



**HAL**  
open science

# L'imagerie nucléaire de l'hypoxie in vivo comme biomarqueurs prédictifs et outil de suivi de la réponse aux thérapies anti-VEGF dans la fibrose pulmonaire idiopathique

Julie Tanguy

► **To cite this version:**

Julie Tanguy. L'imagerie nucléaire de l'hypoxie in vivo comme biomarqueurs prédictifs et outil de suivi de la réponse aux thérapies anti-VEGF dans la fibrose pulmonaire idiopathique. Biologie cellulaire. Université Bourgogne Franche-Comté, 2022. Français. NNT : 2022UBFCK055 . tel-03964684

**HAL Id: tel-03964684**

**<https://theses.hal.science/tel-03964684>**

Submitted on 31 Jan 2023

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

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

**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE  
FRANCHE-COMTE**

**PREPAREE A L'UMR INSERM 1231 « LIPIDES, NUTRITION, CANCER »**

**EQUIPE PROTEINE DE CHOC THERMIQUE : MORT CELLULAIRE,  
DIFFERENCIATION CELLULAIRE ET PROPRIETES TUMORIGENIQUES (HSP-  
PATHIES)**

Ecole doctorale n°554

Environnement – Santé

Doctorat de Sciences-Vie

Par

**Julie Tanguy**

**Etude de l'hypoxie *in vivo* comme biomarqueur prédictif et outil de suivi de la réponse aux  
thérapies anti-VEGF et étude des rôles des protéines de choc thermique HSPB5 et  
HSP90 dans la fibrose pulmonaire idiopathique**

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 23 septembre 2022

Composition du jury :

Dr. Emilie BONCOEUR ..... Rapportrice  
Dr. Christophe GUIGNABERT..... Rapporteur  
Dr Carmen GARRIDO.....Examinatrice  
Dr. Audrey JOANNES.....Examinatrice  
Dr. Pierre-Simon BELLAYE ..... Co-directeur de thèse  
Dr. Françoise GOIRAND ..... Directrice de thèse  
Pr. Philippe BONNIAUD.....Invité

# REMERCIEMENTS

---

Tout d'abord, je souhaite remercier vivement les membres de mon jury de thèse qui ont accepté d'évaluer/relire mon travail de thèse et qui se sont déplacés jusqu'en Bourgogne pour l'occasion.

À Carmen Garrido qui suite à un échange de mail, m'a ouvert les portes de son unité et sans qui tout cela n'aurait pas pu exister : je vous remercie du fond du cœur Carmen.

Au professeur Philippe Bonniaud, je suis très admirative de votre investissement sur tous les fronts. Merci de prendre hebdomadairement un peu de votre précieux temps pour nous suivre, nous conseiller, nous aider et nous encourager. La confiance que vous m'avez accordée jusqu'à maintenant me permet tous les jours de gagner en assurance et me pousse à toujours donner le meilleur. Je souhaite à tous les étudiants en thèse de pouvoir réaliser leurs travaux dans un tel climat de bienveillance. Je suis ravie d'avoir l'opportunité de continuer de marcher à vos côtés pendant ces deux prochaines années. Un énorme merci Philippe.

À ma directrice de thèse Françoise Goirand, qui depuis mon master2, m'encadre, m'appuie et me soutien. Du fond du cœur un grand merci Françoise de m'avoir fait confiance depuis mon premier jour, d'avoir cerné ma personnalité d'angoissée, d'avoir pu m'aider à prendre du recul et de m'avoir laissé en autonomie tout en m'épaulant durant ces années recherches. Merci aussi d'avoir pris le temps pour nos discussions régulières qui m'ont permises de garder le cap et de persévérer pour mener à bien nos différents projets. Merci de m'avoir laissé la chance de poursuivre en thèse à vos côtés. Je n'aurais pas souhaité une autre directrice de thèse et on recommence demain si vous le souhaitez. Un grand merci Françoise.

À Pierre-Simon mon co-encadrant de thèse, un énorme merci pour ces trois ans de partage scientifique qui m'ont énormément appris. Merci de m'avoir donné ma chance dès mon entrée en thèse et de m'avoir fait confiance dans la réalisation des différents projets. Je t'en suis très reconnaissante et j'adorerais continuer à collaborer avec toi. Merci pour tes mots toujours encourageants, ton accessibilité et ton naturel apaisé face à toutes les situations. Cela m'a poussé à toujours mieux faire sans pour autant perdre confiance et de m'y investir à 200 %. Milles merci PS.

A Lucile, sans ta patience et ta pédagogie à mon arrivée, tout cela n'aurait pas été possible. Ta bienveillance m'a donné l'envie de poursuivre l'aventure en thèse et de devenir aussi bonne pédagogue que toi. Merci de m'avoir enseigné la rigueur et inculqué les bons réflexes qu'un scientifique doit avoir. C'est un véritable plaisir quotidien de travailler avec toi dans la bonne humeur. Tu es un rayon de soleil, jamais tu ne te plains et tu es un élément indispensable au turnover des futurs scientifiques de l'équipe qui apprécieront sans aucun doute, eux aussi, ta gentillesse et ta clémence dans leurs prémices. Difficile de trouver un binôme fiable ailleurs alors je vais rester... ahahah. Un grand merci Lulu

À Olivier, merci pour les nombreuses interactions scientifiques et personnelles que l'on a pu

avoir pendant ces trois années de thèse. Nous devrions avoir l'occasion d'en avoir de très nombreuses autres pendant les deux prochaines années et j'ai déjà hâte de collaborer avec toi pour je l'espère, aboutir à un joli travail de science et continuer d'apprendre à tes côtés.

À Guigui, merci pour ta bonne humeur quotidienne et ton humour qui m'ont fait apprécier chacune de tes venues au laboratoire. Merci aussi pour tes cours de pneumo qui m'aident à mieux comprendre/appréhender la pathologie sur laquelle je travaille. Je te souhaite beaucoup de courage pour cette dernière année de thèse et tu peux compter sur moi au besoin. (Rédiger ta thèse, c'est non.)

A tous les autres membres de la team fibrose, merci pour les interactions quotidiennes, l'aide et les fous rires ; c'est un plaisir de vivre dans l'open space avec vous !!

Aux anciens de cette unité, Marine, Gaëtan, François, Elise, Kilian, vous avez vraiment été des exemples pour moi depuis mon arrivée en M2.

En vous voyant je me suis dit qu'on pouvait être drôlement c\*\*\* et quand même avoir une thèse ! Trêve de plaisanterie, c'était un bonheur (trop éphémère à mon goût) de tous vous avoir au même étage. Aujourd'hui vous accomplissez tous de grandes choses, vous pouvez être fiers de vous (en tout cas moi je le suis !). Je me sens privilégiée d'avoir partagé quelques années avec vous et encore plus de vous compter comme amis aujourd'hui (vous et vos moitiés respectives, Rom et Adélie). J'espère que les réunions de famille dureront encore de nombreuses années. Ravie de pouvoir toujours compter sur la présence de mon Fanfan et de ma Elise de temps à autre, vous êtes une vraie source d'oxygène dans ce monde de brutes. Au fait, c'est bientôt la Jean-Guile ! Milles merci pour votre soutien les potos !

A mon Jeannou, sans qui cette expérience de thèse aurait été bien plus fade. Merci de m'avoir fait une place dans ta vie (devrais-je dire, la vôtre !) merci d'être un aussi bon soutien, une oreille attentive et une amie fiable et aidante ! J'espère que je suis une amie à ta hauteur parce que ce n'est pas chose aisée d'assurer autant que toi. Vivement nos prochains voyages, nos années supplémentaires ensemble au travail, nos prochains week-ends en famille. C'est déjà difficile d'imaginer un ailleurs sans vous. Qui d'autre que toi pourra me remettre les oreilles dans le sens du vent quand je serai trop gentille ou m'apprendra à dire non avec ton franc parlé si caractéristique ?? En tout cas, sachez que peu importe où la vie nous emmènera, vous serez toujours des membres de la famille à part entière et on vous garde une place de choix dans nos cœurs. Mon Alex, bientôt ton jubilé, aucun doute sur ton succès et tout mon soutien pour cette grande étape à passer ! On sera évidemment là pour t'encourager et te féliciter du travail bluffant accompli.

A Lisou, toujours un plaisir de prendre du temps pour échanger et se marrer avec toi. La thèse c'est un défi que tu relèveras avec brio, j'en suis sûre ! Tu arrives au bout, dernière ligne droite pour notre bossueuse et fonceuse qui jamais ne se plaint et sourit tout le temps ! Bravo championne, continue de nous épater. Tout mon soutien pour cette année et aucun soupçon de doute quant à ton succès prochain.

À Virg, une grande sœur dont on a besoin dans un parcours de thèse. Toujours de bons conseils, un soutien permanent, un rayon de soleil au quotidien...toujours un immense plaisir

de t'apercevoir dans les couloirs de l'unité ! (Merci aussi pour mon plaisir olfactif, je te piste à tous les coups ! ahah) Vivement nos prochaines soirées, nos moments de lâcher-prise qui font un bien fou. Merci du fond du cœur pour tout ma Virg.

A Abdelou, c'est un plaisir de t'avoir dans le box toujours calme et de bonne humeur ; un exemple de résilience ; toujours là pour tendre la main aux autres. Merci aussi au nom de tous, pour ton investissement au sein du laboratoire. Merci aussi pour la découverte du Maroc, une vraie parenthèse enchantée... on repart quand tu veux alors prends des vacances et fais ta valise ! ; tu sais déjà ce que j'en pense mais prends soin de toi... débraille, souffle un peu, c'est une course de fond qui risque de te laisser des séquelles et la science ne peut pas se permettre de perdre un élément comme toi. Bravo pour tout Abdelou, ça va payer ! Courage pour cette dernière année, de tout cœur avec toi.

Un grand merci général à tous les membres des équipes de 3ème étage sans qui le quotidien n'aurait pas été aussi appréciable. J'ai apprécié chacune de nos interactions, chacun de vos sourires et chacun de vos bonjours égayés. Merci donc pour cet environnement positif et propice à la bonne réalisation d'une thèse. Tout mon soutien et courage à ceux qui sont sur la fin et à ceux qui partent vers de nouvelles aventures !

Aux filles de la plateforme cellimap et aux membres de la plateforme de cytométrie, merci pour votre professionnalisme et votre soutien au cours de ces trois années de thèse ; merci de m'avoir appris l'histologie et la cytométrie et merci pour l'aide, la patience et la bienveillance ; toujours un plaisir de venir échanger avec vous et rigoler 5 min (parfois un peu plus, j'avoue.) J'ai déjà hâte de retravailler avec vous. Un énorme merci.

A Lolo, Bas, Loulou, avec qui nous avons vécu une parenthèse enchantée de notre vie pendant 1 an au Canada. Merci la vie de m'avoir mise sur la route de ces amis incroyables. Pas un jour ne passe sans que je veuille repartir avec vous ici ou là avec un baluchon sur le dos. Merci les copains de ne pas tenir rigueur de mes absences, physiques et téléphoniques ; sachez que je serai TOUJOURS là pour vous, que je suis infiniment fière de vos réussites et que je vous aime beaucoup beaucoup.

Dans la team Canada, une autre mérite une tonne de remerciements : PAT, mon colloque et ami laissé outre-Atlantique qui me manque chaque jour. La vie icitte sans toi mon chum est un peu plate. Merci de m'avoir permis de prolonger l'expérience canadienne, merci pour les partys, les drives en chantant et tout cet amour et cette confiance que tu m'as offerte. Je n'ai rien oublié et je n'oublierai rien de cette bulle de bonheur. Les années passent et rien de change et ne changera, promis mon Pat.

A ma gégé, mon amie qui me suit depuis la plus tendre enfance. Merci d'être si investie dans la préservation de notre lien depuis 25 ans ; je reconnais être vraiment médiocre dans la prise de nouvelles, l'échange, etc. et je te remercie de faire constamment l'effort sans m'en tenir rigueur. Tu sais que je serai évidemment toujours là pour toi, dans les bons moments et les coups durs. Je suis si fière d'avoir une amie comme toi et du lien qui nous unit. Bravo pour ton parcours et ta persévérance. Merci à Jeff de prendre soin de toi quotidiennement et merci de me laisser pouponner votre petite merveille. Hâte de vivre votre union prochaine et encore

pleins d'autres moments uniques à vos côtés. Je vous aime.

À ma sœur Alina, maintenant presque 15 ans d'amitié, partie d'un échange franco-allemand. Quelle chance j'ai eu d'arriver à l'aéroport de Frankfurt et de tomber sur cette famille adoptive ! Malgré la distance et nos vies à 200 à l'heure, nous parvenons à maintenir ce lien et à nous retrouver régulièrement, qui l'eut cru ?! T'es une personne incroyable ma sœur. J'ai énormément d'admiration pour celle que tu es et je te remercie de m'avoir fait une place dans ton cœur et pour la vie. Je serai toujours là, ou que tu sois (oui même en Jordanie, en Namibie ou à Hong-Kong parce que je sais que tu vas me faire le coup un de ces quatre) ; Bravo pour ton parcours, ton abnégation, ton courage et ton sourire face à toutes les épreuves de la vie. Merci à mon étoile de t'avoir mise au monde.

À mes amis de lycée, Clément et Thib, merci d'être encore présents 10ans après et de toujours autant me faire rire. Merci d'aujourd'hui prendre le temps de fêter avec moi l'aboutissement de ces longues années d'études et de ne pas vous modifier avec les années ; triste de ne pas avoir pu fêter avec vous vos réussites mais très fière de vous les mecs !

Aux Châlonnais, Clém, lolo, Lolotte, Nico, Adri, coco, quelles rencontres ! Merci à mon doudou de m'avoir permise de vous connaître. Une chance de pouvoir nous échapper de nos quotidiens régulièrement et venir se poiler à vos côtés le temps d'une soirée, d'un week-end ou d'un événement ! J'espère qu'on partagera encore de nombreux moments ensemble, vous êtes au top, ne changez jamais !

À Quent et Marine, un autre noyau dur dijonnais sans qui ces années auraient été bien moins chantantes ! Toujours un plaisir de vous retrouver et de partager de superbes moments avec vous ! Merci Quent de tracer le chemin à mon doud, de l'aider et le soutenir. Vous êtes des grands malades mais Marine et moi sommes TRÈS fières de votre courage. Marine, je bénie encore ta super journée de merde qui a fait que nous nous sommes rencontrées pour la première fois. À vous et à notre amitié, il va falloir lever un verre très prochainement ! Merci pour tout, les copains.

À Bene et Sélim, qui se sont expatriés de nos quotidiens mais pas de nos vies. C'était un immense plaisir de vous retrouver cet été. Trop chouette de pouvoir vivre ce genre de moments où le temps est suspendu avec vous. Nous sommes chanceux d'avoir des amis si bienveillants à nos côtés. Merci à Jeannou et à mon doud d'avoir permis nos rencontres. J'espère qu'on va très prochainement planifier nos retrouvailles et maintenir le cap pendant de nombreuses années. Vivement l'anapath !

À Charlotte, merci de me compter parmi tes amies et d'être présente avec ton mari Simon pour ce grand jour. Votre soutien me fait plaisir et me touche beaucoup. Je remercie Manon d'avoir provoqué notre rencontre. J'espère qu'on aura à nouveau l'occasion de se retrouver pour un week-end entre craquettes prochainement. Merci encore de m'avoir permise d'assister à votre union, c'était superbe !

À Fred, le tonton de substitution, l'ami depuis maintenant 15 ans, qui à chaque fois m'offre l'opportunité de vivre des expériences uniques et si ressourçantes. Je pense que même 1000 merci ne seraient pas suffisants pour tout ce que tu m'as soutenu, aidé et encouragé. Des jobs étudiants, aux études supérieures, présent à chaque étape pour me rappeler de ne rien lâcher... merci mon Fred d'être un ami si exceptionnel (et d'être venu me chercher à Salvetat-sur-Agout à 7h du mat mouahaha). C'est en dire long sur le genre d'ami que tu es, présent dans la moindre difficulté. Tu as toujours fait en sorte que je sois équipée au mieux pour réussir et si aujourd'hui j'en suis là, c'est aussi grâce à toi. Un ÉNORME merci Fred. Des gros bisous à Yves qui veille bien sur toi là-bas en Isère.

À ma famille (tantes/oncles/cousins) qui m'encourage et me soutien depuis l'enfance. Merci de ne pas m'en vouloir d'être si peu présente et d'avoir raté quelques événements marquants. Merci de m'avoir confié la mission d'être marraine, défis que je m'efforce de relever du mieux que je peux. Je promets de me rattraper dans les années à venir avec mes petits cousins. Je vous aime tous très fort. À mes oncles qui me font l'honneur de leurs présences, merci beaucoup d'y avoir cru, vous êtes ma force et mes exemples. Tonton Ewald, soutien pendant toutes ces années d'études supérieures, c'est aussi grâce à toi si Max et moi avons pu y parvenir, merci de nous avoir toujours poussé à aller au bout de nos objectifs et de nous avoir fait confiance.

À mon frère et ma belle-sœur, merci pour l'amour et le soutien tout au long de cette thèse, merci pour nos appels du dimanche soir pour mieux appréhender la semaine, merci pour la fury room à Lion-sur-mer (bon moyen de se libérer du stress accumulé), merci mon frère d'avoir toujours veillé à ce que je puisse étudier dans les meilleures conditions et merci à vous d'être fiers de moi, ça me donne des ailes. Je suis très fière de vos réussites à tous les deux et je la crie sur tous les toits. A ma belle-sœur, avant tout mon amie, et quelle amie ! Petite nana d'exception, qui transpire l'amour, la générosité et la bienveillance, je suis si contente de savoir Max si bien entouré et infiniment fière de toi, ton courage et ton abnégation. Je te souhaite de trouver le chemin de ton épanouissement et je serai là à chaque étape pour t'épauler. Merci d'avoir toujours été là pour moi et évidemment je serai toujours là pour vous et j'ai hâte de vivre de nouvelles étapes de votre vie. Je vous aime.

À la famille Allais, investit comme ma propre famille pendant tout mon cursus d'étude supérieures. Je vous remercie du fond du cœur de m'avoir accueillie dans votre famille. Merci lolo pour nos nombreuses discussions m'ayant permis de faire les bons choix d'avenir et d'accepter les difficultés rencontrées avec beaucoup de philosophie. Merci aussi de m'aimer comme ta propre fille depuis le premier jour. Merci Guy de m'avoir fait confiance et permis de vivre l'expérience canadienne, clairement sponsorisée par le CICD. Ravie de savoir Max maintenant membre de cette famille d'exception. Je vous aime

À mon boub, mon soutien éternel, ma lueur d'espoir au fond du tunnel, celle qui m'accompagne depuis 15 ans dans toutes les difficultés et moments de joies. À celle qui essuie mes larmes, encaisse mes angoisses, mon stress, me fait mourir de rire, me diagnostique à distance, me fait voyager (et j'en passe car la feuille ne serait pas assez grande), je te dédie cette thèse. Merci de m'avoir accompagnée dans tous les revirements de

situation, tout cela n'existerait pas sans toi. Les plans d'avenir ont eu beau se modifier au cours du temps, le fait de te garder dans ma vie était une priorité. Merci de me connaître comme ta poche, de me comprendre mieux que personne, de me soutenir et de me donner confiance en moi. La distance est là mais rien ne change et ici toute la bourgogne a déjà entendu parler de mon Boub, ma grande fierté. Vivement Cabourg et le Royal MNII, on s'fait ch\*\*\* avec eux. Je t'aime beaucoup beaucoup.

À Jean-Mi, pourtier's father, tu as été un excellent papa de substitution. Merci de m'avoir accueillie toute jeune pour venir faire mes études. Merci pour le confort de vie que tu nous as offert pendant ces deux années et merci d'être toi : aimant, aidant et complètement barré ! Des gros poutoux

À mon Doudy's, qui partage mon quotidien depuis plus de 3 ans, sans doute un des plus gros trésors qu'abrite la bourgogne et c'est sur moi qu'il fallait que ça tombe... doud je te suis infiniment reconnaissante pour tout cet amour, ce soutien, cette confiance, ce bonheur que tu m'apportes au quotidien. Merci de croire en moi tous les jours et d'être fier, c'est complètement grâce à toi si je sors de cette thèse indemne. Toi seul à la clé pour m'apaiser, me reconforter et m'épauler dans les difficultés. Merci de l'aide que tu m'as apportée à chaque étape de nos vies perso et pro, t'es un pilier indispensable à ma vie. Je suis très fière que tu es le courage de te lancer dans un nouveau cursus et je ferai de mon mieux pour t'épauler au quotidien de façon à ce que tu puisses t'investir à 1000% dans ce nouveau défi. Merci d'être mon trèfle à quatre feuilles, je n'ai plus besoin de rien d'autre.

Enfin, je dédie cette thèse à mes parents, qui depuis l'enfance nous poussent à atteindre nos objectifs et nous ont permis d'étudier dans les meilleures conditions possibles. Aujourd'hui ce sont certes les diplômes qui nous offrent la possibilité d'exercer Max et moi les métiers de nos rêves mais l'éducation, les valeurs et l'ouverture d'esprit que vous nous avez données sont pour moi avant tout la clé de nos réussites. Je me fixe comme objectif de vie d'être un jour un aussi bon parent que vous. Merci de m'avoir permis de m'ouvrir sur le monde depuis l'adolescence et merci de nous aimer au-delà de l'imaginable. Vous êtes ma force et la raison de tous mes combats. Je vous aime



# TABLE DES MATIERES

---

REMERCIEMENTS .....	2
TABLE DES MATIERES.....	8
LISTE DES FIGURES .....	10
LISTE DES TABLEAUX .....	11
LISTE DES ABREVIATIONS .....	12
INTRODUCTION.....	14
I.    Epidémiologie .....	14
II.   Les traitements .....	16
1.   La pirféridone .....	16
2.   Nintédanib .....	18
3.   La transplantation pulmonaire.....	19
ETAT DE LA LITTERATURE.....	21
I.    Protagonistes de la fibrose pulmonaire.....	21
1.   De la cicatrisation physiologique au développement de la fibrose : mécanismes général et acteur principaux .....	21
2.   Le collagène : principal constituant de la matrice extracellulaire et outil de diagnostic .....	22
3.   Le Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) : cytokine majoritaire.....	28
3.1.   Biosynthèse et sécrétion .....	29
3.2.   Les récepteurs du TGF $\beta$ .....	31
3.3.   Les voies de signalisation du TGF- $\beta$ 1 .....	33
3.3.i. La voie de signalisation canonique : la voie des SMADs .....	33
3.3.ii. Les voies de signalisation non canoniques.....	37
4.   Les principales cellules incriminées : les myofibroblastes.....	40
5.   La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) : un des mécanismes de fibrogenèse les plus décrits.....	43
II.   La place de l'hypoxie dans la fibrogenèse .....	46
1.   Structure et rôles pathologiques .....	48
1.1.   Structure d'HIF.....	48
2.   HIF-1alpha et fibrogenèse .....	49
2.1.   Implication d'HIF- $\alpha$ dans la différenciation myofibroblastique.....	49
2.1.i. La TEM.....	49

2.1.ii. La voie des ROS.....	50
2.1.iii. La voie du TGF-β1.....	52
2.1.iiii Le stress du RE .....	52
2.2. Implication d’HIF-α dans la reprogrammation métabolique.....	53
2.3. Implication d’HIF-α dans l’angiogenèse .....	54
2.4. Implication d’HIF-α dans l’inflammation .....	55
3. HIF comme outil diagnostic, pronostic et prédictif de la FPI .....	58
3.1. Signatures pronostiques caractéristiques dans la FPI en conditions hypoxiques .....	58
4. L’examen HRCT : un outil diagnostique et pronostique.....	59
5. La tomographie à émission de positrons : un outil prédictif .....	60
III. Les modèles animaux préclinique de fibrose pulmonaire .....	63
1. Modèle de fibrose pulmonaire induite par injection de bléomycine .....	64
2. Modèle de fibrose pulmonaire induite par transfert de gène du TGF-β1 .....	66
IV. Les protéines de chocs thermiques .....	69
1. Généralités.....	69
2. Les HSPs de haut poids moléculaire .....	70
2.1. HSP90.....	70
2.2. HSP70.....	74
2.3. HSP47.....	77
3. Les petites HSPs ou « Small HSPs ».....	78
3.1. Structure .....	78
3.2. HSP27.....	80
3.3. HSPB5 (αB-crystallin) .....	81
V. Objectifs de thèse .....	84
RESULTATS .....	85
Projet 1. ....	85
Projet 2. ....	103
Projet 3 .....	118
Revue.....	134
DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....	153
CONCLUSION GENERALE .....	164
REFERENCES.....	165

# LISTE DES FIGURES

---

<b>Figure 1.</b> Algorithme diagnostique chez un patient suspect de fibrose pulmonaire idiopathique..	15
<b>Figure 2.</b> Schématisation de la cicatrisation : vers la régénération tissulaire ou la fibrose	22
<b>Figure 3.</b> Structure moléculaire des collagènes fibrillaires avec les différents sous-domaines ainsi que les sites de clivage des N- et C-procollagénases	25
<b>Figure 4.</b> Outils moléculaires ciblant le collagène.	27
<b>Figure 5.</b> Stimulation de la réponse fibrotique par le TGF- $\beta$ lors de la réparation tissulaire	29
<b>Figure 6.</b> Structure et synthèse du TGF- $\beta$	30
<b>Figure 7.</b> Description des récepteurs de la superfamille du TGF- $\beta$ .	32
<b>Figure 8.</b> Représentation de la structure des protéines SMAD	34
<b>Figure 9.</b> Schéma de la voie canonique du TGF- $\beta$ SMADs-dépendante.	36
<b>Figure 10.</b> Schéma des voies non canoniques du TGF- $\beta$ .	37
<b>Figure 11.</b> Origine et mécanismes conduisant à la formation de myofibroblastes	42
<b>Figure 12.</b> Régulation de la cicatrisation et de la fibrose par hypoxie et HIF-1	47
<b>Figure 13.</b> Régulation post-transcriptionnelle de HIF-1 $\alpha$ par le niveau d'O <sub>2</sub> cellulaire.	48
<b>Figure 14.</b> Contribution du stress oxydatif aux modifications profibrotiques médiées par HIF-1 au cours des lésions rénales.	51
<b>Figure 15.</b> Les voies de signalisation profibrotiques classiques TGF- $\beta$ /Smad3 et PI3K/AKT médient la fibrose rénal grâce à HIF	52
<b>Figure 16.</b> Stratégie de ciblage de la succinate déshydrogénase dans les fibroblastes par l'IR-780 pour prévenir la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine.	54
<b>Figure 17.</b> Effet de l'hypoxie cyclique sur l'angiogenèse dans le cancer. L'hypoxie cyclique active HIF-1 et NF- $\kappa$ B dans la cellule tumorale.	57
<b>Figure 18.</b> Mode opératoire et cinétique du développement de la fibrose pulmonaire induite via la voie intratrachéale (IT) par la bléomycine	65
<b>Figure 19.</b> Modèle de fibrose induite par injection d'adénovirus codant pour le TGF- $\beta$ 1	67
<b>Figure 20.</b> Validation du modèle d'injection intra-pleurale d'un vecteur adénoviral codant pour la $\beta$ -galactosidase.	68
<b>Figure 21.</b> Réseau de régulation de la protéostase.	70
<b>Figure 22.</b> Le cycle chaperon Hsp90	71
<b>Figure 23.</b> Implication d'HSP90 dans la voie du TGF- $\beta$ 1	73
<b>Figure 24.</b> L'inhibition de la protéine de choc thermique HSP90 entrave la signalisation profibrotique à plusieurs niveaux	74
<b>Figure 25.</b> Le cycle de liaison/libération du substrat de HSP70	75
<b>Figure 26.</b> Schéma du mécanisme de la surexpression de HSP70 inhibant la fibrose	76
<b>Figure 27.</b> Schéma du mécanisme de HSP47 dans la promotion de la fibrose.	78
<b>Figure 28.</b> Domaines structuraux des protéines humaines HSPB1 et HSPB5.	79
<b>Figure 29.</b> Représentation schématique de l'implication d' $\alpha$ B-crystallin dans la voie du TGF- $\beta$ 1	83
<b>Figure 30.</b> Représentation des mesures histomorphométriques	123

# LISTE DES TABLEAUX

---

<b>Tableau 1.</b> Description des effets indésirables mineurs et majeurs recensés chez les patients FPI traités par de la pirfénidone : menée sur 8 études. ....	18
<b>Tableau 2.</b> Indications et contrindications à la transplantation pulmonaire de patients atteints de fibrose pulmonaire.....	20
<b>Tableau 3.</b> Description des différents types de collagène et leur distribution tissulaire.....	24
<b>Tableau 4.</b> Peptides de liaison au collagène et leurs applications .....	26
<b>Tableau 5.</b> Molécules ciblant le collagène dénaturé et leurs applications.....	27
<b>Tableau 6.</b> Description des différents types cellulaires constituant le pool de myofibroblastes impliqués dans la fibrogenèse pulmonaire et leurs propriétés.....	44
<b>Tableau 7.</b> Tableau non exhaustif des modèles animaux de fibrose pulmonaire chez le rongeur décrivant les avantages et les inconvénients de chacun d’entre eux .....	64
<b>Tableau 8.</b> Anticorps primaires utilisés .....	120
<b>Tableau 9.</b> Liste des anticorps utilisés pour le marquage cytométrie.....	124

# LISTE DES ABREVIATIONS

---

AA : Acides aminés	FVC : Forced vital capacity
Ad : Adénovirus	GGA : Geranylgeranylacetone
ADN : Acide Desoxyribonucléique	GLUT 1 : Transporteur de glucose de classe I
AEC : Cellules épithéliales alvéolaires	Gp96 : Glycosylated protein 96
Akt : Protéine kinase B	H&E : Hématoxyline & Eosine
ALAT : Latin American Thoracic Society	HAT : Histones acétyltransférases
ALK : Activin receptor-like kinase	HDAC : Histones désacétylases
AMM : Autorisation de mise sur le marché	HIF-1 : Facteur de transcription inductible par l'hypoxie 1
ARN : Acide RiboNucléique	HRCT : Tomodensitométrie à haute résolution
ATP : Adenosine triphosphate	HSE : Heat Shock Elements
ATS : American Thoracic Society	HSF : Heat Shock Factors
BMP : Bone morphogenetic proteins	HSP : Protéine de choc thermique
CD : Cluster de différenciation	IC : Intervalle de confiance
CHOP : Protéine homologue C/EBP	IFN : InterFeroN
CRF : Capacité résiduelle fonctionnelle	IL : Interleukine
CTGF34 : Tissue growth factor	IP : Intrapéritonéale
DLCO : capacité de diffusion du monoxyde de carbone	IRM : Imagerie par resonance magnétique
eHSP : extracellular HSP	IT : Intratrachéale
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases	IV : Intraveineuse
ERS : European Respiratory Society	JAK: Janus Kinase
FAO : beta oxydation des acides gras	JNK : Jun amino-terminal Kinase
FDG : Fluorodésoxyglucose	JRS : Japanese Respiratory Society
FGF : Fibroblast Growth Factor	LAP : Latency associated protein
FMISO : Fluoromisonidazole	LRP1 : Low density lipoprotein Receptor-related Protein 1
FP : Fibrose pulmonaire	LTBP : Latent TGF- $\beta$ Binding Protein
FPI : Fibrose pulmonaire idiopathique	
FSP-1 : Fibroblast-specific protein-1	

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases  
 MEC : Matrice extracellulaire  
 MMP : Métalloprotéases matricielles  
 mTor : mammalian Target Of Rapamycin Complex  
 NBD : Nucleotide Binding Domain  
 NEF : Nuclear Exchange Factor  
 NES : Nuclear export signal  
 NF- $\kappa$ B : Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells  
 NLS : Nuclear Localization Signal  
 NM : Non mentionnée  
 OUU : obstruction urétérale unilatérale  
 PDGF : Platelet-Derived Growth Factor  
 PET-scan : Positron Emission Tomography-scanner  
 PFKB3 : 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3  
 PFS : Progression free survival  
 PGE : Prostaglandine  
 PHD : Domaine prolyl hydroxylase  
 Pi3K : Phosphatidylinositol 3-Kinase  
 PIA : Pneumopathies interstitielles aiguës  
 PIC : Pneumonie interstitielle commune  
 PID : Pneumopathies interstitielles diffuses  
 PINS : Pneumonies interstitielles non spécifiques  
 PIP3 : Phosphatidylinositol-3-phosphate  
 RE : Réticulum endoplasmique  
 RhoA : Ras homolog family member A  
 ROS : Espèces réactives de l'oxygène  
 SBD : SMAD Binding Domain  
 SBD $\beta$  : Substrate Binding Domain  
 SC : Sous-cutanée  
 SMAD : Suppressor of Mothers against Decapentaplegic  
 SSc : sclérodermie systémique  
 STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription  
 SUV : Standardized uptake value  
 TDM : Tomodensitométrie  
 TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse  
 TGF- $\beta$ 1 : Transforming Growth Factor- $\beta$ 1  
 TIF-1 $\gamma$  : Transcription intermediary factor-1 gamma  
 TIMP : Tissue Inhibitors of Metalloproteinases  
 TLR : Toll like Receptor  
 TNF : Tumor Necrosis Factor  
 TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor  
 TRAP1 : Tumor necrosis factor Receptor Associated Protein-1  
 TRIM33 : Tripartite motif-containing 33  
 Ubs : Ubiquitin-Proteasome System  
 VC : Vital capacity  
 VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor  
 ZEB1 : Zinc finger Ebox-binding homeobox 1  
 ZO : Zona occludens  
 $\alpha$ -SMA :  $\alpha$ -smooth-muscle actin

# INTRODUCTION

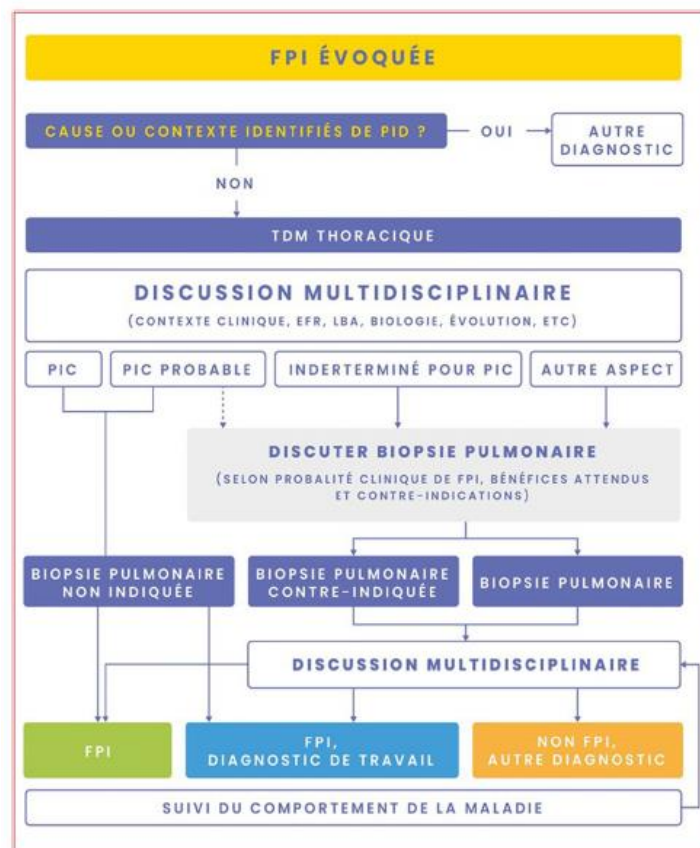
---

Les pneumopathies interstitielles diffuses (PID) regroupent des maladies pulmonaires respiratoires affectant majoritairement l'interstitium pulmonaire. Leur conséquence principale est dans 13 à 40 %<sup>1</sup> des cas, le développement progressif d'une fibrose pulmonaire aboutissant à une insuffisance respiratoire létale. En Europe, les pathologies interstitielles fibrosantes concernent entre 2.2 et 20 personnes pour 100 000<sup>1</sup>. On distingue schématiquement trois types d'étiologie de fibrose pulmonaire progressive : la fibrose pulmonaire sous-jacente à une première pathologie générale (notamment polyarthrite rhumatoïde, sclérose systémique), les fibroses pulmonaires en lien avec une exposition (pneumoconioses, iatrogénie, pneumopathies d'hypersensibilités) et la fibrose dont on ignore les causes (PID idiopathiques). Parmi les formes de PID idiopathiques fibrosantes, on retrouve les pneumopathies interstitielles aiguës (PIA), les pneumonies interstitielles non spécifiques (PINS) fibrosantes et la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI)<sup>2</sup>, qui est la PID idiopathique la plus courante.

## I. Epidémiologie

La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une pathologie dévastatrice d'origine inconnue et dont la médiane de survie avoisine les 5 ans. Cette pathologie touche actuellement entre 0.33 et 4.51 personnes sur 10 000 dans le monde<sup>3</sup>. Dans la FPI, on observe une disparité d'atteinte avec plus de cas recensés chez les hommes que chez les femmes. Pour autant, l'âge moyen des patients souffrant de FPI reste inchangé entre les deux sexes et la pathologie se manifeste rarement avant 60 ans<sup>4,5</sup>. L'âge reste le premier facteur de risque. Toutefois, les facteurs génétiques et environnementaux (cigarette, pollution, etc.) sont impliqués dans son évolution<sup>6</sup>. Le diagnostic et donc la prise en charge de la maladie sont souvent tardifs ce qui explique la faible espérance de vie après diagnostic. Aussi, les comorbidités tels que, l'apnée du sommeil obstructive, l'hypertension pulmonaire et l'emphysème sont autant de facteurs associés à son développement<sup>7</sup>. Dans ce contexte, une meilleure prise en charge des patients atteints de FPI fait l'objet d'une préoccupation internationale et multidisciplinaire. A ce titre, un consortium entre l'American Thoracic Society (ATS), l'European Respiratory Society (ERS), la Japanese Respiratory Society (JRS) et la Latin American Thoracic Society (ALAT) a permis d'établir un guide (régulièrement mis à jour) définissant les critères diagnostiques de la FPI<sup>8</sup>. Les recommandations française viennent d'être mises à jour<sup>9</sup>. Les critères cliniques, radiologiques et histopathologiques sont organisés selon un algorithme proposé (Figure 1). Face

à une suspicion de FPI, identifier une éventuelle cause constitue le premier élément de l'examen. En cas de cause connue, le diagnostic de FPI est écarté. Un examen radiologique par tomodensitométrie à haute résolution (TDM) est toujours prescrit lors d'une suspicion de PID. En cas d'images de pneumonie interstitielle commune (PIC) caractérisées par lésions « en rayon de miel », dans les régions sous pleurales et basales et sans autres anomalies et l'absence d'étiologie, le diagnostic de FPI est établi (Figure 1). Lorsque des doutes subsistent suite à l'examen radiologique, une biopsie pulmonaire en vue d'une analyse histopathologique est discutée. Cette dernière permettra de distinguer des motifs anatomopathologiques de PIC typiques qui se caractérisent par un remodelage de l'architecture pulmonaire. Les zones fibreuses sont riches en fibroblastes/myofibroblastes qui génèrent une accumulation forte de collagène mise en évidence sur coupes histologiques par coloration Hématoxyline & Eosine (H&E). Le diagnostic final fera l'objet d'une concertation entre experts de PID.



**Figure 1.** Algorithme diagnostique chez un patient suspecté de fibrose pulmonaire idiopathique. FPI : fibrose pulmonaire idiopathique ; PIC : pneumopathie interstitielle commune ; PID pneumopathie interstitielle diffuse ; TDM tomodensitométrie. Figure de Cottin *et al.* (2022) <sup>9</sup>.

Malgré ces outils de diagnostic, la prise en charge des patients FPI reste un défi, en particulier à regard de l'offre thérapeutique limitée.



## II. Les traitements

Aujourd'hui, deux médicaments sont indiqués dans le traitement de la FPI, le nintédanib et la pirfénidone. Cependant leur efficacité est souvent modeste et ces médicaments entraînent des effets indésirables pouvant nécessiter de stopper leur utilisation. Dans ce contexte, seule la transplantation pulmonaire constitue une offre thérapeutique pérenne bien que la quantité de greffon, le diagnostic tardif des patients et leur âge limitent souvent l'accès à cette chirurgie. Par conséquent, la découverte de marqueurs prédictifs et la mise au point de nouveaux agents thérapeutiques constituent des enjeux cliniques majeurs.

### 1. La pirfénidone

La pirfénidone (5-méthyl-1-phénylpyridine-2-one) obtient son autorisation de mise sur le marché (AMM) en 2012. Indiqué chez l'adulte dans le traitement de la fibrose pulmonaire idiopathique légère à modérée, elle exerce une activité anti-fibrotique, anti-inflammatoire et anti-oxydante<sup>10</sup>. Bien que les mécanismes d'action de la pirfénidone aient été récemment partiellement élucidés, son activité moléculaire reste mal comprise. La pirfénidone modulerait la sécrétion de cytokines pro-fibrosantes par les macrophages<sup>11,12</sup> tel que le *Transforming Growth Factor-β1* (TGF-β1) et atténuerait ainsi la prolifération et la différenciation fibroblastique ainsi que la synthèse de fibronectine et de collagène. *Ex vivo*, sur tissu de poumons de rat, il a été démontré que la pirfénidone réduisait la sécrétion de pro-collagène I induite par un traitement au TGF-β1<sup>13</sup>. *In vivo*, sur des modèles murins de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, la pirfénidone semble diminuer l'expression de la fibrose pulmonaire via la diminution de l'expression de la protéine de choc thermique 47 (HSP47), chaperonne spécifique du collagène<sup>14</sup>. De surcroît, il a été montré que la pirfénidone limitait la fibrose pulmonaire en réduisant l'accumulation pulmonaire des fibrocytes<sup>15</sup> (cellule du tissu conjonctif dérivant des fibroblastes et ayant une activité cicatricielle et un potentiel répliatif réduit).

Une récente méta-analyse publiée dans *l'European Journal of Medical Research*, retrace l'ensemble des essais contrôlés randomisés menés depuis leur première utilisation jusqu'à mars 2021 afin d'évaluer l'efficacité et les effets secondaires de la pirfénidone chez les patients FPI<sup>16</sup>. Dans ce travail, 1824 patients atteints de FPI ont été inclus. Les résultats de la méta-analyse ont montré que comparativement au groupe témoin, la pirfénidone améliore trois paramètres majoritaires de la fonction respiratoire : elle améliore la survie sans progression (PFS) (HR = 0,65, IC à 95 % 0,55 ~ 0,76, P < 0,001), améliore la capacité vitale (CV) (standardized mean

différence (SMD) = 0,43, IC à 95 % 0,21 ~ 0,66, P < 0,001) et diminue le déclin de la capacité vitale forcée (CVF) (SMD = 0,31, IC à 95 % 0,14 ~ 0,48, P < 0,001)<sup>16</sup>. La capacité vitale est la capacité maximale que peut inhaler une personne après complète exhalation. La capacité vitale forcée équivaut à la quantité d'air qui peut être exhalée de force des poumons après avoir pris la respiration la plus profonde possible. Cette étude montre donc que la pirféridone a un rôle sur la progression de la fibrose des patients atteints de FPI, en diminuant le déclin de la fonction respiratoire.

Ce traitement présente des effets indésirables fréquents et parfois sévères principalement de type digestifs et cutanés, qui peuvent justifier l'arrêt du traitement (Tableau 1). Toutefois, son indication présente une balance bénéfique/risque favorable dans un contexte de fibrose faible à modérée et elle reste un traitement de première intention <sup>9</sup>.

Etudes	Taille des échantillons de l'étude	Effets indésirables mineurs	Effets indésirables majeurs nécessitant l'arrêt des traitements
Azuma 2005	72 patients groupe expérimental vs 35 patients groupe contrôle	Photosensibilité (43.8%), inconfort gastrointestinal (30.1%), anorexie (31.5%)	Photosensibilité (5 cas), vomissements, fièvre, dysfonction hépatique, vertiges, paralysie faciale, tumeur du foie (1 cas)
CAPACITY 2011	174 patients groupe expérimental vs 174 patients groupe contrôle	Nausée (36%), démangeaison (32%)	Nausée (36%), démangeaison (28.1%), céphalée (25.9%), toux (25.2%), diarrhée (22.3%)
Huang 2015	38 patients groupe expérimental vs 38 patients groupe contrôle	Démangeaison (39.5%), nausée (5.26%), diarrhée (7.89%)	NM
King 2014	278 patients groupe expérimental vs 277 patients groupe contrôle	Démangeaison (28.1%), nausée (36%), céphalée (25.9%), toux (25.2%), diarrhée (22.3%)	Exacerbation aiguë de la FPI, augmentation des enzymes hépatiques, pneumonie (1.1%)
Lei 2018	20 patients groupe expérimental vs 20 patients groupe contrôle	Photosensibilité, perte d'appétit, fatigue	NM
Li 2015	43 patients groupe expérimental vs 44 patients groupe contrôle	NM	NM

Li 2016	24 patients groupe expérimental vs 24 patients groupe contrôle	Réaction gastro-intestinale, dysfonctionnement hépatique	NM
Taniguchi 2010	110 patients groupe expérimental vs 109 patients groupe contrôle	Photosensibilité (51.4%), rhinopharyngite (49.5%), anorexie (16.5%)	Photosensibilité (2.8%), cancer du poumon (1.8%), fièvre (1.8%), détresse respiratoire (1.8%)

**Tableau 1.** Description des effets indésirables mineurs et majeurs recensés chez les patients FPI traités par de la pirféridone : menée sur 8 études. NM = information non mentionnée. Adapté d'après Zang *et al.* (2021)

16.

## 2. Nintédanib

Le nintédanib (BIBF 1120) obtient son AMM dans le traitement de la FPI en 2015. Il s'agit d'un inhibiteur de tyrosine kinase intracellulaire aux propriétés antifibrotiques et anti-inflammatoires<sup>17</sup>. Il exerce notamment son rôle inhibiteur sur les récepteurs dérivés des plaquettes PDGF (de l'anglais Platelet-Derived Growth Factor), les récepteurs de croissance des fibroblastes FGF (de l'anglais Fibroblast Growth Factor) et les récepteurs de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF (de l'anglais Vascular Endothelial Growth Factor)<sup>18</sup>. Les données d'études *in vitro* ont montré que les actions anti-fibrotiques du nintédanib s'exercent via le blocage de la différenciation des myofibroblastes et la suppression de l'inflammation et de l'angiogenèse<sup>19</sup>. Il est le second médicament dont l'utilisation a été approuvée dans la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) et plus récemment également dans d'autres maladies fibrosantes chroniques au phénotype progressif associé à une sclérose systémique (SSc-ILD)<sup>20</sup>. L'essai clinique INBUILD mené récemment suggère même que son utilisation pourrait être élargie aux diverses PID fibrosantes chroniques au phénotype progressif, peu importe leur type (pneumopathie d'hypersensibilité, PID autoimmune, pneumonie interstitielle non spécifique, pneumopathies interstitielles inclassables et autres PID)<sup>21,22</sup>. Dans la fibrose pulmonaire idiopathique, son indication fait suite aux études cliniques de phase III dénommées INPULSIS-1 et INPULSIS-2. Dans ces études menées de façon randomisée, en double aveugle, sur 1066 patients et comparativement à un groupe placebo, le nintédanib a permis de réduire le déclin de la capacité vitale forcée d'un facteur 1.8 à 2 et d'ainsi ralentir significativement la progression de la pathologie<sup>23</sup>.

L'essai INPULSIS-ON inscrit donc le nintédanib sur la liste des traitements de la FPI dont la balance bénéfices/risques permet une utilisation au long cours. Toutefois, ce traitement comme la pirfénidone, peut induire des effets indésirables sévères, principalement de type diarrhéiques (pour environ 60% des patients traités<sup>24</sup>) et hépatiques et qui peuvent conduire à l'arrêt de son utilisation.

### **3. La transplantation pulmonaire**

Le seul traitement à visée réellement curative de la FPI est la transplantation pulmonaire. Cependant, de multiples contrindications (Tableau 2) à la transplantation comme la présence de comorbidités des patients souffrant de FPF et/ou leur âge, limitent son application<sup>25</sup>. Auparavant préconisée par *l'International Society for Heart and Lung transplantation* pour des patients âgés de moins de 65 ans, elle est maintenant tolérée pour des patients de 70 ans et plus dans certains centres<sup>26</sup>. Malheureusement, la disponibilité de greffons constitue un autre point limitant à la prise en charge chirurgicale. De nombreuses études internationales décrivent la forte mortalité des patients en attente de greffe, des suites de la pathologie avant transplantation<sup>27-29</sup>. En 2017, et au niveau mondial, sur 40.5 % de greffes de patients souffrant d'une PID, 32.4% concernaient des patients atteints de FPI<sup>30</sup>. A ce jour, la médiane de survie après greffe des patients souffrant de FPI est estimée à 4,5 années<sup>31</sup>. Le rejet du greffon constitue la principale cause de décès des patients atteints de FPI transplantés. La transplantation de patients atteints de FPI est largement recommandée par *l'American Thoracic Society (ATS)*, *l'European Respiratory Society (ERS)*, la *Japanese Respiratory Society (JRS)* et la *Latin American Thoracic Association (ALAT)* puisqu'elle réduit de 75 % les risques de décès des patients comparativement à la seule médication<sup>32</sup>.

<b>Indications</b>
Risque élevé de mort (>50%) dans les deux ans à venir sans transplantation Probabilité élevée de survie (>80%) au moins 90 jours après transplantation Probabilité élevée de survie (>80%) 5 ans après transplantation
<b>Contre-indications formelles</b>
Historique de cancer Dysfonction d'un organe vital Coronaropathie non obstructive Coagulopathie Déformation de la paroi thoracique Obésité morbide Tuberculose Infection résistante non contrôlée Etat général altéré et inaptitude à la réhabilitation Troubles psychiatriques sévères Conditions sociales limitées Faible observance thérapeutique
<b>Contre-indications mineures</b>
Age >65 ans Obésité (IMC 30-34.9) Malnutrition sévère Ostéoporose sévère Chirurgie thoracique antérieure avec résection pulmonaire Ventilation mécanique et/ou assistance extracorporelle Infection virale B ou C avec signes de lésions hépatiques importantes et/ou d'hypertension portale

**Tableau 2. Indications et contrindications à la transplantation pulmonaire de patients atteints de fibrose pulmonaire.** Adapté de Laporta *et al.* (2018) <sup>33</sup>

A ce jour, les seuls traitements médicamenteux, la pirféridone et le nintédanib sont accessibles (dans les limites du respect des contres-indications générales, insuffisance hépatique, et insuffisance rénale avec clairance <30) aux patients souffrant de FPI.

Dans ce contexte, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans la prise en charge des patients atteints de FPI constitue un enjeu clinique majeur. Plusieurs études scientifiques s'intéressent à la mise au point de stratégies combinatoires de nouvelles molécules avec celles déjà existantes dans la FPI. Cependant, dans le but d'intervenir plus précocement dans sa prise en charge, la découverte de nouveaux biomarqueurs prédictifs de l'évolution de la pathologie semble indispensable. Aussi, la physiopathologie de la fibrogenèse nécessite d'être mieux comprise.

# ETAT DE LA LITTERATURE

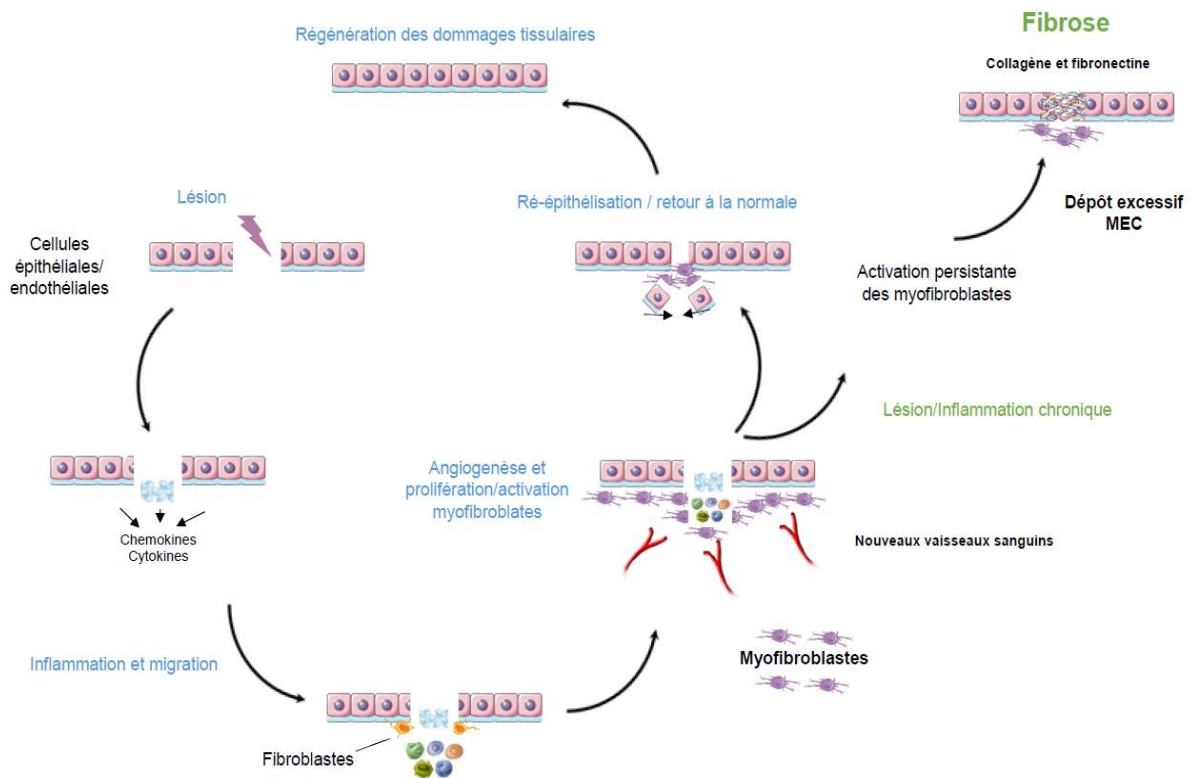
---

## I. Protagonistes de la fibrose pulmonaire

L'exposition à différents agents environnementaux tel que la pollution, le tabac, les métaux, etc. agresse de façon chronique et répétée le tissu pulmonaire. En réponse, la régénération du tissu par des mécanismes cicatriciels, permet le remplacement du tissu original par du tissu conjonctif, la MEC (matrice extracellulaire) (Figure 2). Dans la fibrose, ce processus de cicatrisation s'emballé ce qui provoque une accumulation disproportionnée et/ou un défaut de dégradation du tissu conjonctif ainsi qu'un remodelage du tissu pulmonaire<sup>34</sup>.

### 1. De la cicatrisation physiologique au développement de la fibrose : mécanisme général et acteurs principaux.

Initiée lors d'une blessure au niveau de l'épithélium/endothélium pulmonaire, la lésion du tissu pulmonaire provoque l'activation des thrombocytes (plaquettes), suivie de la formation de fibrine qui constituera une MEC provisoire. Cette MEC est constituée majoritairement de collagène et d'élastine, responsables de sa conformation. Les cellules environnantes à la blessure sécrètent un ensemble de cytokines/chémokines comme le TGF- $\beta$ 1 (pour Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 en anglais), le CTGF<sup>35</sup> (pour connective tissue growth factor en anglais), le TNF- $\alpha$  (pour Tumor Necrosis Factor en anglais) ainsi que des métalloprotéases matricielles (MMP)<sup>36</sup>. Ensemble, ces facteurs pro-fibrosants participent à la destruction de la lame basale permettant ainsi l'infiltration des cellules immunitaires. Dans l'infiltrat immunitaire, les éosinophiles, les lymphocytes, les neutrophiles et les macrophages recrutés produisent des ROS (espèces réactives de l'oxygène) et participent à la sécrétion de cytokines tels que le TGF- $\beta$ 1, le PDGF, l'IL-13<sup>37</sup>. Cet environnement pro-fibrosant favorise entre autre, la neovascularisation de la zone lésée et l'activation des fibroblastes. Les fibroblastes activés sont des cellules clés dans ce processus ; elles expriment notamment l' *$\alpha$ -smooth-muscle actin* ( $\alpha$ -SMA), protéine caractéristique de leur transformation mésenchymateuse. Ces cellules ayant acquis un phénotype migratoire sont nommées les myofibroblastes. Leur persistance via l'inhibition de leur apoptose, est à l'origine de la sécrétion accrue de collagène à l'origine donc, de la fibrose<sup>38</sup>.



**Figure 2.** Schématisation de la cicatrisation : vers la régénération tissulaire ou la fibrose. Adapté d'après Wynn *et al.* (2007) <sup>39</sup>

Ce mécanisme de cicatrisation est régulé par la présence de métalloprotéases matricielles et de leurs inhibiteurs, nommés les TIMP (pour *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases en anglais*). Lorsque la balance MMP-TIMP est déséquilibrée, on assiste à l'accumulation de MEC à l'origine de la fibrose tandis que, l'équilibre de la balance permet la régénération du tissu lésé <sup>40</sup>(Figure 2).

## 2. Le collagène : principal constituant de la matrice extracellulaire et outil de diagnostic

Le collagène appartient à la famille des protéines fibreuses et est le composant mécanique majoritaire de la matrice extracellulaire chez les vertébrés. Il est à l'origine de la stabilité et donc, de l'intégrité structurelle des tissus <sup>41</sup>. A ce jour on identifie 28 types de collagènes différents. Structurellement, le collagène se caractérise par une répétition d'un triplet d'acides aminés spécifiques dont le motif le plus fréquent est l'association Proline-Hydroxyproline-Glycine (Pro-Hyp-Gly) <sup>42</sup>. Ensemble, ces résidus sont à l'origine de la

formation de chaînes polypeptidiques (les chaînes alpha) qui varient en taille, en nombre, en fonction et en distribution tissulaire<sup>43</sup> (Tableau 3). Ces chaînes forment une structure en triple hélice.

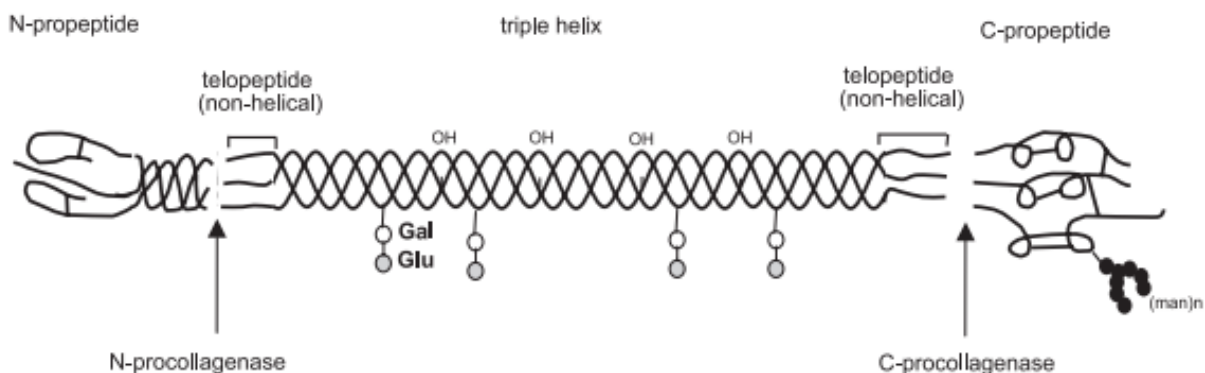
Types	Gènes	Distribution tissulaire
<i>Collagène formant des fibrilles</i>		
I	COL1A1 COL1A2	Os, derme, tendon, ligaments, cornée
II		
III	COL2A1	Cartilage, corps vitré, noyau pulpeux
	COL3A1	Peau, Paroi du vaisseau, fibres réticulaires de la plupart des tissus (poumons, foie, rate, etc.)
V	COL5A1 COL5A2 COL5A3	Poumons, cornée, os, membranes fœtal ;
XI	COL11A1 COL11A2 COL11A3	Cartilage, corps vitré
<i>Collagène de la membrane basale</i>		
IV	COL4A1 COL4A2 COL4A3 COL4A4 COL4A5 COL4A6	Membranes basales
<i>Collagènes microfibrillaires</i>		
VI	COL6A1 COL6A2 COL6A3	Répartis : derme, cartilage, placenta, poumons, paroi vasculaire, disque intervertébral
<i>Ancrage des fibrilles</i>		
VII	COL7A1	peau, jonctions dermo-épidermiques ; muqueuse buccale, col de l'utérus
<i>Collagènes formant un réseau hexagonal</i>		
VIII	COL8A1 COL8A2	cellules endothéliales, membrane de Descemet
X	COL10A1	cartilage hypertrophique



<i>Collagène associé aux fibrilles</i>		
IX	COL9A1 COL9A2	cartilage, humeur vitrée, cornée
XII XIV XIX	COL12A1 COL9A1 COL19A1	périchondre, ligaments, tendon derme, tendon, paroi vasculaire, placenta, poumons, foie rhabdomyosarcome
XX XXI	COL21A1	épithélium cornéen, peau embryonnaire, cartilage sternal, tendon paroi des vaisseaux sanguins
<i>Collagènes transmembranaires</i>		
XIII XVII	COL13A1 COL17A1	épiderme, follicule pileux, endomysium, intestin, chondrocytes, poumons, foie jonctions dermique – épidermique
<i>Multiplexine collagènes</i>		
XV XVI XVIII	COL15A1 COL16A1 COL18A1	fibroblastes, cellules musculaires lisses, rein, pancréas fibroblastes, amniotique, kératinocytes poumons, foie

**Tableau 3.** Description des différents types de collagène et leur distribution tissulaire. D'après Gelse *et al.* (2003) <sup>43</sup>

Elles sont produites sous forme de procollagène (Figure 3) par les cellules et excrétées pour former un réseau complexe. Les collagènes le plus fréquemment retrouvés sont les collagènes de type I à IV. Le collagène de type I contribue à la structure du squelette osseux. Le collagène de types II contribue principalement à la matrice fibrillaire du cartilage articulaire. Le collagène de type IV est prédominant dans les membranes basales. Les collagènes de type I, III et V sont majoritairement produits par les fibroblastes tandis que le collagène IV est produit par les cellules épithéliales.



**Figure 3.** Structure moléculaire des collagènes fibrillaires avec les différents sous-domaines ainsi que les sites de clivage des N- et C-procollagénases (illustration d'une molécule de collagène de type I). D'après Gelse *et al.* (2003)<sup>43</sup>

Dans la fibrose, l'expression des collagènes de type I et III est augmentée. Le ratio collagène I/III évolue en fonction du type de fibrose. Dans la fibrose débutante, le ratio reste à l'équilibre malgré l'augmentation de leur expression. En revanche, la progression de la fibrose est associée à une surexpression du collagène de type I par rapport au type III ce qui entraîne un déséquilibre de la balance des collagènes I et III<sup>44</sup>. Dans le sérum de patients atteints de FPI, il a été montré que les marqueurs de dégradation du collagène par les MMP étaient augmentés<sup>45</sup>. Leur concentration sérique est corrélée à la progression de la pathologie et leur taux d'augmentation prédit la survie des patients<sup>46</sup>.

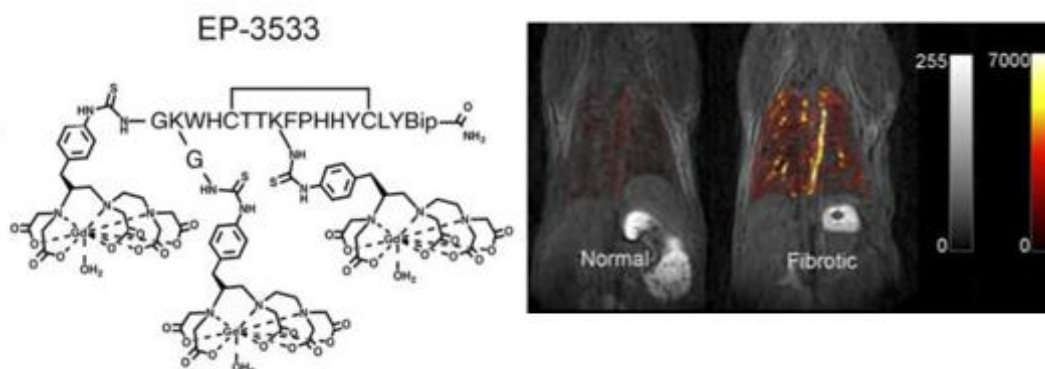
Récemment, une étude a permis d'identifier par immunohistochimie et reconstruction 3D de poumons, la localisation de différents types de collagène (I, III, IV, V et VI) au cœur des foyers fibroblastiques de poumons de patients atteints de FPI<sup>47</sup>. Ainsi, la mise en place de stratégies de ciblage du collagène natif ou dégradé permettrait de mieux suivre l'évolution de la pathologie et d'ainsi améliorer la prise en charge des patients atteints de FPI. Dans cet intérêt, Wahyudi *et al*<sup>48</sup> ont répertorié plusieurs études dans lesquelles des peptides ont été synthétisés afin de mimer l'action des facteurs de croissance et de lier différents types de collagène dans le but de limiter leur envahissement (Tableau 4).

Peptides de liaison au collagène	Origine des peptides de liaison au collagène	Cibles de ces peptides	Applications
RRANAALKAGELYK SILYGC	récepteur plaquettaire du collagène I	collagène de type I	moduler la fibrillogenèse du collagène et inhiber la dégradation du collagène médiée par les MMP
MIVIELGTNPLKSSGI ENGAFQGMKK	répétitions riches en leucine (LRR) 4-5 de la décorine	collagène de type I	Induire la minéralisation du collagène dans les défauts osseux
LRELHLNNN	surface intérieure des répétitions riches en leucine 10 de la décorine	collagène de type I	Promouvoir la libération contrôlée de molécules > 2KDa
WREPSFCALS	Facteur Von-Willebrand	collagène de type I	Promeut la vascularisation et la cellularisation
TKKTLRT	Collagénase	collagène de type I	promeut la vascularisation et la cellularisation
WYRGRL	Phage display	collagène de type II	cibler le cartilage articulaire
KLWVLPK	Phage display	collagène de type IV	sites cibles exposés au collagène dans les vaisseaux sanguins endommagés par l'angioplastie transluminale

**Tableau 4. Peptides de liaison au collagène et leurs applications.** ND = non déterminé. Adapté de Wahyudi *et al.* (2016) <sup>48</sup>

Le collagène est aussi une cible privilégiée pour surveiller et dépister la pathologie de façon non invasive. A ce titre, plusieurs outils moléculaires tel que l'agent de contrast EP-3533 (Figure 4) , le CM-101 et le ProCA32.collagen1 <sup>49</sup>, permettent de suivre par imagerie à résonance magnétique, la progression fibrotique dans les tissus (Figure 4). D'autres outils développés à partir de phage ou d'anticorps, permettent non pas de cibler le collagène natif mais

le collagène dégradé afin, de détecter des marqueurs spécifiques de pathologies, de faciliter le développement d'agents d'imagerie et d'adapter les thérapies (Tableau 5) <sup>48</sup>.



**Figure 4. Outils moléculaires ciblant le collagène.** EP-3533, un agent de contraste IRM qui permet le suivi du collagène et l'évolution de la fibrose pulmonaire *in vivo* en imagerie moléculaire. Adapté d'après Wahyudi *et al.* (2016) <sup>48</sup>

Molécules ciblant le collagène dénaturé	Méthode de découverte	Cible	Application
MAb HUIV26	immunisation soustractive	le collagène dénaturé de type IV	inhiber l'angiogenèse et la croissance tumorale
MAb HUI77	immunisation soustractive	le collagène dénaturé de type I-V	ND
D93	mAb humanisé dérivé de HUI77	le collagène dénaturé de type IV dégradé par les MMP	inhiber la croissance tumorale
MAb E1E5	dosage immunologique quantitatif	le collagène dénaturé de type II	Détecter le collagène dénaturé de type II
MAb E4A11	dosage immunologique quantitatif	le collagène dénaturé de type II	Détecter le collagène dénaturé de type II
TLTYTWS	Phage display	Collagène de type IV dégradé par les MMP-2	Réduire la différenciation endothéliale et inhiber l'angiogenèse

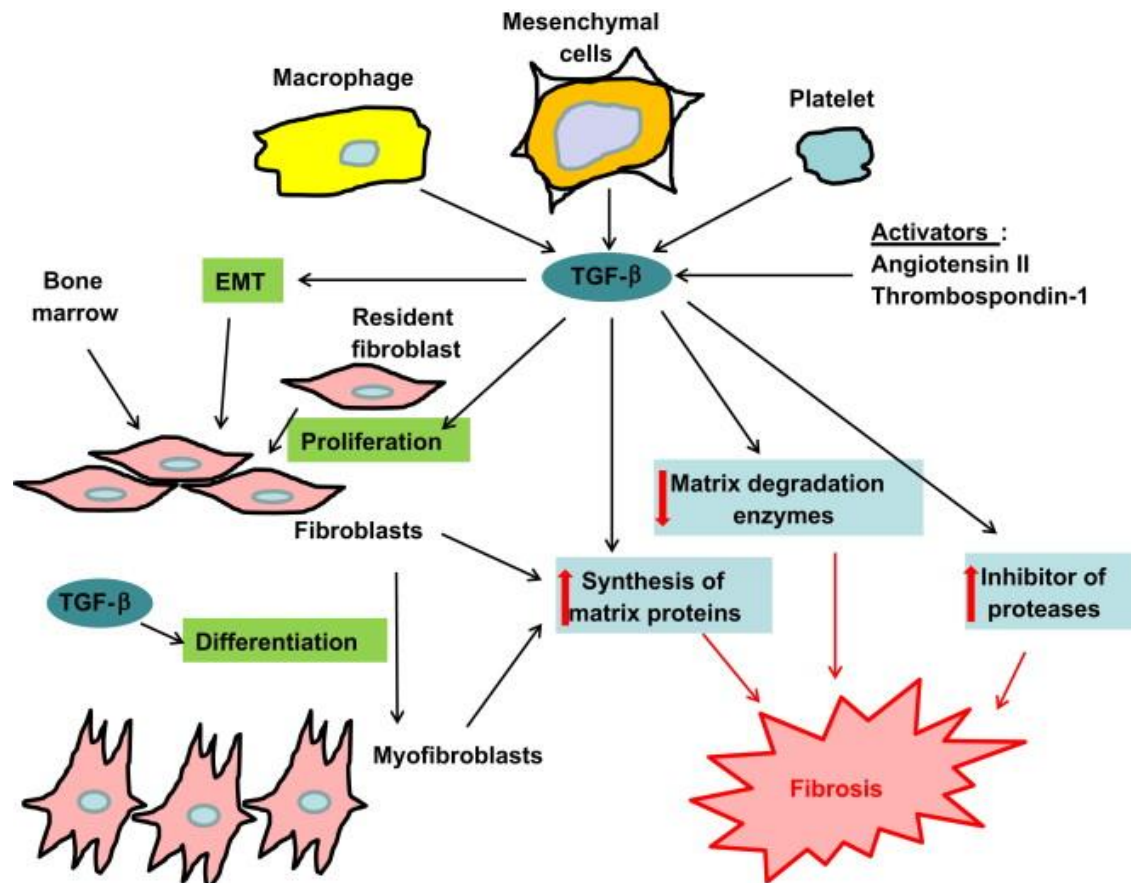
**Tableau 5. Molécules ciblant le collagène dénaturé et leurs applications.** Adapté de Wahyudi *et al.* (2016) <sup>48</sup>

Récemment, une sonde radioactive nommée  $^{68}\text{Ga}$ -CBP8 et ciblant le collagène de type I par PET-scan (*Positron Emission Tomography-scanner*), a été caractérisée comme outil de suivi de la fibrose pulmonaire chez l'Homme <sup>50</sup>.

Le collagène accumulé ou dégradé constitue ainsi un outil théranostique de choix. La découverte d'autres outils davantage prédictifs de la pathologie serait une avancée majeure dans la prise en charge des patients souffrant de FPI.

### **3. Le Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) : cytokine majoritaire**

Différentes cytokines pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires sont impliquées dans la fibrogenèse. Les facteurs pro-inflammatoires comme l'interleukine-1 (IL-1), l'interleukine-6 (IL-6), le *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) ou les espèces réactives de l'oxygène (ROS pour *Reactive Oxygen Species* en anglais) sont libérés consécutivement à l'atteinte et favorise un microenvironnement propice au développement de la fibrose. La fibrose se caractérise par l'accumulation tissulaire du collagène et la sécrétion de facteurs de croissance comme le VEGF, FGF, PDGF ou encore le TGF- $\beta$ 1, cytokine clé la plus décrite dans les processus de fibrogenèse (Figure 5) <sup>51</sup>.

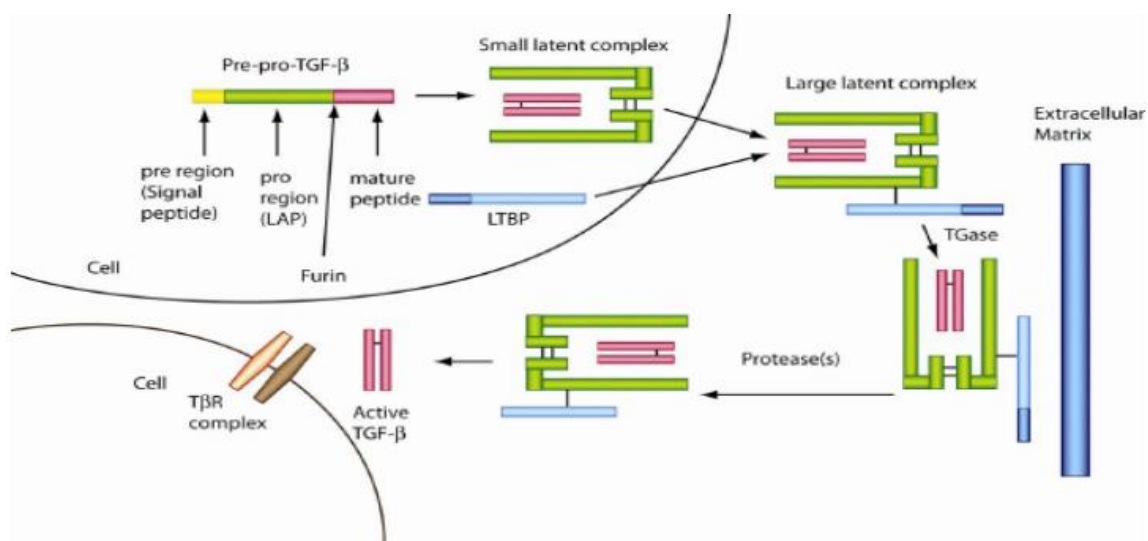


**Figure 5. Stimulation de la réponse fibrotique par le TGF- $\beta$  lors de la réparation tissulaire.** Le TGF- $\beta$  est libéré par les plaquettes, les cellules parenchymateuses et les macrophages et son activité est stimulée par des facteurs endogènes tels que l'angiotensine II. Sous l'influence du TGF- $\beta$ , la prolifération et la migration des fibroblastes résidents et le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) se produisent et les fibroblastes se différencient en myofibroblastes au niveau de la plaie. Les myofibroblastes différenciés synthétisent des protéines de la matrice extracellulaire. L'accumulation de matrice extracellulaire est renforcée par le TGF- $\beta$  via ses effets inhibiteurs des métalloprotéases matricielles et ses effets stimulants des inhibiteurs de métalloprotéases. D'après Jiang *et al.* (2014)<sup>52</sup>

### 3.1. Biosynthèse et sécrétion

Le TGF- $\beta$ 1 appartient à la superfamille du TGF- $\beta$ , impliquée dans le contrôle de nombreux processus physiologiques comme la prolifération, la différenciation cellulaire, la cicatrisation, la régulation du système immunitaire et de nombreux processus pathogéniques comme le cancer et la fibrose<sup>51</sup>. Chez l'Homme, il existe trois isoformes du TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 et TGF- $\beta$ 3) et le TGF- $\beta$ 1 est le premier responsable de la fibrose chez l'adulte<sup>53</sup>. La séquence de l'ARNm du TGF- $\beta$  est très conservée entre les espèces. La biosynthèse peptidique du TGF- $\beta$  est initiée par la formation d'un pré-pro-précurseur (pre-pro-TGF- $\beta$ ) de 390 acides aminés (AA) composé d'un peptide signal en position N-terminale et d'une séquence de 112 AA nommée TGF- $\beta$  mature en position C-terminale. Entre ces deux séquences, on retrouve un domaine LAP

pour « latency- associated Protein » de 249AA. Le peptide signal subit un premier clivage sous l'action d'une endopeptidase et ce clivage provoque la libération du peptide LAP et du pro-TGF- $\beta$ 1, second produit de 25 kDa. Ces peptides s'homodimérisent respectivement grâce à des ponts di-sulfures (S-S) et se lient de manière non covalente pour former un complexe latent du TGF- $\beta$  de 75 kDa. Ce petit complexe latent ne peut pas se fixer à son récepteur. Son interaction avec une protéine LTBP<sup>54</sup> (pour *Latent TGF- $\beta$  Binding Protein en anglais*) permet la formation d'un grand complexe latent du TGF- $\beta$  pouvant être stocké dans la cellule et sécrété (Figure 6).



**Figure 6. Structure et synthèse du TGF- $\beta$ .** Synthétisé sous forme d'un précurseur pré-pro-TGF- $\beta$ , le complexe est ensuite clivé pour devenir le pro-TGF- $\beta$ , qui se dimérise et forme le petit complexe latent du TGF- $\beta$ . L'association du peptide LTBP est nécessaire la sécrétion et la constitution du complexe latent du TGF- $\beta$ . Ensemble, ils forment un large complexe latent. D'après Shi *et al.* (2011)<sup>54</sup>

Le TGF- $\beta$ , sécrété sous forme inactive subit des étapes d'activation. L'hydrolyse acide, la chaleur ou encore l'action de sérines protéases peuvent activer le TGF- $\beta$  (Jenkins) via le clivage de LAP. Parmi les protéases, on recense par exemple la plasmine et la thrombine. Leur mécanisme d'action précis reste toutefois à élucider. La Thrombospondin-1 (TSP-1) est une protéine d'adhésion sécrétée par un grand nombre de types cellulaires. Elle possède une séquence particulière pouvant se fixer à LAP et ainsi empêcher sa liaison avec le TGF- $\beta$  dans le but d'entraîner sa libération. Le récepteur *Insulin-like Growth Factor-II/Mannose-6-phosphate* (IGFII/M6P-R) a également été décrit comme un activateur du TGF- $\beta$ . Ce récepteur lie le complexe TGF- $\beta$ /LAP/LTBP et libère le TGF- $\beta$  dans sa forme active<sup>55</sup>.

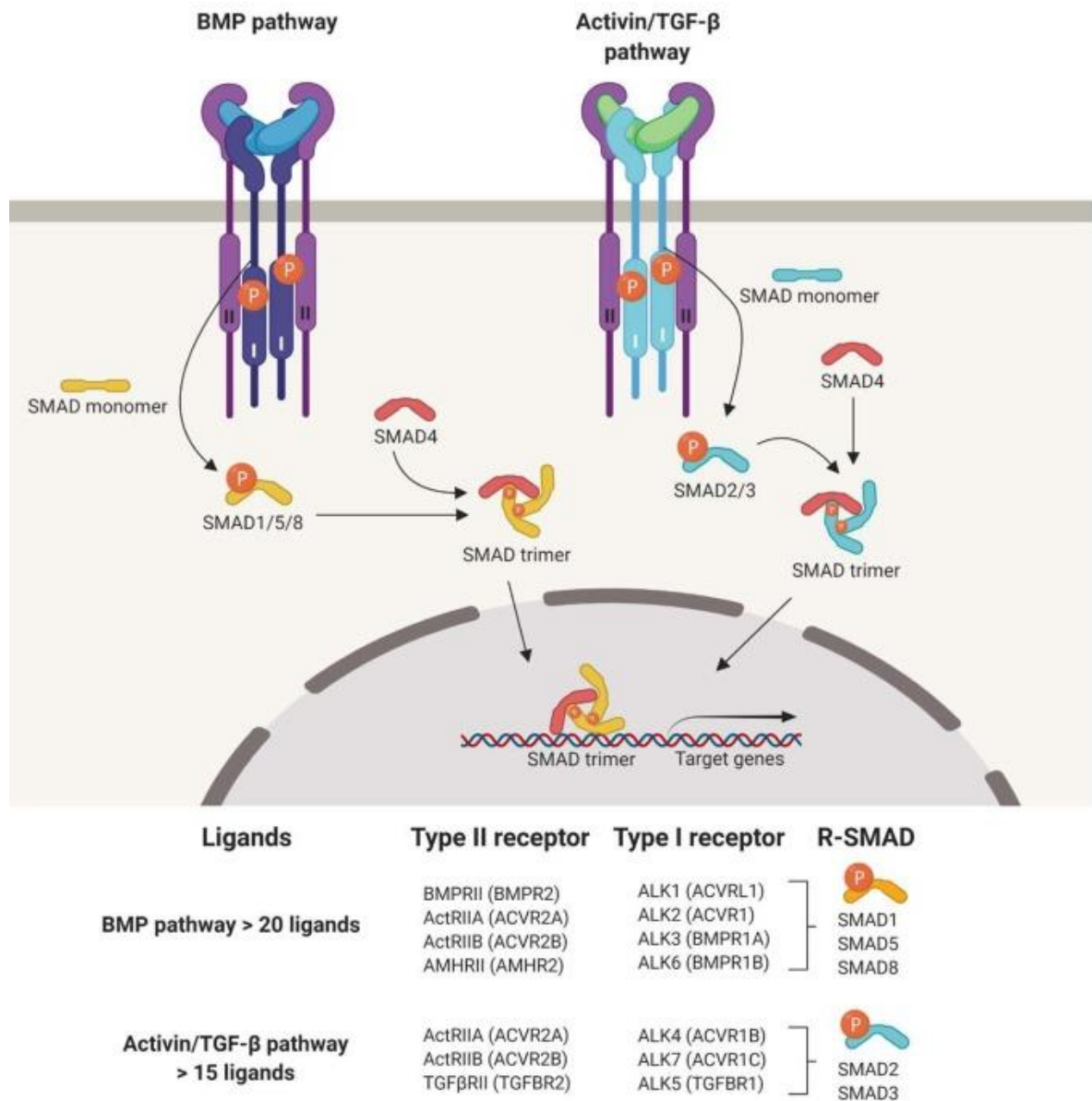
Enfin, les intégrines sont la dernière catégorie d'activateurs du TGF- $\beta$  <sup>56</sup>. Il s'agit de récepteurs hétérodimériques (composés d'une sous-unité  $\alpha$  et  $\beta$ ) d'adhésion cellulaire qui permettent à la cellule d'interagir avec la MEC. Les intégrines lient le peptide LAP via leur séquence d'AA RGD (Arg-Gly-Asp). Elles piègent ainsi le complexe latent à la surface membranaire et facilitent l'activité protéolytique d'autres protéases afin de libérer la forme active du TGF- $\beta$ . C'est le cas des isoformes  $\alpha\beta8$  et  $\alpha\beta6$  pour qui le ligand majoritaire est le TGF- $\beta$  latent <sup>57,58</sup>. Les métalloprotéases de la matrice (MMPs) ont elles aussi été décrites comme facilitant l'activation du TGF- $\beta$  notamment en agissant en collaboration avec les intégrines de surface <sup>59,60</sup>.

### 3.2. Les récepteurs du TGF $\beta$

Les cytokines de la superfamille du TGF- $\beta$  se lient à des récepteurs transmembranaires de la famille des sérine/thréonine kinases nommés TGF- $\beta$ RI et TGF- $\beta$ RII <sup>61</sup>. Le TGF- $\beta$  et les autres ligands (comme les BMP (bone morphogenetic proteins), l'activine, l'inhibine, etc.) sont associés à un couple de récepteurs qui leur est propre. Par exemple, le TGF- $\beta$  se lie au récepteur de type II TGF- $\beta$ RII qui lui-même s'associe soit à ALK5 (ou TGF- $\beta$ RI) soit à ALK1 (activin receptor-like kinase 1) en fonction du type cellulaire tandis que les BMP se lient au récepteur BMPRII qui lui-même s'associe à ALK1 (Figure 7). Chaque récepteur possède une partie N-terminale située dans le compartiment extracellulaire qui interagit directement avec le TGF- $\beta$ , une région transmembranaire et une partie C-terminale intracellulaire à activité sérine/thréonine kinase. Les récepteurs de type I possèdent un domaine GS caractérisé par la séquence « TTSGSGSG » en région N-terminale. Cette GS box en position N-terminale se situe dans la zone cytoplasmique de la cellule. L'affinité du ligand pour son récepteur est différente selon la sous-famille de ligand. Par exemple, les ligands de la sous-famille BMP se lient, dans un premier temps au récepteur de type I alors que les TGF- $\beta$  et l'activine lient le récepteur de type II. Ainsi, dans le cas du TGF- $\beta$ , après fixation avec le récepteur de type II, le récepteur de type I se rapproche pour former le complexe TGF- $\beta$ /TGF- $\beta$ RI/TGF- $\beta$ RII. Le ligand TGF- $\beta$  capte un deuxième récepteur de type II (TGF- $\beta$ RII) et ensemble, ils recrutent le récepteur de type I (ALK). Le complexe formé comprend donc 2 TGF- $\beta$ RI et 2 TGF- $\beta$ RII. Le récepteur kinase de type II phosphoryle le domaine intracellulaire GS du récepteur de type I et ses multiples résidus sérine et thréonine. La signalisation intracellulaire médiée par la fixation du TGF- $\beta$  à son récepteur<sup>62</sup> est alors initiée.



Dans la FP (fibrose pulmonaire), ALK5 est le récepteur TGF- $\beta$ RI le plus décrit <sup>63</sup>. Terashima *et al.* ont démontré que son inhibition conduit à l'atténuation de la fibrose pulmonaire en limitant l'accumulation du collagène de type I dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine <sup>64</sup>.



**Figure 7. Description des récepteurs de la superfamille du TGF- $\beta$ .** Ils sont classés en fonction de leurs ligands BMP et TGF- $\beta$ /Activin. La liaison du ligand induit la voie de signalisation canonique des SMAD, voie principale médiée par le TGF- $\beta$  permettant de relayer le signal au noyau afin de débiter la transcription de gènes. D'après Martinez-Hackert *et al* (2021) <sup>65</sup>

Suite à l'interaction du TGF- $\beta$  avec son récepteur et l'activation du complexe par phosphorylation, deux voies de signalisation sont initiées et permettent de relayer le signal au noyau afin de débiter la transcription de gènes. Il s'agit des voies : canonique (comprenant la

principale voie des Smads) et non canonique (regroupant un ensemble de voies de signalisation annexes). La voie de signalisation canonique est la plus connue des voies de signalisation médiées par le TGF- $\beta$ . La voie non canonique est à ce jour moins documentée mais suscite de plus en plus d'intérêts dans le traitement des maladies fibrosantes <sup>66</sup>.

### 3.3. Les voies de signalisation du TGF- $\beta$ 1

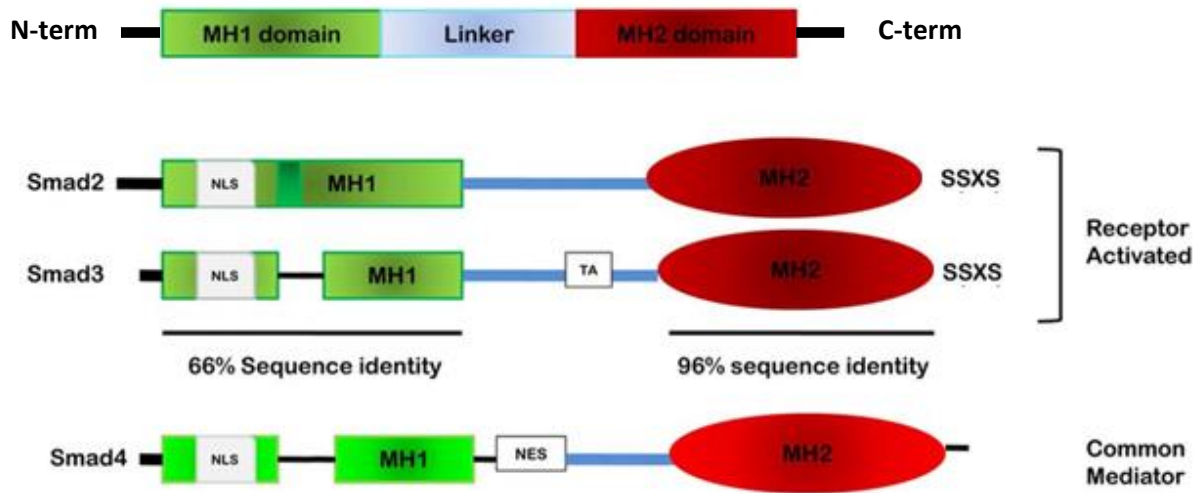
#### 3.3.i. La voie de signalisation canonique : la voie des SMADs

La voie des SMAD (supressor of *mothers against decapentaplegic homolog*) est la voie principale de réponse cellulaire médiée par l'interaction du TGF- $\beta$  à son récepteur. Cette voie de signalisation nécessite l'intervention de protéines de la famille des SMAD. Ces dernières se dissocient en trois groupes :

- Les SMAD associées aux récepteurs (R-SMAD) ; parmi elles, on recense les protéines SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 et SMAD8 (appelé aussi SMAD9) qui induisent toutes une voie de signalisation différente
- SMAD4 dite SMAD co-régulatrice (Co-SMAD) ; il s'agit d'une protéine effectrice nécessaire à la translocation nucléaire du complexe des SMADs et à la constitution du facteur de transcription
- Les SMADs antagonistes ou inhibitrices (I-SMAD) ; SMAD6 et SMAD7 sont deux I-SMAD qui permettent de réguler négativement la voie de signalisation via la dégradation des récepteurs au TGF- $\beta$  ou l'inhibition des R-SMAD <sup>67</sup>.

Les SMAD sont des protéines dont la structure est conservée entre les espèces. Elles possèdent un domaine MH1 (*Mad Homology domain 1*) en position N-terminale et un domaine MH2 en position C-terminale (Figure 8). Ces domaines sont connectés par une région nommée linker. Seules les protéines R-SMAD et Co-SMAD possèdent le même domaine MH1. Les protéines R-SMAD et SMAD4 possèdent dans leur domaine MH1, un peptide signal de localisation nucléaire (NLS) et également un signal d'export nucléaire pour SMAD4 (NES). Le domaine MH1 est essentiel pour l'import des R- et Co- SMAD dans le noyau. Le domaine MH2 est commun à toutes les protéines SMAD. Ce domaine est essentiel pour leur régularisation et leur oligomérisation. Les R-SMAD possèdent dans leur domaine MH2 une région de deux résidus sérine répétés (appelés motif (SSXS)) leur permettant d'interagir avec le TGF- $\beta$ RI activé. SMAD4 contient dans sa région linker, une séquence peptidique de 48 AA nommée

SAD (*SMAD4 Activation Domain*) , indispensable à l'activation de l'expression des gènes cibles <sup>68</sup> (Figure 8).



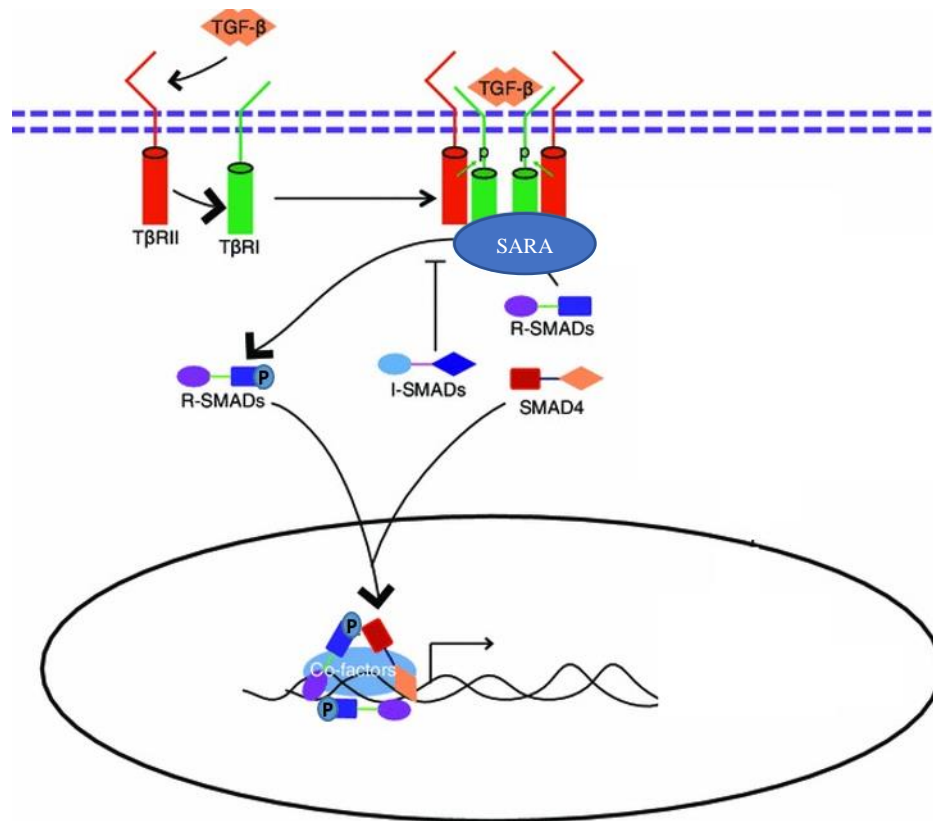
**Figure 8. Représentation de la structure des protéines SMAD.** Les protéines SMAD possèdent un schéma structural commun et comptent un domaine MH1 en position N-terminale et un domaine MH2 en position C-terminale reliés entre eux par une région linker. Chacun de ces domaines confère une activité particulière à la protéine. Le domaine MH1 est nécessaire à la fixation des SMAD à l'ADN et à l'import ou à l'export de la protéine grâce aux signaux de localisation nucléaire (Nuclear Localization Signal ou NLS) ou d'export nucléaire (nuclear export signal ou NES). Le domaine MH2 est commun à toutes les SMAD. Adapté de Samanta *et al.* (2012) <sup>69</sup>

La signalisation est donc initiée par la fixation du ligand (TGF- $\beta$ ) au récepteur de type II induisant le rapprochement du récepteur de type I et permettant ainsi l'activation du complexe TGF- $\beta$ /TGF- $\beta$ RI/TGF- $\beta$ RII par phosphorylation. Ce complexe interagit directement avec les R-SMAD et le TGF- $\beta$ RI (Figure 9). La protéine SARA, une protéine co-activatrice des SMAD, contient deux domaines en doigts de zinc (domaine FYVE) qui lui permettent un ancrage membranaire via son affinité pour le phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P). Elle possède un domaine de fixation au SMAD (SBD pour *SMAD Binding Domain*) qui lui permet de se lier préférentiellement à SMAD2/3 (R-SMAD) non phosphorylé. SARA est localisée à proximité des récepteurs au TGF- $\beta$ . Dès lors, lors d'une activation de la voie de signalisation médiée par le TGF- $\beta$ , la phosphorylation de SMAD2/3 induit la destruction du complexe SMAD2/SARA ou SMAD3/SARA. SARA entraîne donc une accumulation au niveau de la membrane de protéines SMAD2/3, sollicitées lors de l'activation des récepteurs au TGF- $\beta$ . La libération de SARA perpétue la formation de nouveaux complexes SARA/SMAD2 ou SARA/SMAD3. Le recrutement de SMAD2/3 au niveau du TGF- $\beta$ RI induit sa phosphorylation au niveau du domaine SSXS puis sa dislocation avec SARA <sup>70</sup>.

Une fois phosphorylées, les R-SMAD acquièrent des conformations stœchiométriques différentes et forment :

- des hétérotrimères comprenant deux R-SMAD et un SMAD4
- des hétérodimères comprenant un R-SMAD et un SMAD4

Ces différentes associations en hétérodimères ou trimères dépendent du ligand et du facteur de transcription recruté lors de l'interaction avec l'ADN <sup>71</sup>. Suite à la formation de cet oligomère, le complexe se transloque dans le noyau et est associé à divers facteurs de transcription en fonction de l'expression du gène cible (Figure 9). Le complexe SMAD se lie faiblement à l'ADN grâce à une séquence consensus riche en GC nommée SBE (*SMAD-Binding Element*). Afin d'accroître son affinité aux éléments de réponse, ce complexe recrute des facteurs de transcription et des cofacteurs. Leur nature est dépendante du tissu et du type de réponse souhaitée<sup>72</sup>. Il existe un très grand nombre de facteurs de transcription associés à la voie des SMAD <sup>73</sup>. Le complexe SMAD peut également s'associer à des modificateurs de chromatine tels que les histones désacétylases (HDAC) ou histones acétyltransférases (HAT) afin de moduler le niveau d'expression de gènes cibles <sup>74</sup>.



**Figure 9. Schéma de la voie canonique du TGF- $\beta$  SMADs-dépendante.** Lors de la liaison du ligand, le récepteur TGF- $\beta$  de type II (T $\beta$ RII) recrute et phosphoryle le récepteur de type I (T $\beta$ RI) dans la membrane cellulaire. Le complexe de récepteurs de type II-I activé induit ensuite la phosphorylation des R-SMAD préalablement libérés de la protéine SARA. Les R-SMAD activés recrutent le Co-SMAD (SMAD4) pour la liaison. Les complexes R-SMAD/Co-SMAD effectuent une translocation et s'accablent dans le noyau afin d'initier l'expression des facteurs de transcription cibles à l'aide d'autres cofacteurs. Adapté de Zhang et al. (2014) <sup>75</sup>

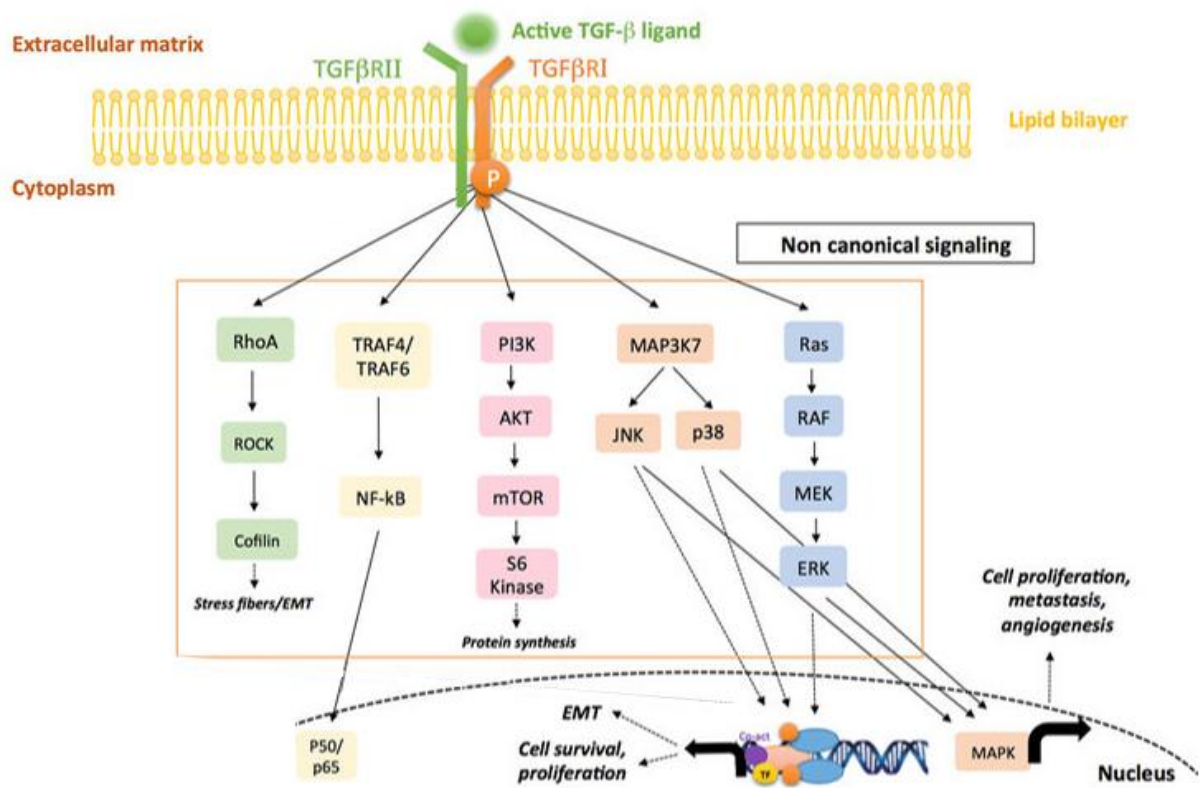
Cette voie canonique peut être régulée à différents niveaux. Suite à leur stimulation, les récepteurs du TGF- $\beta$  sont endocytés par invagination de la membrane plasmique de manière clathrine-dépendante. Cette endocytose permet à la cellule d'effectuer une première régulation membranaire en réduisant la densité de récepteurs à sa surface <sup>76</sup>. Cependant, le récepteur contenu dans un endosome précoce peut continuer d'activer SMAD2/SMAD3 via son domaine intracellulaire maintenu ancré à la membrane <sup>77</sup>. De plus, la I-SMAD SMAD7 peut interférer avec le recrutement de R-SMAD, en stimulant la déphosphorylation des récepteurs et en favorisant le recrutement d'une E3-ubiquitine ligase afin d'induire la dégradation du complexe SMAD2/3 et des récepteurs aux TGF- $\beta$  <sup>78</sup>. Enfin, la protéine à activité ubiquitine ligase TRIM33 (*Tripartite motif-containing 33*), également nommée TIF-1 $\gamma$  (*transcription intermediary factor-1 gamma*) a été décrite comme étant un régulateur négatif de la signalisation du TGF- $\beta$ 1 à travers l'ubiquitination de SMAD4 <sup>79</sup> (Figure 8). Plus récemment, TRIM33 a également été décrite comme ayant une activité anti-fibrosante en déstabilisant l'interaction entre HSPB5 (une

petite protéine de choc thermique appelée aussi  $\alpha$ B-crystallin) et SMAD4, interaction essentielle à la translocation de SMAD4 dans le noyau<sup>80,81</sup>.

### 3.3.ii. Les voies de signalisation non canoniques

En parallèle de la voie de signalisation dépendante des SMAD (voie canonique), la stimulation par le TGF- $\beta$  induit de nombreuses autres voies de signalisation annexes. Celles-ci constituent l'enjeu clinique de demain dans le développement de thérapies anti-fibrosantes<sup>66,67,82</sup>. Nous n'évoquons ci-dessous que les 5 voies non canoniques les plus documentées dans la littérature.

La voie des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) est une des voies non canoniques et est impliquée dans de nombreux phénomènes cellulaires comme l'apoptose, la différenciation cellulaire et également la signalisation médiée par le TGF- $\beta$ . Cette voie nécessite d'être régulée par des membres de 3 grandes familles de protéines : les ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinases*), les MAPK p38 et ses diverses isoformes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) et les JNK (*Jun amino-terminal Kinase*)<sup>83</sup>.



**Figure 10.** Schéma des voies non canoniques du TGF- $\beta$ . Le complexe récepteur TGF- $\beta$  transmet son signal par d'autres facteurs, tels que les protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK), la phosphatidylinositide 3-kinase (PI3K), le facteur 4/6 associé au récepteur TNF (TRAF4/ 6) et la famille Rho de petites GTPases. Les MAPK activées peuvent exercer une régulation transcriptionnelle soit par interaction directe avec le complexe

protéique nucléaire SMAD, soit via d'autres protéines en aval. De plus, les JNK/p38/ERK activés interviennent dans les métastases, l'angiogenèse et la croissance cellulaire via les facteurs de transcription, tels que c-JUN et ATF. RhoA/ROCK peut être activé par le TGF- $\beta$  pour induire la formation de fibres de stress d'actine pendant la TEM via un mécanisme non transcriptionnel. Le TGF- $\beta$  peut activer PI3K et AKT en induisant une interaction physique entre la sous-unité PI3K p85 et le complexe récepteur conduisant à des réponses traductionnelles via l'activation de mTOR/S6kinase. L'activation par le TGF- $\beta$  des protéines TRAF peut initier une activité de signalisation du facteur nucléaire- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), conduisant à la réponse inflammatoire parmi d'autres processus. Adapté de Costanza *et al.* (2017) <sup>84</sup>

Le TGF- $\beta$  est capable d'activer la voie ERK/MAPK par phosphorylation de ShcA. Suite à son activation, le TGF- $\beta$ RI phosphoryle la protéine adaptatrice ShcA et forme un complexe avec deux autres partenaires : Grb2 et Sos. Ce complexe initie alors la cascade Ras GTPase et s'en suit une activation séquentielle de RAF, MEK (MAP kinase/ERK kinase) et ERK1/2 kinases <sup>85</sup>. Pannu *et al.* décrivent que, dans un modèle murin de fibrose sous-jacente à la sclérodémie et induite par surexpression d'ALK5, le processus fibrosant dépend de SMAD1 et de ERK1/2 et non de SMAD2/3 <sup>86</sup>. Dans une autre étude menée sur cellules épithéliales, les auteurs ont montré que la voie Ras-MAPK induisait la phosphorylation de la région linker de SMAD2/3 conduisant à sa séquestration dans le cytoplasme et à l'inhibition de la signalisation induite par le TGF- $\beta$  <sup>87</sup>. Les voies JNK et p38-MAPK, peuvent également être activées par le TGF- $\beta$  de façon SMAD indépendante <sup>88</sup>. Le récepteur au TGF- $\beta$  activé interagit avec TRAF6, (*Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor 6*) une E3 ubiquitine ligase. L'association de ce facteur avec le TGF- $\beta$ R induit l'auto-ubiquitinylation de TRAF6 et sa ligation avec TAK1 (TGF- $\beta$  activated kinase 1). TRAF6 poly-ubiquitine TAK1 initiant ainsi la cascade de signalisation des MAPK par activation séquentielle de MKK4 et JNK ou de MKK3/6 et p38-MAPK <sup>85</sup>.

Dans la fibrose pulmonaire, la protéine MAPK phosphatase-5 (MKP-5), une tyrosine phosphatase, a été identifiée comme régulatrice négative de l'activation de p38-MAPK et de JNK. Les travaux de Xylourgidis *et al.*, suggèrent un phénomène complexe de compensation entre voie canonique et voie non canonique dans un modèle de fibrose induite par la bléomycine <sup>89</sup>. Le déficit en MKP-5 (qui lève la régulation négative des voies JNK et p38-MAPK) dans un modèle pro-fibrosant chez la souris, protégerait les cellules pulmonaires de leur transformation en myofibroblastes. Les auteurs suggèrent que cette voie non canonique régulerait négativement la voie de signalisation induite par le TGF- $\beta$ 1 via l'activation de SMAD7 en conditions physiologiques et que cette voie non canonique serait inhibée par la protéine MKP-5 en conditions de fibrose <sup>89</sup>. En revanche, d'autres études soutiennent que JNK1 est directement impliquée dans le développement de la fibrose pulmonaire <sup>90</sup> et que son inhibition, ainsi que

celle de p38-MAPK, par un antibiotique (méthacycline) contribuerait à réduire la transformation mésoenchymateuse *in vitro* et protégerait les souris de la fibrose pulmonaire induite par injection de bléomycine <sup>91</sup>. Ces résultats contradictoires suggèrent une régulation complexe menée par les JNK et un rôle qui reste à élucider dans la FPI.

Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) possède une signalisation complexe et participe à la régulation de nombreuses voies de signalisation. Son activation est associée aux mécanismes de cancérogenèse (survie cellulaire, prolifération, angiogenèse, invasion/métastases) <sup>92</sup>. Ce facteur est aussi impliqué dans les processus d'inflammation en réponse à des cytokines comme l'IL-1 $\beta$  ou le TNF- $\alpha$  et il est fortement exprimé par les cellules immunitaires. Son activation est décrite dans beaucoup de maladies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde, l'athérosclérose, la maladie de Crohn ou encore la rectocolite hémorragique <sup>93</sup>. NF- $\kappa$ B a été décrit dans la pathogenèse de nombreuses maladies pulmonaires <sup>94</sup> et son implication dans la voie de signalisation induite par le TGF- $\beta$  via la voie des MAPK et l'intervention de TAK1, a été mise en évidence <sup>95</sup>. TAK1 est capable de phosphoryler le complexe I $\kappa$ B kinase (IKK), l'activer et inhiber NF- $\kappa$ B. I $\kappa$ B est alors ubiquitinylé et dégradé par le protéasome tandis que NF- $\kappa$ B activé migre dans le noyau et active la transcription de gènes cibles. Dans la fibrose pulmonaire, NF- $\kappa$ B semble être impliqué dans la différenciation des fibroblastes humains et murins à la suite d'une stimulation par le TGF- $\beta$  <sup>96</sup>.

La voie Pi3K-Akt (*Phosphatidyl Inositol 3-Kinase/protein kinase B*) est une voie complexe également impliquée dans un grand nombre de voies métaboliques et notamment en cancérogenèse <sup>97</sup> (survie cellulaire, prolifération, TEM...). Le TGF- $\beta$  active cette voie via son interaction entre son récepteur et Pi3K <sup>75</sup>. De manière intéressante, la sous-unité régulatrice de Pi3K, p85, est associée de manière constitutive avec les récepteurs de type 2, mais inductible par le TGF- $\beta$ 1 au niveau du récepteur de type I <sup>88</sup>. La stimulation par TGF- $\beta$  active TRAF6 qui induit l'ubiquitinylation de p85 et active Pi3K, qui provoque l'activation de Akt par phosphorylation. De plus, l'activation de Akt peut passer par la voie mTORC2 (*mammalian Target Of Rapamycin Complex 2*) induite par Pi3K <sup>85</sup>. Cette voie Akt possède de nombreuses cibles comme les facteurs de transcription snail et twist1 largement impliqués dans la fibrogenèse <sup>98</sup>. Cette voie est impliquée dans la fibrogenèse de nombreux tissus <sup>99</sup> et notamment dans la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la rat. L'utilisation d'un inhibiteur



spécifique de la voie Pi3K/Akt (LY294002) contribue à protéger les animaux de la fibrose induite <sup>98</sup>.

La voie des JAK/STAT (*Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription*) est une voie essentielle à l'homéostasie cellulaire. La perturbation de cette voie initie des processus pathologiques cancéreux ou pro-inflammatoires <sup>100</sup>. Cette voie est la cible de nombreux médicaments tel que les inhibiteurs de JAK (ou jakinibs) approuvés dans le traitement de différents cancers ou maladies inflammatoires <sup>101</sup>. La famille du médiateur cellulaire JAK comprend trois membres (JAK1, JAK2 et JAK3) tous trois nécessaires pour initier la transduction du signal au niveau du récepteur. Les protéines STAT représentent les facteurs de transcription et il en existe sept isoformes (STAT1, 2, 3, 4, 5A, 5B et 6) <sup>102</sup>. Le choix des couples JAK/STAT dépend de la nature du couple ligand/récepteur. Lors d'une stimulation par le TGF- $\beta$ 1, c'est le couple JAK2/STAT3 qui est activé. La protéine JAK induit la phosphorylation du récepteur et le recrutement de la protéine STAT via son domaine SH2. La protéine JAK phosphoryle et active STAT qui s'homodimérise avec une autre forme phosphorylée, migre dans le noyau et induit l'expression de ses gènes cibles. De nombreuses études décrivent l'importance des voies JAK/STAT dans les PID <sup>103</sup>. Parmi celles-ci, Pedroza *et al.*, ont démontré que STAT3 contribue à la mise en place de la fibrose pulmonaire en induisant la différenciation des cellules résidentes (épithéliales et fibroblastes) en myofibroblastes. De plus, son inhibition protège les souris de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine <sup>104</sup>.

Il existe d'autres voies non-canoniques du TGF- $\beta$  décrites dans le processus de fibrogenèse. Par exemple, la voie Rho-GTPase qui régule la dynamique du cytosquelette et la mobilité cellulaire. Le TGF- $\beta$  active la petite protéine G (GTPases) RhoA (*Ras homolog family member A*) qui à son tour active ROCK (*Rho-associated colied-coil containg protein kinases*), un médiateur important de cette voie. Cette voie a été décrite comme étant cruciale pour la différenciation myofibroblastique et la production de MEC par les fibroblastes humains isolés de peau de patients atteints de sclérodémie systémique <sup>105</sup> (maladie pouvant induire une PID).

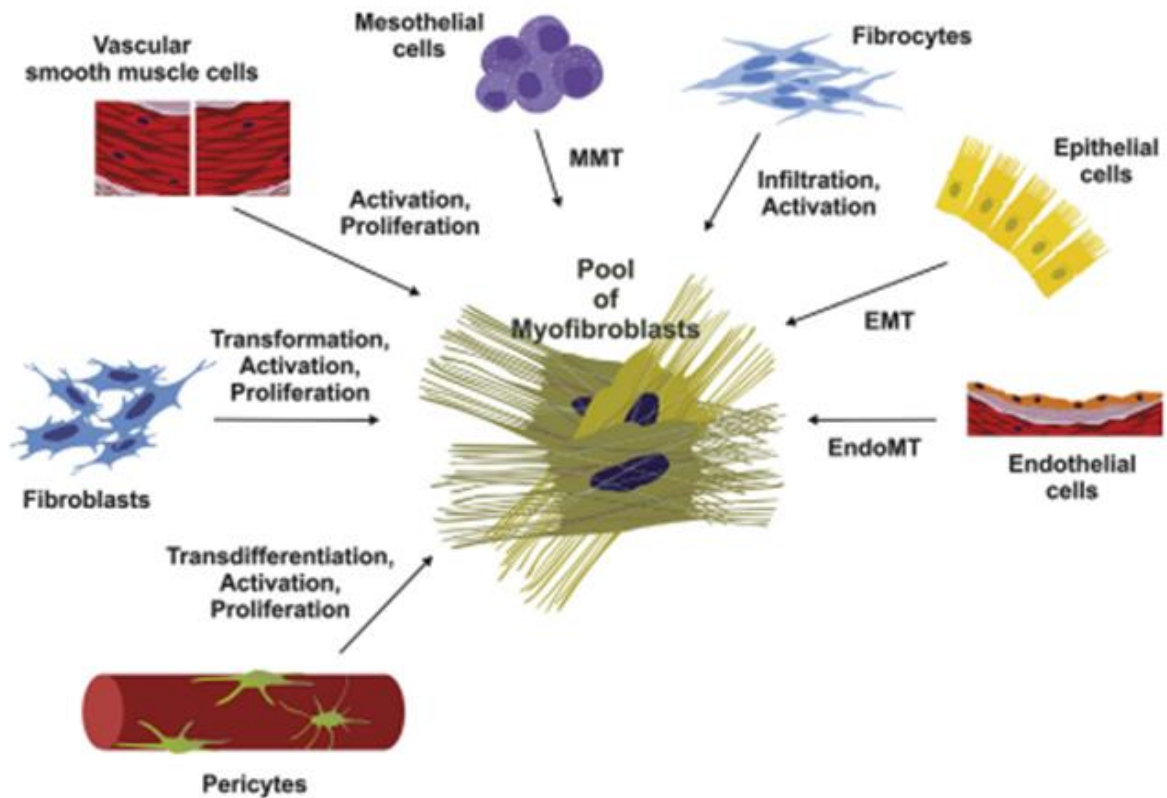
#### **4. Les principales cellules incriminées : les myofibroblastes**

Les myofibroblastes sont des médiateurs clés et principaux de la cicatrisation physiologique mais également de la cicatrisation pathologique à l'origine de la fibrose. Ces cellules se définissent comme étant des fibroblastes « activés » ayant acquis des propriétés pro-migratoires

et sécrétrices de collagène. Ces cellules expriment de l'*α-smooth muscle actin* ( $\alpha$ -SMA) responsable de leur contractilité et de leur mobilité<sup>106</sup>. Au cours d'un processus de cicatrisation, les myofibroblastes produisent la MEC au niveau de la zone lésée<sup>107</sup>. Dans un processus physiologique, la production de MEC est contrôlée par la balance entre les métalloprotéinases (MMP) et les inhibiteurs de MMP (balance MMPs/TIMPs), mais également par l'apoptose des myofibroblastes<sup>108</sup>. Bien que les myofibroblastes proviennent principalement de la transformation de fibroblastes résidents, plusieurs autres types cellulaires peuvent acquérir un phénotype « myofibroblastique » dans un environnement pro-fibrotique propice<sup>109</sup>. Les cellules se transformant en myofibroblastes ont des origines variables. Elles peuvent provenir de cellules :

- fibroblastiques
- mésothéliales
- fibrocytaires
- épithéliales
- endothéliales
- péricytaires
- vasculaires

Dans le tableau ci-après (Tableau 6), nous recenserons l'ensemble des types cellules pulmonaires à l'origine du pool de myofibroblastes (Figure 11), leurs origines, leurs propriétés et leur rôle dans la fibrogenèse.



**Figure 11. Origine et mécanismes conduisant à la formation de myofibroblastes.** Au cours de la fibrogenèse, les myofibroblastes sont des acteurs clés de la synthèse de la matrice extracellulaire. Cette population cellulaire peut être dérivée de fibroblastes résidents, de cellules mésothéliales, de fibrocytes circulants, de cellules épithéliales, cellules endothéliales, de péricytes et de cellules musculaires lisses vasculaires (liste non exhaustive). Différents mécanismes dont l'activation cellulaire, la transformation, la prolifération, l'infiltration, l'expansion, la transition épithélio-mésenchymateuse (la TEM), la transition mésothéliale-mésenchymateuse (MMT) et la transition endothéliale-mésenchymateuse (EndoMT) sont à l'origine de l'augmentation du pool de myofibroblastes. Adapté de Weiskirchen *et al.* (2019)<sup>110</sup>

Types de cellules	Propriétés	Rôles dans la fibrogenèse
Fibroblastes (source majoritaire de myofibroblastes)	Synthétisent : <ul style="list-style-type: none"> <li>- protéines structurales de la MEC</li> <li>- protéines d'adhésion</li> <li>- protéines de la coagulation sanguine</li> <li>- cytokines inflammatoires</li> <li>- collagène de type I et III</li> </ul>	Impliqués dans : <ul style="list-style-type: none"> <li>- l'angiogenèse</li> <li>- la fibrogenèse</li> <li>- l'inflammation</li> </ul>
Mésothéliales	sécrètent des composés de la MEC ( $\alpha$ -SMA, collagène) <sup>111</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- se transforment en cellules mésenchymateuse (MMT)<sup>112</sup></li> <li>- migrent dans les régions sous-pleurales et envahissent progressivement le parenchyme pulmonaire<sup>109,113,114</sup></li> <li>- impliquées dans la défense immunitaire des poumons<sup>115</sup></li> <li>- initient la fibrose pulmonaire<sup>113,116,117</sup></li> <li>- expriment fortement le TGF-<math>\beta</math>1<sup>118</sup> et sont à l'origine de la synthèse de collagène<sup>119</sup></li> </ul>
Fibrocytes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- impliquée dans la réparation tissulaire<sup>120</sup></li> <li>- expriment des composants de fibroblastes (la vimentine, le collagène, la fibronectine)</li> <li>- présentent des caractéristiques monocytaires et fibroblastiques<sup>121</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- expriment l'<math>\alpha</math>-SMA sous l'induction du TGF-<math>\beta</math>1 et se différencient ainsi en myofibroblastes<sup>122,123,124</sup></li> <li>- soutiennent l'angiogenèse<sup>125</sup></li> <li>- produisent du collagène de type I, du collagène de type III et de la vimentine</li> </ul>
Epithéliales	<ul style="list-style-type: none"> <li>- synthèse massive des composants de la MEC<sup>126-128,129,130</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Se transforment en cellules mésenchymateuses (EMT)<sup>126-128,129,130</sup></li> <li>- Migrent et envahissent le tissu pulmonaire<sup>126-128,129,130</sup></li> </ul>
Endothéliales	<ul style="list-style-type: none"> <li>- maintien des fonctions barrières, de la circulation sanguine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Se transforment en cellules mésenchymateuses (EndoMT)</li> <li>- Expriment l'<math>\alpha</math>-SMA et contribuent à la fibrose pulmonaire<sup>131,132</sup> suite</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- participants cellulaires actifs dans les réponses inflammatoires</li> </ul>	à l'endoMT provoquée par l'exposition au TGF- $\beta$ 1 ou l'exposition à un stress oxydatif <sup>133</sup>
Péricytes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- régulation du flux sanguin et phagocytose des débris cellulaires</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Se transforment en cellules mésenchymateuse (transition péricytes-myofibroblastes)<sup>134</sup></li> <li>contribution controversée dans la FP <sup>135</sup> mais :</li> <li>- expriment l'<math>\alpha</math>-SMA et d'autres protéines de la MEC sous induction du TGF-B <sup>136-138</sup></li> <li>- produisent du collagène</li> </ul>
Cellules musculaires lisses vasculaires	<ul style="list-style-type: none"> <li>- contraction et relaxation des vaisseaux</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- impliquées dans le développement de foyers fibrotiques au sein du parenchyme pulmonaire et le dépôt de collagène <sup>139</sup></li> <li>- expriment l'<math>\alpha</math>-SMA et différentes protéines de la MEC</li> </ul>

**Tableau 6. Description des différents types cellulaires constituant le pool de myofibroblastes impliqués dans la fibrogenèse pulmonaire et leurs propriétés.**

## 5. La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) : un des mécanismes de fibrogenèse les plus décrits

L'initiation du mécanisme de fibrogenèse serait majoritairement induit par une altération répétée et chronique de l'épithélium pulmonaire <sup>107,140,141</sup>.

On compte divers inducteurs de la TEM (*inducers*). Parmi les principaux, on retrouve des membres de la superfamille du TGF- $\beta$  <sup>126,142</sup>. En réponse à leur stimulation, les cellules épithéliales synthétisent un grand nombre de facteurs de transcription comme Snail, Slug, ZEB-1 et -2 et Twist <sup>143</sup>. Cette reprogrammation entraîne la perte du caractère polaire des cellules épithéliales et des jonctions intercellulaires maintenues physiologiquement par des protéines de jonction comme zonula occludens (ZO-1) et E-cadhérine. De plus, cette modification phénotypique entraîne l'apparition de filaments intermédiaires comme la vimentine. On assiste alors à la mise en place d'un phénotype mésenchymateux caractérisé par l'augmentation de l'expression de N-Cadhérine et l'invasion cellulaire <sup>36</sup> permise par la dégradation de la lame basale par les métalloprotéines MMP-2 et MMP-9. Le remodelage du cytosquelette est associé à l'augmentation d'expression et la réorganisation de la vimentine ainsi qu'à l'augmentation de l'expression d' $\alpha$ -SMA, marqueur clé des myofibroblastes différenciés. Ces cellules mésenchymateuses acquièrent la capacité de synthétiser la fibronectine et le collagène (deux composants essentiels de la MEC) mais également de FSP-1 (*fibroblast-specific protein-1*), d'intégrines, de cadhérine (N et OB) et également de micro-ARN (miRNA) spécifiques <sup>144</sup>.

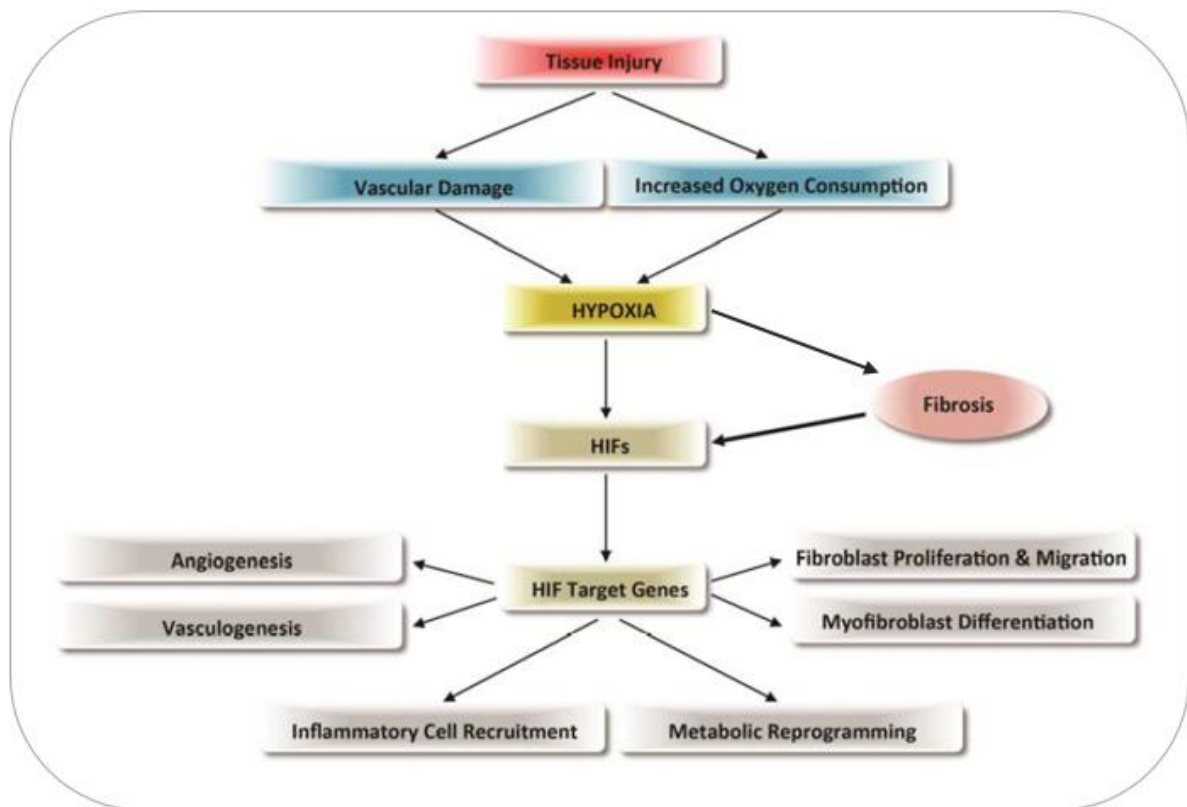
L'implication de la TEM a été rapidement mise en évidence dans les processus de fibrogenèse pulmonaire <sup>145</sup>. Pour autant, elle reste controversée <sup>142</sup>. Dans un modèle murin transgénique de fibrose pulmonaire, Rock *et al.*, ne sont pas parvenus à observer la différenciation des AEC II en myofibroblastes <sup>135</sup>. Une autre étude a permis de mettre en évidence que la TEM contribuait indirectement à la différenciation myofibroblastique via une signalisation paracrine exercée sur les cellules épithéliales. Ce mécanisme impliquerait l'expression de ZEB1, facteur de transcription surexprimé dans les cellules épithéliales situées à proximité de la MEC chez les patients atteints de FPI <sup>146</sup>. En revanche, Degryse *et al.*, montrent dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par injections répétées de bléomycine que la moitié des fibroblastes pulmonaires sont dérivés de cellules épithéliales <sup>147</sup>. Cette transformation directe des cellules épithéliales en myofibroblastes est décrite dans de nombreuses autres études portant sur la fibrogenèse pulmonaire <sup>142,148-150</sup>.

## II. La place de l'hypoxie dans la fibrogenèse

L'oxygène est essentiel au métabolisme aérobie normal des cellules chez les mammifères. L'hypoxie se définit comme étant la diminution de la quantité d'oxygène que le sang distribue aux tissus. Parmi ses causes on retrouve : l'hypoxémie (faible teneur et pression en oxygène dans le sang), l'altération de l'apport d'oxygène et l'altération de l'absorption/utilisation de l'oxygène cellulaire <sup>151</sup>.

L'hypoxie est l'un des principaux facteurs microenvironnementaux dans les lésions tissulaires et la cicatrisation des plaies <sup>152</sup>. En effet, par le biais du facteur de transcription inductible par l'hypoxie (HIF-1), elle joue un rôle essentiel dans les processus physiologiques de réparation tissulaire. Les lésions tissulaires provoquent la perte transitoire de la perfusion vasculaire, et l'hypoxie qui en résulte induit l'expression de nombreuses protéines qui permettent aux tissus de s'adapter à ce manque d'oxygène afin de débiter le processus de réparation. Parmi ces protéines dont l'expression est augmentée on retrouve par exemple : GLUT1 (transporteur de glucose de classe I), TGF- $\beta$ 1, certaines intégrines, le VEGF, la fibronectine et le collagène<sup>153</sup>. Une fois recrutées, ces protéines restaurent le tissu au plus proche de sa structure initiale. Cependant, dans certains cas de lésions chroniques, d'hypoxie chronique et de réparation pathologique, la voie de l'hypoxie peut contribuer au processus de fibrose et être à l'origine de cicatrices excessives compromettant la fonction des organes<sup>154</sup>.

Les mécanismes sous-jacents à la régulation hypoxique de la cicatrisation des plaies restent toutefois mal compris. Une meilleure compréhension de ce processus de cicatrisation régulé par le microenvironnement hypoxique et sa voie de signalisation HIF-1, est indispensable au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans des pathologies pour lesquelles les mécanismes de cicatrisation sont altérés comme par exemple les plaies diabétiques ou la fibrose (Figure 12).



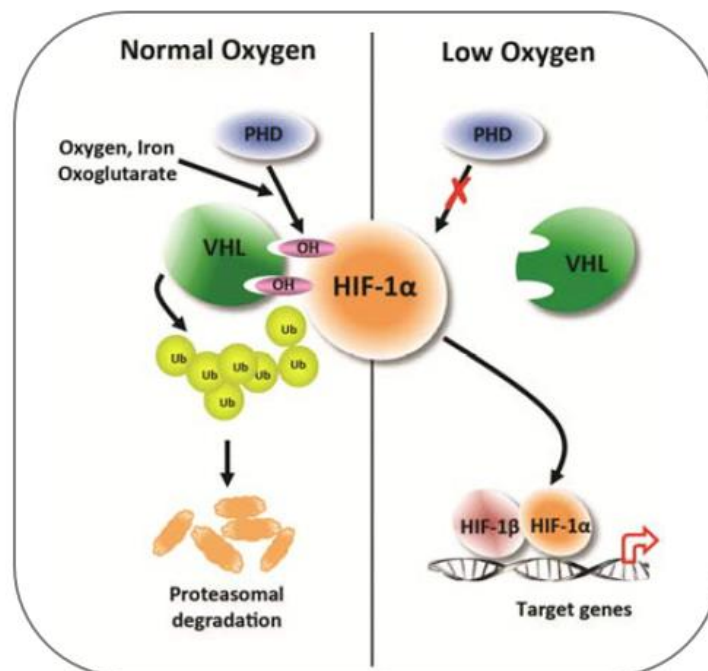
**Figure 12. Régulation de la cicatrisation et de la fibrose par hypoxie et HIF-1.** Lors de lésions tissulaires, les lésions vasculaires et l'augmentation de la consommation d'oxygène entraînent un microenvironnement hypoxique qui conduit à l'induction des HIF. Les HIF activent des gènes cibles qui contribuent aux processus de cicatrisation et aux remodelages des plaies ; y compris l'angiogenèse, la vasculogenèse, la prolifération et la migration des fibroblastes, la différenciation des myofibroblastes, le recrutement des cellules inflammatoires et la reprogrammation métabolique. L'induction de HIF-1 est réprimée dans les plaies diabétiques entraînant un retard de cicatrisation. En revanche, la fibrose est favorisée par les HIF et l'hypoxie, qui aggravent la progression pathogénique des troubles fibrotiques. Adapté d'après Ruthenborg *et al.* (2014)<sup>152</sup>



## 1. Structure et rôles pathologiques

### 1.1. Structure d'HIF

HIF-1 est un dimère comprenant, une sous-unité alpha (HIF-1 $\alpha$ ) et une sous-unité bêta (HIF-1 $\beta$ ) qui se lient en conditions hypoxiques et entraînent la transcription des gènes inductibles par l'hypoxie <sup>153</sup> (Figure 13).



**Figure 13. Régulation post-transcriptionnelle de HIF-1 $\alpha$  par le niveau d'O<sub>2</sub> cellulaire.** Dans des conditions normales de niveau de tension d'oxygène, les résidus de proline dans le domaine dépendant de l'oxygène (ODD) de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  sont hydroxylés par les prolyl hydroxylases (PHD) qui nécessitent de l'oxygène, du fer et du 2-oxoglutarate comme substrats. La protéine suppresseur de tumeur Von Hippel-Lindau (VHL) reconnaît et lie la sous-unité HIF-1 $\alpha$  hydroxylée en la ciblant pour la polyubiquitination et la dégradation protéasomique. Dans des conditions de faible niveau de tension d'oxygène, l'hydroxylation des sous-unités HIF-1 $\alpha$  par les PHD est inhibée, stabilisant HIF-1 $\alpha$  et permettant sa translocation vers le noyau et son interaction avec son partenaire de liaison HIF-1 $\beta$ . Le complexe HIF-1 se lie aux éléments de réponse à l'hypoxie (HRE : hypoxia response element) impliqués dans les processus d'adaptation hypoxique et de survie. D'après Ruthenborg *et al.* (2014) <sup>152</sup>

HIF-1 et HIF-2 sont des facteurs de transcription basiques-hélice-boucle-hélice qui permettent aux cellules de survivre dans un environnement pauvre en oxygène en régulant le métabolisme énergétique, le remodelage vasculaire, l'érythropoïèse, la prolifération cellulaire et l'apoptose. Dans la tumorigenèse, le rôle pathogène de l'hypoxie a été décrit depuis de nombreuses années. Dans la fibrogenèse, les études sont plus récentes et moins nombreuses mais sous entendent déjà l'implication majeure d'HIF-1 $\alpha$  dans les processus fibrosants. Dans les paragraphes

suivants, nous décrirons le rôle d'HIF-1 $\alpha$  dans les mécanismes de fibrogenèse dans différents modèles de fibrose.

## 2. HIF-1 $\alpha$ et fibrogenèse

### 2.1. Implication d'HIF- $\alpha$ dans la différenciation myofibroblastique

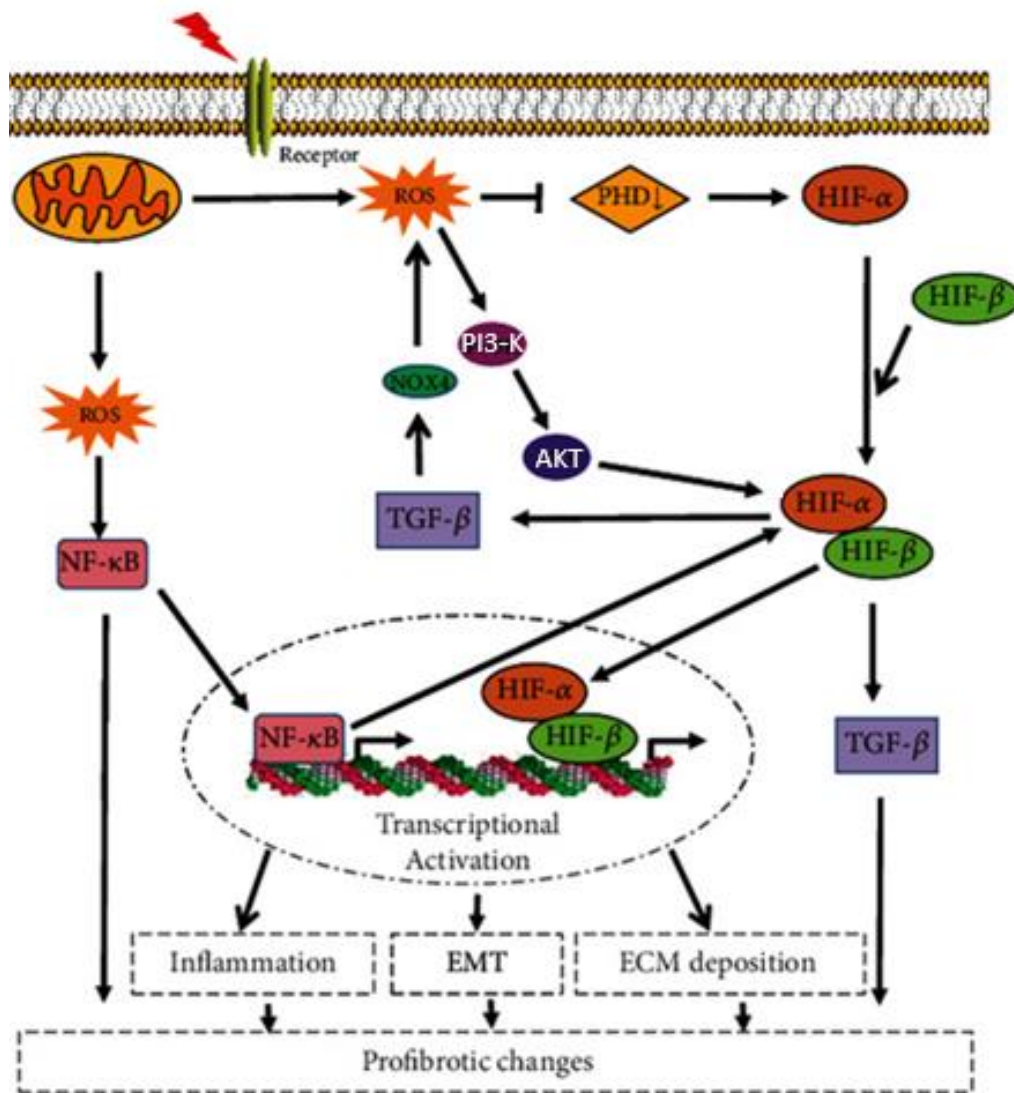
#### 2.1.i. La TEM

Plusieurs études portant sur la fibrogenèse ont mis en évidence qu'HIF-1 $\alpha$  était directement impliqué dans la TEM, mécanisme largement décrit dans la fibrose. En effet, dans la fibrose pulmonaire, Zhou *et al.* ont mis en évidence que l'hypoxie induisait l'expression d' $\alpha$ -SMA, de la vimentine et diminuait l'expression d'E-cadhérine de cellules épithéliales alvéolaires (AEC) transformées et primaires chez l'homme, le rat et la souris <sup>155</sup>. Epstein Shochet *et al.*, dans un système de matrice conditionnée permettant l'étude de l'interaction matrice-fibroblaste, montrent également que la surexpression d'HIF-1 $\alpha$  induit l'augmentation des protéines PAI-1, VEGF-A et TIMP 1. Dans ce système, HIF1 $\alpha$  permet également aux fibroblastes pulmonaires humains primaires dérivés de patients atteints de FPI, de produire des composés de la matrice extracellulaire permettant la propagation des cellules pathogènes au sein des cellules physiologiques <sup>156</sup>. Dans cette étude, il a été montré que le nintédanib diminuait la régulation à la hausse de HIF1 $\alpha$ . Uzunhan *et al.* démontrent que l'expression des facteurs de transcription pilotant la TEM tels que SNAIL1, ZEB1 et TWIST1, l'expression de l'ARNm du TGF- $\beta$ 1 et la sécrétion de TGF- $\beta$ 1 actif en milieu apical, ainsi que l'expression du facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF), sont augmentées en conditions hypoxiques <sup>157</sup>. Dans un modèle murin de fibrose induite à la bléomycine, Guo *et al.* confirment que l'hypoxie induit la TEM dans les alvéoles distales par la voie hypoxie-HIF-1 $\alpha$ -ZEB1 et favorise la différenciation des cellules épithéliales pulmonaires en fibroblastes par phosphorylation des protéines p38 MAPK et Erk1/2 <sup>158</sup>. Zhu *et al.*, montrent qu'*in vitro*, la délétion transitoire d'HIF-1 $\alpha$  par un siARN dans un modèle de fibrose induite au paraquat (PQ), un puissant herbicide, diminue la TEM via les voies Snail et  $\beta$ -caténine <sup>159</sup>. Dans un modèle de fibrose hépatique, l'exposition d'hépatocytes à des faibles concentrations d'oxygène (conditions d'hypoxie avec 1% d'O<sub>2</sub>) augmentait également l'expression de marqueurs de la TEM comme celle des protéines  $\alpha$ -SMA, vimentine, et FSP-1 (pour fibroblast-specific protein en anglais) tandis que l'expression d'E-cadhérine et de zona occludens-1 (ZO-1) étaient diminuées <sup>160</sup>. Dans la fibrose rénale cette fois-ci, l'activation du HIF favorisait également la transition épithéliale-mésenchymateuse (TEM) et la fibrogenèse rénale <sup>161</sup>. En effet, chez des patients atteints d'insuffisance rénale chronique, ils démontrent

que l'expression rénale d'HIF-1 $\alpha$  est associée à une lésion tubulo-interstitielle augmentée <sup>162</sup>. *In vivo*, l'utilisation d'un système Cre-loxP permettant l'inactivation d'HIF-1 $\alpha$  dans un modèle d'obstruction urétérale unilatérale (OUU), a permis d'inhiber le développement de la fibrose tubulo-interstitielle dans les reins OUU, de diminuer le dépôt de collagène interstitiel, de diminuer l'infiltration des cellules inflammatoires et de réduire l'expression de la protéine spécifique des fibroblastes FSP-1 caractéristique de la TEM des cellules interstitielles rénales <sup>162</sup>. Cependant, dans un second modèle murin de néphropathie obstructive inductible par le tamoxifène, la délétion globale d'HIF-1 $\alpha$  atténuait le dépôt interstitiel de collagène uniquement les premiers jours suggérant ainsi, que les mécanismes profibrogéniques dépendant d'HIF-1 $\alpha$  interviennent au début de la fibrose rénale et régressent avec la progression du modèle murin OUU<sup>163</sup>. Ensemble, ces données suggèrent que l'hypoxie exerce une régulation majeure sur la transition épithélio-mésenchymateuse dans la fibrogenèse.

### 2.1.ii. La voie des ROS

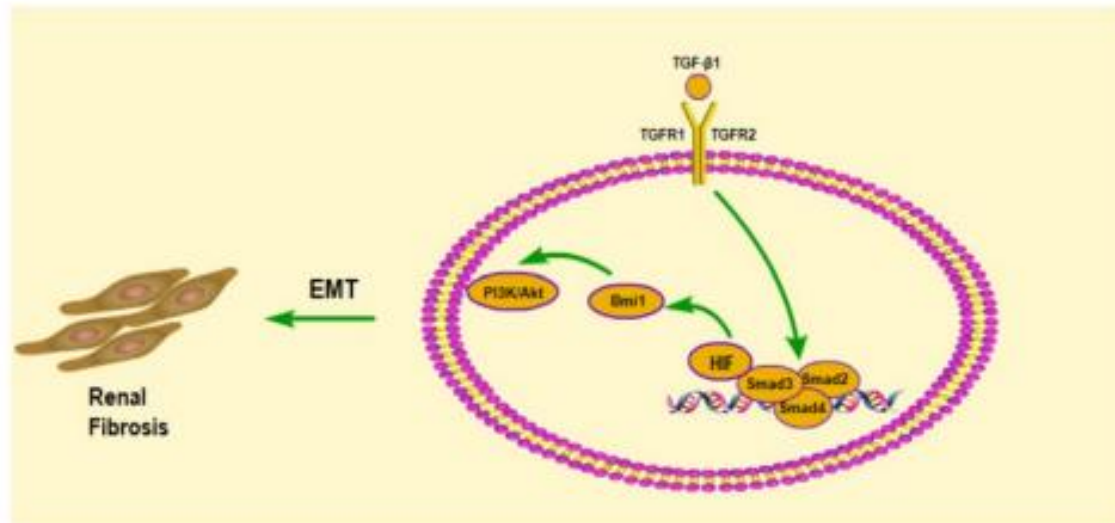
Selon différentes études, l'activation de HIF-1 $\alpha$  pourrait être le fruit du stress oxydatif produisant des radicaux libres (ROS) induit suite à une lésion. Dans la fibrose rénale, il a été montré que les ROS régulent l'expression et l'activité de HIF-1 $\alpha$  en inhibant l'expression des protéines contenant le domaine prolyl hydroxylase (PHD) et limitant ainsi sa dégradation proteosomale. De cette façon, HIF-1 $\alpha$  induit l'expression de la phosphoinositide 3-kinase (PI-3K) à l'origine de l'activation de la voie profibrosante AKT <sup>164</sup> (Figure 14). Haase *et al.* montrent que l'inhibition pharmacologique des PHD mime les effets de l'ablation génétique de HIF-1 sur la motilité cellulaire *in vitro* et sur la fibrogenèse *in vivo*, suggérant alors que les PHD sont des médiateurs importants de la signalisation HIF profibrotique (Figure 14) <sup>165</sup>. Une autre étude mentionne que la régulation des facteurs de transcription Twist et Bmi1 par HIF-1 $\alpha$  favoriserait la phosphorylation de PI3K et l'activation de cette voie. Bmi1 semble donc jouer un rôle crucial dans la TEM médiée par HIF-1 $\alpha$  et le développement ultérieur de la fibrose rénale <sup>166</sup> (Figure 15). Dans la FP, Zhou *et al.* démontrent que l'ajout d'un « piègeur » de ROS, l'Euk-134, abolit l'induction de la TEM par l'hypoxie. L'utilisation d'un modèle cellulaire Rho(0) déficient en mitochondrie, limite également cette TEM et confirme donc le mécanisme ROS-dépendant de l'hypoxie. Le même constat était établi dans un modèle murin de FP induit par la bléomycine, où Xiong, Gille et Haine *et al.* montraient que, l'hypoxie intermittente (provoquée par l'apnée obstructive du sommeil) augmentait le stress oxydatif et l'inflammation via les voies ROS/HIF-1 $\alpha$  et aggravait ainsi la FP <sup>167-169</sup>.



**Figure 14. Contribution du stress oxydatif aux modifications profibrotiques médiées par HIF-1 au cours des lésions rénales.** En conditions de stress (hypoxie ou inflammation), l'augmentation des ROS inhibe l'activité des PHD, ce qui provoque l'inhibition de l'hydroxylation et l'hydrolyse d'HIF- $\alpha$ . L'accumulation de ROS active la signalisation NF- $\kappa$ B et favorise ainsi l'expression de HIF- $\alpha$ . HIF- $\alpha$  se stabilise et se dimérise avec HIF- $\beta$  avant d'être transloqué dans le noyau et d'induire la transcription de gènes profibrosants. HIF-1 peut également favoriser l'apoptose et conduire à la libération de médiateurs inflammatoires tels que l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ , aggravant l'hypoxie et le stress oxydatif. HIF-1 favorise la TEM et le dépôt de MEC pour médier les changements profibrotiques via divers régulateurs transcriptionnels et facteurs fibrogéniques. L'accumulation de HIF-1 augmente également l'expression du TGF- $\beta$  qui favorise l'expression génique de Nox4 NADPH oxydase ou active la NADPH oxydase et génère à nouveau des ROS. La boucle s'autorégule et favorise ainsi la fibrose rénale. HIF-1 peut également réguler l'expression de divers microARN comme miR217, miR23a et miR-21, inhibant la formation de ROS et favorisant le développement de la fibrose via l'activation de la signalisation PI-3K.

### 2.1.iii. La voie du TGF-β1

L'hypoxie semblerait également promouvoir la voie du TGF-β1, largement impliquée dans la fibrose. En effet, Zhou *et al.* ont montré que l'expression du TGF-β1 promu par l'hypoxie, pouvait être abolie par un inhibiteur du récepteur au TGF-β1, le SB431542 et pouvait ainsi diminuer la TEM des cellules épithéliales alvéolaires dans un modèle de FP <sup>155</sup>. Sur des hépatocytes déficients en HIF-1β et prétraités avec le SB431542, la fibrose hépatique induite par HIF-1α était reversée <sup>160</sup>. *In vivo*, sur des souris déficientes pour HIF-1α, l'expression de FSP-1, marqueur mésenchymateux, était également diminuée. Le TGF-β1 induirait donc la transition des hépatocytes vers les cellules mésenchymateuses productrices de collagène via HIF-1α (Figure 15) <sup>170</sup>. Ces altérations morphologiques et moléculaires à l'origine de la fibrose hépatique sont donc les mêmes que celles observées dans la FP. Dans une autre étude réalisée *in vivo* dans un modèle de cicatrisation hypertrophique et de sclérodémie, un antagoniste du TGF-β1, le CD109 a été caractérisé. Ce dernier diminuerait la production de MEC et la réponse fibrotique en conditions hypoxiques <sup>171</sup>. Cet inhibiteur pourrait être un inhibiteur de choix dans la FP.



**Figure 15.** Les voies de signalisation profibrotiques classiques TGF-β/Smad3 et PI3K/AKT médient la fibrose rénale grâce à HIF. D'après Wei *et al.* (2020) <sup>166</sup>

### 2.1.iiii Le stress du RE

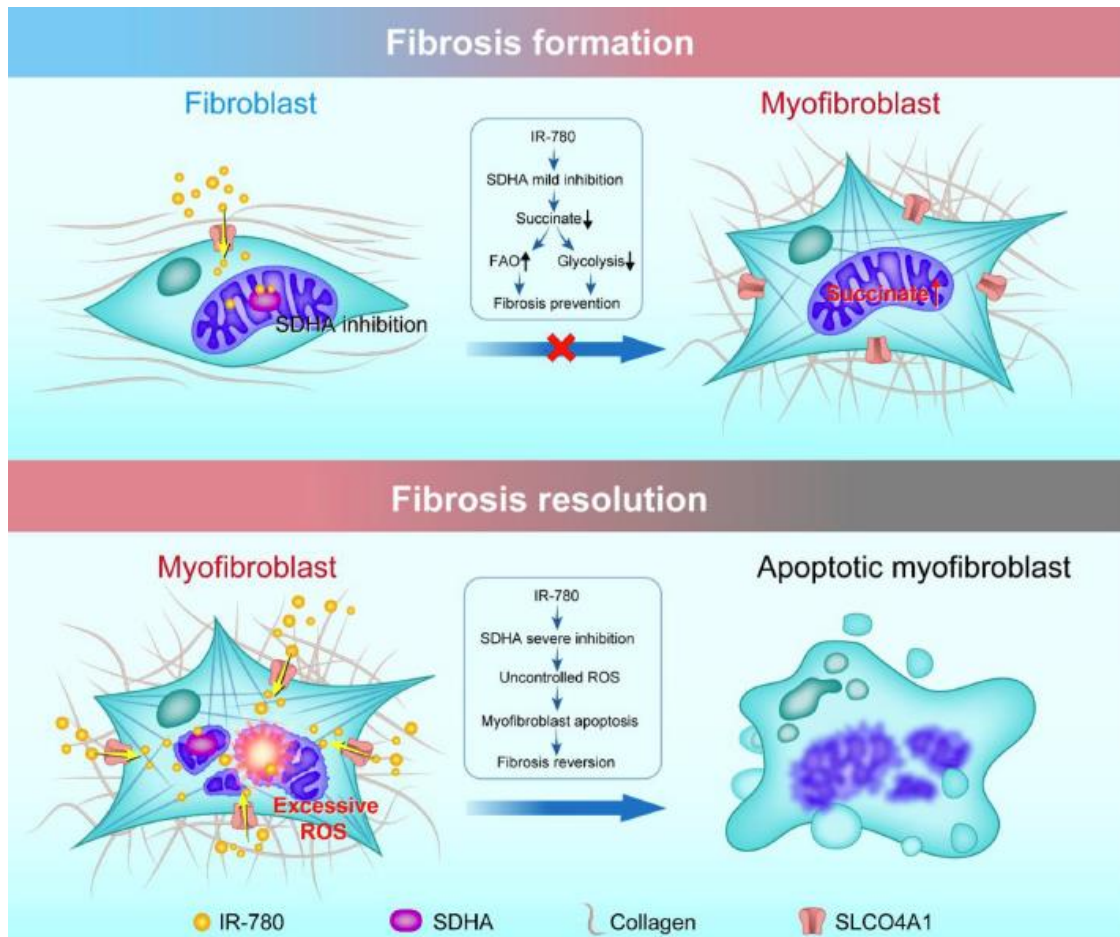
Une étude menée dans des modèles *ex vivo*, *in vivo* et *in vitro* par Delbrel et son équipe, a mis en évidence que le microenvironnement hypoxique alvéolaire (par le biais d'HIF-1α) générant un stress du réticulum endoplasmique (RE) et l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires médiée par la protéine homologue C/EBP (CHOP) <sup>172</sup>. Dans le cadre d'une hypoxie

intermittente, l'administration d'un inhibiteur du stress du RE, le TUDCA, un acide biliaire hydrophile utilisé dans le cadre de troubles hépatiques, a permis de prévenir l'augmentation des protéines de stress du RE Grp78 et CHOP et de diminuer l'apoptose accrue des cellules du tissu pulmonaire<sup>173</sup>. Dès lors, cibler HIF-1 $\alpha$  dans le but de limiter l'apoptose des cellules alvéolaires et l'activation des protéines de stress du RE pourrait permettre de limiter la fibrose et d'accroître les cibles thérapeutiques dans le FPI.

## 2.2. Implication d'HIF- $\alpha$ dans la reprogrammation métabolique

Depuis plusieurs années, de nombreux processus ont été associés au développement de la FPI<sup>174</sup>. Les études portant sur la dérégulation du métabolisme cellulaire dans la FPI sont plus récentes. Dans une première étude, il a été démontré que dans la fibrose, un changement métabolique cellulaire s'opérait au même titre que dans la cancérogenèse. Une étude menée par Xie *et al.* a permis de montrer que la reprogrammation glycolytique participait bien à la pathogenèse de la fibrose pulmonaire<sup>175</sup>. En effet, il a été observé une augmentation précoce de la glycolyse qui était maintenue au cours de la différenciation des myofibroblastes et promu par l'augmentation d'enzymes glycolytiques critiques, comme la 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3 (PFKFB3). L'inhibition de la glycolyse par le PFKFB3-3PO diminuait la différenciation des fibroblastes pulmonaires en myofibroblastes et atténuait les phénotypes profibrotiques dans les myofibroblastes isolés des poumons de patients atteints de FPI. Enfin, l'inhibition de la glycolyse par le PFKFB3-3PO démontrait également une inhibition de la transition mésenchymateuse dans la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine et le TGF- $\beta$ 1 chez la souris. Dans une autre étude sur la fibrose pulmonaire induite *in vivo* par la bléomycine, il a été montré dans les fibroblastes du poumon fibreux, une augmentation de la glycolyse et une diminution de la beta oxydation des acides gras (FAO). En effet, il a été constaté que la stabilisation d'HIF-1 $\alpha$  induisait une accumulation importante de succinate dans les tissus pulmonaires fibrotiques et les myofibroblastes suite à un fonctionnement inversé de la succinate déshydrogénase (SDH), enzyme clé de la bêta-oxydation des acides gras. Ce changement métabolique favoriserait le développement de la fibrose pulmonaire. Une molécule de ciblage, l'IR-780, a permis de cibler et d'inhiber la sous-unité A de la succinate déshydrogénase (SDHA) dans les fibroblastes afin de prévenir la formation de fibrose et les éventuels dysfonctionnements respiratoires. Aussi, l'inhibition via l'IR-780 dans les myofibroblastes, contribuerait à la formation excessive de ROS initiant leur apoptose et améliorant ainsi la fibrose pulmonaire induite *in vivo* (Figure 16). Ensemble, ces

données soutiennent le concept de reprogrammation glycolytique dans la pathogenèse de la fibrose pulmonaire <sup>176</sup> et permettent d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le traitement des troubles fibrotiques, tels que la FPI <sup>177</sup>.



**Figure 16.** Stratégie de ciblage de la succinate déshydrogénase dans les fibroblastes par l'IR-780 pour prévenir la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine. La régulation à la hausse de la glycolyse et la régulation à la baisse de la FAO contribuent à la formation de la fibrose pulmonaire. Ce processus est causé par une accumulation importante de succinate dans les fibroblastes. L'IR-780, cible et induit une légère inhibition de la sous-unité A de la succinate déshydrogénase (SDHA) dans les fibroblastes normaux et inhibe ainsi, la SDH induite par le TGF- $\beta$ 1 et l'élévation du succinate. Ce processus permet de prévenir la formation de fibrose et un dysfonctionnement respiratoire. En outre, il a été démontré qu'une meilleure rétention cellulaire de l'IR-780 médiée partiellement par SLCO4A1, favorisait une inhibition sévère de la SDHA dans les myfibroblastes contribuant ainsi à la génération excessive de ROS. De plus, cette inhibition de la SDHA induit l'apoptose des myfibroblastes. D'après Wang *et al.* (2021) <sup>177</sup>

### 2.3. Implication d'HIF- $\alpha$ dans l'angiogenèse

Dans une étude très récente, Mao Jing *et al.* ont mis en évidence que l'hypoxie induisait la transformation interstitielle des cellules endothéliales microvasculaires via la signalisation HIF-1 $\alpha$ /VEGF dans la sclérose systémique (SSc), une autre PID fibrosante <sup>178,179</sup>. En effet, une

analyse protéomique préalable à mis en évidence une surexpression d'HIF-1 $\alpha$  dans les échantillons de patients atteints de SSc. De plus, comparativement au groupe témoin, l'étude a montré sur coupes histologiques, une régulation positive pour  $\alpha$ -SMA, HIF-1 $\alpha$  et VEGF-A dans les tissus cutanés des patients atteints de SSc. *In vitro*, les cellules HMEC-1 cultivées en conditions hypoxiques ont montré une diminution significative de l'expression de CD31 et de la VE-cadhérine (marqueurs de cellules endothéliales), ainsi qu'une augmentation marquée de l'expression de l' $\alpha$ -SMA, de la fibronectine, d'HIF-1 $\alpha$  et de VEGF-A<sup>178</sup>. Aussi, l'inhibition de HIF-1 $\alpha$  par le tamoxifène a permis de diminuer l'induction hypoxique du VEGF-A et d' $\alpha$ -SMA sans restaurer l'expression de CD31. D'autre part, le bevacizumab, un inhibiteur du VEGF-A, a eu le même effet que le tamoxifène sur l'expression d' $\alpha$ -SMA et du CD31 mais n'a pas permis de réduire le HIF-1 $\alpha$ . Dans ces pathologies fibrosantes, le ciblage d'HIF-1 $\alpha$  constitue également un enjeu clinique majeur. Dans la FP, Barratt *et al.* montrent que l'hypoxie pourrait potentialiser le rôle du VEGF et de ses récepteurs, puissant facteur angiogénique nécessaire au remodelage des voies respiratoires<sup>180</sup>.

#### 2.4. Implication d'HIF- $\alpha$ dans l'inflammation

L'immunité innée et la réponse hypoxique sont liées via la transcription de HIF-1 $\alpha$ <sup>181</sup>. En effet, la réponse hypoxique et la réponse innée sont deux réponses déclenchées en cas de stress. L'une est contrôlée par le facteur de transcription inductible par l'hypoxie-1 (HIF-1) tandis que l'autre est régulée par plusieurs facteurs de transcription, parmi lesquels NF- $\kappa$ B joue un rôle central. Son activation est contrôlée par les kinases I $\kappa$ B (IKK) dont la principale est IKK-bêta. IKK-bêta est modérément activée dans les cultures de cellules hypoxiques. *In vitro*, il a été montré qu'HIF-1 $\alpha$  régule NF- $\kappa$ B et HIF-1 $\alpha$  réprime l'expression génique dépendante d'NF- $\kappa$ B<sup>182</sup>. La diminution d'HIF-1 $\alpha$  améliore la réponse NF- $\kappa$ B et empêche les réponses pro-inflammatoires excessives et dommageables des différents types cellulaires comme les macrophages, les neutrophiles et les cellules B et T<sup>183</sup>. Enfin, dans un modèle murin de fibrose induite à la bléomycine et exposé à l'hypoxie intermittente chronique, Braun *et al.* que comparativement à un groupe témoin, la compliance pulmonaire est réduite, la production de ROS est augmentée, la voie NF- $\kappa$ B est activée et l'expression ARNm de l'interleukine 17 (IL-17) et du collagène de type I (Coll1 $\alpha$ 1) est augmentée<sup>184</sup>. Ces résultats suggèrent donc qu'à la suite d'une lésion pulmonaire, les voies oxydatives mais également inflammatoires sont activées par HIF-1 $\alpha$ . Dans la sarcoïdose pulmonaire, une autre PID fibrosante<sup>179</sup>, Jeny *et al.* ont montré que l'hypoxie favorisait un phénotype mixte de macrophages inflammatoires et fibrotiques. En

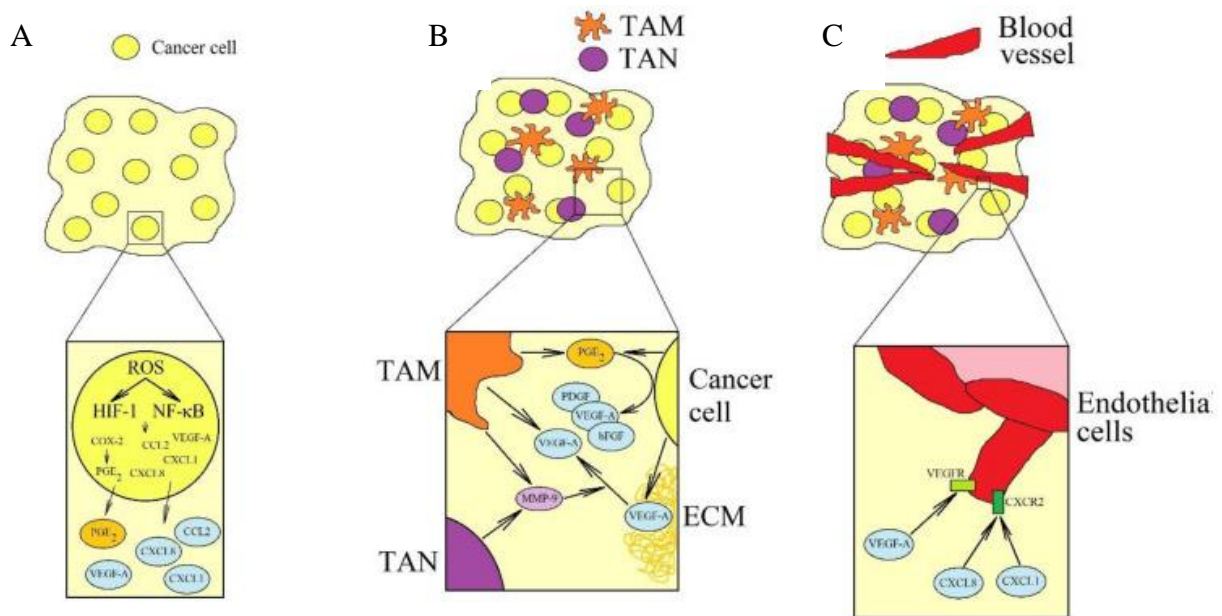


effet, comparativement au groupe témoin et sur macrophages dérivés de monocytes, l'hypoxie augmente significativement l'activité d'HIF-1 $\alpha$ , favorise leur réponse pro-inflammatoire via la production de TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  sans activer la voie NF- $\kappa$ B et favorise leur réponse profibrotique via la sécrétion de TGF- $\beta$ 1 et PDGF<sup>179</sup>. Sur des biopsies pulmonaires de patients atteints de sarcoïdose, HIF-1 $\alpha$  et PAI-1 étaient également augmentés. Par conséquent, l'hypoxie pourrait promouvoir la fibrose en favorisant la réponse des cytokines profibrotiques et en séquestrant les fibroblastes au voisinage des granulomes. Enfin, l'hypoxie pourrait jouer un rôle important dans la pathogenèse de la sarcoïdose en augmentant la réponse pro-inflammatoire des macrophages et en réduisant la présentation de l'antigène entraînant une réponse déficiente des lymphocytes T.

Dans un modèle de cellules épithéliales bronchiques humaines primaires et immortalisées (BEAS-2B), il a été montré que la stimulation inflammatoire par des cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-4 et IL-1 $\beta$ ) et l'hypoxie, activent en coopération HIF-1 $\alpha$  via les voies PI3K et NF- $\kappa$ B<sup>185,186</sup>. L'inhibition respective de ces deux voies a permis de contrer l'activation d'HIF-1 $\alpha$ . Cette étude met donc en évidence l'impact direct de ces cytokines inflammatoires sur la signalisation HIF par le biais de sa régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle. D'après Acosta-Iborra *et al.*, il existerait également un lien entre HIF-1 $\alpha$  et IFN- $\gamma$  à l'origine d'une modulation fonctionnelle (production en cytokine, présentation aux antigènes, activité phagocytaire) des macrophages hypoxiques<sup>187</sup>. Aussi, l'expression de TLR4 (impliqué dans la voie NF- $\kappa$ B) dans les macrophages était régulée par HIF-1 $\alpha$  en réponse au stress hypoxique<sup>188</sup>.

L'hypoxie et l'inflammation sont souvent des caractéristiques communes du microenvironnement tissulaire d'un large éventail de maladies inflammatoires<sup>186</sup> comme la fibrose ou le cancer. Dans le développement de tumeurs, l'activation prolongée d'HIF-1 $\alpha$  en conditions inflammatoires contribue à la survie de tissus et de cellules endommagées<sup>189</sup>. Dans des tumeurs malignes, l'inflammation chronique du cancer est provoquée par l'hypoxie (HIF-1) et le facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) qui induisent des modifications de l'expression des gènes<sup>190</sup>. Parmi les mécanismes de l'inflammation on retrouve, la synthèse de ROS, la synthèse des espèces réactives de l'azote (RNS) via l'oxyde nitrique synthase, l'acétylation de HIF-1 et l'action des cascades MAPK. Dans l'étude, Korbecki *et al.* ont mis en évidence les effets de l'alternance cyclique entre hypoxie et normoxie sur le microenvironnement tumoral. En effet, l'hypoxie provoque la surexpression de VEGF-A, CCL2/MCP-1, CXCL1/GRO- $\alpha$ , CXCL8/IL-8 et COX-2 avec PGE2. Ces facteurs induisent l'angiogenèse et recrutent différentes cellules

dans la niche tumorale, dont les neutrophiles et les monocytes. Dans la tumeur, les monocytes seront transformés en neutrophiles associés aux tumeurs (TAN) et en macrophages associés aux tumeurs (TAM) qui participent à la tumorigénèse (Figure 17).



**Figure 17.** Effet de l'hypoxie cyclique sur l'angiogenèse dans le cancer. L'hypoxie cyclique active HIF-1 et NF- $\kappa$ B dans la cellule tumorale. (A) Cela conduit à une production accrue de VEGF-A, CCL2/MCP-1, CXCL1/GRO- $\alpha$ , CXCL8/IL-8 et PGE2. (B) CCL2 / MCP-1, CXCL1 / GRO- $\alpha$  et CXCL8 / IL-8 induit le recrutement de TAM et TAN dans la niche tumorale. Ces cellules acquièrent des propriétés pro-angiogéniques, pro-tumorales et pro-fibrosantes. Les TAN sécrètent MMP-9 dans le microenvironnement tumoral, tandis que les TAM sécrètent MMP-9 et VEGF-A. La MMP-9 est une métalloprotéinase qui libère le VEGF-A. La PGE2 augmente également l'expression des facteurs proangiogéniques. (C) VEGF-A, CCL2/MCP-1, CXCL1/GRO- $\alpha$  et CXCL8/IL-8 induisent l'angiogenèse de la tumeur.

Dans une seconde étude menée par Nam *et al.*, il a été montré une seconde fois qu'HIF-1 $\alpha$  induit par le facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) favorisait la croissance tumorale gastrique via la voie NF- $\kappa$ B/HIF-1 $\alpha$ /VEGF permettant ainsi d'améliorer l'angiogenèse.

Comme à nouveau évoqué ci-dessus, les mécanismes décrits dans le cancer étant sensiblement les mêmes que ceux impliqués dans la fibrose pulmonaire idiopathique, l'élargissement au domaine pulmonaire, des méthodes de suivi, de pronostics et de prédiction actuellement utilisées en oncologie, pourrait nous permettre de suivre la pathogenèse et constitue un enjeu clinique majeur dans le traitement de la FPI.

### 3. HIF comme outil diagnostic, pronostic et prédictif de la FPI

#### 3.1. Signatures pronostiques caractéristiques dans la FPI en conditions hypoxiques

Les patients atteints de FPI présentent des tableaux cliniques, pronostics et des réponses au traitement très variables d'un patient à un autre. A l'heure actuelle, les biomarqueurs de pronostic dans la FPI font défaut pour anticiper une prise en charge thérapeutique personnalisée. A ce titre, certaines études s'intéressent à l'établissement de signatures cellulaires et génétiques caractéristiques de la pathologie. Parmi elles, une étude réalisée par Li *et al.* a permis d'établir une signature immunitaire en condition hypoxique capable de prédire le pronostic de survie des patients <sup>191</sup>. En effet, les patients présentant une forte réponse immune sous l'effet d'une forte stimulation hypoxique (activation massive des lymphocytes T CD8+, des lymphocytes activés CD4+, des lymphocytes T mémoire, des lymphocytes NK, des mastocytes activés et des macrophages de type M1 et M0) avaient un pronostic de survie plus sombre. Une récente étude transcriptomique réalisée sur des cellules de lavage bronchoalvéolaire de patients, a permis d'identifier cinq gènes, dont HS3ST1, WFDC2, SPP1, TFPI et CDC42EP2 comme étant liés à l'inflammation et à l'hypoxie et pouvant permettre de prédire les résultats cliniques chez les patients atteints de FPI <sup>192</sup>. L'hypoxie induit donc l'activation immunitaire ainsi que l'inflammation chronique des voies respiratoires et conduit à la fibrose. Puis, le dysfonctionnement cellulaire et organique provoqué par la fibrose, aggrave la formation d'un microenvironnement inflammatoire hypoxique et l'ensemble se régule sous l'action d'une boucle de rétroaction. Ces signatures pourraient permettre d'évaluer le pronostic individuel de chaque patient et d'adapter les thérapeutiques dans le but d'un accès à une médecine personnalisée des patients atteints de FPI. Cependant, cette méthode très invasive d'évaluation dans les lavages bronchoalvéolaire est particulièrement inadaptée voir contre-indiquée chez des patients atteints de FPI, souvent pluri pathologiques et âgés.

Dans le cancer du poumon ou bien la fibrose pulmonaire idiopathique, les réponses adaptatives à l'hypoxie sont directement impliquées dans la pathogenèse. Les facteurs inductibles par l'hypoxie (HIF) sont des régulateurs principaux de cette adaptation <sup>193</sup>. Aussi, comme évoqué précédemment, de récentes études indiquent que de nombreux aspects du métabolisme des lipides sont modifiés pendant l'hypoxie <sup>194</sup>. En effet, au sein du microenvironnement tumoral, les cellules tumorales dialoguent avec les cellules inflammatoires et ensemble, elles modulent le métabolisme, l'inflammation et la progression de la tumeur <sup>195</sup>.

Tous ces processus médiés par HIF étant similaires à ceux observés dans la FPI, les outils thérapeutiques préconisés dans le cadre de cancer pourraient être utilisés dans le traitement et le suivi de la progression de la FPI.

#### **4. L'examen HRCT : un outil diagnostique et pronostique**

L'examen de tomodensitométrie à haute résolution (HRCT) est un outil d'évaluation de la fibrose pulmonaire. En effet, la réalisation d'HRCT thoraciques couplés à des tests de fonction pulmonaire permettent une analyse CT quantitative des zones en nid d'abeille dans la fibrose pulmonaire<sup>196</sup>. Cette méthode d'évaluation est largement utilisée afin de diagnostiquer la FPI. En effet, l'expertise des apparences typiques de la FPI en tomodensitométrie à haute résolution (HRCT) est souvent suffisante pour établir un diagnostic sûr de la FPI sans nécessité de biopsie chirurgicale. Aussi, l'examen HRCT peut fournir des informations pronostiques importantes dans la FPI malgré l'hétérogénéité de l'atteinte<sup>197</sup>. En effet, une nouvelle ligne directrice clinique pour la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) utilise des profils HRCT à des fins de diagnostics poussés. Dans une étude réalisée par Kwon *et al.* ils ont cherché à déterminer si ces schémas HRCT pouvaient être utilisés afin de prédire les modifications de la fonction pulmonaire et la survie chez les patients atteints de FPI<sup>198</sup>. Les patients ont été classés selon les critères de diagnostic de la FPI de 2018. Trois groupes ont été constitués suite à la lecture HRCT : 48,4% des patients présentaient une pneumonie interstitielle habituelle (PUI), 32,6% des patients présentaient une PUI probable, 9,8% des patients présentaient un tableau indéterminé pour la PUI et 9,2% des patients présentaient un diagnostic alternatif. Le groupe dont la PUI était indéterminée a montré une fonction pulmonaire et une capacité d'exercice plus élevées et un meilleur pronostic que les autres groupes. Ils ont également présenté une diminution de la fonction pulmonaire moindre que les autres groupes au cours du suivi. Cependant, le groupe PUI probable présentait des altérations de la fonction pulmonaire et un pronostic de survie similaire aux autres groupes PUI. Ces résultats suggèrent qu'un modèle indéterminé de PUI sur HRCT prédit une évolution clinique plus favorable (risque réduit de décès ou de transplantation pulmonaire)<sup>199</sup> chez les patients atteints de FPI et a confirmé la validité des nouvelles directives de diagnostic de la FPI via l'examen HRCT.

Plus récemment, un autre essai réalisé entre 2011 et 2021 a inclus 39 patients atteints de FPI dans le but de suivre leurs paramètres cliniques suite à la prise d'anti-fibrotique. En supplément des classiques tests de fonction pulmonaire, l'examen HRCT a permis de mesurer l'épaisseur des tissus mous et d'évaluer le schéma HRCT au moment du diagnostic. Dans cette étude,

l'examen HRCT a permis de montrer que chez les patients atteints de FPI et traités avec des agents anti-fibrotiques, l'épaisseur des tissus mous au niveau de la 9<sup>e</sup> côte droite visible sur la radiographie thoracique et la capacité résiduelle fonctionnelle (CRF) (qui se définit comme le volume d'air présent dans les poumons à la fin de l'expiration passive) peuvent être de nouveaux prédicteurs de la mortalité liée à la FPI <sup>200</sup>.

Enfin, l'évaluation du rapport entre le volume pulmonaire normalement atténué sur l'HRCT et le volume pulmonaire total (somme de la capacité vitale et du volume résiduel) pourrait permettre de prédire la mortalité de la FPI. Dans l'étude menée par Ohkubo *et al* <sup>201</sup>, le volume pulmonaire total était bien un facteur pronostique de la progression de la FPI et contribue à faire de l'HRCT une méthode utile de « stratification » dans la FPI. Dans toutes ces études, l'identification précise des modèles sur l'imagerie est essentielle dans le processus de diagnostic multidisciplinaire et évite souvent la nécessité d'une biopsie pulmonaire chirurgicale <sup>202,203</sup>.

Pour autant, cette méthode d'analyse ne permet pas d'anticiper la progression de la pathologie ou bien d'adapter les thérapeutiques de façon personnalisée à chaque patient. A ce titre, la tomographie à émission de positrons (PET) comme outil de suivi de l'évolution de la FPI pourrait être un outil prometteur.

## **5. La tomographie à émission de positrons : un outil prédictif**

Dans la fibrose, des modifications métaboliques lipidiques ont été observées au même titre qu'en cancérologie. A ce titre, l'utilisation du <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose (<sup>18</sup>F-FDG), un analogue du glucose détectable par imagerie TEP, utilisé en routine en cancérologie pour détecter l'activité métabolique accrue des tumeurs, a été étendue au suivi de la progression de la FPI. Le <sup>18</sup>F-FDG, pénètre dans les cellules par l'action de transporteurs membranaires ou il y subit une phosphorylation qui l'empêche d'emprunter la voie naturelle de la glycolyse et le piège dans la cellule. Le radio isotope nommé <sup>18</sup>F préalablement couplé au FDG s'accumule donc dans la cellule et permet une détection du tissu tumoral sous forme d'une hyperfixation. Dans la FPI, il a été montré par imagerie TEP que le <sup>18</sup>F-FDG était davantage accumulé dans les tissus fibreux comparativement à l'examen de poumons de patients sains <sup>204</sup>. Aussi, comparativement à un examen classique par HRCT, la TEP présentait l'avantage de mettre en évidence l'hétérogénéité de la FPI dans le poumon. En effet, dans l'étude, cet examen a permis de montrer des variations d'absorption du <sup>18</sup>F-FDG dans des zones de poumon des patients atteints de FPI, avant même qu'elles ne soient décelables sur examen HRCT. A ce titre,

l'analyse de texture de l'imagerie TEP-CT pulmonaire est une nouvelle approche dans l'étude des changements précoces de la FPI. Cet outil a aussi permis de différencier les nodules pulmonaires solitaires (SPN) bénins et malins, consécutifs à la FPI<sup>205</sup>. Dans une autre étude, il a été montré que le <sup>18</sup>F-FDG TEP/CT pouvait prédire une exacerbation aiguë de la FPI postopératoire<sup>206</sup>. L'exacerbation aiguë survenant chez 3 à 25% des patients atteints de FPI et entraînant le décès dans 7 à 23% des cas, l'intérêt de les prévenir grâce au <sup>18</sup>F-FDG est primordial. Yoon *et al.* montrent d'autre part que le <sup>18</sup>F-FDG permettrait d'évaluer la gravité de la maladie et le pronostic des patients atteints de FPI. Sur 89 patients d'âge moyens de 68.1 ans et atteints de FPI, les valeurs d'absorption standardisées (SUV pour Standardized uptake value en anglais) moyennes et maximales du <sup>18</sup>F-FDG ont été mesurées dans les zones fibrotiques. Chez les patients souffrant de FPI, tous les paramètres SUV étaient inversement corrélés avec la capacité vitale forcée et la capacité de diffusion du monoxyde de carbone (défini comme la capacité de transfert des gaz des alvéoles jusqu'aux globules rouges à travers les épithéliums ; cette constante est diminuée dans le cadre de la FPI)<sup>207</sup>. A l'inverse, tous les paramètres SUV étaient positivement corrélés avec le taux de protéine C-réactive (la CRP traduisant une inflammation) et l'index sexe-âge-physiologie. Dans une autre étude réalisée par Umeda *et al.*, 50 patients atteints de FPI ont subi des examens par TEP au <sup>18</sup>F-FDG à un temps précoce (60min) et à un temps tardif (180min) post-injection du radiotracer<sup>208</sup>. Les valeurs SUV standardisées ont été mesurées à chacun des deux temps et une valeur d'indice de rétention (RI-SUV) a été calculée à partir de la formule suivante :  $RI - SUV (\%) = \frac{SUV \text{ tardive} - SUV \text{ précoce}}{SUV \text{ précoce}} \times 100$ . Dans cette étude, un score RI-SUV plus élevé et un score plus élevé du score de fibrose (évalué par tomographie à haute résolution (HRCT)) prédisaient une survie sans progression plus courte. La médiane de survie sans progression des patients avec un score RI-SUV négatif était meilleure que celle des patients avec un score RI-SUV positif. Aussi, un RI-SUV plus élevé et une capacité vitale forcée plus faible prédisaient une survie globale plus courte. Enfin, un RI-SUV positif était un indicateur significatif de mortalité. Ces résultats permettent à nouveau d'envisager l'utilisation du <sup>18</sup>F-FDG à des fins pronostiques et prédictives dans la prise en charge de la FPI<sup>205</sup>.

Outre les mesures de SUV et de RI-SUV, d'autres paramètres sont évalués en TEP comme le MAV (maximum alveolar volume) qui se définit comme la somme du volume de réserve expiratoire et du volume résiduel et le TLG (total lesion glycolysis) qui se définit comme la glycolyse totale de la lésion calculée en multipliant la MAV par le facteur SUV.

Dans une étude récente, Justet *et al.* ont montré que la MAV et la TLG permettaient également de prédire la survie sans progression des patients souffrant de FPI <sup>209</sup>. En effet, les valeurs de SUV moyenne, SUV max, la MLV (metabolic lung volume) et la TLG étaient corrélées à la sévérité de l'atteinte pulmonaire mesurée par une diminution de la capacité vitale forcée (CVF), une diminution de la capacité de diffusion des poumons pour le monoxyde de carbone (DLCO) et une augmentation du score GAP (outil permettant d'estimer le risque de mortalité au cours de la FPI en fonction du genre, de l'âge et de la physiologie du patient). De plus, l'augmentation de la MLV et de la TLG étaient des facteurs prédictifs indépendants de décès ou de progression de la maladie au cours des 12 mois suivant la fin de la TEP. L'évaluation seule du SBR (ratio signal sur bruit de fond) correspondant au rapport entre la SUVmax et la SUVmin, permet également de prédire le risque accru de mortalité chez les patients atteints de FPI <sup>21</sup>. Ainsi, l'absorption pulmonaire du <sup>18</sup>F-FDG calculée sur différents paramètres, permet d'évaluer la sévérité de la FPI et permet de prédire la survie sans progression des patients atteints de FPI.

Dans une autre étude, la réponse métabolique précoce est évaluée par TEP scan au <sup>18</sup>F-FDG après traitements avec les médicaments antifibrotiques chez les patients atteints de FPI <sup>210</sup>. La pirféridone réduit significativement l'absorption pulmonaire de <sup>18</sup>F-FDG pendant la phase fibrotique dans un modèle murin de FPI (bléomycine). Cependant, chez l'homme, l'utilisation du <sup>18</sup>F-FDG afin d'évaluer la réponse précoce des patients atteints de FPI traités au nintédanib ou avec la pirféridone, semble présenter un intérêt limité <sup>210</sup>. En effet, les données précliniques obtenues chez la souris n'ont pas été confirmées chez les patients atteints de FPI 3 mois après le début du traitement antifibrotique.

Dans un modèle de pneumopathie interstitielle liée à la myopathie inflammatoire chronique (MII), grâce au <sup>18</sup>F-FDG, Liang *et al.* ont pu construire un modèle prédictif de la progression en PID de la pathologie. En effet, une SUV pulmonaire bilatérale élevée, des ganglions lymphatiques médiastinaux anormaux et une diminution du pourcentage de DLCO étaient significativement associés à la progression vers une PID des patients atteints de MII-PID. Le TEP scan est ici à nouveau décrit comme un outil prédictif de l'évolution de la pathologie.

Chez des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules de stade II et III, l'absorption du <sup>18</sup>F-FDG a été comparé à celle du <sup>18</sup>F-Fluoromisonidazole (<sup>18</sup>F-FMISO), un traceur TEP de l'hypoxie, afin d'identifier les sous-volumes intratumoraux à risque plus élevé de rechute après radiothérapie <sup>211</sup>. L'analyse basée sur le volume tumoral global montrait une

bonne superposition entre le signal du  $^{18}\text{F}$ -FDG et le  $^{18}\text{F}$ -FMISO pour toutes les méthodes de segmentation d'images, mais une faible corrélation entre la fixation tissulaire réelle du  $^{18}\text{F}$ -FDG et celle du  $^{18}\text{F}$ -FMISO dans le poumon. Dans une autre étude, les traceurs  $^{18}\text{F}$ -FDG et  $^{18}\text{F}$ -FMISO ont été utilisés pour évaluer précocement et de façon non invasive la radiosensibilité d'un traitement à l'irisquinone (IQ) dans un modèle de gliome. Les auteurs ont ainsi mis en évidence grâce à l'absorption du  $^{18}\text{F}$ -FDG et du  $^{18}\text{F}$ -FMISO, l'existence d'une corrélation significative avec l'expression de HIF-1 $\alpha$ . En effet, HIF-1 $\alpha$  était diminué suite à l'action de l'IQ<sup>212</sup>.

Comme en cancérologie, les traceurs d'hypoxie et/ou traceurs métaboliques en tomographie à émission de positrons, semblent être des outils prometteurs pour prédire l'évolution de la FPI mais également afin d'adapter les stratégies thérapeutiques en fonction de la réponse aux traitements.

### III. Les modèles animaux précliniques de fibrose pulmonaire

De nombreux modèles animaux ont été développés dans le but de modéliser au mieux, la fibrose pulmonaire idiopathique observée chez les patients. Parmi eux, on retrouve : l'administration intra-trachéale de bléomycine, l'injection de FITC, de silice, d'amiante, l'irradiation ou encore l'expression spécifique grâce à des vecteurs viraux (adénovirus). Chacun de ces modèles présente des avantages et des inconvénients décrits dans le tableau 4 (Tableau 7)<sup>213,214</sup>.

Modèle murin	Avantages	Inconvénients
Bléomycine (IT)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Très bien caractérisé</li> <li>- Plusieurs voies d'administration possible</li> <li>- Développement rapide (14-28 jours)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fibrose non homogène</li> <li>- régression de la fibrose sous 28 jours (si administration unique)</li> </ul>
Fluorescent isothiocyanate (FITC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Relativement reproductible et phénotype de fibrose persistante (jusqu'à 6 mois)</li> <li>- Développement rapide (14-28 jours)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Absence de motif de PIC et d'inflammation précédant la fibrose</li> </ul>
Silice	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Modèle proche des lésions pulmonaires chez l'Homme</li> <li>- Persistance des lésions</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Manque de reproductibilité</li> <li>- Difficile à administrer</li> <li>- Développement lent (12-16 semaines)</li> <li>- Absence de lésion caractéristique de PIC</li> </ul>



Amiante	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Modélisation de l'exposition à l'amiante chez l'Homme</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Développement lent (au moins 1 mois)</li> <li>- Injection IT unique qui conduit à une fibrose centrale et non une initiation pleurale de cette dernière</li> </ul>
Irradiation	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pertinence clinique de fibrose pulmonaire radio-induite</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Développement de la fibrose très lente (supérieur à 30 semaines)</li> <li>- Onéreux</li> </ul>
Vecteurs viraux	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Possibilité de surexpression d'une cytokine (ex : TGF-<math>\beta</math>1, IL-1<math>\beta</math>...) et d'observer les voies de signalisation <i>in vivo</i></li> <li>- Possibilité d'adapter le tropisme</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Adénovirus n'affecte que les cellules épithéliales</li> <li>- Très fort taux de cytokines peut comparable aux taux réels</li> </ul>

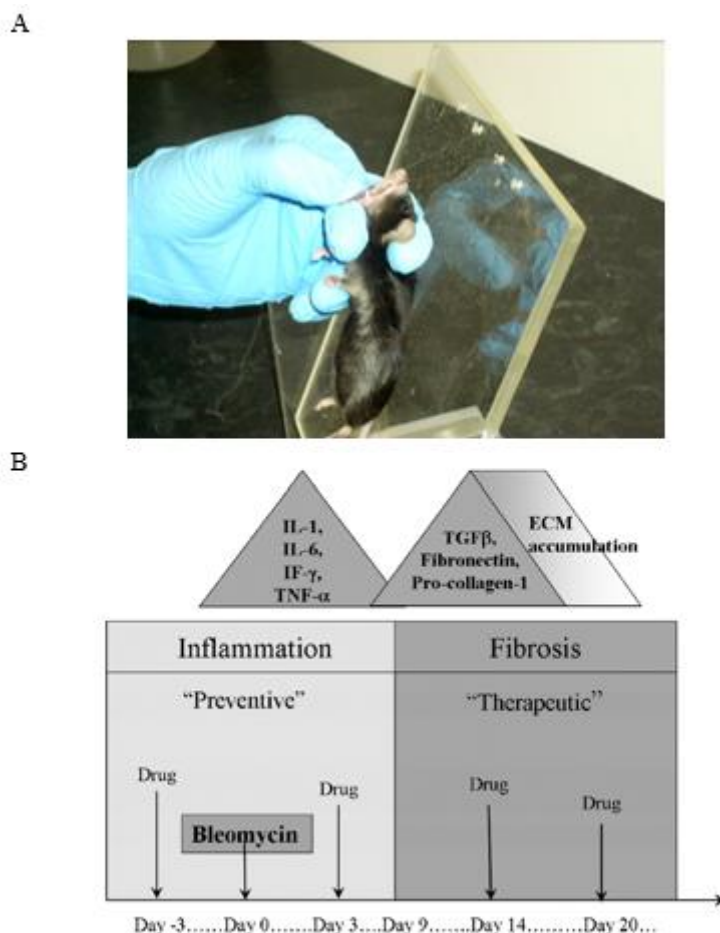
**Tableau 7. Tableau non exhaustif des modèles animaux de fibrose pulmonaire chez le rongeur décrivant les avantages et les inconvénients de chacun d'entre eux :** FPI : Fibrose Pulmonaire Idiopathique, PIC : Pneumopathie Interstitielle Commune, IT : IntraTrachéale, NOD : Non-Obese Diabetic, SCID : Severe Combined ImmunoDeficiency. Adapté de Tashiro *et al.* (2017)<sup>213</sup>, Moore *et al.* (2013)<sup>214</sup>

## 1. Modèle de fibrose pulmonaire induite par injection de bléomycine

La bléomycine est un agent antibiotique chimiothérapique utilisé dans le traitement de certains cancers tel que le lymphome et le cancer des testicules. Sa toxicité pulmonaire<sup>215</sup> limite son indication thérapeutique dans certains cas<sup>216</sup>. Chez l'homme, sa toxicité pulmonaire est dose-dépendante et associée à un taux de mortalité allant de 1 à 5%<sup>217</sup>. L'atteinte pulmonaire induite par la bléomycine présente des similitudes avec celle observée en cas de FPI avec notamment un départ sous-pleural de la fibrose<sup>218</sup>. Le mécanisme principal de la bléomycine est d'induire la mort cellulaire. A faible dose, elle induit des cassures doubles-brins et de nombreux dommages à l'ADN<sup>219</sup>. Le poumon et la peau sont particulièrement vulnérables aux effets de la bléomycine car ces tissus n'expriment pas ou peu, la bléomycine hydrolase, une enzyme capable de la dégrader<sup>220</sup>. Il a récemment été montré que l'utilisation d'une forme déglycosylée de la bléomycine limitait les effets tumoraux *in vivo* dans plusieurs modèles de cancer murins mais n'induisait pas le développement de la fibrose pulmonaire<sup>221</sup>.

Dans ce modèle de fibrose pulmonaire induite, la souche génétique des animaux a son importance. Les souris C57Bl/6J sont sensibles à la bléomycine<sup>222</sup> tandis que les souris BALB/c ou SV129 sont résistantes<sup>223</sup>. La bléomycine peut être administrée selon différentes voies : l'injection orotrachéale (nommée à tort intratrachéale (IT)), intrapéritonéale (IP), sous-cutanée (SC), intraveineuse (IV) et par voie inhalée (chambre d'inhalation). La voie IT est la voie la plus communément utilisée pour générer les lésions caractéristiques de la fibrose<sup>213</sup>. Le

modèle de fibrose pulmonaire induite par injection IT de bléomycine est bien caractérisé (Figure 18). La bléomycine induit d'importantes lésions de l'épithélium pulmonaire et la sécrétion de médiateurs inflammatoires tels que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, le TNF- $\alpha$  et l'IFN $\gamma$  dans les 7 jours suivants l'injection de bléomycine. A partir du 7<sup>ème</sup> jour, les facteurs pro-fibrosants tels que le TGF- $\beta$ 1 sont massivement sécrétés dans le tissu pulmonaire. Le pic de production des médiateurs pro-fibrosants se situe à 14 jours de l'injection. Au cours du développement, une production massive de MEC envahit les espaces alvéolaires avec une prédominance péri-bronchique et éventuellement sous pleurale<sup>224</sup>.



**Figure 18.** Mode opératoire et cinétique du développement de la fibrose pulmonaire induite via la voie intratrachéale (IT) par la bléomycine. (A) La souris est suspendue sur un fil par ses dents supérieures. La langue est tirée vers l'extérieur de sa bouche à l'aide d'une pince et l'insertion d'un otoscope permet l'injection de la bléomycine au-dessus des cordes vocales de l'animal. (B) L'injection IT de bléomycine à J0 induit de nombreuses lésions au niveau de l'épithélium pulmonaire à l'origine d'une phase inflammatoire s'étalant sur 7-9 jours. La phase inflammatoire est ensuite remplacée par une phase fibrosante caractérisée par l'expression du TGF- $\beta$ 1 et l'accumulation excessive de MEC jusqu'à une vingtaine de jours post-injection de bléomycine. D'après Moëller et al. (2008)<sup>224</sup>

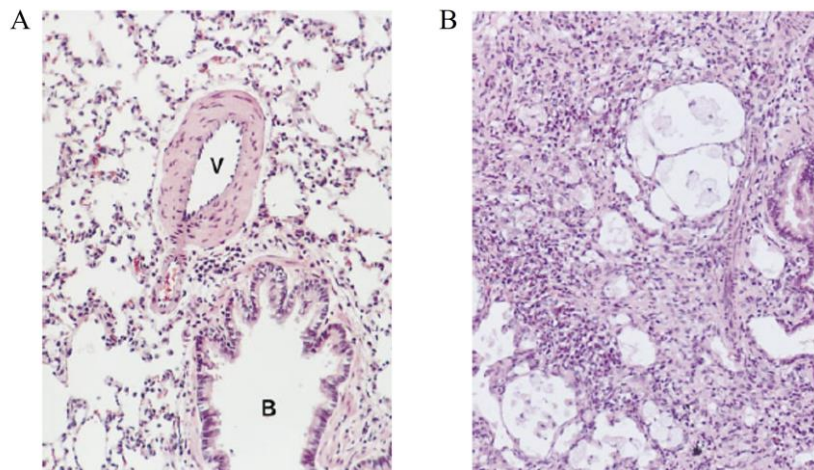
L'administration de molécules thérapeutiques pendant la phase inflammatoire peut permettre de conclure en faveur d'une activité préventive des composés. Cependant, l'administration des composés actifs au cours de cette période demeure controversée puisqu'elle permet de conclure sur les effets anti-inflammatoires et non antifibrosants des molécules <sup>213,225</sup>. Les équipes de recherche administrent plus classiquement les composés thérapeutiques au terme des 9 jours d'inflammation inhérente à l'injection de bléomycine <sup>225,226</sup>.

Bien que majoritairement utilisé jusqu'alors, ce modèle diffère de la FPI progressive, irréversible et initialement sous-pleurale <sup>227</sup>. En effet, la fibrose pulmonaire induite par cette administration est davantage bronchique et régresse à partir de 28 jours post-injection.

En 2010, Degryse *et al.*, suggèrent l'utilisation d'un modèle répété d'injections IT de bléomycine qui induirait des lésions plus proches histologiquement de celles de poumons de patients atteints de FPI. La fibrose induite serait aussi plus sévère et formerait dans le parenchyme, des structures ressemblant à des foyers fibroblastiques <sup>147</sup>.

## **2. Modèle de fibrose pulmonaire induite par transfert de gène du TGF- $\beta$ 1**

Ce modèle se base sur l'administration d'un adénovecteur qui induit une surexpression localisée d'un gène particulier. Dans le cas de la fibrose pulmonaire, plusieurs cytokines ont été ciblées : TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$ , IL-13 et TNF- $\alpha$  <sup>214</sup>. Le modèle de surexpression de TGF- $\beta$ 1 par injection d'un adénovirus (AdTGF- $\beta$ 1) nécessite l'utilisation d'un adénovirus codant pour la forme active du TGF- $\beta$ 1 (et non la forme latente) capable d'induire une fibrose pulmonaire. Dans ce modèle, l'administration de l'AdTGF- $\beta$ 1 est effectuée par voie IT à une dose de  $10^9$  PFU (*Plaque Formation Unit*) chez des rats. Il en résulte une accumulation cellulaire périvasculaire et péribronchique à 7 jours post-injection (J7) (Figure 19) qui s'étend dans le parenchyme et persiste 64 jours post-injection (Figure 19). Les auteurs ont aussi montré que la pluricellularité s'accompagnait d'un dépôt de MEC important dans le poumon et d'une augmentation de l'expression d' $\alpha$ -SMA, caractéristique de l'activation des myofibroblastes <sup>228</sup>. Ce modèle induit une fibrose pulmonaire progressive et sévère ainsi qu'une faible inflammation comparativement au modèle de fibrose induite par la bléomycine. Cette progression du modèle ne semble pas être imputable à l'administration de l'AdTGF- $\beta$ 1 car selon les auteurs, les taux de TGF- $\beta$ 1 reviennent à des taux basaux 14 jours après administration. Ce modèle confirme à nouveau le rôle central du TGF- $\beta$ 1 dans l'initiation de la fibrose pulmonaire.

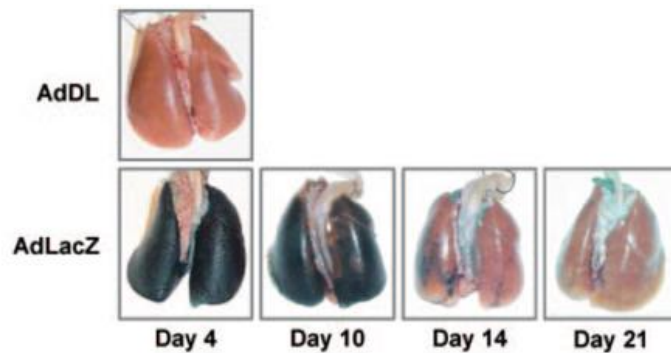


**Figure 19. Modèle de fibrose induite par injection d'adénovirus codant pour le TGF- $\beta$ 1.** (A) Observation de sections de poumons de rats 7 jours après injection intratrachéale (IT) d'un adénovirus codant pour le TGF- $\beta$ 1 actif (AdTGF- $\beta$ 1) et (B) 64 jours après injection. Marquage Hématoxyline & Eosine, grossissement x250. V : structure vasculaire, B : structure bronchique. D'après Sime et al. (1997)<sup>228</sup>

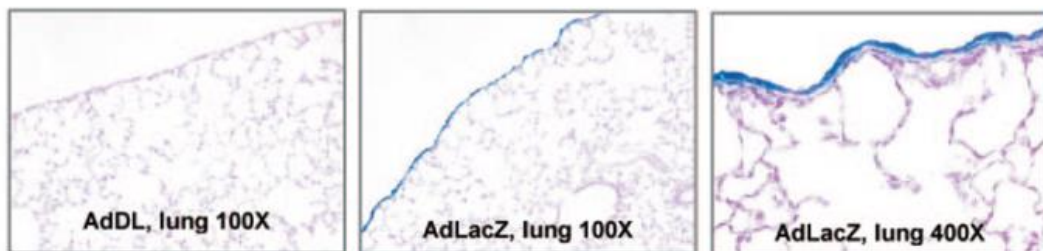
Ce modèle présente tout de même quelques limites. En effet, l'injection ne peut se pratiquer qu'en milieu confiné de niveau de sécurité biologique 2 et seules les personnes habilitées à manipuler ce type d'outil peuvent procéder à ces injections. De plus, les adénovecteurs utilisés possèdent un tropisme spécifique aux cellules épithéliales ce qui limite donc la surexpression du TGF- $\beta$ 1 à ce type cellulaire et ne reflète pas la réalité physiologique. Enfin, le niveau de surexpression du transgène induit lors de l'infection est bien supérieur au niveau d'expression physiologique observé en cas de fibrose<sup>214</sup>.

L'équipe du Pr. Bonniaud a développé des modèles de fibrose pleurale chez le rat et la souris<sup>229,230</sup>. L'objectif était d'induire une fibrose initiée dans la plèvre en administrant l'adénovirus codant pour le TGF- $\beta$ 1 entre les feuillets de la plèvre<sup>230</sup>. Cette injection se réalise dans le flanc droit au niveau du sixième espace intercostal. Pour valider le modèle, un adénovirus codant pour le gène LacZ a été utilisé. Ce gène code pour une enzyme nommée la  $\beta$ -galactosidase et dont l'ajout de son substrat provoque la formation d'un colorant bleu. La coloration du tissu pulmonaire pleural a ainsi permis de valider cette voie d'administration intrapleurale (Figure 20).

A



B



**Figure 20.** Validation du modèle d'injection intra-pleurale d'un vecteur adénoviral codant pour la  $\beta$ -galactosidase. (A) Photo de poumons de rats 4, 10, 14 et 21 jours après l'injection intra-pleurale de l'adénovirus contrôle (AdDL) ou codant pour la  $\beta$ -galactosidase (AdLacZ). (B) Coupe histologique de poumons de rats 4 jours après injection intra-pleurale de l'AdLacZ. Contre coloration : « Nuclear fast Red ». D'après Decologne *et al.* (2007)<sup>229</sup>

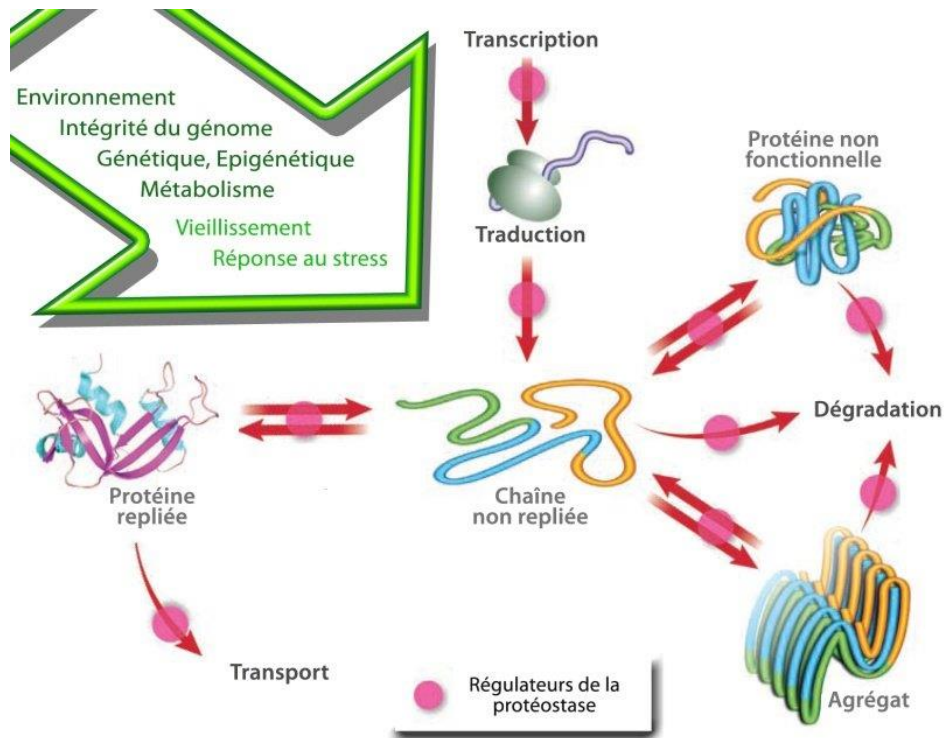
En remplaçant, l'AdLacZ par l'AdTGF- $\beta$ 1, les auteurs ont développé un modèle de surexpression pleurale du TGF- $\beta$ 1 et ainsi caractérisé l'évolution de la fibrose dans ces conditions expérimentales. La fibrose pleurale est progressive et se développe jusqu'à 64 jours post-administration de l'adénovirus. Ce modèle permet de mettre en évidence l'importance des cellules mésothéliales de la plèvre dans le développement de la fibrose.

## IV. Les protéines de chocs thermiques

### 1. Généralités

Les protéines de choc thermique ou *Heat Shock Protein* (HSP), aussi appelées protéines de stress, sont synthétisées par les cellules lors d'un stress cellulaire (choc thermique, stress oxydatif, UV, etc.) et sont exprimées de manière ubiquitaire. Chez les mammifères, les HSPs sont classées en fonction de leur poids moléculaire. On distingue les HSP de haut poids moléculaire (HSP110, HSP90, HSP70, HSP60 et HSP47) et celles de petit poids moléculaire, dites *small HSP* (sHSP), incluant HSPB1 ou HSP27 (dont l'homologue murin est HSP25) et HSPB5. Ces protéines induites lors d'un stress sont également exprimées de manière constitutive dans le but de maintenir l'homéostasie cellulaire<sup>231</sup>. Les facteurs de transcription impliqués dans cette induction sont appelés les HSF (*Heat Shock Factors*) qui se fixent sur les éléments de réponse génique appelés HSE (*Heat Shock Elements*)<sup>232</sup>.

Le rôle principal de ces protéines est d'aider à la bonne conformation des protéines néosynthétisées, mal repliées ou bien de les dégrader afin de prévenir leur agrégation, phénomène toxique pour la cellule. Pour se faire, elles collaborent avec le système protéasome/ubiquitine (*Ubiquitin-Proteasome System* ou UPS). En effet, si les HSP ne parviennent pas à restaurer la conformation fonctionnelle des protéines dénaturées, elles dirigent ces dernières vers le protéasome afin qu'elles y soient détruites. A ce titre, les HSP font parties des régulateurs de la protéostase cellulaire<sup>233</sup> définie comme étant l'ensemble des mécanismes régulant la production, le repliement, le transport et la dégradation des protéines dans la cellule afin de maintenir son homéostasie (Figure 21).



**Figure 21. Réseau de régulation de la protéostase.** Les régulateurs de la protéostase (ronds roses) interviennent à tous les niveaux du réseau régulant le repliement correct des protéines et la dégradation des espèces non natives. Ce réseau est influencé à une échelle supérieure par la réponse au stress et le vieillissement par exemple, eux-mêmes dépendants des propriétés intrinsèques de la cellule ou de l'organisme et de son environnement extérieur. Figure de Céline N. Martineau adaptée d'après Balch *et al.* (2008) <sup>234</sup>

Les HSP ont été largement étudiées dans le domaine de la cancérologie. Elles sont impliquées dans la résistance des cellules cancéreuses à la mort cellulaire induite par les agents cytotoxiques. Les recherches menées sur ces protéines visent à inhiber leur fonction de façon à sensibiliser à nouveau les cellules tumorales aux chimiothérapies.

Les HSP sont retrouvées au niveau cytosolique mais également au niveau extracellulaire où elles jouent le rôle de ligands de récepteurs membranaires et induisent des effets différents de leur homologue intracellulaire. L'étude des HSP extracellulaires suscite un intérêt croissant dans la théranostique, néologisme des termes thérapie et diagnostic.

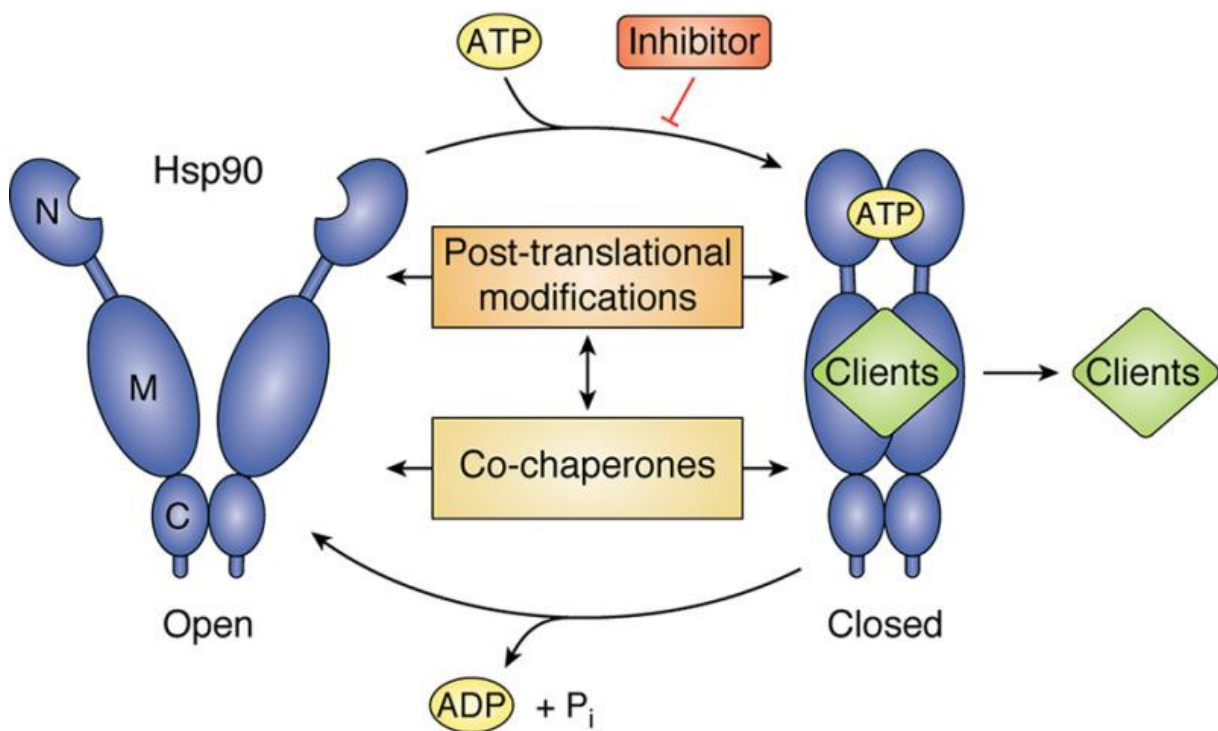
Dans ce chapitre, nous évoquerons uniquement les HSPs intracellulaires et extracellulaires impliquées dans la fibrose pulmonaire.

## 2. Les HSPs de haut poids moléculaire

### 2.1. HSP90

La famille des HSP90 est la plus abondante des HSP intracellulaire. Elle représente 1% du total des protéines retrouvées en conditions basales <sup>235</sup>. Elle se décline en isoformes majeures :

HSP90 $\alpha$  ou HSPC1 (forme majeure inductible) et HSP90 $\beta$  ou HSPC3 (forme mineure constitutive). Son analogue Gp96 (*Glycosylated protein 96*) est retrouvé dans le réticulum endoplasmique tandis que son analogue TRAP1 (*Tumor necrosis factor Receptor Associated Protein-1*) est situé dans la matrice mitochondriale <sup>236</sup>. HSP90 est une protéine ATP-dépendante. HSP90 est constituée de trois domaines : un domaine N-terminal sur lequel se lie l'ATP, un domaine central qui lui permet d'interagir avec des protéines clientes et un domaine C-terminal qui lui permet de se dimériser (Figure 22). HSP90 forme majoritairement des homodimères mais peut également être retrouvée sous forme d'hétérodimères. Un dimère d'HSP90 prend en charge une protéine cliente, la stabilise en la repliant puis la rend active suite à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP <sup>237</sup> (Figure 22).

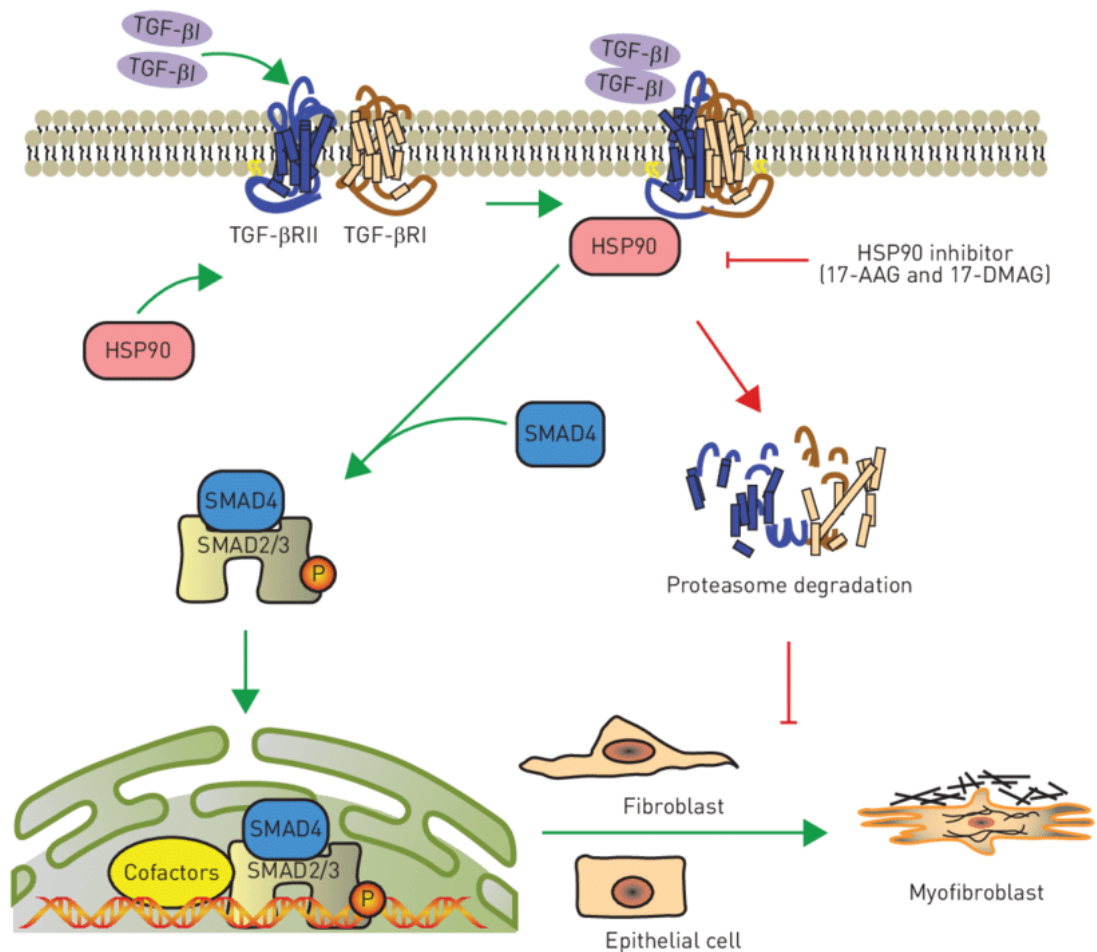


**Figure 22. Le cycle chaperon Hsp90.** Hsp90 commence son cycle chaperon dans une conformation ouverte dimérisée uniquement au niveau du domaine C. La liaison à l'ATP et une série de changements de conformation lui permettent d'adopter une conformation fermée, dimérisée en N-terminal. Lors de l'hydrolyse de l'ATP, Hsp90 revient à la conformation ouverte et commence un autre cycle chaperon. Les protéines clientes sont ainsi activées. Ce cycle est étroitement régulé par des protéines co-chaperonnes, des modifications post-traductionnelles et peut être inhibé par des inhibiteurs de Hsp90. D'après Backe *et al.* (2020) <sup>238</sup>

Dans le traitement du cancer, plusieurs molécules inhibitrices d'HSP90 ont déjà été identifiées. Par exemple, le 17AAG (17-(allylamino)-17-déméthoxygeldanamycine) empêche la fixation de molécules d'ATP sur le dimère d'HSP90 <sup>239</sup>. L'utilisation de tels inhibiteurs a permis d'améliorer la compréhension du rôle d'HSP90 dans la signalisation médiée par le TGF-



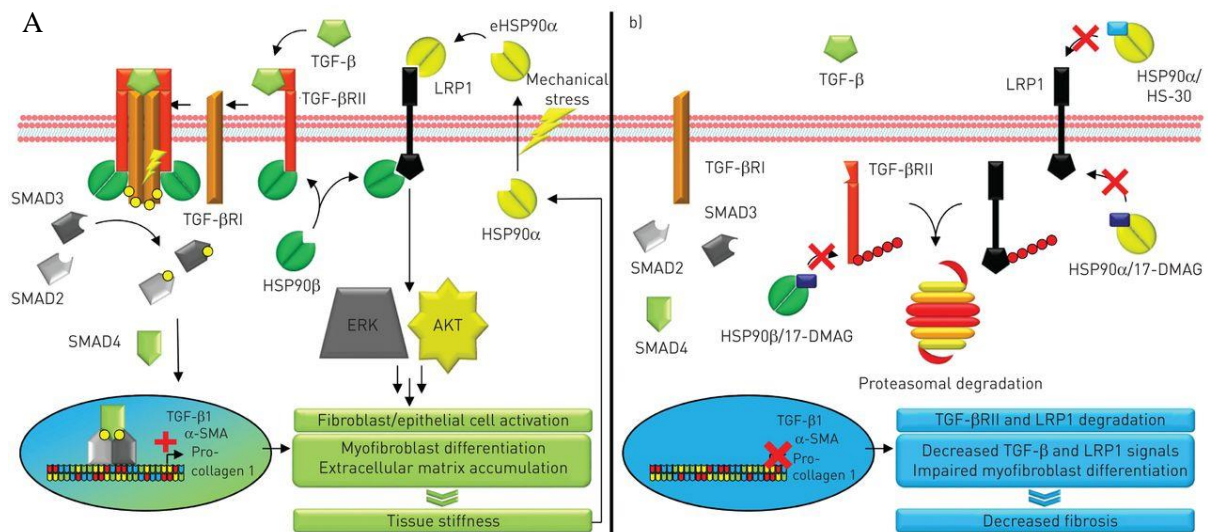
$\beta$ 1. Sontake *et al.* décrivent HSP90 comme un activateur potentiel de la transformation myofibroblastique et de la production de MEC. Ils montrent que le 17AAG limite le développement de la fibrose induite par la bléomycine chez la souris <sup>240</sup>. Une autre étude menée par Li *et al.* a permis de mettre en évidence que la myricétin, un flavonoïde d'origine végétale, interférait dans la liaison entre HSP90 $\beta$  et TGF- $\beta$ RII et empêchait ainsi l'activation des fibroblastes et la TEM dans un modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris <sup>241</sup>. Bellay *et al.* ont également montré qu'HSP90 était capable de se lier au TGF- $\beta$ RII et d'ainsi le protéger d'une dégradation protéosomale via son ubiquitinylation. Aussi, HSP90 serait capable de lier le récepteur aux glucocorticoïdes et de faciliter ainsi l'export nucléaire du facteur NF- $\kappa$ B profibrosant. Selon les auteurs, l'inhibition d'HSP90 par le 17-AAG pourrait permettre la séquestration du facteur NF- $\kappa$ B régulant ainsi négativement la voie du TGF- $\beta$ 1 et limitant la fibrogenèse <sup>242</sup>(Figure 23).



**Figure 23. Implication d’HSP90 dans la voie du TGF-β1.** Le (TGF)-β1 profibrotique se lie au récepteur II du TGF-β (TGF-βRII) et forme un complexe avec le TGF-βRI, qui est stabilisé par l’interaction HSP90. La kinase TGF-βRI activée phosphoryle Smad2/3, qui recrute ensuite Smad4 et se transloque dans le noyau pour initier l’expression de gènes fibrotiques. L’inhibition de HSP90 (par exemple avec la 17-allylamino-17-déméthoxygeldanamycine (17-AAG) ou la 17-diméthylaminoéthylamino-17-déméthoxygeldanamycine (17-DMAG)) empêche la formation de complexes HSP90/TGF-βR, et favorise ainsi la dégradation des TGF-βR par le protéasome. Cela met fin à la voie de signalisation TGF-β et bloque la transdifférenciation en myofibroblastes des fibroblastes ou des cellules épithéliales dans le poumon. D’après Sibinska *et al.* (2017) <sup>243</sup>

Concernant la sécrétion d’HSP90, elle a initialement été décrite au niveau de cellules cancéreuses en conséquence d’un stress cellulaire comme l’hypoxie ou encore la stimulation par des facteurs de croissance comme le TGF-α <sup>241,244</sup>. En 2017, Dong *et al.*, décrivent l’existence d’un anticorps monoclonal dirigé contre la forme extracellulaire d’HSP90 (eHSP90), le 1G6-D7, capable d’atténuer la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine en interférant avec la signalisation LRP1 (*Low density lipoprotein Receptor-related Protein 1*) Erk <sup>245</sup>. Cette étude suggère donc l’existence d’une signalisation eHSP90/LRP1. En 2018, Bellaye *et al.* montrent que l’on retrouve plus d’HSP90α circulant chez des patients atteints de FPI et que leur concentration dans le sérum corrèle avec la sévérité de la pathologie. De plus, ils

montrent une surexpression de cette protéine dans les LBA et sérum de rat atteints de fibrose pulmonaire induite par administration d'AdTGF- $\beta$ 1. Cette surexpression corrèle avec le niveau de collagène mesuré dans les poumons des animaux. De plus, ces travaux ont permis d'établir une corrélation directe entre HSP90 $\beta$  (forme intracellulaire) et LRP1, essentielle à la stabilisation de ce récepteur et favorisant ainsi la signalisation eHSP90 $\alpha$ /LRP1 qui promeut la différenciation myofibroblastique<sup>246</sup> (Figure 24).

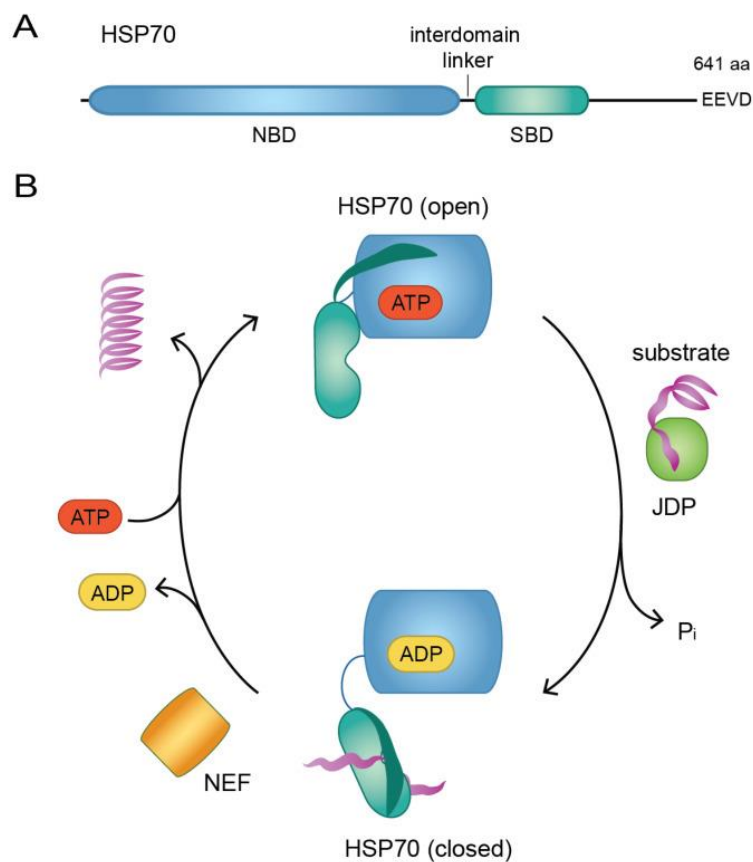


**Figure 24. L'inhibition de la protéine de choc thermique HSP90 entrave la signalisation profibrotique à plusieurs niveaux.** A) HSP90 $\beta$  stabilise le récepteur TGF- $\beta$  de type II (TGF- $\beta$ RII) favorisant la signalisation profibrotique du facteur de croissance transformant (TGF)- $\beta$ . HSP90 interfère également avec la dégradation du protéasome LRP1. La rigidité tissulaire induit la sécrétion de HSP90 $\alpha$  dans le milieu extracellulaire. HSP90 $\alpha$  extracellulaire interagit avec le récepteur LRP1 pour améliorer la différenciation des myofibroblastes et favoriser les voies profibrotiques. B) L'inhibition de HSP90 par des dérivés de geldanamycine (tels que 17-DMAG) interfère avec la stabilisation de TGF- $\beta$ RII et de LRP1 par HSP90 intracellulaire, déclenchant leur dégradation protéasomique et diminuant les signaux fibrotiques induits par TGF- $\beta$  et LRP1. De plus, l'inhibition spécifique de HSP90 $\alpha$  extracellulaire à l'aide de l'inhibiteur de HSP90 non perméable HS-30 bloque l'interaction de HSP90 $\alpha$  avec LRP1. D'après Bonniaud et al. (2018)<sup>247</sup>

## 2.2. HSP70

HSP70 est l'une des HSP les plus connues et son activité anti-apoptotique en fait une cible thérapeutique majeure dans le cancer<sup>248,249</sup>. Le système chaperon HSP70 est essentiel au remodelage des protéines dénaturées. Ce groupe d'HSP comporte un grand nombre d'isoformes les deux formes principales sont la forme constitutive HSC70 (*Heat Shock Cognate 71*) aussi appelée HSPA8 et la forme inductible HSP70 appelée aussi HSPA1A. Les membres de la famille HSP70 partagent une structure commune qui comprend : le domaine N-terminal NBD (*Nucleotide Binding Domain*), un domaine SBD $\beta$  (*Substrate Binding Domain*), un domaine en couvercle hélicoïdal (SBD $\alpha$ ) et une queue C-terminale de longueur variable (Figure 25)<sup>250</sup>.

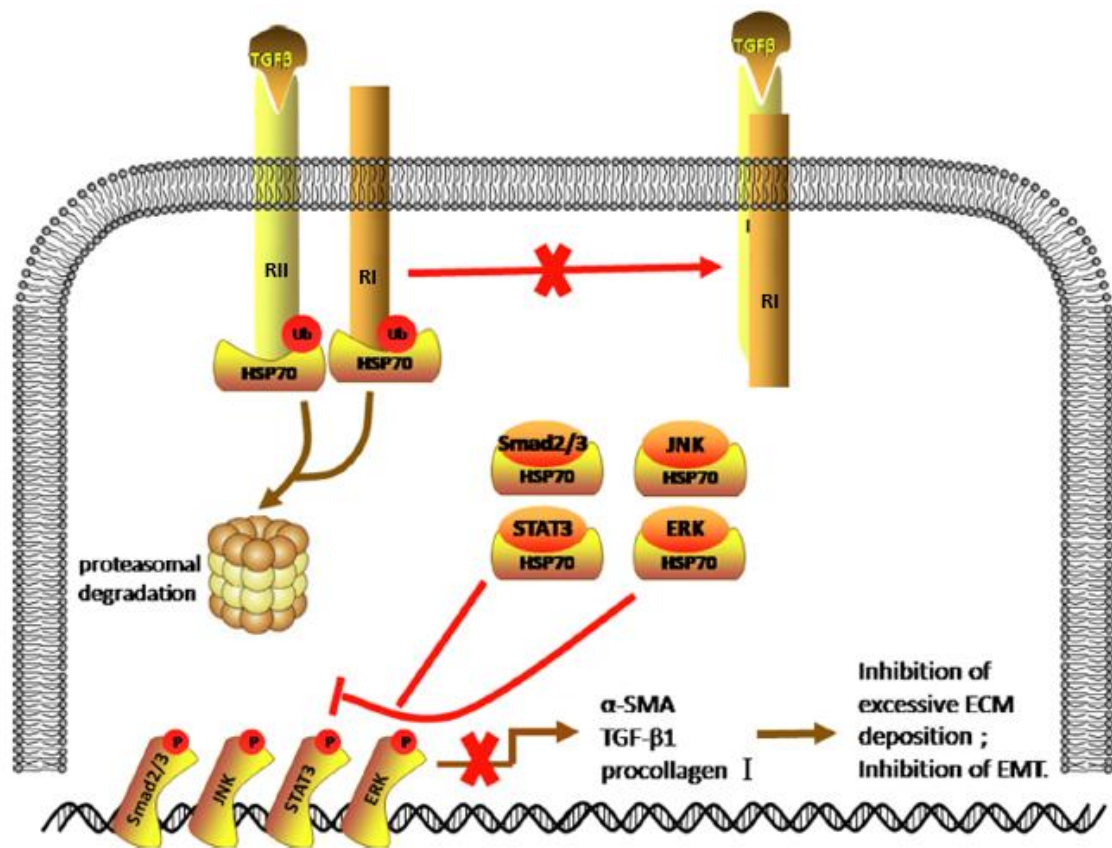
Les domaines SBD sont les domaines de liaison des protéines clientes. Cette fixation est ATP-dépendante. L'ATP lié permet à la protéine HSP70 d'adopter une conformation « ouverte » affine pour le substrat<sup>233</sup>. Cette conformation permet à la protéine de lier HSP40 afin de faciliter la fixation du substrat et l'hydrolyse de l'ATP<sup>251</sup>. La consommation d'une molécule d'ATP permet le repliement de la protéine native ou mal repliée. Le substrat est relargué grâce à l'intervention du facteur NEF (*Nuclear Exchange Factor*) qui correspond à HSP110<sup>251</sup> (Figure 25). La boucle se perpétue suite au nouveau recrutement d'une molécule d'ATP. L'action d'HSP70 est donc finement régulée par les chaperonnes HSP40 et HSP110.



**Figure 25. Le cycle de liaison/libération du substrat de HSP70.** (A) structure du domaine HSP70. NBD : domaine de liaison aux nucléotides, SBD : domaine de liaison au substrat, aa : acides aminés. (B) La conformation ouverte liée à l'ATP de HSP70 s'engage avec une protéine de domaine J (JDP) liée au substrat, ce qui provoque l'hydrolyse de l'ATP et le transfert du substrat à HSP70, ce qui le conduit à passer dans sa conformation fermée. Un facteur d'échange de nucléotides (NEF) médie la libération d'ADP, qui permet la liaison de l'ATP et entraîne l'ouverture de HSP70 et la libération ultérieure du substrat. D'après Abildgaard et al. (2020)<sup>252</sup>

A l'inverse d'HSP90, l'expression d'HSP70 est réduite dans le tissu pulmonaire des patients atteints de fibrose pulmonaire. HSP70 est décrite comme limitant la signalisation TGF- $\beta$ . En effet, dans une étude menée sur des souris KO pour HSP70, les souris présentaient une plus

grande sensibilité à la bléomycine <sup>253</sup>. Aussi, la Geranylgeranylacetone (GGA), un inducteur d'HSP70 a été décrit comme molécule protectrice contre la fibrose pulmonaire chez les animaux <sup>254</sup>. De manière intéressante, Yun *et al.*, ont montré en 2010 dans un modèle de fibrose rénale et dans des lignées cellulaires de poumon, que la geldanamycine (un inhibiteur d'HSP90) augmentait l'expression d'HSP70 et entraînait une diminution des récepteurs au TGF- $\beta$ 1 subissant une dégradation protéasomale <sup>255</sup>. De plus, HSP70 est capable de séquestrer Smad2 et Smad3, favorisant ainsi l'inhibition de la voie du TGF- $\beta$ 1 <sup>136,256</sup> (Figure 26).



**Figure 26.** Schéma du mécanisme de la surexpression de HSP70 inhibant la fibrose. En cas de surexpression, HSP70 se lie au TGF- $\beta$  RI et au TGF- $\beta$  RII pour soutenir leur ubiquitination et leur dégradation protéasomale. De plus, HSP70 entraînerait la séquestration de Smad2, Smad3, STAT3, ERK et JNK, puis restreindrait leur phosphorylation et leur translocation nucléaire, entraînant ainsi le blocage de leurs voies de signalisation en aval et donc la diminution de l'expression d' $\alpha$ -SMA, du collagène I et du TGF- $\beta$ 1. Cette inhibition limite l'accumulation de MEC et inhibe la TEM. En cas de faible niveau d'expression d'HSP70, la protéine n'interfère pas avec la signalisation du TGF- $\beta$ 1. D'après Zhang *et al.* (2021) <sup>257</sup>

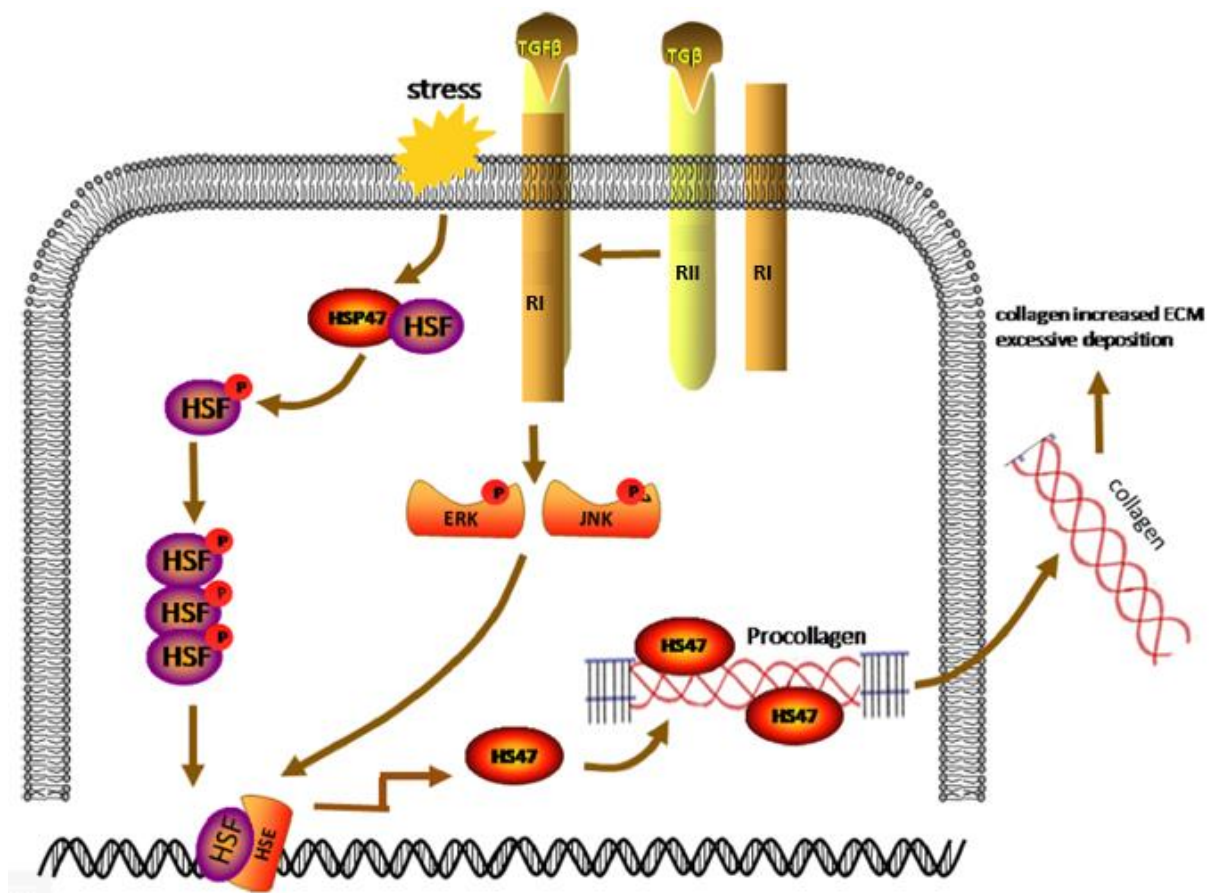
L'expression d'HSP70 a été mesurée dans plusieurs études via une mesure d'anticorps dirigés contre HSP70. Kahloon *et al.*, ont détecté une concentration élevée d'IgG anti-HSP70 dans le sérum de patients atteints de FPI en comparaison à des volontaires sains. Dans cette même étude, les auteurs montrent que l'augmentation de la mortalité et de la fréquence d'exacerbations aiguës est corrélée au niveau circulant d'IgG anti-HSP70 <sup>258</sup>. Cependant, Mills

*et al.* observent un niveau élevé d'eHSP70 dans le sérum de patients atteint de FPI mais ne montrent pas de différence de concentration entre ces patients et ceux du groupe comparatif atteints d'autres ILD <sup>259</sup>. González-Ramos *et al.*, montrent en 2013 que la protéine eHSP70 se lie aux récepteurs TLR4 et induit la production de TGF- $\beta$ 1 par les voies JNK et ERK <sup>260</sup>. En tant que médiateur extracellulaire, HSP70 pourrait favoriser le développement de la fibrose et son blocage spécifique dans ce compartiment, pourrait être bénéfique afin de limiter le développement de la maladie.

Néanmoins, les études méritent d'être poursuivies afin d'éclaircir le fonctionnement contradictoire d'eHSP70 dans les processus fibrosants.

### 2.3. HSP47

HSP47 (appelée aussi SERPINH1 ou encore gp46) est la protéine chaperonne la plus étudiée dans le processus de fibrogenèse puisqu'elle a pour seul substrat, le collagène. HSP47 est indispensable aux étapes finales de sa biosynthèse, elle assure le repliement des triples hélices de procollagène <sup>261</sup> (Figure 27) et son expression est corrélée à celle du collagène <sup>262</sup>. HSP47 a donc été particulièrement étudiée dans la recherche de thérapies anti-fibrosantes <sup>263</sup>. Sur un modèle de slices pulmonaires murines cultivées en présence de TGF- $\beta$ 1, l'inhibition d'HSP47 par siARN réduit la sécrétion de fibronectine sans moduler les autres aspects de la fibrogenèse (différenciation en myofibroblastes, sécrétion et dépôt de collagène)<sup>264</sup>.



**Figure 27.** Schéma du mécanisme de HSP47 dans la promotion de la fibrose. Les HSF se lient généralement à HSP47 sous forme de molécules inactives dans le cytosol. En conditions de stress, les HSF sont phosphorylés par des protéines kinases, forment des trimères et sont transloqués au noyau ou ils interagissent avec HSE pour augmenter l'expression de HSP47 dans le cytosol. HSP47 stabilise le procollagène, favorise la formation de la triple hélice de procollagène et aide à activer les cellules sécrétrices du collagène, conduisant à un dépôt excessif de MEC. De plus, le TGF- $\beta$  favorise l'expression d'HSP47 et la fibrose en régulant les voies de signalisation ERK et JNK. D'après Zhang *et al.* (2021) <sup>257</sup>

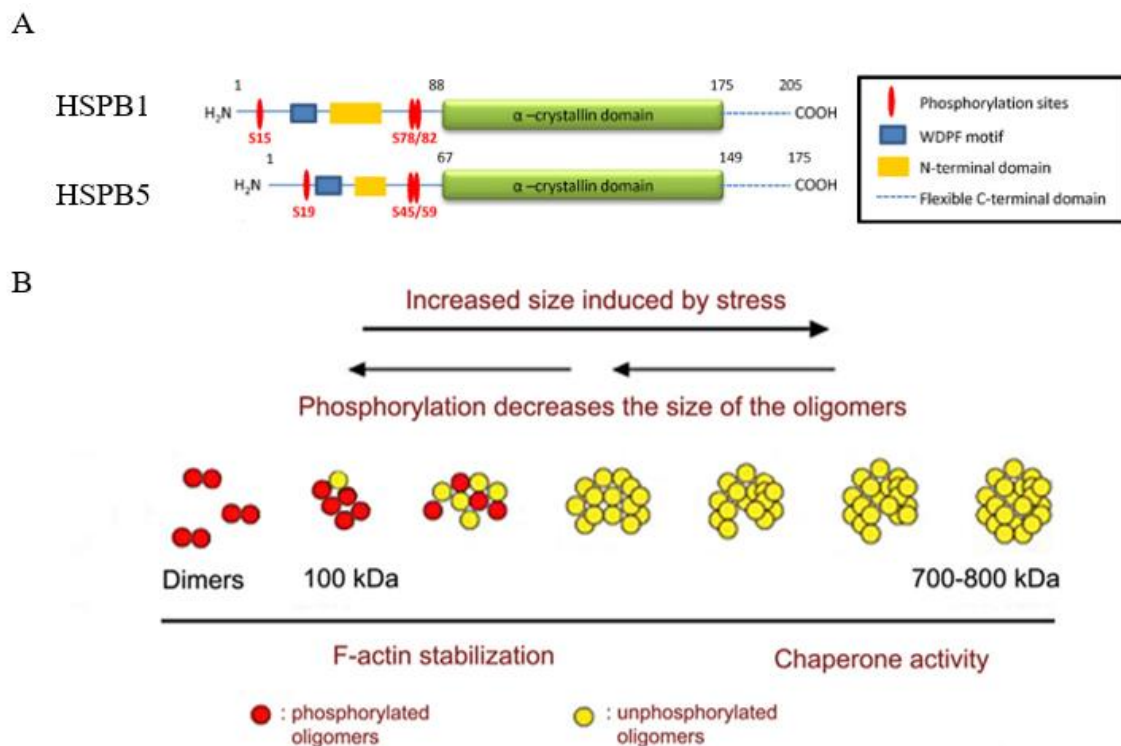
Dans le sérum de patients atteints de FPI, des études montrent une augmentation de la concentration d'HSP47 mais uniquement en cas d'exacerbation aiguë <sup>265</sup>. L'utilité diagnostique de la mesure d'HSP47 circulant en cas de FPI nécessite d'être précisée.

### 3. Les petites HSPs ou « Small HSPs »

#### 3.1. Structure

Les *small HSP* ou sHSP sont des protéines de faible poids moléculaire (entre 12-43 kDa) <sup>232</sup>. En revanche, elles peuvent s'oligomériser et former un complexe protéique supérieur à 800 kDa <sup>266</sup>. Cette famille compte 10 membres dont HSPB1 (HSP27), HSPB5 ( $\alpha$ B-crystallin), HSPB6 (HSP20) et HSPB8 (HSP22) sont les plus communément étudiées <sup>267</sup>. A l'inverse des HSPs de haut poids moléculaire, les petites HSP ne nécessitent pas d'ATP pour interagir avec

leur protéine cliente. Comme pour les HSP de haut poids moléculaire, le rôle principal des sHSP est d'éviter la formation d'agrégats protéiques létaux pour la cellule. Elles travaillent en étroite collaboration avec les HSP ATP-dépendantes pour, renaturer ou guider les protéines non fonctionnelles vers le protéasome en vue de leur dégradation. Les sHSP possèdent une structure primaire commune comptant 3 domaines: un domaine  $\alpha$ -crystallin conservé entre HSP27 et HSPB5, un domaine N-terminal et une courte queue C-terminale flexible <sup>268</sup>. HSP27 et  $\alpha$ B-crystallin, possèdent toutes les deux un domaine WPDF en région N-terminale, responsable de la formation des grands oligomères. Les deux protéines peuvent être phosphorylées sur des résidus sérine en position 15, 78 et 82 pour HSP27 et 19, 45 et 59 pour HSPB5 (Figure 28A). La phosphorylation régule l'oligomérisation de ces protéines (Figure 28B). Lors d'un stress, les gros oligomères non phosphorylés collaborent avec les chaperonnes ATP-dépendantes pour aider à la conformation fonctionnelle des protéines ou induire leur dégradation, tandis que les petits dimères/oligomères phosphorylés favorisent la polymérisation de l'actine et ont donc un rôle structural pour la cellule <sup>269</sup>.



**Figure 28. Domaines structuraux des protéines humaines HSPB1 et HSPB5.** (A) Représentation schématique des structures d'HSPB1 et d'HSPB5 indiquant le domaine N-terminal, le domaine C-terminal flexible, le domaine WPDF et le domaine cristallin ainsi que les sites de phosphorylation de la sérine (S). (B) la structure tridimensionnelle de la protéine est gouvernée par son état de phosphorylation. Les dimères et petits oligomères sont constitués en majorité de protéines phosphorylées alors que suite à un stress, les sHSP adoptent une structure



d'oligomères non-phosphorylés pouvant atteindre 800 kDa. Ces différents états suivent un équilibre dynamique au sein de la cellule. Adapté de Arrigo *et al.* <sup>269</sup>(2007) et de Acunzo *et al.* (2012) <sup>270</sup>

### 3.2. HSP27

HSP27 ou HSPB1 (HSP25 chez la souris) est très étudiée en cancérologie. En effet, il a été montré que cette protéine était surexprimée dans les tissus pulmonaires et le sérum de patients atteint d'un cancer bronchique non à petites cellules. Son expression est directement corrélée au mauvais pronostic des patients <sup>271</sup>. Dans le cancer ovarien, l'expression sérique d'HSP27 est augmentée et pourrait à ce titre, constituer un marqueur de la pathologie et de sa progression <sup>272</sup>. Lors d'un stress, des petits oligomères d'HSP27 favorisent la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  promouvant ainsi l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et donc l'expression de gènes impliqués dans la survie cellulaire <sup>273</sup>. Aussi, HSP27 favorise les métastases et la TEM <sup>274</sup> et semble à ce titre, être une cible intéressante dans la recherche de thérapies anti-cancéreuses <sup>275</sup>. Différentes molécules ont été identifiées dans le but de limiter ses effets délétères. Le RP101 ou brivuldine, un nucléoside capable d'inhiber les fonctions d'HSP27 en se fixant sur cette protéine a ainsi été identifié. Le RP101 limiterait ses capacités anti-apoptotiques en inhibant sa fixation sur les oncogènes comme Akt1, pro-caspase 3 et cytochrome C <sup>276</sup>. Dans un essai clinique de phase II testant l'association du RP101 au gemcitabine, les patients atteints d'un cancer pancréatique montraient une amélioration de survie de 2 mois comparativement aux patients contrôles ou aux patients traités uniquement par la gemcitabine <sup>277</sup>. Le xanthone, un autre composé utilisé en thérapies anti-cancéreuses était lui capable, d'induire une dimérisation anormale d'HSP27 <sup>278</sup> et de sensibiliser les cellules pathogènes à la radiothérapie dans des modèles murins de cancers bronchiques non à petites cellules <sup>275</sup>. Enfin, des aptamères peptidiques (PA), PA11 et PA50, ont été développés afin de se fixer à HSP27 et l'inhiber, de façon à induire l'apoptose cellulaire. La combinaison de ces aptamères peptidiques et de la radiothérapie a d'ailleurs montré une réduction significative du développement tumoral dans des modèles murins immunodéprimés <sup>279</sup>.

Dans la FPI, HSP27 est surexprimée et omniprésente dans les zones de prolifération myofibroblastique <sup>117,280</sup>. *In vitro*, la stimulation pro-fibrosante de cellules pulmonaires (épithéliales, mésothéliales, fibroblastes) augmente l'expression d'HSP27. HSP27 favorise la phosphorylation de ERK et de Smad3 ce qui contribue à potentialiser l'activation myofibroblastique <sup>281</sup>. *In vivo*, dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par radiothérapie, HSP27 était capable d'interagir avec I $\kappa$ B et d'ainsi potentialiser la voie NF- $\kappa$ B

stimulant la synthèse de facteurs pro-fibrosants <sup>282</sup>. Enfin, l'utilisation d'un oligonucléotide antisens (OGX-427) dirigé contre HSP27 a permis de limiter le développement de la fibrose dans un modèle de fibrose pulmonaire induite par administration d'AdTGF chez le rat. Dans cette étude Wettstein *et al.* imputent cet effet à la dégradation de Snail (un facteur de transcription impliqué dans la TEM) chaperonné par HSP27 <sup>117</sup>. L'essai SPRUCE, un essai clinique de phase II, montre que le traitement par Apatorsen (OGX-427) couplé au carboplatine et permetrexed, induit une légère amélioration de la survie sans progression des patients atteints de cancers bronchiques non à petites cellules de stade IV <sup>283</sup>.

Plusieurs travaux montrent qu'HSP27 peut être excrétée dans le compartiment extracellulaire. Dans un contexte d'ischémie cardiaque, HSP27 est décrit comme un motif moléculaire associé aux dangers (DAMP pour Damage Associated Molecular Pattern en anglais) ciblant les Toll-like récepteurs 2 et 4 (TLRs) et induisant ainsi une signalisation NF- $\kappa$ B <sup>284</sup>. *In vitro* sur des cellules endothéliales microvasculaires humaines, l'augmentation des concentrations d'HSP27 extracellulaire induit des effets pro-migratoires et pro-angiogéniques via l'activation de TLR3 <sup>285</sup>. De plus, HSP27 induit l'expression et la sécrétion d'IL-10 et de TNF- $\alpha$  par des monocytes humains en culture via une signalisation MAPK (p38) <sup>286</sup>. Sur une lignée cellulaire de monocytes cancéreux (THP-1), une étude montre qu'un traitement par HSP27 induit la sécrétion d'un grand nombre de cytokines pro- et anti-inflammatoires via encore une fois une signalisation NF- $\kappa$ B <sup>287</sup>. Dans le cancer du sein, Banerjee *et al.* (2010) décrivent que la concentration d'HSP27 est augmentée dans le sérum de patientes comparativement à des patients sains. Dans cette étude, HSP27 extracellulaire exercerait des effets pro- et anti-inflammatoires via la réduction de la production de cytokines Th1 (IFN- $\gamma$ ) et Th2 (IL-13) par les macrophages différenciés en présence d'HSP27 <sup>288</sup>. Une autre étude a montré la présence d'HSP27 dans des vésicules extracellulaires dérivées de cellules THP-1 (lignée leucémique monocyttaire humaine). Les auteurs montrent que les exosomes enrichis en HSP27 induisent la sécrétion d'IL-10 <sup>289</sup>.

Dans la FPI, le potentiel rôle d'HSP27 extracellulaire n'a pas encore été mis en évidence.

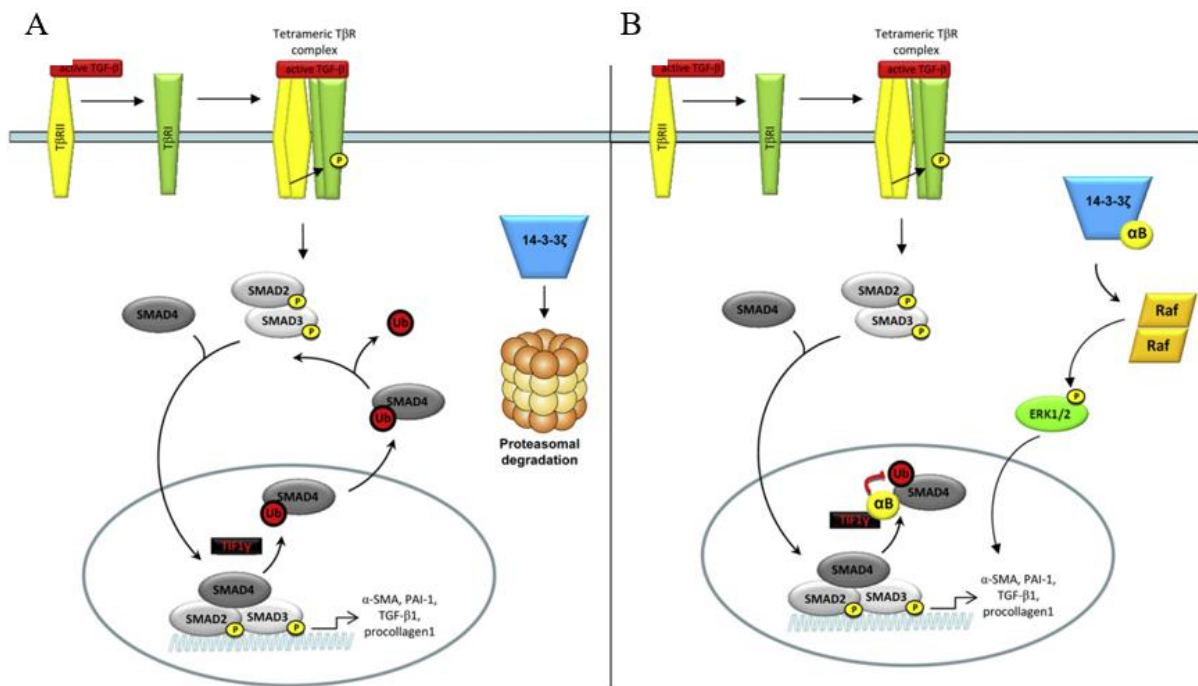
### **3.3. HSPB5 ( $\alpha$ B-crystallin)**

HSPB5 (ou  $\alpha$ B-crystallin) est une petite HSP présente dans de nombreux organes. Elle est omniprésente dans le cristallin de l'œil et le cœur. Dans les tissus et notamment le tissu pulmonaire, son expression est limitée. Sa mutation est associée à diverses pathologies comme la

maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et certains cancers <sup>290</sup>. Comme HSP27, HSPB5 exerce de puissants effets anti-apoptotiques <sup>291</sup> et est à ce titre, une cible potentielle dans le traitement du cancer <sup>292</sup>.

Dans un contexte de fibrose hépatique, HSPB5 est surexprimée dans le cytoplasme suite à l'activation de HSC (*Hepatic Stellate Cells*) et est transloquée dans le noyau en cas de choc thermique <sup>293,294</sup>. Dans une étude menée par Huang *et al.*, il a été montré qu'HSPB5 forme un complexe avec la protéine 14-3-3 $\zeta$  afin d'être protégée d'une dégradation protéasomale. 14-3-3 $\zeta$  est alors accumulée dans la cellule et permet l'activation d'Erk1/2 et de Slug, un facteur de transcription impliqué dans la TEM <sup>295</sup>.

Dans la FPI, Bellaye *et al.*, ont montré qu'HSPB5 était surexprimée dans les poumons de patients atteints de FPI, notamment au niveau des foyers fibroblastiques <sup>242</sup>. Son expression est augmentée dans différents modèles de fibrose pulmonaire murins et les souris déficientes pour HSPB5 sont protégées de la fibrose pulmonaire induite. Les auteurs décrivent qu'HSPB5 empêche l'ubiquitination de Smad4 par l'E3-ubiquitine ligase TIF-1 $\gamma$  et favorise ainsi la localisation nucléaire de Smad4. La localisation nucléaire de Smad4 dans le noyau favorise la transcription de gènes pro-fibrosants. L'inhibition d' $\alpha$ B-crystallin apparaît donc comme une stratégie intéressante dans le traitement de la FPI. (Figure 29)



**Figure 29.** Représentation schématique de l'implication d' $\alpha$ B-crystallin dans la voie du TGF- $\beta$ 1. (A) En l'absence d' $\alpha$ B-crystallin, la voie des Smads est régulée par l'E3 ubiquitine ligase TIF-1 $\gamma$  qui ubiquitine Smad4 induisant ainsi sa sortie du noyau et sa dégradation. De plus, la protéine 14-3-3 $\zeta$  est dégradée par le protéasome l'empêchant d'induire sa signalisation. (B)  $\alpha$ B-crystallin, inhibe l'ubiquitinylation de smad-4 par TIF-1 $\gamma$  et son externalisation du noyau, ce qui favorise les voies pro-fibrosantes. Elle protège la protéine 14-3-3 $\zeta$  de la dégradation, ce qui favorise la signalisation ERK1/2 et donc l'expression de gènes pro-fibrosants. D'après Bellaye et al. (2014)<sup>242</sup>

Il n'existe à ce jour aucune molécule capable d'inhiber spécifiquement HSPB5. Une étude portant sur l'interaction d'HSPB5 avec le VEGF, a permis l'identification de 40 composés capables *in silico* d'inhiber cette interaction. Un de ces composés, le NCI-41356 a montré des propriétés particulièrement intéressantes dans le cancer du sein triple négatif. En effet, *in vitro* le NCI-41356 inhibe la liaison HSPB5-VEGF et son administration chez la souris inhibe la croissance et l'angiogenèse tumorale induite<sup>296</sup>. Le cancer et la fibrose partagent de nombreux mécanismes d'action dans leur pathogenèse. A ce titre, l'étude les effets du NCI-41356 dans un contexte de fibrose pulmonaire méritait d'être approfondie et a constitué une partie de mon travail de thèse.

## V. Objectifs de thèse

Pendant ces trois années, mon travail a permis d'évaluer le potentiel d'un marqueur d'hypoxie prédictif de la progression de la fibrose et de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques dans la prise en charge des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique.

Pour se faire, mon travail a été divisé en 3 parties :

- la première partie de mon travail portait sur l'étude de l'hypoxie pulmonaire *in vivo* par imagerie TEP au  $^{18}\text{F}$ -FMISO afin d'évaluer le potentiel prédictif de cette sonde et son efficacité thérapeutique dans des modèles précliniques de fibrose pulmonaire et comparativement au  $^{18}\text{F}$ -FDG. Ces travaux ont été publiés au cours de ma thèse.
- la seconde partie de mon projet de thèse consistait à évaluer l'intérêt de l'utilisation d'un inhibiteur chimique d'HSPB5, le NCI-41356, dans des modèles murins de fibrose pulmonaire induite à la bléomycine. Ces travaux sont en cours de soumission.
- la troisième partie de mon projet de thèse consistait à évaluer le potentiel d'un anticorps ciblant la partie extracellulaire de la protéine de choc thermique HSP90 dans le traitement de la fibrose pulmonaire idiopathique. Ces travaux sont encore en étude.

# RESULTATS

---

## Projet 1.

### **Imagerie TEP/TDM $^{18}\text{F}$ -FMISO de l'hypoxie en tant que biomarqueur non invasif de la progression de la maladie et de l'efficacité thérapeutique dans un modèle préclinique de fibrose pulmonaire : comparaison avec l'approche TEP/TDM $^{18}\text{F}$ -FDG**

**Objectif :** Un des écueils de la prise en charge de la FPI est le retard au diagnostic. Une partie de ma thèse a consisté à développer une stratégie de marquage précoce non invasive du développement de la fibrose, en particulier par des techniques d'imagerie. L'imagerie de la FPI se cantonne à la tomodensitométrie à haute résolution (HRCT) qui n'est souvent pas suffisante pour un diagnostic définitif et qui a un impact limité sur la décision thérapeutique et la prise en charge du patient. L'hypoxie du tissu pulmonaire est une caractéristique du développement de la fibrose et a été corrélée à la sévérité de la maladie. Plusieurs sondes traceurs d'hypoxie ont été développées et testées lors d'études précliniques et cliniques dans le cancer, et notamment la sonde  $^{18}\text{F}$ -FMISO. Notre étude consistait à évaluer l'intérêt du marquage des zones pulmonaires hypoxiques par imagerie TEP à l'aide du radiotracteur  $^{18}\text{F}$ -FMISO, dans le but d'en faire un biomarqueur prédictif de la progression de la maladie et de l'efficacité thérapeutique des traitements. Cette étude a été réalisée sur nos modèles précliniques de fibrose pulmonaire et le  $^{18}\text{F}$ -FMISO a été comparé  $^{18}\text{F}$ -FDG.

**Méthodes :** Des souris C57/BL6 âgées de huit semaines ont reçu une administration intratrachéale de bléomycine (BLM) au jour (J) 0 pour initier une fibrose pulmonaire. Les souris ont ensuite été traitées à la pirféridone (300 mg/kg) ou au nintédanib (60 mg/kg) par gavage quotidien de J9 à J23. Les souris ont subi des imageries TEP/CT successives à plusieurs stades de la maladie (initial, J8/J9, J15/J16, J22/J23) avec le  $^{18}\text{F}$ -FDG et le  $^{18}\text{F}$ -FMISO. L'analyse histologique de l'expression pulmonaire des marqueurs de l'hypoxie et de l'activité métabolique (HIF-1 $\alpha$  et GLUT-1) a été réalisée à J23.

**Résultats :** Nous avons démontré sur notre modèle de fibrose induite par la bléomycine que le marquage  $^{18}\text{F}$ -FDG ou  $^{18}\text{F}$ -FMISO étaient capables de caractériser une fibrose pulmonaire de la même façon que le CT/scan. Aux stades précoces de la maladie, les zones pulmonaires avec absorption de  $^{18}\text{F}$ -FMISO apparaissent toujours normales au scanner et correspondent à des zones qui se détériorent en lésions fibreuses à des stades plus tardifs, ce qui suggère l'intérêt de l'utilisation du  $^{18}\text{F}$ -FMISO pour le marquage précoce des lésions. Le nintédanib et la pirféridone ont considérablement et rapidement diminués la densité pulmonaire moyenne au scanner ainsi que les fixations pulmonaires du  $^{18}\text{F}$ -FDG et du  $^{18}\text{F}$ -FMISO. L'absorption pulmonaire précoce du  $^{18}\text{F}$ -FMISO a été corrélée à une progression agressive de la maladie et à une meilleure efficacité du nintédanib.

**Conclusion :** Notre résultats suggèrent que l'imagerie TEP utilisant la sonde  $^{18}\text{F}$ -FMISO est un outil prometteur pour détecter et surveiller précocement la progression de la fibrose pulmonaire et prédire l'efficacité des traitements.

Ce travail a fait l'objet d'une publication le 13 février 2021 dans l'European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging.



## [<sup>18</sup>F]FMISO PET/CT imaging of hypoxia as a non-invasive biomarker of disease progression and therapy efficacy in a preclinical model of pulmonary fibrosis: comparison with the [<sup>18</sup>F]FDG PET/CT approach

Julie Tanguy<sup>1,2</sup> · Françoise Goirand<sup>1,2</sup> · Alexanne Boucharde<sup>3</sup> · Jame Frenay<sup>3</sup> · Mathieu Moreau<sup>4</sup> · Céline Mothes<sup>5</sup> · Alexandra Oudot<sup>3</sup> · Alex Helbling<sup>3</sup> · Mélanie Guillemin<sup>3</sup> · Philippe Bonniaud<sup>1,2</sup> · Alexandre Cochet<sup>3,6</sup> · Bertrand Collin<sup>1,4</sup> · Pierre-Simon Bellaye<sup>2,3</sup>

Received: 10 November 2020 / Accepted: 17 January 2021 / Published online: 13 February 2021  
© The Author(s) 2021

### Abstract

**Purpose** Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive disease with poor outcome and limited therapeutic options. Imaging of IPF is limited to high-resolution computed tomography (HRCT) which is often not sufficient for a definite diagnosis and has a limited impact on therapeutic decision and patient management. Hypoxia of the lung is a significant feature of IPF but its role on disease progression remains elusive. Thus, the aim of our study was to evaluate hypoxia imaging with [<sup>18</sup>F]FMISO as a predictive biomarker of disease progression and therapy efficacy in preclinical models of lung fibrosis in comparison with [<sup>18</sup>F]FDG.

**Methods** Eight-week-old C57/BL6 mice received an intratracheal administration of bleomycin (BLM) at day (D) 0 to initiate lung fibrosis. Mice received pirfenidone (300 mg/kg) or nintedanib (60 mg/kg) by daily gavage from D9 to D23. Mice underwent successive PET/CT imaging at several stages of the disease (baseline, D8/D9, D15/D16, D22/D23) with [<sup>18</sup>F]FDG and [<sup>18</sup>F]FMISO. Histological determination of the lung expression of HIF-1 $\alpha$  and GLUT-1 was performed at D23.

**Results** We demonstrate that mean lung density on CT as well as [<sup>18</sup>F]FDG and [<sup>18</sup>F]FMISO uptakes are upregulated in established lung fibrosis (1.4-, 2.6- and 3.2-fold increase respectively). At early stages, lung areas with [<sup>18</sup>F]FMISO uptake are still appearing normal on CT scans and correspond to areas which will deteriorate towards fibrotic lesions at later timepoints. Nintedanib and pirfenidone dramatically and rapidly decreased mean lung density on CT as well as [<sup>18</sup>F]FDG and [<sup>18</sup>F]FMISO lung uptakes (pirfenidone: 1.2-, 2.9- and 2.6-fold decrease; nintedanib: 1.2-, 2.3- and 2.5-fold decrease respectively). Early [<sup>18</sup>F]FMISO lung uptake was correlated with aggressive disease progression and better nintedanib efficacy.

**Conclusion** [<sup>18</sup>F]FMISO PET imaging is a promising tool to early detect and monitor lung fibrosis progression and therapy efficacy.

**Keywords** [<sup>18</sup>F]FMISO · Hypoxia · Lung fibrosis · PET/CT · [<sup>18</sup>F]FDG

Bertrand Collin and Pierre-Simon Bellaye contributed equally to this work.

This article is part of the Topical Collection on Preclinical Imaging

✉ Pierre-Simon Bellaye  
psbellaye@cgl.fr

<sup>1</sup> INSERM U1231, Equipe HSP-pathies, 7 Boulevard Jeanne d'Arc, Dijon, France

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

<sup>3</sup> Centre George François Leclerc, Service de médecine nucléaire, Plateforme d'imagerie et de radiothérapie précliniques, 1 rue du professeur Marion, Dijon, France

<sup>4</sup> Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, UMR CNRS 6302, Université de Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France

<sup>5</sup> Oncodesign, 21076 Dijon Cedex, France

<sup>6</sup> ImVIA, EA 7535, Université de Bourgogne, Dijon, France

Springer

## Introduction

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive disease of the lung, inducing significant morbidity through worsening dyspnoea and overall lung function decline. The cause of IPF remains elusive and treatment options are limited with only two approved drugs, nintedanib and pirfenidone, which demonstrate efficacy to slow down fibrosis progression but are unable to reverse or even stop the disease [1]. The prognosis of IPF is poor, with a median survival time of less than 5 years.

Despite major improvements, the diagnosis of IPF remains complex. While it is possible to validate the diagnosis of IPF with typical high-resolution computed tomography (HRCT) in the presence of a usual interstitial pneumonia (UIP) pattern, most patients may require lung biopsy, which is associated with a high morbidity and mortality [2]. In addition, honeycombing, one of the key imaging criteria of UIP, is indicative of an already advanced stage of the disease. Yet, early diagnosis is crucial in IPF since longer time to diagnosis is related to poorer outcome and increased mortality [3]. Thus, imaging biomarkers for early/active fibrosis are needed to promote early diagnosis, which could dramatically shorten current treatment delays.

The lack of tools to monitor disease progression and response to anti-fibrotic therapies are also major clinical concerns. IPF progression is heterogeneous with some patients deteriorating rapidly leading to death within months, while others follow a slower decline with limited progression. In addition, the high interpersonal variability among IPF patients in the response to pirfenidone and nintedanib suggests that non-responders to one drug might benefit from the other. Considering the disabling side effects which may be associated with these therapies, the early prediction of treatment efficacy is a major clinical issue. As a consequence, identifying novel imaging predictive biomarkers to predict/monitor fibrosis progression and therapeutic efficacy would be the first step towards a personalized management of IPF patients.

In vivo molecular imaging has become an essential tool in preclinical research, clinical trials and medical practice. Recent publications highlight potential benefits from the use of [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET imaging in IPF mainly due to the TGF $\beta$ 1-dependent upregulation of glucose transporters on myofibroblasts [4]. Lung areas with high [ $^{18}\text{F}$ ]FDG uptake have been associated with regions of lung parenchymal changes on HRCT [5–7]. In addition, [ $^{18}\text{F}$ ]FDG lung uptake has been shown to be increased in a preclinical model of lung fibrosis induced by bleomycin (BLM) [8]. Interestingly, in BLM-treated mice, pirfenidone significantly reduced the [ $^{18}\text{F}$ ]FDG uptake compared to control mice [8]. Despite such promising findings, whether [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET has a significant clinical value for the management of IPF patients remains unknown.

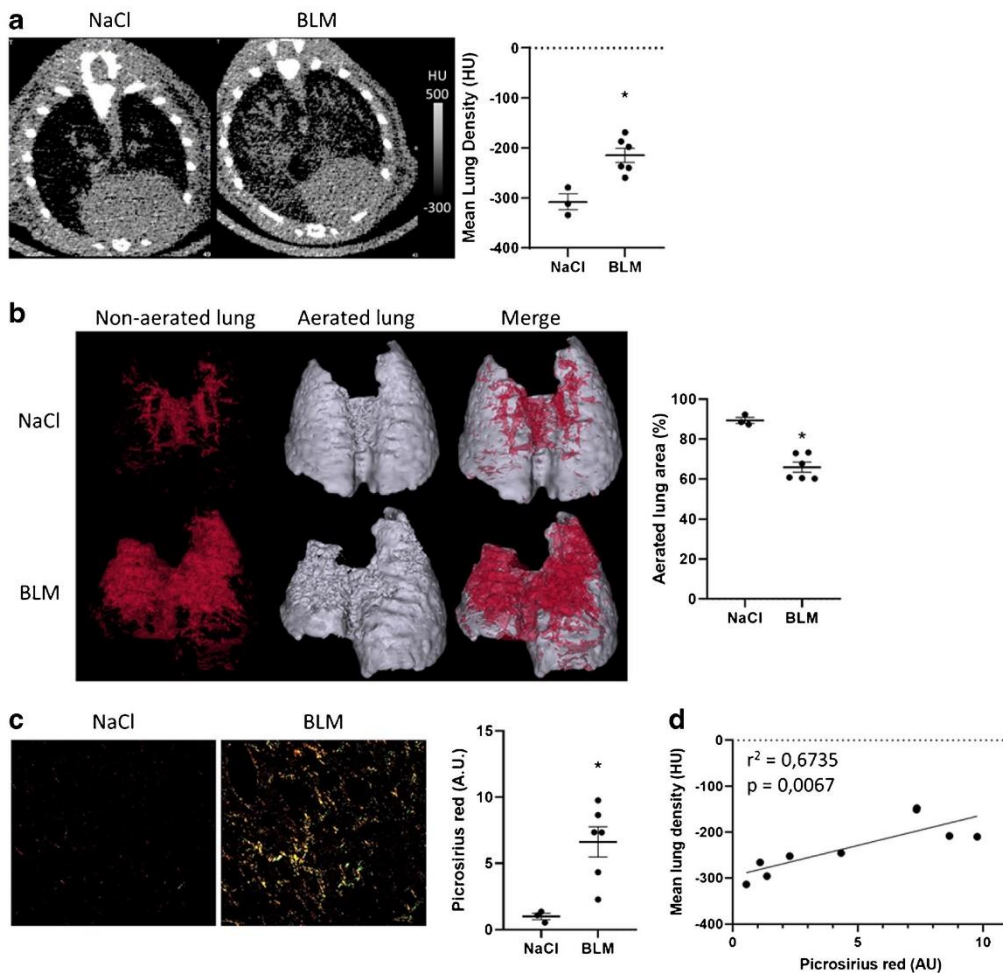
Tissue remodelling occurring during the course of IPF ultimately causes the disruption of the alveolar structure leading to major hypoxic areas in the lungs of IPF patients [9]. Several studies have demonstrated a direct link between hypoxia and the development of IPF, mainly because hypoxia worsens fibrosis progression by increasing ECM deposition and vice versa. Transcriptomic analysis of IPF lungs has shown that hypoxia signalling pathways are upregulated [10]. At the cellular level, hypoxia signalling is mainly mediated by the upregulation of HIF-1 $\alpha$  which is able to drive the behaviour of IPF-derived fibroblasts. As a consequence, the scarring of lung tissue in IPF is reinforced by the expansion of fibroblast/myofibroblasts *foci*. Interestingly, HIF-1 $\alpha$  and carbonic anhydrase IX (CAIX), a transmembrane protein expressed in hypoxic conditions, have been demonstrated to be upregulated in the lungs of IPF patients [11]. HIF-1 $\alpha$  and CAIX expression have also been shown to be upregulated in preclinical models of lung fibrosis [12, 13], and chronic hypoxia was shown to worsen BLM-induced lung fibrosis in mice [14]. Furthermore, Burman et al. [15] demonstrated that BLM induced the formation of hypoxic patches localized around fibrotic areas. Pimonidazole, a compound which specifically accumulates in cells in hypoxic conditions, was found to accumulate in alveolar epithelial cells boarding fibrotic lung areas upon BLM in mice. Several hypoxia-sensing probes have been extensively studied in cancer and are now evaluated in preclinical and clinical settings as tracers for hypoxia imaging including  $^{18}\text{F}$ -fluoromisonidazole ([ $^{18}\text{F}$ ]FMISO [16]). Whether tracers of tissue hypoxia may be useful for lung fibrosis monitoring remains unstudied and preclinical data evaluating [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO PET in lung fibrosis are desperately missing. We therefore hypothesized that hypoxia might be an early event in the course of lung fibrosis development and might drive fibrosis progression. The current study evaluates the value of hypoxia in vivo PET imaging with [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO to monitor disease progression and therapy efficacy in a preclinical model of pulmonary fibrosis in comparison with computed tomography (CT) and [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET imaging.

## Material and methods

### Animal experiments

All animal studies were conducted in accordance with the legislation on the use of laboratory animals (directive 2010/63/EU) and were approved by an accredited ethical committee (C2ea Grand Campus n°105) and the French Ministries of Research and Agriculture (project #12816). Eight-week-old female C57/Bl6 mice received at D0 a single intratracheal injection of 2 mg/kg of BLM (Santa Cruz Biotechnology, USA) or NaCl (controls) under anaesthesia (3% isoflurane). BLM-induced lung fibrosis is characterized





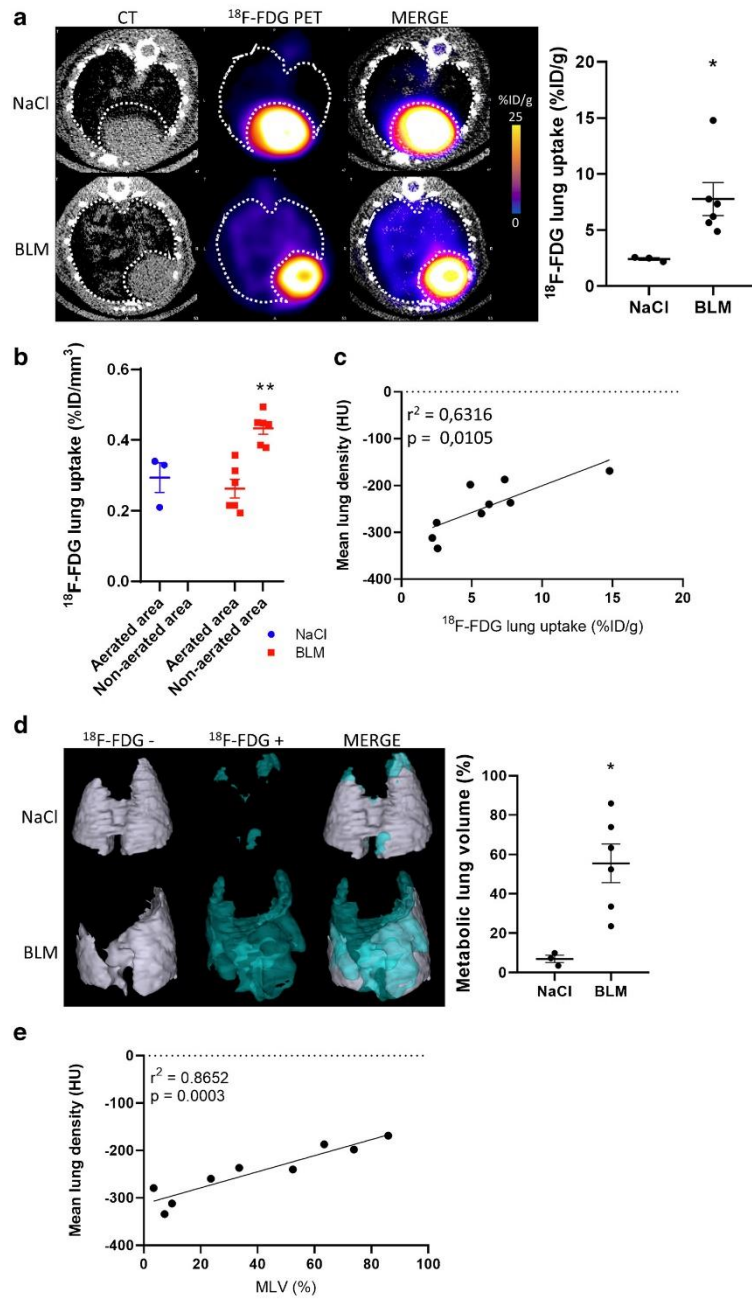
**Fig. 1** Computed tomography is able to detect advanced BLM-induced lung fibrosis. **a** Representative lung CT images of NaCl- and BLM-receiving mice at D21. Graph represents the mean lung density quantified on CT images. Results are presented as mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$  for NaCl and  $n = 6$  for BLM.  $*p < 0.05$ . HU, Hounsfield unit. **b** Representative 3D reconstruction of lung 3DROI segmentation of lung CT images of NaCl- and BLM-receiving mice at D21. Red represents high-density lung areas ( $-100$  to  $300$  HU) representative of non-aerated lungs; grey represents normal density lung areas ( $-800$  to  $-100$  HU) representative of

aerated lungs. Graph represents the percentage of aerated lung on CT images. Results are presented as mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$  for NaCl and  $n = 6$  for BLM.  $*p < 0.05$ . **c** Representative Picrosirius red staining lung sections of NaCl- and BLM-receiving mice at D21. Graph represents the intensity of picrosirius red staining. Results are presented as mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$  for NaCl and  $n = 6$  for BLM.  $*p < 0.05$ . **d** Correlation between mean lung density (HU) measured on CT images and picrosirius red staining of corresponding lungs at D21

by an initial inflammatory phase lasting from D0 to D7 which moves on to a fibrotic phase from D7 to D23. When indicated, animals were treated with nintedanib (60 mg/kg) or pirfenidone (300 mg/kg) by daily gavage during the fibrotic phase of BLM-induced lung fibrosis from D9 to D23 as recommended [17].

#### PET/CT imaging

A pilot study was performed on NaCl- ( $n = 3$ ) and BLM-receiving ( $n = 6$ ) mice by successive PET/CT with [ $^{18}\text{F}$ ]FDG at D20 and [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO at D21. Mice were anaesthetized through isoflurane (1.5%) inhalation for intravenous injection



**Fig. 2** [ $^{18}\text{F}$ ]FDG is able to detect advanced BLM-induced lung fibrosis. **a** Representative lung PET/CT images with [ $^{18}\text{F}$ ]FDG of NaCl- and BLM-receiving mice at D21. Graph represents the [ $^{18}\text{F}$ ]FDG lung uptake in %ID/g of NaCl- and BLM-receiving mice at D21. Results are presented as mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$  for NaCl and  $n = 6$  for BLM.  $*p < 0.05$ . **b** Graph represents the [ $^{18}\text{F}$ ]FDG lung uptake in %ID/g of NaCl- and BLM-receiving mice at D21 in aerated and non-aerated lung areas (segmented on CT images). Results are presented as mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$  for NaCl and  $n = 6$  for BLM.  $**p < 0.01$ . **c** Correlation between mean lung density (HU) measured on CT images and [ $^{18}\text{F}$ ]FDG lung uptake (%ID/g) of corresponding lungs measured on PET at D21. **d** Representative 3D reconstruction of lung 3DROI segmentation of lung PET images representative of metabolic lung volume (MLV) of NaCl- and BLM-receiving mice at D21. Cyan represents areas with high [ $^{18}\text{F}$ ]FDG lung uptake (above the threshold of  $\text{MLV}_{\text{threshold}} = (\text{SUVmean})_{\text{D0}} + 2\text{SD}$ ); grey represents areas with low [ $^{18}\text{F}$ ]FDG lung uptake (below the threshold). Graph represents the MLV of NaCl- and BLM-receiving mice at D21. Results are presented as mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$  for NaCl and  $n = 6$  for BLM.  $*p < 0.05$ . **e** Correlation between mean lung density (HU) measured on CT images and MLV (%) of corresponding lungs measured on PET at D21

(tail vein) of 5 MBq of [ $^{18}\text{F}$ ]FDG 20 min before imaging or 10 MBq of [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO 2 h before imaging. Mice were then maintained under anaesthesia (1.5%) and placed on an imaging heated bed inside a BioPET<sup>TM</sup>-CT (Bioscan, USA). A CT scan of a lung-centered region was obtained (150  $\mu\text{A}$ , 45 kV, 360 projections, 2 shots/projection) followed by PET acquisition (30 min) of the same region (lung-centered, 250–700 keV, Suppl. Fig. 1a).

In another experiment, longitudinal imaging of lung fibrosis was performed on NaCl- ( $n = 4$ ) and BLM-receiving mice treated with vehicle ( $n = 5$ ), nintedanib ( $n = 5$ ) or pirfenidone ( $n = 5$ ) by successive PET/CT with [ $^{18}\text{F}$ ]FDG and [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO before BLM installation, at D8/D9, D15/D16 and D22/D23 following the same imaging protocol as described above (Suppl. Fig. 1b).

After the last [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO PET imaging, mice were sacrificed and lungs and blood were harvested for ex vivo quantification using a  $\gamma$ -counter (Wizard, Perkin Elmer). Lungs were collected in 10% formalin for further histological analysis.

### Image analysis

All PET/CT fusion images were obtained using the VivoQuant<sup>TM</sup> software (In vivo, USA). Each PET/CT image was visually interpreted and 3D regions of interest (3DROI) corresponding to the lungs were manually drawn for CT quantification and to determine their radioactivity content. Injected doses per animal were measured at the time of injection in MBq. Lung radioactivity content was expressed in MBq, converted to percentage of injected dose per gram of tissue (%ID/g). PET scanner was indeed cross-calibrated to the dose calibrator and PET data were corrected for scatter and attenuation. All images were decay corrected for quantification.

Additionally, other PET parameters were measured for [ $^{18}\text{F}$ ]FDG and [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO (SUVmean, SUVmax), lung-to-background ratio (LTBR). SUV values have been calculated using a general soft tissue value of 1 g/mL. In addition, the metabolic lung volume (MLV) which refers to the volume of the lungs with high metabolic activity was determined on [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET. The MLV represents the volume of lung tissue with a [ $^{18}\text{F}$ ]FDG uptake above a threshold determined at D0 as follows [18]:

$$\text{MLV}_{\text{threshold}} = (\text{SUVmean})_{\text{D0}} + 2 \text{SD}$$

Finally, the hypoxic lung volume (HLV) was calculated exclusively on [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO PET. The HLV represents the volume of lung tissue with a [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO uptake above a threshold determined as follows [8]:

$$\text{HLV}_{\text{threshold}} = \text{LTBR} \times 1.4$$

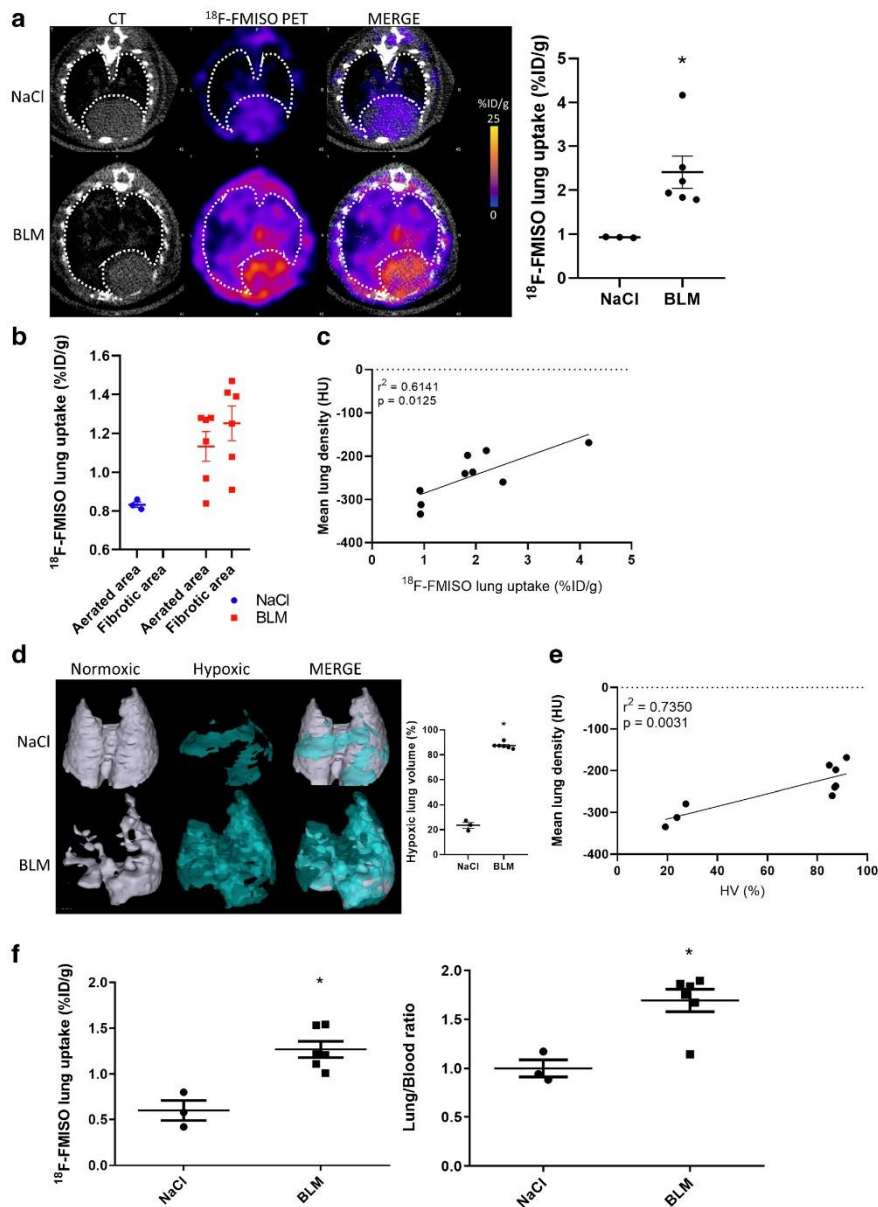
In addition, a semi-automatic segmentation of 3DROI was performed on CT scans as follows: normal lung density (– 800 to – 100 HU) corresponding to aerated lung areas and high lung density (– 100 to 300 HU) corresponding to non-aerated/fibrotic lung areas as previously described [19]. This semi-automatic segmentation allowed the independent quantification of the radioactivity content of [ $^{18}\text{F}$ ]FDG and [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO (%ID/g) in normal and high-density lung tissue respectively.

### Fluorescence in vivo imaging

Hypoxia fluorescence imaging was performed on NaCl- and BLM-receiving mice at D21. Mice under anaesthesia (1.5% isoflurane) received intravenous injection (tail vein) of a carboxylic anhydrase IX (CAIX) targeting tracer, Hypoxisense 680<sup>TM</sup> (2 nmol/100  $\mu\text{L}$ ), 24 h prior imaging. Hypoxisense 680<sup>TM</sup> (PerkinElmer, France) is a commercially available near-infrared (NIR) fluorescent agent which detects the surface expression of CAIX protein, which increases in hypoxic tissues. Mice were then maintained under anaesthesia (1.5% isoflurane) and placed on an imaging heated bed inside an optical imager IVIS<sup>®</sup> LUMINA III (Perkin Elmer, France). Fluorescence images were acquired with the optimal filter pair ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 660 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 710 nm). Images were processed through the Living Image<sup>®</sup> software (Perkin Elmer) for exclusion of background signals (auto-fluorescence, food). Data were quantified with the Living Image<sup>®</sup> software and expressed in mean radiant efficiency.

### Collagen quantification

For histomorphometric assay, the amount of collagen in paraffin-embedded tissue sections was quantified by staining with Picrosirius red as previously described [20].



**Immunohistochemistry-immunofluorescence**

After deparaffinization (Xylene), endogenous peroxidases inhibition (PBS-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% 20 min) and antigen unmasking

(30 min in citrate buffer pH 6), sections were saturated (BSA 8%) and incubated overnight at 4 °C with specific antibodies at a dilution of 1:100 for the detection of HIF-1 $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology, sc-13515), GLUT-1 (Abcam,

**Fig. 3** [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO is able to detect advanced BLM-induced lung fibrosis. **a** Representative lung PET/CT images with [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO of NaCl- and BLM-receiving mice at D21. Graph represents the [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO lung uptake in %ID/g of NaCl- and BLM-receiving mice at D21. Results are presented as mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$  for NaCl and  $n = 6$  for BLM. \* $p < 0.05$ . **b** Graph represents the [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO lung uptake in %ID/g of NaCl- and BLM-receiving mice at D21 in aerated and non-aerated lung areas (segmented on CT images). Results are presented as mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$  for NaCl and  $n = 6$  for BLM. **c** Correlation between mean lung density (HU) measured on CT images and [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO lung uptake (%ID/g) of corresponding lungs measured on PET at D21. **d** Representative 3D reconstruction of lung 3DROI segmentation of lung PET images representative of hypoxic lung volume (HLV) of NaCl- and BLM-receiving mice at D21. Cyan represents areas with high [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO lung uptake (above the threshold of  $\text{HLV}_{\text{threshold}} = \text{TBR} \times 1.4$ ); grey represents areas with low [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO lung uptake (below the threshold). Graph represents the MLV of NaCl- and BLM-receiving mice at D21. Results are presented as mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$  for NaCl and  $n = 6$  for BLM. \* $p < 0.05$ . **e** Correlation between mean lung density (HU) measured on CT images and HLV (%) of corresponding lungs measured on PET at D21. **f** Radioactivity content in lungs of NaCl- and BLM-receiving mice and lung to blood ratio at D21 measured ex vivo with a  $\gamma$ -counter. Results are presented as mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$  for NaCl and  $n = 6$  for BLM. \* $p < 0.05$

ab115730) and  $\alpha$ -SMA (Abcam, ab21027). HRP-conjugated antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Suffolk, UK) or Alexa488- and Alexa568-conjugated (Abcam, France) were used as the secondary antibody (1:250, 45 min). For immunofluorescence, slides were mounted in ProLong<sup>®</sup> Gold with DAPI (ProLong<sup>®</sup> Gold antifade reagent with DAPI, Life Technologies).

### Statistical analysis

Comparison between two groups was performed using the Mann-Whitney non-parametric  $t$  tests. Comparison between multiple groups has been performed using the Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA tests. A  $p < 0.05$  was considered significant (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). Results are presented as mean  $\pm$  SEM.

## Results

### CT, [ $^{18}\text{F}$ ]FDG and [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO PET are able to detect BLM-induced lung fibrosis

BLM-receiving mice (or NaCl) underwent successive [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET/CT and [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO PET/CT at D20 and D21, respectively. Lung CT of BLM-receiving mice at D21 showed an increase in fibrotic consolidations compared with control mice (Fig. 1a). CT quantification showed an increase in mean lung density (MLD) in BLM-treated mice compared with controls (Fig. 1a). In addition, lungs from BLM-treated mice presented an increase in high-density voxels associated with a decrease in normal

density voxels showing a limitation of aerated lung areas upon BLM (Fig. 1b). As expected, BLM induced an increase in lung collagen content measured by Picrosirius red staining (Fig. 1c). Interestingly, MLD measured on CT images strongly correlated with lung collagen content (Fig. 1d).

The global [ $^{18}\text{F}$ ]FDG and [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO lung uptake was significantly increased in BLM-treated mice at D20 and D21 respectively compared to controls (Fig. 2a, Fig. 3a). Similarly, SUVmean, SUVmax and LTBR were increased in BLM-treated mice at D20 and D21 (Suppl Fig. 2a, Suppl Fig. 3a). Interestingly, the increase in [ $^{18}\text{F}$ ]FDG uptake was mainly localized in high-density lung areas observed on CT images confirming a specific uptake of [ $^{18}\text{F}$ ]FDG in fibrotic lung areas (Fig. 2b). Contrarily, the increase in [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO uptake was localized in both aerated and non-aerated lung areas suggesting an uptake of [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO in lung areas appearing normal on CT scans (Fig. 3b). In addition, [ $^{18}\text{F}$ ]FDG and [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO lung uptake was strongly correlated with MLD measured on CT (Fig. 2c, Suppl Fig. 2b, Fig. 3c, Suppl Fig. 3b). Moreover, upon BLM, the MLV and HLV significantly increased (Fig. 2d, Fig. 3d) with a very strong correlation with MLD quantified on CT (Fig. 2e).

Finally, ex vivo radioactivity quantification of the lungs confirmed an increase in [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO lung uptake at D21 in BLM-treated animals associated with an increase in lung/blood ratio (Fig. 3f).

The hypoxic status of the lungs of BLM-treated animals was confirmed by optical imaging using Hypoxisense<sup>™</sup>. The lung uptake of Hypoxisense<sup>™</sup> was increased at D21 demonstrating that CAIX expression was enhanced in fibrotic lungs (Suppl Fig. 4a–b). Interestingly, the Hypoxisense<sup>™</sup> signal was correlated with lung collagen content (Suppl Fig. 4c).

### CT can assess anti-fibrotic therapies efficacy

CT scan revealed an increase in MLD in BLM-treated mice starting from D9 with a peak at D16 and a stabilization up to D23 (Fig. 4a). CT quantification showed that pirfenidone and nintedanib stopped the increase in MLD induced by BLM from D9 to D23 (Fig. 4a). A deeper analysis demonstrated that BLM induces fibrosis progression with a decrease in lung aerated areas which was prevented by pirfenidone and nintedanib from D9 to D23 (Fig. 4b, Suppl Fig. 5). CT results at D23 were confirmed by histology which showed an increase in collagen in BLM-treated mice (Fig. 4c) which was inhibited by nintedanib and pirfenidone (Fig. 4c).

### [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET can detect advanced lung fibrosis and is suitable for anti-fibrotic therapies follow-up

Unlike CT scans, lung uptake of [ $^{18}\text{F}$ ]FDG did not increase at early stage (D8) in BLM-receiving mice while it significantly increased at D15 and D22 (Fig. 5a, Suppl

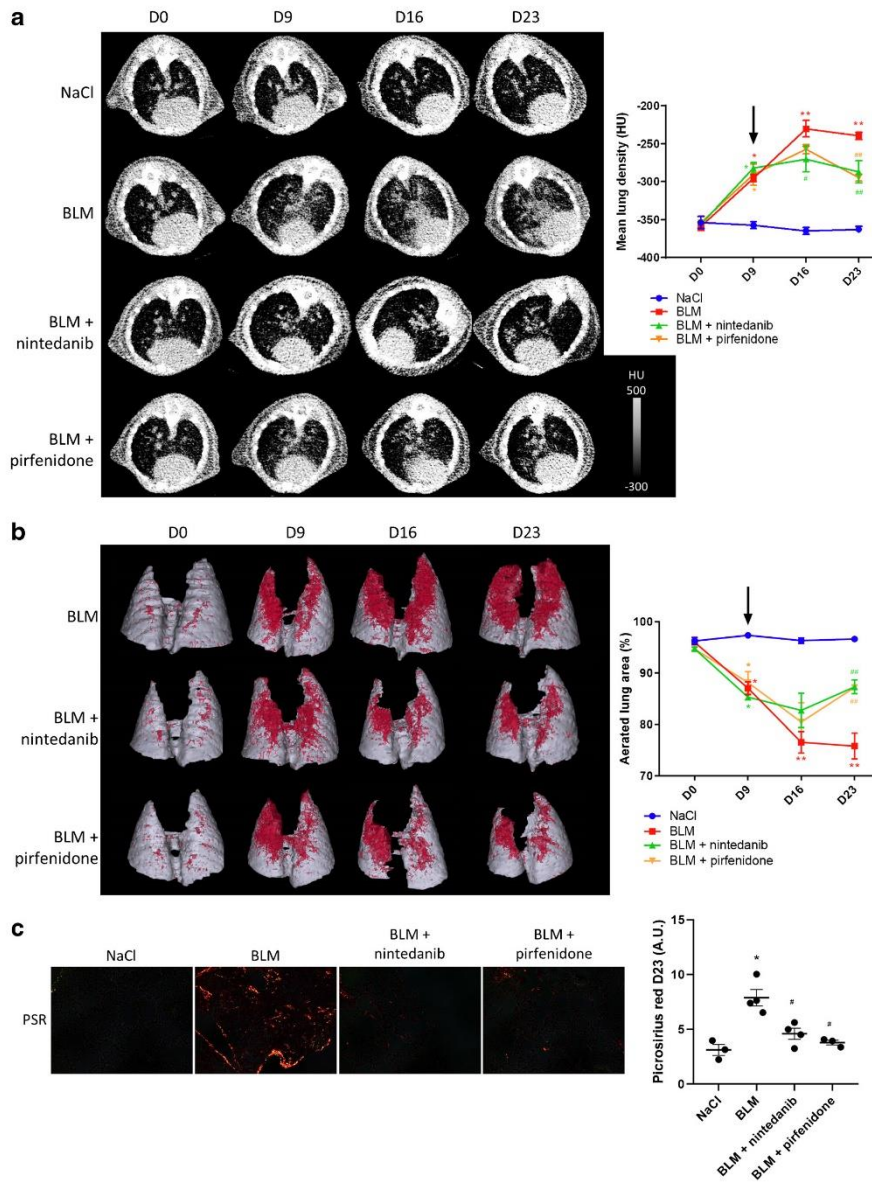


Fig. 6a). Pirfenidone and nintedanib treatments dramatically decreased  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  lung uptake at D15 and D22 (Fig. 5a, Suppl Fig. 6a). Similarly, MLV significantly increased in BLM-receiving mice and was decreased by pirfenidone and nintedanib treatment (Fig. 5b, Suppl

Fig. 6b). In BLM-receiving mice, the  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  lung uptake was mainly observed in non-aerated lung areas with a significant difference at D22 suggesting that  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  uptake specifically occurs in fibrotic lung areas (Fig. 5c). In parallel, in mice treated with pirfenidone and

**Fig. 4** CT scan can detect lung fibrosis and efficacy of anti-fibrotic therapies. **a** Representative lung CT images of NaCl- and BLM-receiving mice treated or not with nintedanib or pirfenidone at D0, D9, D16 and D23. Graph represents evolution of the mean lung density quantified on CT images at all time points. Results are presented as mean  $\pm$  SEM,  $n = 4$  for NaCl and  $n = 5$  for other groups. Stars (\*) are representative of statistical comparison between time points for each group and hashes (#) are representative of statistical comparison between the groups at each time points.  $^{*}p < 0.05$ ,  $^{**}p < 0.01$ . Black arrow represents the start of treatments. **b** Representative 3D reconstruction of lung 3DROI segmentation of lung CT images of NaCl- and BLM-receiving mice treated or not with nintedanib or pirfenidone at D0, D9, D16 and D23. Red represents high density lung areas ( $-100$  to  $300$  HU) representative of non-aerated lungs; grey represents normal density lung areas ( $-800$  to  $-100$  HU) representative of aerated lungs. Graph represents the percentage of evolution of aerated lung on CT images. Results are presented as mean  $\pm$  SEM,  $n = 4$  for NaCl and  $n = 5$  for other groups. Stars (\*) are representative of statistical comparison between time points for each group and hashes (#) are representative of statistical comparison between the groups at each time points.  $^{*}p < 0.05$ ,  $^{**}p < 0.01$ . Black arrow represents the start of treatments. **c** Representative Picrosirius red staining lung sections of NaCl- and BLM-receiving mice treated or not with nintedanib or pirfenidone at D23. Graph represents the intensity of picrosirius red staining. Results are presented as mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$  for NaCl,  $n = 4$  for BLM and BLM-nintedanib and  $n = 3$  for BLM-pirfenidone. Stars (\*) are representative of the comparison of each group with the NaCl group and hashes (#) are representative of statistical comparison of each group with BLM group  $^{*}p < 0.05$

nintedanib, there was no difference in [ $^{18}$ F]FDG uptake between aerated and non-aerated lung areas (Fig. 5c). Immunohistochemistry performed at D23 demonstrated an increase in  $\alpha$ -SMA and GLUT-1 expression in BLM-treated lungs which was inhibited by pirfenidone and nintedanib (Suppl Fig. 7a).

#### [ $^{18}$ F]FMISO PET can detect early lung fibrosis and is suitable for anti-fibrotic therapies follow-up

Lung uptake of [ $^{18}$ F]FMISO increased at early stage (D9) in BLM-receiving mice and remained higher compared to control up to D23 (Fig. 6a, Suppl Fig. 8a). Interestingly, in BLM-receiving mice, pirfenidone and nintedanib treatments dramatically decreased [ $^{18}$ F]FMISO lung uptake at D16 and D23 (Fig. 6a, Suppl Fig. 8a). These results were confirmed by gamma counting at D23 in which [ $^{18}$ F]FMISO lung uptake was significantly higher in BLM-receiving mice and was decreased by nintedanib and pirfenidone (Fig. 6b). Similarly, LHV significantly increased from D9 to D23 in BLM-receiving mice and was decreased by pirfenidone and nintedanib treatments (Fig. 6c, Suppl Fig. 8b). In BLM-receiving mice, the [ $^{18}$ F]FMISO lung uptake was observed in both aerated and non-aerated lung areas suggesting that [ $^{18}$ F]FMISO uptake occurs in normal and fibrotic lung areas (Fig. 6d). In BLM-receiving mice, some aerated areas (normal lung density on CT) which showed an uptake of [ $^{18}$ F]FMISO at D9 (Fig. 6a, white arrowheads) also showed

fibrotic consolidations at D16 and D23 demonstrating that early [ $^{18}$ F]FMISO uptake was indicative of the development of fibrotic lesions (Fig. 6a, white arrowheads). Immunohistochemistry performed at D23 demonstrated an increase in HIF-1 expression in BLM-treated lungs which was inhibited by pirfenidone and nintedanib (Suppl Fig. 9a).

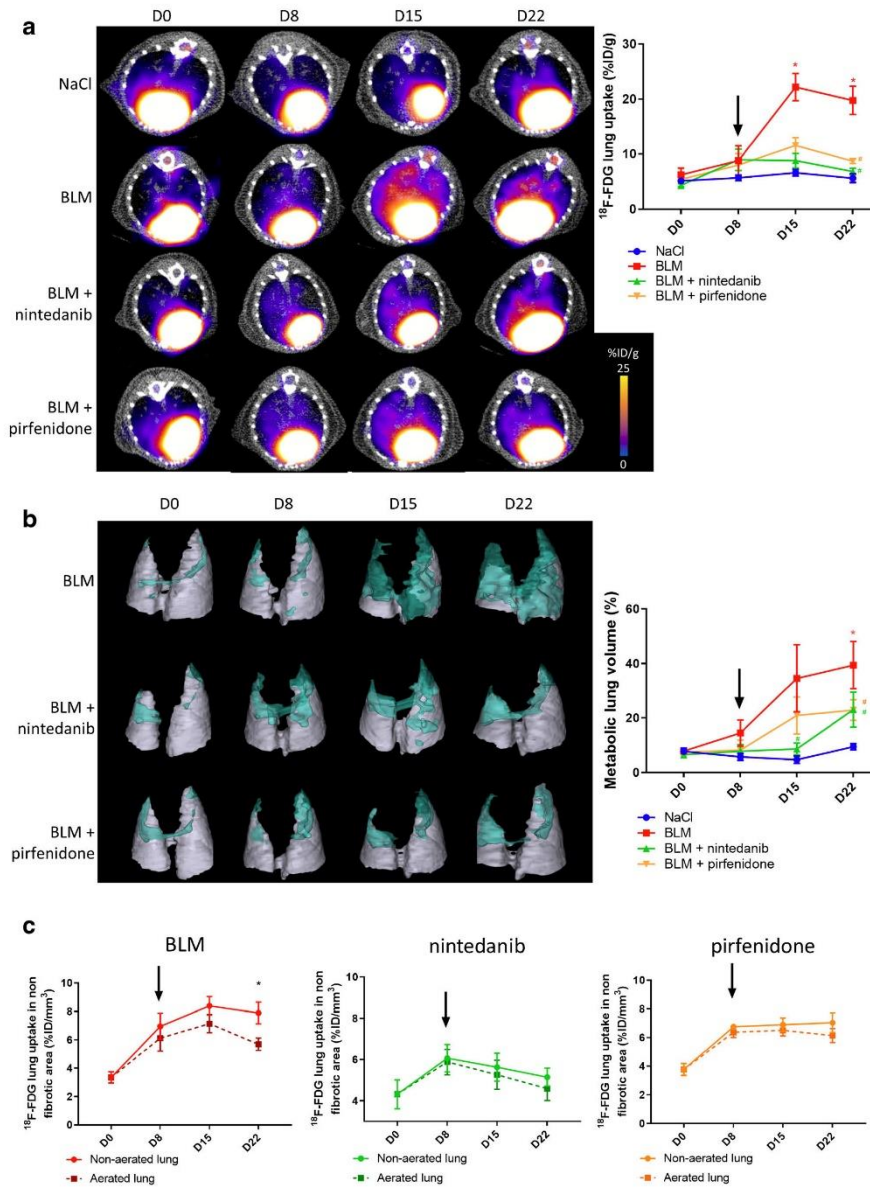
#### [ $^{18}$ F]FMISO PET is correlated with fibrosis progression and nintedanib efficacy

Fibrosis progression as well as pirfenidone and nintedanib efficacy was quantified using the variation of MLD between D9 and D23 ( $\Delta CT^{D9-D23}$ ). BLM induced an increase in  $\Delta CT^{D9-D23}$  demonstrating fibrosis progression between D9 and D23 (Fig. 7a). Both nintedanib and pirfenidone significantly decreased  $\Delta CT^{D9-D23}$  showing therapy efficacy (Fig. 7a). In order to determine the predictive value of early CT imaging, [ $^{18}$ F]FDG PET and [ $^{18}$ F]FMISO PET, correlation between  $\Delta CT^{D9-D23}$  and values at D9 of MLD, [ $^{18}$ F]FDG uptake and [ $^{18}$ F]FMISO uptake were performed. Interestingly, in BLM-receiving mice, [ $^{18}$ F]FMISO uptake at D9 positively correlated with  $\Delta CT^{D9-D23}$  showing that lungs with higher [ $^{18}$ F]FMISO uptake at D9 were those with higher fibrosis progression (Fig. 7b). On the contrary, MLD and [ $^{18}$ F]FDG uptake at D9 did not correlate with  $\Delta CT^{D9-D23}$  (Fig. 7b).

Similarly, [ $^{18}$ F]FMISO uptake at D9 positively correlated with  $\Delta CT^{D9-D23}$  of nintedanib-treated mice demonstrating that lungs with higher [ $^{18}$ F]FMISO uptake at D9 were those in which nintedanib showed the best efficacy (Fig. 7c). On the contrary, MLD and [ $^{18}$ F]FDG uptake at D9 did not correlate with  $\Delta CT^{D9-D23}$  in nintedanib-treated animals (Fig. 7c).

Neither [ $^{18}$ F]FDG uptake nor [ $^{18}$ F]FMISO uptake significantly correlated with  $\Delta CT^{D9-D23}$  of pirfenidone-treated mice demonstrating that the early uptake of these two tracers is not correlated with pirfenidone efficacy (Fig. 7d). On the contrary, MLD at D9 negatively correlated with  $\Delta CT^{D9-D23}$  of pirfenidone-treated mice meaning that pirfenidone showed the best efficacy on lungs with higher MLD at early fibrotic stage (D9, Fig. 7d).

Similar results were obtained when correlating early (D9) CT, [ $^{18}$ F]FDG and [ $^{18}$ F]FMISO uptakes with the amount of collagen at D23 measured by histological staining. Only early [ $^{18}$ F]FMISO uptake significantly and positively correlated with the amount of collagen at D23 in BLM-receiving mice demonstrating that the lung with high early [ $^{18}$ F]FMISO uptake had the most fibrotic outcome (Suppl Fig. 10a). Similarly, only early [ $^{18}$ F]FMISO uptake significantly and negatively correlated with end collagen content in BLM-receiving mice treated with nintedanib demonstrating that the lung with high early [ $^{18}$ F]FMISO uptake responded better to nintedanib (Suppl Fig. 10b). Neither early (D9) CT, [ $^{18}$ F]FDG nor [ $^{18}$ F]FMISO uptakes correlated with response to pirfenidone (Suppl Fig. 10c).



**Discussion**

In vivo molecular imaging has become a central tool in preclinical research, clinical trials and medical practice for the diagnosis and monitoring of several diseases. Imaging

of IPF remains limited to HRCT in the clinical practice both for diagnosis and monitoring. In the current study, we confirm in a preclinical model that longitudinal CT imaging is a reliable tool to monitor the severity and progression of lung fibrotic areas. Semi-automatic mice lung



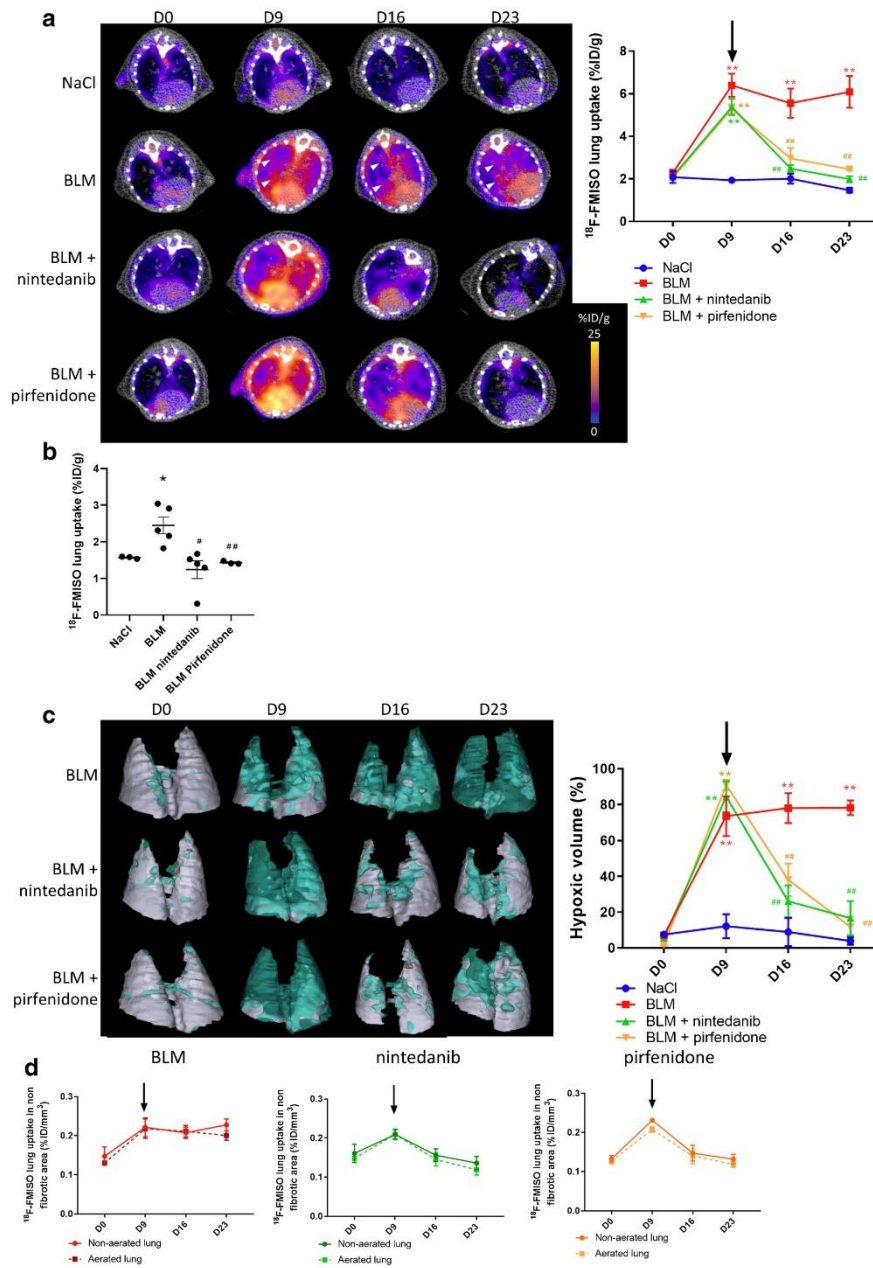
◀ **Fig. 5** [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET can detect advanced lung fibrosis and is suitable for anti-fibrotic therapies follow-up. **a** Representative [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET/CT images of NaCl- and BLM-receiving mice treated or not with nintedanib or pirfenidone at D0, D8, D15 and D22. Graph represents evolution of [ $^{18}\text{F}$ ]FDG lung uptake (%ID/g) at all time points. Results are presented as mean  $\pm$  SEM,  $n=4$  for NaCl and  $n=5$  for other groups. Stars (\*) are representative of statistical comparison between time points for each group and hashes (#) are representative of statistical comparison between the groups at each time points.  $^{*60}p < 0.05$ . Black arrow represents the start of treatments. **b** Representative 3D reconstruction of lung 3DROI segmentation of PET images representative of metabolic lung volume (MLV) of BLM-receiving mice treated or not with nintedanib or pirfenidone at D0, D8, D15 and D22. Cyan represents areas with high [ $^{18}\text{F}$ ]FDG lung uptake (above threshold of  $\text{MLV}_{\text{threshold}} = (\text{SUV}_{\text{mean}})_{\text{D0}} + 2\text{SD}$ ); grey represents areas with low [ $^{18}\text{F}$ ]FDG lung uptake (below the threshold). Graph represents the percentage of evolution of MLV. Results are presented as mean  $\pm$  SEM,  $n=4$  for NaCl and  $n=5$  for other groups. Stars (\*) are representative of statistical comparison between time points for each group and hashes (#) are representative of statistical comparison between the groups at each time points.  $^{*}p < 0.05$ . Black arrow represents the start of treatments. **c** Graph represents the evolution of [ $^{18}\text{F}$ ]FDG lung uptake in %ID/g of BLM-receiving mice treated or not with nintedanib or pirfenidone at D0, D8, D15 and D22 in aerated and non-aerated lung areas (segmented on CT images). Results are presented as mean  $\pm$  SEM,  $n=4$  for NaCl and  $n=5$  for other groups,  $^{*}p < 0.05$ . Black arrow represents the start of treatments

segmentation allowed accurate CT quantification with parameters such as MLD and the determination of aerated lung areas which are decreased during fibrosis. In our study, CT quantification detected fibrotic changes in the lungs of BLM-receiving mice from D9 with progression up to D23 in correlation with classical histological determination of lung collagen content in this preclinical model. Our results are in accordance with previous studies demonstrating that lung CT imaging segmentation and quantification using equivalent methods were in good agreement with histological read-outs and were able to quantify effectively and non-invasively disease progression longitudinally in several lung fibrosis models [21–23]. Furthermore, we demonstrate that our CT imaging lung segmentation/quantification allowed the monitoring of pirfenidone and nintedanib anti-fibrotic efficacy by reducing MLD and increasing lung aerated areas from D9 up to D23. Similar results were found in a study monitoring the impact of imatinib on aerated lung volume and MLD by longitudinal CT scans demonstrating the usefulness of such technique to monitor therapy efficacy in fibrosis animal models [24].

The main clinical challenge remains the impossibility to predict the disease course at the time of diagnosis. Coconcelli et al. [25] demonstrated that fibrotic extent in HRCT of IPF patients was useful to differentiate rapid from slow progressors at presentation. In addition, early structural changes on HRCT have been shown to predict progression in lung function of IPF patients [26] and

HRCT scanning indexes including MLD represent additive value for prediction of outcome [27]. On the contrary, our preclinical study on BLM-induced lung fibrosis in mice did not demonstrate a correlation between early CT quantification and disease progression. This discrepancy may be explained by the differences between the lesions observable on CT in animal models and in human IPF. While BLM-induced fibrosis remains a robust model regrouping characteristic features such as collagen accumulation and deterioration of lung function, it does not fully recapitulate IPF features such as honeycombing which is a hallmark of HRCT in IPF patients. Another bias resides in the progression pattern of BLM-induced fibrosis which may be more homogeneous compared with one of IPF patients due to controlled experimental procedures. In addition, baseline HRCT in IPF patients are likely representative of more advanced lung fibrosis than in our animal model due to diagnosis delays. As a consequence, early fibrotic lesions observed in our model at D9 may not be enough advanced to correlate with fibrosis progression as observed in human IPF. Nevertheless, our preclinical study highlighted the fact that baseline CT quantification correlated with pirfenidone efficacy in accordance with a clinical study by Higo et al. [28] which demonstrates that an early deterioration of HRCT was significantly more observed in the progressive versus improved/stable IPF patients under pirfenidone treatment. Similarly, increased honeycombing and ground glass opacities on HRCT were shown to be associated with progressive IPF patients under pirfenidone [29]. Despite such promising preclinical and clinical results, HRCT quantification is not yet integrated in a routine clinic.

Our results confirm the upregulation of Glut-1 specifically in  $\alpha$ -SMA positive myofibroblasts in BLM-induced fibrotic lungs. Accordingly, [ $^{18}\text{F}$ ]FDG lung uptake was specifically found in fibrotic areas and was only increased at later stages from D15 suggesting that it requires a certain amount of differentiated myofibroblasts to be observable. Our results are in accordance with the previous finding in preclinical models showing an increase in [ $^{18}\text{F}$ ]FDG lung uptake upon BLM at D15 and clinical findings showing that lung areas with high [ $^{18}\text{F}$ ]FDG uptake were associated with regions of lung parenchymal changes on HRCT [5–7]. The temporal and spatial distribution of the [ $^{18}\text{F}$ ]FDG uptake in the fibrotic lung both in clinical and preclinical setting suggest that [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET may detect fibrotic regions that are already visible on HRCT, thus limiting its interest as a novel imaging tool for lung fibrosis. In addition, a number of issues persist with the use of [ $^{18}\text{F}$ ]FDG for IPF management. Even though glucose transporters are upregulated on myofibroblasts in IPF, macrophages and cancer cells are also characterized by an increased uptake of [ $^{18}\text{F}$ ]FDG



which can lead to misinterpretation of  $^{18}\text{F}$ FDG PET imaging in IPF patients with common co-morbidities such

lung infection or lung cancer. Interestingly, in line with our results, a recent study demonstrated the inefficiency

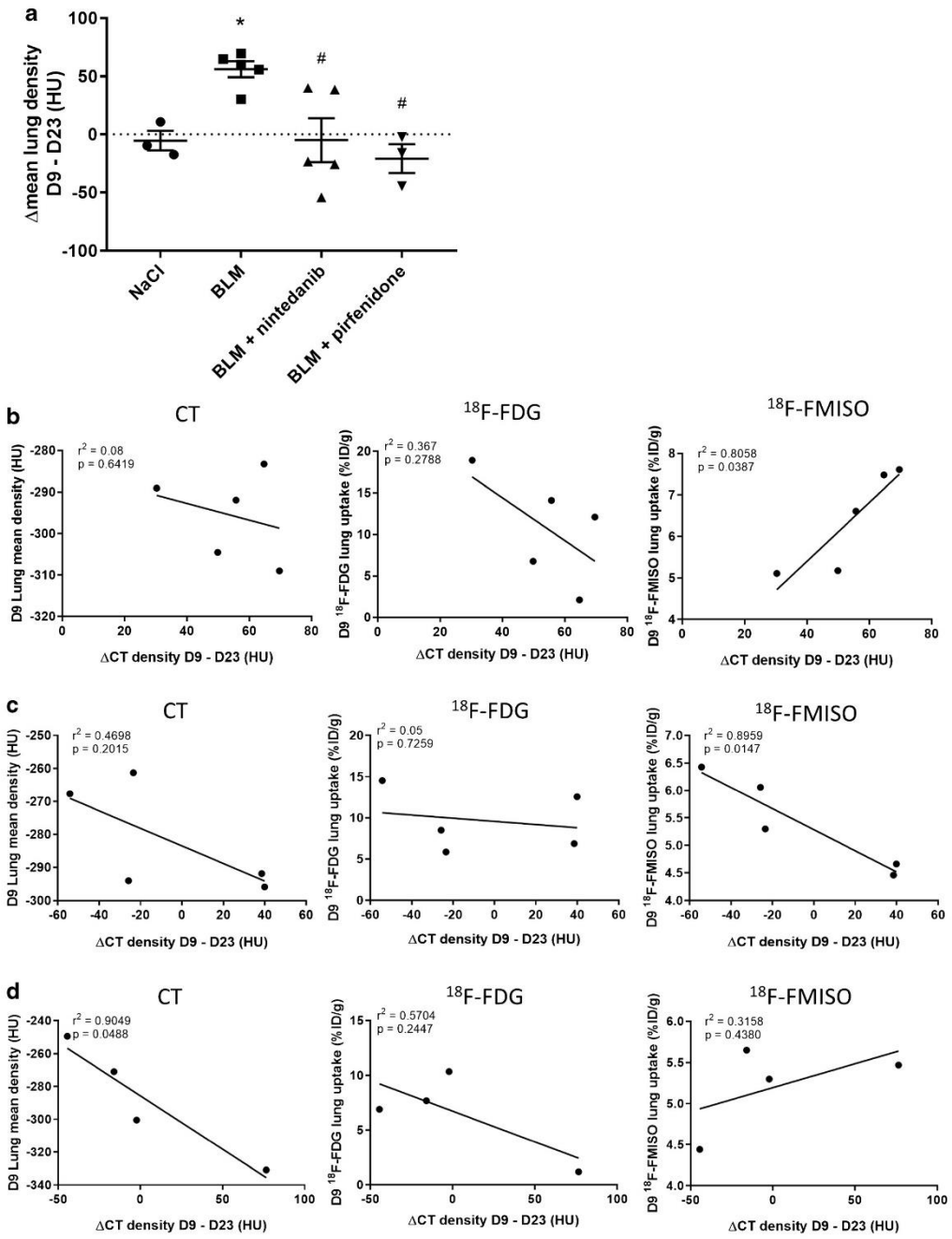
**Fig. 6** [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO PET can detect advanced lung fibrosis and is suitable for anti-fibrotic therapies follow-up. **a** Representative [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO PET/CT images of NaCl- and BLM-receiving mice treated or not with nintedanib or pirfenidone at D0, D9, D16 and D23. Graph represents evolution of [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO lung uptake (%ID/g) at all time points. Results are presented as mean  $\pm$  SEM,  $n = 4$  for NaCl and  $n = 5$  for other groups. Stars (\*) are representative of statistical comparison between time points for each group and hashes (#) are representative of statistical comparison between the groups at each time points. \*\*\*(#) $p < 0.01$ . Black arrow represents the start of treatments. **b** Radioactivity content in lungs of NaCl- and BLM-receiving mice treated or not with nintedanib or pirfenidone and lung to blood ratio at D23 measured ex vivo with a  $\gamma$ -counter. Results are presented as mean  $\pm$  SEM,  $n = 4$  for NaCl and  $n = 5$  for other groups. Stars (\*) are representative of comparison of each group with NaCl group and hashes (#) are representative of statistical comparison of each group with the BLM group. \*(#) $p < 0.05$  and \*\*(#) $p < 0.01$ . **c** Representative 3D reconstruction of lung 3DROI segmentation of PET images representative of hypoxic lung volume (HLV) of BLM-receiving mice treated or not with nintedanib or pirfenidone at D0, D9, D16 and D23. Cyan represents areas with high [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO lung uptake (above threshold of  $\text{HLV}_{\text{threshold}} = \text{TBR} \times 1.4$ ); grey represents areas with low [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO lung uptake (below the threshold). Graph represents the percentage of evolution of HLV. Results are presented as mean  $\pm$  SEM,  $n = 4$  for NaCl and  $n = 5$  for other groups. Stars (\*) are representative of statistical comparison between time points for each group and hashes (#) are representative of statistical comparison between the groups at each time points. \*(#) $p < 0.01$ . Black arrow represents the start of treatments. **d** Graph represents the evolution of [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO lung uptake in %ID/g of BLM-receiving mice treated or not with nintedanib or pirfenidone at D0, D9, D16 and D23 in aerated and non-aerated lung areas (segmented on CT images). Results are presented as mean  $\pm$  SEM,  $n = 4$  for NaCl and  $n = 5$  for other groups. Black arrow represents the start of treatments

of [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET imaging to assess the early response of IPF patients to nintedanib or pirfenidone [18], further highlighting the crucial need for a better tracer for IPF early detection and therapy efficacy monitoring.

Chronic hypoxia of the lung is a significant clinical feature of patients with IPF and hypoxia exposure exacerbates bleomycin-induced lung fibrosis [15]. Interestingly, Burman et al. [15] demonstrated that BLM induced the formation of hypoxic patches localized around fibrotic areas. Furthermore, pimonidazole, a compound which specifically accumulates in cells in hypoxic conditions with a similar mechanism than [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO, was found to accumulate in alveolar epithelial cells boarding fibrotic lung areas upon bleomycin in mice. Our data support the fact that a hypoxic microenvironment develops in the fibrotic lungs upon BLM in mice with the upregulation of hypoxic markers such as HIF-1 $\alpha$  associated with an increase in [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO lung uptake in correlation with fibrosis severity, as already demonstrated in oncology [30]. We demonstrate that the increase in [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO lung uptake occurs in the area appearing “normal” on early CT scans and which will evolve towards fibrotic lesion. These data are in line with other studies demonstrating that HIF-1 $\alpha$  and CAIX were

upregulated not only in areas of active fibrosis but also within areas of IPF lung that appear histologically normal [11]. These findings suggest that activation of hypoxia signalling is driving the remodelling of areas in the IPF lung which are not yet fibrotic thus promoting disease progression. These data are also supported by the fact that [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO uptake occurred at early stage from D9 suggesting the hypoxia imaging with [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO could represent an early marker of fibrosis progression. While these preclinical results are certainly promising, their relevance for human IPF may not be unchallenging. BLM-induced fibrosis, while a very robust model of progressive lung fibrosis, may show some important limitations for clinical translation regarding hypoxia signalling. As demonstrated in our study, BLM induces a diffuse and massive expression of HIF1 $\alpha$  in mice lungs which is rather different from HIF1 $\alpha$  signal in IPF lung in which HIF1 $\alpha$  expression has been shown to be more restricted to hyperplastic alveolar epithelial cells and not (myo)fibroblasts [10, 15, 31]. As a consequence, our preclinical results certainly need to be further confirmed in phase I clinical studies evaluating the relevance of [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO PET in IPF patients.

In addition, we demonstrate that early [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO lung uptake correlates with fibrosis progression. Upon BLM, mice lungs with higher [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO uptake show the most severe fibrosis progression. Similarly, unlike CT scans and [ $^{18}\text{F}$ ]FDG, [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO imaging correlates with nintedanib efficacy. Upon BLM, mice lungs with higher [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO uptake show a better anti-fibrotic response with nintedanib. Fibrosis progression and therapy efficacy have been measured by the variation of MLD between start and end of treatment (D9 and D23) in BLM-receiving mice treated or not with pirfenidone and nintedanib. This method therefore assumes that CT scan is an accurate tool to quantify lung fibrosis. In addition, as mentioned before, differences in CT scans between preclinical model and human IPF represent a limitation regarding the translation of our results in clinical setting. To further validate our approach, we demonstrated that early [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO lung uptake also correlated with end collagen content which is a validated readout in preclinical lung fibrosis studies. Our preclinical data are in line with recent clinical studies showing that intracellular hypoxia measured by [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO PET has prognostic impact in patients with breast and pancreas cancer [32, 33]. Moreover, Quintela-Fandino et al. [34] demonstrated a predictive role of [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO PET in HER2-negative early breast cancer treated with nintedanib, detecting the patients that did not experience benefit from it based on baseline tumour oxygenation levels and further supporting the potential impact of hypoxia imaging as an early marker of nintedanib efficacy.



◀ **Fig. 7** [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO PET is correlated with fibrosis progression and nintedanib efficacy. **a** Variation of mean lung density on CT scans of NaCl- and BLM-receiving mice treated or not with nintedanib or pirfenidone between D9 and D23 ( $\Delta\text{CT}^{\text{D9-D23}}$ ). Results are presented as mean  $\pm$  SEM,  $n = 4$  for NaCl and  $n = 5$  for other groups. Stars (\*) are representative of comparison of each group with the NaCl group and hashes (#) are representative of statistical comparison of each group with the BLM group.  $^{*(\#)}p < 0.05$ . **b** Correlation between, D9 mean lung density (left), D9 [ $^{18}\text{F}$ ]FDG lung uptake (center) or D9 [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO lung uptake (right) and  $\Delta\text{CT}^{\text{D9-D23}}$  in BLM-receiving mice. **c** Correlation between, D9 mean lung density (left), D9 [ $^{18}\text{F}$ ]FDG lung uptake (center) or D9 [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO lung uptake (right) and  $\Delta\text{CT}^{\text{D9-D23}}$  in BLM-receiving mice treated with nintedanib. **d** Correlation between, D9 mean lung density (left), D9 [ $^{18}\text{F}$ ]FDG lung uptake (center) or D9 [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO lung uptake (right) and  $\Delta\text{CT}^{\text{D9-D23}}$  in BLM-receiving mice treated with pirfenidone

## Conclusion

In light of the lack of tracers to monitor lung fibrosis, our study proposes to evaluate the impact of [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET and [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO PET on lung fibrosis monitoring in a preclinical model. While both tracers are able to detect BLM-induced lung fibrosis in mice as well as CT (Suppl Fig. 11a), [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO PET allows an earlier detection of the disease than [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET which may be crucial with a view to promoting early diagnosis in lung fibrosis. In addition, early [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO lung uptake appears to be a better indicator of BLM-induced lung fibrosis aggressiveness and response to nintedanib. As a consequence, [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO PET may be an interesting tool to evaluate as a first step towards personalized medicine in IPF to identify patients likely to rapidly/dramatically progress and likely to respond to nintedanib rather than pirfenidone. It would therefore become an excellent tool to drive therapeutic decision in order to ultimately improve patients' outcome in this devastating disease. To that end, there is an urgent need to provide phase I clinical studies evaluating the relevance of [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO PET in IPF patients.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00259-021-05209-2>.

**Acknowledgements** We thank the histology platform Cellimap for their invaluable and professional help. We would like to thank Camille Drouet and Valérie Bordat for their technical help. This work was performed within Pharm'Image, a regional center of excellence in Pharmacoinaging. Support was also provided by the French Government through the French National Research Agency (ANR) under the program "Investissements d'Avenir" (ANR-10-EQPX-05-01/IMAPPI Equipex). Julie Tanguy is funded by "La Fondation du Souffle et le Fonds de Recherche en Santé Respiratoire".

**Author contribution** Authors' contributions are as follows:

Conception and design: P. Bonniaud, A. Cochet, B. Collin, PS. Bellaye

Acquiring data: J. Tanguy, F. Goirand, M. Moreau, C. Mothes, A. Helbling, M. Guillemain

Analysing data: A. Oudot, A. Bouchard, J. Frenay, PS. Bellaye

Drafting the manuscript: J. Tanguy, F. Goirand

Revising the manuscript: A. Bouchard, J. Frenay, M. Moreau, C. Mothes, A. Oudot, A. Helbling, M. Guillemain

Enhancing the manuscript intellectual content: P. Bonniaud, A. Cochet, B. Collin, PS. Bellaye

Approving the final content of the manuscript: All authors

**Funding** This project was supported by ANR (ANR-20-CE17-0005) and "La Fondation du Souffle et le Fonds de Recherche en Santé Respiratoire" (AO Plate-forme2018, DETECT-FIP).

## Declarations

**Ethics approval** All animal studies were conducted in accordance with the legislation on the use of laboratory animals (directive 2010/63/EU) and were approved by an accredited ethical committee (C2ea Grand Campus n°105) and the French Ministries of Research and Agriculture (project #12816).

**Consent for publication** All authors approved the article for publication.

**Conflict of interest** Philippe Bonniaud: Roche (board/advice/travel for ERS conference), Boehringer (board/advice/congress fees). All other authors declare no competing interests.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

- Martinez FJ, Collard HR, Pardo A, Raghu G, Richeldi L, Selman M, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17074. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.74>.
- Kaarteehano R. The current position of surgical lung biopsy in the diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res*. 2013;14:43. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-14-43>.
- Lamas DJ, Kawut SM, Bagiella E, Philip N, Arcasoy SM, Lederer DJ. Delayed access and survival in idiopathic pulmonary fibrosis: a cohort study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184:842–7. <https://doi.org/10.1164/rccm.201104-0668OC>.
- Xie N, Tan Z, Banerjee S, Cui H, Ge J, Liu RM, et al. Glycolytic reprogramming in myofibroblast differentiation and lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192:1462–74. <https://doi.org/10.1164/rccm.201504-0780OC>.
- Groves AM, Win T, Screaton NJ, Berovic M, Endozo R, Booth H, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis and diffuse parenchymal lung disease: implications from initial experience with  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT. *J Nucl Med*. 2009;50:538–45. <https://doi.org/10.2967/jnumed.108.057901>.
- Meissner HH, Soo Hoo GW, Khonsary SA, Mandelkern M, Brown CV, Santiago SM. Idiopathic pulmonary fibrosis: evaluation with

- positron emission tomography. *Respiration*. 2006;73:197–202. <https://doi.org/10.1159/000088062>.
7. Umeda Y, Demura Y, Morikawa M, Anzai M, Kadowaki M, Ameshima S, et al. Prognostic value of dual-time-point 18F-FDG PET for idiopathic pulmonary fibrosis. *J Nucl Med*. 2015;56:1869–75. <https://doi.org/10.1080/10.2967/jnumed.115.163360>.
  8. Monnich D, Thorwarth D, Leibfarth S, Pfannenbergl C, Reischl G, Manz PS, et al. Overlap of highly FDG-avid and FMISO hypoxic tumor subvolumes in patients with head and neck cancer. *Acta Oncol*. 2017;56:1577–82. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2017.1363910>.
  9. Kottmann RM, Kulkarni AA, Smolnycki KA, Lyda E, Dahanayake T, Salibi R, et al. Lactic acid is elevated in idiopathic pulmonary fibrosis and induces myofibroblast differentiation via pH-dependent activation of transforming growth factor-beta. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186:740–51. <https://doi.org/10.1164/rccm.201201-0084OC>.
  10. Tzouvelekis A, Harokopos V, Paparountas T, Oikonomou N, Chatziioannou A, Vilaras G, et al. Comparative expression profiling in pulmonary fibrosis suggests a role of hypoxia-inducible factor-1alpha in disease pathogenesis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176:1108–19. <https://doi.org/10.1164/rccm.200705-683OC>.
  11. Bodempudi V, Hergert P, Smith K, Xia H, Herrera J, Peterson M, et al. miR-210 promotes IPF fibroblast proliferation in response to hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014;307:L283–94. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00069.2014>.
  12. Ertekin A, Deger Y, Mert H, Mert N, Yur F, Dede S, et al. Investigation of the effects of alpha-tocopherol on the levels of Fe, Cu, Zn, Mn, and carbonic anhydrase in rats with bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Biol Trace Elem Res*. 2007;116:289–300. <https://doi.org/10.1007/BF02698013>.
  13. Rabbani ZN, Mi J, Zhang Y, Delong M, Jackson IL, Fleckenstein K, et al. Hypoxia inducible factor 1alpha signaling in fractionated radiation-induced lung injury: role of oxidative stress and tissue hypoxia. *Radiat Res*. 2010;173:165–74. <https://doi.org/10.1667/RR1816.1>.
  14. Kathirya JJ, Nakra N, Nixon J, Patel PS, Vaghasiya V, Alhassani A, et al. Galectin-1 inhibition attenuates profibrotic signaling in hypoxia-induced pulmonary fibrosis. *Cell Death Dis*. 2017;3:17010. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.10>.
  15. Burman A, Kropfki JA, Calvi CL, Serezani AP, Pascoalino BD, Han W, et al. Localized hypoxia links ER stress to lung fibrosis through induction of C/EBP homologous protein. *JCI Insight*. 2018;3. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.99543>.
  16. Desvaux E, Courteau A, Bellaye PS, Guillemain M, Drouet C, Walker P, et al. Cherenkov luminescence imaging is a fast and relevant pre-clinical tool to assess tumour hypoxia in vivo. *EJNMMI Res*. 2018;8:111. <https://doi.org/10.1186/s13550-018-0464-7>.
  17. Kolb P, Upagupta C, Vierhout M, Ayaub E, Bellaye PS, Gauldie J, et al. The importance of interventional timing in the bleomycin model of pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2020;55. <https://doi.org/10.1183/13993003.01105-2019>.
  18. Bondue B, Castiaux A, Van Simaey G, Mathey C, Sherer F, Egrise D, et al. Absence of early metabolic response assessed by 18F-FDG PET/CT after initiation of antifibrotic drugs in IPF patients. *Respir Res*. 2019;20:10. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-0974-5>.
  19. Ask K, Labiris R, Farkas L, Moeller A, Froese A, Farncombe T, et al. Comparison between conventional and "clinical" assessment of experimental lung fibrosis. *J Transl Med*. 2008;6:16. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-6-16>.
  20. Decolgne N, Kolb M, Margetts PJ, Menetrier F, Artur Y, Garrido C, et al. TGF-beta1 induces progressive pleural scarring and subpleural fibrosis. *J Immunol*. 2007;179:6043–51.
  21. Ruscitti F, Ravanetti F, Essers J, Ridwan Y, Belenkov S, Vos W, et al. Longitudinal assessment of bleomycin-induced lung fibrosis by micro-CT correlates with histological evaluation in mice. *Multidiscip Respir Med*. 2017;12:8. <https://doi.org/10.1186/s40248-017-0089-0>.
  22. Rodt T, von Falck C, Dettmer S, Halter R, Maus R, Ask K, et al. Micro-computed tomography of pulmonary fibrosis in mice induced by adenoviral gene transfer of biologically active transforming growth factor-beta1. *Respir Res*. 2010;11:181. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-11-181>.
  23. Ruscitti F, Ravanetti F, Donofrio G, Ridwan Y, van Heijningen P, Essers J, et al. A multimodal imaging approach based on micro-CT and fluorescence molecular tomography for longitudinal assessment of bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *J Visualized Exp: JoVE*. 2018. <https://doi.org/10.3791/56443>.
  24. Vande Velde G, Poelmans J, De Langhe E, Hillen A, Vanoirbeek J, Himmelreich U, et al. Longitudinal micro-CT provides biomarkers of lung disease that can be used to assess the effect of therapy in preclinical mouse models, and reveal compensatory changes in lung volume. *Dis Model Mech*. 2016;9:91–8. <https://doi.org/10.1242/dmm.020321>.
  25. Cocconcelli E, Balestro E, Biondini D, Barbiero G, Polverosi R, Calabrese F, et al. High-resolution computed tomography (HRCT) reflects disease progression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF): relationship with lung pathology. *J Clin Med*. 2019;8. <https://doi.org/10.3390/jcm8030399>.
  26. Kim GHI, Weigt SS, Belperio JA, Brown MS, Shi Y, Lai JH, et al. Prediction of idiopathic pulmonary fibrosis progression using early quantitative changes on CT imaging for a short term of clinical 18–24-month follow-ups. *Eur Radiol*. 2020;30:726–34. <https://doi.org/10.1007/s00330-019-06402-6>.
  27. Loeh B, Brylski LT, von der Beck D, Seeger W, Krauss E, Bonniand P, et al. Lung CT densitometry in idiopathic pulmonary fibrosis for the prediction of natural course, severity, and mortality. *Chest*. 2019;155:972–81. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2019.01.019>.
  28. Higo H, Miyahara N, Taniguchi A, Senoo S, Itano J, Watanabe H, et al. Deterioration of high-resolution computed tomography findings predicts disease progression after initial decline in forced vital capacity in idiopathic pulmonary fibrosis patients treated with pirfenidone. *Respir Investig*. 2020;58:185–9. <https://doi.org/10.1016/j.resinv.2019.12.007>.
  29. Balestro E, Cocconcelli E, Giraudo C, Polverosi R, Biondini D, Lacedonia D, et al. High-resolution CT change over time in patients with idiopathic pulmonary fibrosis on antifibrotic treatment. *J Clin Med*. 2019;8. <https://doi.org/10.3390/jcm8091469>.
  30. Sato J, Kitagawa Y, Yamazaki Y, Hata H, Okamoto S, Shiga T, et al. 18F-fluoromisonidazole PET uptake is correlated with hypoxia-inducible factor-1alpha expression in oral squamous cell carcinoma. *J Nucl Med*. 2013;54:1060–5. <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.114355>.
  31. Delbrel E, Soumare A, Naguez A, Label R, Bernard O, Bruhat A, et al. HIF-1alpha triggers ER stress and CHOP-mediated apoptosis in alveolar epithelial cells, a key event in pulmonary fibrosis. *Sci Rep*. 2018;8:17939. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36063-2>.
  32. Asano A, Ueda S, Kuji I, Yamane T, Takeuchi H, Hirokawa E, et al. Intracellular hypoxia measured by (18F)-fluoromisonidazole positron emission tomography has prognostic impact in patients with

- estrogen receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res : BCR*. 2018;20:78. <https://doi.org/10.1186/s13058-018-0970-6>.
33. Hernandez-Agudo E, Mondejar T, Soto-Montenegro ML, Megias D, Mouron S, Sanchez J, et al. Monitoring vascular normalization induced by antiangiogenic treatment with (18)F-fluoromisonidazole-PET. *Mol Oncol*. 2016;10:704–18. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2015.12.011>.
34. Quintela-Fandino M, Lluch A, Manso L, Calvo I, Cortes J, Garcia-Saenz JA, et al. (18)F-fluoromisonidazole PET and activity of neoadjuvant nintedanib in early HER2-negative breast cancer: a window-of-opportunity randomized trial. *Clin Cancer Res*. 2017;23:1432–41. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0738>.

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Projet 2.

### L'inhibition de la protéine HSPB5 par le NCI-41356 réduit la fibrose pulmonaire expérimentale en bloquant la signalisation TGF- $\beta$ 1

Objectif : Un axe majeur de recherche de notre équipe est de mieux caractériser le rôle des petites protéines de choc thermique dans le développement de la fibrose pulmonaire. Dans de précédents travaux, nous avons montré la surexpression de HSPB5 dans le tissu pulmonaire en cas de fibrose, et l'efficacité de son inhibition pour en limiter la progression. Différentes stratégies d'inhibition ont été développées dans l'équipe. Dans le cadre de mon travail de thèse, je me suis intéressée au NCI-41356, un inhibiteur chimique d'HSPB5 connu pour inhiber la liaison HSPB5-VEGF et limiter le développement tumoral.

Cette partie de ma thèse a consisté à caractériser les effets antifibrosants de ce composé dans nos modèles *in vitro* et *in vivo* de fibrose pulmonaire.

Méthodes : *In vivo*, la fibrose a été évaluée chez des souris injectées par voie intratrachéale (i.t.) à la bléomycine (BLM) et traitées avec du NaCl ou du NCI-41356 (3 fois i.t. ou 3 fois par semaine i.v.). La fibrose a été évaluée par quantification du collagène (Sircol, coloration rouge Sirius), immunofluorescence, expression de l'ARNm TGF- $\beta$  (RNAscope). *In vitro*, la signalisation du TGF- $\beta$ 1 a été évaluée dans des cellules épithéliales traitées par le TGF- $\beta$ 1 avec ou sans NCI-41356 (Western Blot, Immunofluorescence, Proximity ligation assay). En parallèle, nous avons exploré les propriétés inhibitrices spécifiques du NCI-41356 sur l'interaction HSPB5/SMAD4 (Monolith).

Résultats : *In vivo*, le NCI-41356 a réduit l'accumulation de collagène, l'expression du TGF- $\beta$ 1 et de plusieurs marqueurs pro-fibrosants (PAI-1,  $\alpha$ -SMA). *In vitro*, le NCI-41356 a diminué l'interaction entre HSPB5 et SMAD4, et donc le transport nucléaire de SMAD4, étape clé de la signalisation pro-fibrosante induite par le TGF- $\beta$ 1.

Conclusion : Dans cette étude, nous avons montré l'intérêt de l'utilisation du NCI-41356 pour limiter le développement de la fibrose pulmonaire dans nos modèles murins, et que ces effets étaient associés à une inhibition de la signalisation du TGF- $\beta$ 1.

Ce travail est actuellement en cours de soumission au journal *Pharmaceuticals*.





Article

## HSPB5 inhibition by NCI-41356 reduces experimental lung fibrosis by blocking TGF- $\beta$ 1 signaling

Julie Tanguy<sup>1,2</sup>, Pierre-Marie Boutanquoi<sup>1</sup>, Olivier Burgy<sup>1,2</sup>, Lucile Dondaine<sup>1,2</sup>, Burhan Uyanik<sup>1</sup>, Olivier Burgy<sup>1</sup>, Carmen Garrido<sup>1,3</sup>, Philippe Bonniaud<sup>1,2,\*</sup>, Pierre-Simon Bellaye<sup>2,3,†</sup> and Françoise Goirand<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> INSERM U1231, Equipe HSP-pathies, 7 Boulevard Jeanne d'Arc, Dijon, France

<sup>2</sup> Centre de Référence Constitutif des Maladies Pulmonaires Rares de l'Adultes de Dijon, réseau OrphaLung, Filère RespiFil, Centre Hospitalier Universitaire de Bourgogne, Dijon, France

<sup>3</sup> Centre George François Leclerc, Service de médecine nucléaire, Plateforme d'imagerie et de radiothérapie précliniques, 1 rue du professeur Marion, Dijon, France

<sup>†</sup> Contributed equally

\* Correspondence: Pierre-Simon Bellaye, Email: psbellaye@cgfl.fr

**Abstract:** (1) Background: Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic, progressive and lethal disease of unknown aetiology. In France, it ranks among the most frequent interstitial pathologies and affects 6 out of 8 people per 100,000 each year. IPF is characterized by dysregulated healing mechanisms that lead to the accumulation of large amounts of collagen in the lung tissue that disrupts the alveolar architecture. Nintedanib and Pirfenidone are the only currently available treatments even though they are only able to slow down the disease without being curative. In this context, inhibiting HSPB5, a low molecular weight heat shock protein known to be involved in the development of fibrosis, could constitute a potential therapeutic target. Our aim consists to explore how NCI-41356 (a chemical inhibitor of HSPB5) can limit the development of pulmonary fibrosis. (2) Methods: In vivo, fibrosis was assessed in mice injected intratracheally (i.t.) with bleomycin (BLM) and treated with NaCl or NCI-41356 (3 times i.t. or every other day.). Fibrosis was evaluated by collagen quantification (Sircol, Sirius Red staining), Immunofluorescence, TGF- $\beta$  gene expression (RNAscope). In vitro, TGF- $\beta$ 1 signaling was evaluated in epithelial cells treated by TGF- $\beta$ 1 with or without NCI-41356 (Western Blot, Immunofluorescence, Proximity ligation assay). In parallel, we explored the specific inhibitory properties of NCI-41356 on HSPB5/SMAD4 interaction (Monolith). (3) Results: In vivo, NCI-41356 reduced the accumulation of collagen, the expression of TGF- $\beta$ 1 and several pro-fibrotic markers (PAI-1,  $\alpha$ -SMA). In vitro, NCI-41356 decreased the interaction between HSPB5 and SMAD4, explaining NCI-41356 anti-fibrotic properties. (4) Conclusion: In this study, we determined that inhibition of HSPB5/SMAD4 by NCI-41356 could limit IPF in mice. NCI-41356 modulates SMAD4 nuclear translocation thus limiting TGF- $\beta$ 1 signaling and synthesis of collagen and pro-fibrotic markers. Further investigations are needed to determine if these results can be transposed in human.

**Citation:** Lastname, F.; Lastname, F.; Lastname, F. Title. *Pharmaceuticals* 2022, 15, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date

Accepted: date

Published: date

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



**Copyright:** © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Keywords:** IPF; TGF- $\beta$ ; HSPB5; fibrosis; therapy (List three to ten pertinent keywords specific to the article yet reasonably common within the subject discipline.)

### 1. Introduction

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic, progressive and fatal disease of unknown etiology with a median of survival of only 4-5 years that mainly affects individuals over 50 years old [1]. IPF is characterized by the excessive and aberrant deposition of extracellular matrix (ECM) in the lung parenchyma resulting in impaired respiratory func-

tions and progressive morbidity by pulmonary insufficiency. Last estimates show an increase in the incidence of IPF worldwide with a global prevalence of 0.33–2.51 per 10,000 individuals in Europe [2]. Currently, there is no curative treatments for IPF and available pharmacological treatments, pirfenidone and nintedanib, are only able to mildly slow-down disease progression without stopping it. Even though the mechanisms involved in IPF remain elusive, the emergence and persistence of myofibroblasts responsible for the accumulation of ECM inside the lung are key components explaining the development and progression of IPF. Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ 1 is a key pro-fibrotic factor involved in IPF through the activation of the SMAD pathway [3]. Heat shock proteins (HSPs) are chaperon proteins involved in several pathways which ensure cellular homeostasis. HSPs have been shown to be involved in several pathological contexts including lung fibrosis [4]. Our team has shown that HSPB5 (also called  $\alpha$ B-crystallin) a member of the small heat-shock proteins (sHSP) family, was up-regulated in experimental models of lung fibrosis and in IPF patients [5,6]. Moreover, HSPB5 enhanced the nuclear localization of SMAD2/3/4 thus promoting TGF- $\beta$ 1 signaling and subsequent lung fibrosis. In addition, depletion of HSPB5 in several *in vivo* models was able to reduce pulmonary fibrosis [5,6].

In this context, HSPB5 seems to be a relevant target to develop effective anti-fibrotic therapies. Recently, *Chen et al.*, have discovered a small molecular inhibitor of HSPB5, NCI-41356 ((2S,3R)-3-Methylglutamic Acid Hydrochloride Salt), that can selectively inhibits HSPB5 activity and reduce tumor growth in a breast cancer model [7].

We hypothesized that selective inhibition of HSPB5 with NCI-41356 may represent an innovative therapeutic strategy for IPF.

In the current study, we highlight a mechanism by which NCI-41356 inhibits the interaction between HSPB5 and SMAD4 and therefore disrupts the pro-fibrotic TGF- $\beta$ 1 pathway. In addition, our findings demonstrate that this inhibitor reduces the excessive collagen deposition in the lungs and decreases the expression of markers of myofibroblast differentiation in experimental lung fibrosis.

## 2. Results

### 2.1 NCI-41356 inhibits HSPB5 activity and prevents HSPB5/SMAD4 interaction

HSPs are known for their chaperone-like activity preventing protein aggregation. First, we investigated if NCI-41356 was able to inhibit the chaperon activity of HSPB5. Luciferase was denatured by a heat shock (HS) in presence or not of HSPB5 and HSPB1 (as negative control). In absence of NCI-41356, both HSPB1 and HSPB5 were able to partially restore luciferase activity upon HS (Figure 1A, \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). However, in presence of NCI-41356, the protective activity of HSPB5 on luciferase was significantly decreased (Figure 1A, \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). On the contrary, NCI-41356 had no effect on HSPB1 activity demonstrating the specificity of the inhibitor for HSPB5. HSPB5 has been shown to interact with SMAD4 to favor its nuclear localization in fibrotic conditions. Our PLA experiment demonstrated an increase in the proximity between SMAD4 and HSPB5 upon TGF- $\beta$ 1 which was inhibited by NCI-41356 (Figure 1B, \*\*\*\* $p < 0.0001$ ). *In vitro*, we confirmed by a thermophoresis interaction assay that the affinity between HSPB5 and SMAD4 was altered in presence of NCI-41356 in a dose-dependent manner (Figure 1C, \* $p < 0.0278$ ). Further, we demonstrated that NCI-41356 was able to inhibit the translocation of the complex SMAD2/3/4 into the nucleus induced by TGF- $\beta$ 1 (Figure 2A-B).

Altogether, these experiments suggest that NCI-41356 not only selectively inhibits HSPB5 chaperone activity but also interferes with SMAD4 signaling by limiting HSPB5/SMAD4 proximity and reducing SMAD2/3/4 activation and translocation to the nucleus.

## 2.2 Intra-tracheal administration of NCI-41356 protects from BLM-induced lung fibrosis

Lung fibrosis was induced by intra-tracheal (i.t.) administration of BLM. After bleomycin injection at D0, mice received three i.t. treatments with NCI-41356 at D12, D14 and D17 (Figure 3A). Interestingly, NCI-41356 significantly decreased the accumulation of collagen in the lungs at D21 (Figure 3B, \*\* $p=0.0079$ ). Collagen quantification was confirmed by histological measurements that also showed a decrease in collagen lung content at D21 upon NCI-41356 (Figure 3C, \*\* $p=0.0079$ ). Moreover, NCI-41356 was able to effectively reduce the expression of  $\alpha$ -SMA and PAI-1, two important markers of myofibroblasts differentiation (Figure 3D-E, \*\* $p=0.0079$  and \* $p=0.0159$  respectively). In addition, we observed that NCI-41356 also significantly reduced TGF- $\beta$ 1 mRNA expression in lung tissue (Figure 2F, \*\* $p=0.0020$ ).

## 2.3 Intravenous administration of NCI-41356 protects from BLM-induced lung fibrosis

Using the same model of lung fibrosis, the anti-fibrotic activity of intravenous administrations of NCI-41356 was assessed. Intravenous NCI-41356 treatments were performed every other day from day 9 to day 19 (Figure 4A). Moreover, intravenous NCI-41356 treatment was able to decrease collagen accumulation in lungs upon BLM (Figure 4B-C, \* $p=0.0317$  and \* $p=0.0159$ ). In addition, intravenous NCI-41356 reduced  $\alpha$ -SMA (Figure 4D, \* $p=0.0159$ ) and PAI-1 expression (Figure 4E, \* $p=0.0159$ ). Further, intravenous NCI-41356 induced a decrease in TGF- $\beta$ 1 mRNA expression in lungs upon BLM (Figure 4F,  $P<0.0001^*$ ).

Altogether, these results demonstrate that NCI-41356 is able to inhibit pulmonary fibrosis progression when injected locally (i.t.) or systemically (intravenous) by interfering with TGF- $\beta$ 1 signaling *in vivo* (Figure 5).

## 3. Discussion

Nintedanib and pirfenidone are the only available therapeutic strategies for IPF patients, despite being only able to moderately slow down the disease. The lack of curative therapy for IPF remains a major clinical issue which drives us towards the discovery of novel therapeutic combination strategies with compounds affecting complementary profibrotic pathways. HSPs have been shown to play a crucial role in disease development and progression mainly in cancer [8] but also in fibrotic disorders [4,9]. In the context of fibrosis, most HSPs have been shown to be involved in the modulation TGF- $\beta$ 1 signaling, one of the main pro-fibrotic factor taking part in IPF [4], suggesting a potential benefit for combination with nintedanib or pirfenidone which affect other pro-fibrotic pathways. The recent interest in HSPs has led to the development of numerous inhibitors that are now being tested in clinical trials, mainly in patients with various cancers [10]. While clinical trial mainly focused on HSPC1 blockade in cancer, inhibitors of other HSPs recently emerged [11]. Chen *et al.* used structure-based molecular docking of HSPB5 and identified a potent small molecular inhibitor, NCI-41356 [7]. In their study, NCI-41356 showed anti-tumor cell proliferation and invasive effects through the disruption of HSPB5/VEGF interaction and signaling in the breast cancer cells. NCI-41356 also inhibited tumor growth and vasculature development in breast cancer xenograft models [7]. Our study confirms the findings by Chen *et al.* by demonstrating that NCI-41356 is able to inhibit HSPB5 chaperon activity. As the role of VEGF in lung fibrosis remains unclear and considering previous data from our team on the role of HSPB5 on the SMAD-dependent TGF- $\beta$ 1 pathway [5], we focused our study on the impact of NCI-41356 on HSPB5/SMAD4 interaction. We demonstrate that NCI-41356 is able to disrupt the interaction of HSPB5 and SMAD4 in a fibrotic context leading to the inhibition of TGF- $\beta$ 1 signaling *in vitro* and lung fibrosis *in vivo*. These results are in accordance with previous studies demonstrating that the lack of HSPB5 in knock-out mice disrupted the TGF- $\beta$ 1 pathway by interfering with SMAD4 nuclear localization [5,6,12]. Nevertheless, despite the controversial role of VEGF signaling

in fibrosis, the impact of NCI-41356 on HSPB5/VEGF interaction to explain, at least partially, its anti-fibrotic effects cannot be completely ruled out. The role of VEGF in IPF is complex, with "healthy" pulmonary zones showing increased neo-vascularization, whereas fibrotic regions, already invaded by the accumulation of ECM, appear devoid of vascularization. Whether this hyper-vascularization, associated with the overexpression of VEGF by alveolar epithelial cells, is the consequence of the establishment of a protection/regeneration process of the alveolar wall in response to pro-fibrotic stimuli or the cause of tissue remodeling favoring the progression of fibrosis remains a controversial question. Several studies support a protective role of VEGF against pulmonary fibrosis, in particular via the conservation of endothelial cell integrity promoting the survival of pulmonary epithelial cells by a paracrine mechanism [13]. However, an increase in VEGF expression has been demonstrated in non-vascularized fibrotic areas in preclinical models, suggesting a role for VEGF independent of the vascular system [14]. Hamada *et al.* demonstrated that inhibition of VEGF *in vivo* induced attenuation of bleomycin-induced lung fibrosis [15]. Finally, preclinical and clinical results showing an anti-fibrotic effect of nintedanib, a tyrosine kinase inhibitor specific on multiple receptors including VEGF receptors, on bleomycin-induced fibrosis on the one hand and in patients with a decrease in IPF progression on the other hand, suggest an importance of the VEGF signaling pathway in fibrogenesis [16]. The full investigation of the impact of NCI-41356 on VEGF signaling in lung fibrosis is beyond the scope of our paper and will require further studies.

The efficacy of a treatment mostly depends on the techniques by which the drug is delivered and the optimum concentration of the drug in the targeted organ to produce therapeutic benefit without inducing severe side effects. Due to their crucial role on cellular homeostasis, systemic inhibition of HSPs often comes with undesirable side effects and unacceptable toxicity [17]. Similarly, TGF- $\beta$ 1 being a multifunctional cytokine of key importance to the maintenance of tissue homeostasis, systemic targeting of TGF- $\beta$ 1 signaling has been associated with off-target severe side effects [18]. Even though systemic administration is the most common route of drug delivery, in the context of IPF local pulmonary administration of therapeutic compounds may circumvent the occurrence of adverse side effects while optimizing drug concentration at the site of active fibrosis. A comparison between systemic and inhaled administration of levofloxacin demonstrated that local delivery improved access of the drug to the lung tissue supporting the relevance of this approach [19]. As a consequence pulmonary drug delivery for IPF gained interest in the last decade and both pirfenidone and nintedanib inhaled formulations have been successfully tested [20,21]. For both drugs, the local administration in the lung was associated with higher lung and lower plasma concentrations with a conserved anti-fibrotic efficacy [20,21]. Most interestingly, the anti-fibrotic effects of NCI-41356 were similar when applied locally (*i.t.*) and systemically (*i.v.*) suggesting a potential interest of this drug as an inhaled therapy in IPF. Nevertheless, lung drug delivery does not come without issues. Inhalable formulations are a challenge and drug absorption, particle size, inertia, gravitational sedimentation, and Brownian motion are issues that need to be taken into account [22]. As a consequence, further studies are warranted in order to confirm the possibility to use NCI-41356 as an inhaled aerosol to treat lung fibrosis.

#### 4. Materials and Methods

##### *The Animal procedures*

All animals were maintained in specific pathogen-free facilities in accordance with FELASA and Animal Experimental Ethics Committee guidelines (University of Burgundy, France). This study complied with all relevant ethical regulations for animal testing and research and received ethical approval from the Animal Experimental Ethics Committee (University of Burgundy, France). Experiments were performed in 8 weeks-old female C57BL/6 mice weighing 20 to 25 g (Charles River, France). Intratracheal instillation of bleomycin (BLM) at 1.5 mg·kg<sup>-1</sup> (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) or NaCl (control) was performed as previously described [23]. Mice were regularly weighed

and supplemented with Gel Diet (SAFE gel diet, France). (2S,3R)-3-Methylglutamic Acid Hydrochloride Salt (NCI-41356) (sc-206572, Santa Cruz) or NaCl (vehicle) were instilled at 16.5 mg·kg<sup>-1</sup> by intratracheal injection (at day 12, 14 and 17) or at 15 mg·kg<sup>-1</sup> by intravenous injection every two days from day 9 to 19 post-BLM. Mice were euthanized by abdominal aortic bleeding at day 21 post-BLM. Lungs were collected for histological, transcriptomics and collagen quantification analyses.

#### *Collagen quantification*

For histomorphometric assay, the amount of collagen in paraffin-embedded tissue sections was quantified on lung slices from BLM- or NaCl-receiving mice treated or not with NCI-41356 after staining with Picro Sirius Red as previously described [24].

For colorimetric assay, the Sircol assay was performed on lung left lobe extracts using the Sircol kit (Biocolor Ltd, Carrickfergus, UK) and following the manufacturer's recommendations. Results were expressed per mg of lungs.

#### *Duolink Proximity-Ligation Assay (PLA)*

PLA assay was performed with Duolink In Situ Orange Starter Kit Mouse/Rabbit (DUO92102-1KT, Sigma Aldrich) following manufacturer's recommendations. The primary antibodies used were: rabbit anti-SMAD4 (ab40759, 1:100, Abcam), and mouse anti-HSPB5 (ADI-SPA-222, 1:100, EnzoLife). Microscopy images were taken on an Axio Imager 2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany). Images were acquired using an Axio-Cam MRm monochrome CCD camera (Carl Zeiss GmbH) and analyzed using ImageJ software.

#### *Immunofluorescence*

Cells seeded on coverslips in 12-well plates were treated with TGF-β1 (10ng/ml) and/or NCI-41356 (100uM) for 24 hours. Cells were then fixed in 4% formaldehyde for 15 minutes at room temperature (RT), washed and permeabilized with 100% methanol for 20 min on ice. Then, cells were blocked for 1 h with TBS-T 3% BSA and incubated with primary antibody at 4 °C overnight (anti-SMAD4, ab40759, 1:100, Abcam). After incubation, cells were washed and stained with secondary fluorescent antibodies (CF Dye 568; Biotium). Finally, coverslips were rinsed three times with 1X PBS, stained with DAPI (Sigma-Aldrich) and mounted on slides with Fluoromount-G mounting medium (Southern Biotech). Images were acquired as described above and analyzed by Zen 2.1 Lite and ImageJ software.

#### *RNAscope assay*

TGF-β1 mRNA expression was measured using RNAscope assay (RNAscope™ 2.5 HD Assay – BROWN, ACDbio). The assay was performed according to the manufacturer's recommendations. Briefly, lung sections were deparaffinized and endogenous peroxidase activity was blocked before slides were boiled in the 1X Target Retrieval solution for 15 min. Slides were then treated with RNAscope® Protease Plus solution and incubated in a hybridization chamber (HybEZ™ Oven, Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA) for 30 min at 40 °C. Next, slides were incubated with Mm-TGF-β1 probes (407751 ACD bio) or positive or negative control probes (m-PPIB or DapB) at 40 °C for 2h in HybEZ™ Oven. Later, amplification reagents (Amp-1–6) were sequentially added to the samples and finally sections have been incubated with Fast RED-B and Fast RED-A solutions before counterstaining in Hematoxylin Solution and covered with cover slips using EcoMount medium (biocare medical EM897L).

#### *RNAscope quantification*

Microscopy images were taken on an Axio scope.A1 (Carl Zeiss GmbH). Images were acquired using Gryphax Jenoptik software and analyzed as previously described using Qupath software (version 0.2.3) [25]. For each slide, 20 randomly taken pictures at x20

were analyzed. Stain vectors were defined by selecting a region of interest that was representative of the stain. The positive cell detection feature was utilized to identify the positive cells and each automated detection was manually verified. To facilitate visualization, cells were colored on the basis of whether or not they were positive for the marker. The number of positive and negative cells in each specimen for each section was then quantified and results are expressed as the percentage of TGFβ-1 positive cells for each specimen.

#### *Protein interaction studies*

Protein HSPB5 (Enzolife, ADI-SPP-228-200) was labeled using the Protein Labeling Kit RED-Tris-NTA (NanoTemper Technologies). The labeling reaction was performed according to the manufacturer's instructions in the supplied labeling buffer, applying a concentration of 1.6 μM protein (molar dye:protein ratio ≈ 1:2) at room temperature for 30 min in the dark. Unreacted dye was removed by centrifugation. The degree of labeling was determined using UV/VIS spectrophotometry at 650 and 280 nm. A degree of labeling of 0.8 was typically achieved. The labeled protein HSPB5 was adjusted to 400 nM with PBS buffer supplemented with 0.05 % Tween 20. The ligand SMAD4 (ABIN1065691) was dissolved in PBS buffer supplemented with 0.05 % Tween 20, and a series of 16 1:1 dilutions was prepared using the same buffer. For the measurement, each ligand dilution was mixed with one volume of labeled protein HSPB5, which led to a final concentration of protein HSPB5 of 104 nM and final ligand concentrations ranging from 19 pM to 15.6 μM. After 10 min incubation followed by centrifugation at 10 000 × g for 10 min, the samples were loaded into Monolith NT.115 Capillaries (NanoTemper Technologies). MST was measured using a Monolith NT.115 instrument (NanoTemper Technologies) at an ambient temperature of 25°C. Instrument parameters were adjusted to 100 % LED power and medium MST power. Data of three independently pipetted measurements were analyzed (MO.Affinity Analysis software version 2.3, NanoTemper Technologies) using the signal from an MST-on time of 1s.

#### *Cell fractionation and western blot analysis*

Cytoplasmic and nuclear extracts were obtained using the NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction reagent kit (Pierce–Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Samples were prepared in classical loading buffer and loaded on SDS-PAGE gel before being transferred on PVDF membrane (GE Healthcare Europe GmbH) in an ethanol-supplemented glycin buffer. Membranes were saturated with TBS-Tween 0.1% Milk 5% solution for 45 minutes before overnight incubation at 4°C with primary antibodies: rabbit SMAD4 (40759, 1 : 1000, Abcam), rabbit GAPDH (5174, 1 : 1000 Cell Signaling), rabbit PARP (9542, 1 : 1000 Cell Signaling), rabbit Phospho-Smad2 (Ser465/467)/Smad3 (Ser423/425) (D27F4) (#8828, 1:1000, cell signaling) and rabbit HSPB5 (ADI-SPA-223, 1 : 1000 enzolife). Secondary antibodies used for revelation were conjugated to HRP (Jackson ImmunoResearch, Cambridge, UK). Data acquisition was performed using chemiluminescent reagent (Western Blotting Luminol Reagent. Santa Cruz Biotechnology) on Chemi-Doc XRS Imaging System (Bio-Rad).

#### *Quantitative PCR analysis*

Total RNA from lung tissue was extracted with Trizol (Invitrogen). In all, 300 ng of total RNA was transcribed into cDNA by M-MLV reverse transcriptase with random primers in the presence of RNaseOUT RNase inhibitor (Invitrogen). cDNAs were quantified by real-time PCR with a SYBR Green Real-time PCR kit (Applied Biosystems) on a ViiA7 detection system (Applied Biosystems, France). Relative mRNA levels were determined with the ΔCt method. Oligonucleotides used for qRT-PCR are as follows: PAI-1, 5'-GGCCGTGGAACAAGAATGAGA-3' and 5'-GCTTGAAGAAGTGGGGCATGA-3'; L32, 5'-GAAACTGGCGGAAACCCA-3' and 5'-GGATCTGGCCCTTGAACCTT-3.

#### *Anti-aggregation activity of HSPB5*

HSPB5 anti-aggregation function was evaluated as previously described [26]. Human HSPB5 (ADI-SPP-228, enzolife) and human HSPB1 (ADI-SPP-715, enzolife) (1.5 μM) were incubated with firefly luciferase (Sigma-Aldrich, L9506) in reaction buffer (HEPES-KOH 25 mM pH 7.6, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 2 mM, ATP 2 mM) in presence or in absence of NCI-41356 and heated in water bath for 30 min at 42 °C. The heated reaction was diluted 10-fold into buffer containing 60% of rabbit reticulocyte lysate (TnT®T7 QuickMaster Mix, Promega) and incubated for 2 h at RT. Anti-aggregation activity was assessed through a luciferase assay on Envision system (Perkin Elmer).

#### *Statistical analysis*

All results are shown as mean ± SEM, and data sets were compared using nonparametric test Mann–Whitney or two-way ANOVA when appropriate. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 8.3. All p values were two-tailed. A p < 0.05 was considered statistically significant for all experiments.

### **5. Conclusions**

In our study, we demonstrate the anti-fibrotic potential of a new chemical inhibitor of HSPB5/SMAD4 interaction in a bleomycin-induced pulmonary fibrosis model. Our results have shown that NCI-41356 can limit collagen accumulation in the lungs and also decrease the expression of several pro-fibrotic markers through the modulation TGF-β1 signaling. Our findings suggest that NCI-41356 could constitute an effective therapeutic strategy in IPF either alone or in combination with already existing therapies.

### **6. Patents**

This section is not mandatory but may be added if there are patents resulting from the work reported in this manuscript.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: [www.mdpi.com/xxx/s1](http://www.mdpi.com/xxx/s1), Figure S1: title; Table S1: title; Video S1: title.

**Author Contributions:** Conceptualization, JT, PSB and FG; methodology, JT, PSB and FG; validation, JT, PSB and FG; formal analysis, JT, PSB, PMB and FG; investigation, JT, PMB; writing—original draft preparation, JT, PSB and FG; writing—review and editing, JT, FG, PSB, PB, and CG; supervision, PSB, FG, and PB; funding acquisition, PSB, FG, CG and PB. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work received funding from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE14-0004-01 SHOT-IPF and ANR-20-CE17-0005). The C. Garrido team has the “label d’excellence” from La Ligue National Contre le Cancer and L’Association pour la “Recherche sur le Cancer” and belongs to the LabEx LipSTIC and GR-Ex. Julie Tanguy is funded by “La Fondation du Souffle et le Fonds de Recherche en Santé Respiratoire”.

**Informed Consent Statement:** “Not applicable”

**Data Availability Statement:** “Not applicable”

**Acknowledgments:** Data is contained within article.

We thank V. Saint-Giorgio (Centre de Zootechnie, Université de Bourgogne, Dijon, France) and the histology platform (Cellimap core facility, Université de Bourgogne, Dijon, France) for their invaluable and professional help.

**Conflicts of Interest:** “The authors declare no conflict of interest.”

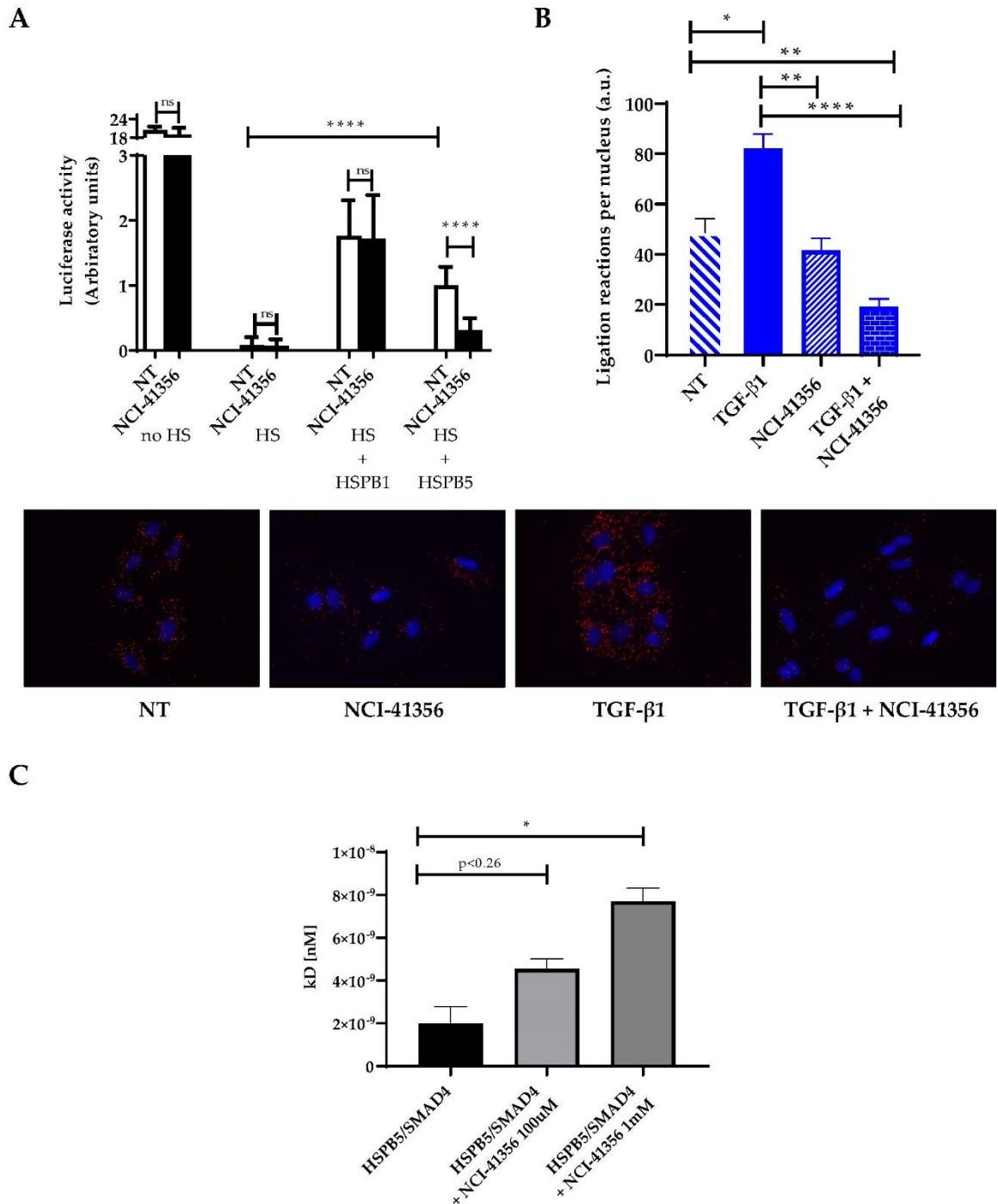
## References

1. Sharif, R. Overview of Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) and Evidence-Based Guidelines. *Am J Manag Care* **2017**, *23*, S176–S182. 356–359
2. Maher, T.M.; Bendstrup, E.; Dron, L.; Langley, J.; Smith, G.; Khalid, J.M.; Patel, H.; Kreuter, M. Global Incidence and Prevalence of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Respir Res* **2021**, *22*, 197, doi:10.1186/s12931-021-01791-z. 360–361
3. Bonniaud, P.; Kolb, M.; Galt, T.; Robertson, J.; Robbins, C.; Stampfli, M.; Lavery, C.; Margetts, P.J.; Roberts, A.B.; Gauldie, J. Smad3 Null Mice Develop Airspace Enlargement and Are Resistant to TGF-Beta-Mediated Pulmonary Fibrosis. *J Immunol* **2004**, *173*, 2099–2108, doi:10.4049/jimmunol.173.3.2099. 362–364
4. Bellaye, P.-S.; Burgy, O.; Causse, S.; Garrido, C.; Bonniaud, P. Heat Shock Proteins in Fibrosis and Wound Healing: Good or Evil? *Pharmacol Ther* **2014**, *143*, 119–132, doi:10.1016/j.pharmthera.2014.02.009. 365–366
5. Bellaye, P.-S.; Wettstein, G.; Burgy, O.; Besnard, V.; Joannes, A.; Colas, J.; Causse, S.; Marchal-Somme, J.; Fabre, A.; Crestani, B.; et al. The Small Heat-Shock Protein AB-Crystallin Is Essential for the Nuclear Localization of Smad4: Impact on Pulmonary Fibrosis. *J. Pathol.* **2014**, *232*, 458–472, doi:10.1002/path.4314. 367–369
6. Bellaye, P.-S.; Burgy, O.; Colas, J.; Fabre, A.; Marchal-Somme, J.; Crestani, B.; Kolb, M.; Camus, P.; Garrido, C.; Bonniaud, P. Antifibrotic Role of AB-Crystallin Inhibition in Pleural and Subpleural Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2015**, *52*, 244–252, doi:10.1165/rcmb.2014-0011OC. 370–372
7. Chen, Z.; Ruan, Q.; Han, S.; Xi, L.; Jiang, W.; Jiang, H.; Ostrov, D.A.; Cai, J. Discovery of Structure-Based Small Molecular Inhibitor of AB-Crystallin against Basal-like/Triple-Negative Breast Cancer Development in Vitro and in Vivo. *Breast Cancer Res. Treat.* **2014**, *145*, 45–59, doi:10.1007/s10549-014-2940-8. 373–375
8. Jego, G.; Hazoumé, A.; Seigneuric, R.; Garrido, C. Targeting Heat Shock Proteins in Cancer. *Cancer Lett* **2013**, *332*, 275–285, doi:10.1016/j.canlet.2010.10.014. 376–377
9. Tanguy, J.; Pommerolle, L.; Garrido, C.; Kolb, M.; Bonniaud, P.; Goirand, F.; Bellaye, P.-S. Extracellular Heat Shock Proteins as Therapeutic Targets and Biomarkers in Fibrosing Interstitial Lung Diseases. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 9316, doi:10.3390/ijms22179316. 378–380
10. Chatterjee, S.; Burns, T.F. Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach. *Int J Mol Sci* **2017**, *18*, E1978, doi:10.3390/ijms18091978. 381–382
11. Sanchez, J.; Carter, T.R.; Cohen, M.S.; Blagg, B.S.J. Old and New Approaches to Target the Hsp90 Chaperone. *Curr Cancer Drug Targets* **2020**, *20*, 253–270, doi:10.2174/1568009619666191202101330. 383–384
12. Boutanquoi, P.-M.; Burgy, O.; Beltramo, G.; Bellaye, P.-S.; Dondaine, L.; Marcion, G.; Pommerolle, L.; Vadel, A.; Spanjaard, M.; Demidov, O.; et al. TRIM33 Prevents Pulmonary Fibrosis by Impairing TGF-B1 Signalling. *Eur Respir J* **2020**, *55*, 1901346, doi:10.1183/13993003.01346-2019. 385–387
13. Murray, L.A.; Habel, D.M.; Hohmann, M.; Camelo, A.; Shang, H.; Zhou, Y.; Coelho, A.L.; Peng, X.; Gulati, M.; Crestani, B.; et al. Antifibrotic Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Pulmonary Fibrosis. *JCI Insight* **2017**, *2*, 92192, doi:10.1172/jci.insight.92192. 388–390
14. Fehrenbach, H.; Kasper, M.; Haase, M.; Schuh, D.; Müller, M. Differential Immunolocalization of VEGF in Rat and Human Adult Lung, and in Experimental Rat Lung Fibrosis: Light, Fluorescence, and Electron Microscopy. *Anat Rec* **1999**, *254*, 61–73, doi:10.1002/(SICI)1097-0185(19990101)254:1<61::AID-AR8>3.0.CO;2-D. 391–393
15. Hamada, N.; Kuwano, K.; Yamada, M.; Hagimoto, N.; Hiasa, K.; Egashira, K.; Nakashima, N.; Maeyama, T.; Yoshimi, M.; Nakanishi, Y. Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Gene Therapy Attenuates Lung Injury and Fibrosis in Mice. *J Immunol* **2005**, *175*, 1224–1231, doi:10.4049/jimmunol.175.2.1224. 394–395



16. Richeldi, L.; du Bois, R.M.; Raghu, G.; Azuma, A.; Brown, K.K.; Costabel, U.; Cottin, V.; Flaherty, K.R.; Hansell, D.M.; Inoue, Y.; et al. Efficacy and Safety of Nintedanib in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med* **2014**, *370*, 2071–2082, doi:10.1056/NEJMoa1402584. 397  
398  
399
17. Jhaveri, K.; Ochiana, S.O.; Dunphy, M.P.; Gerecitano, J.F.; Corben, A.D.; Peter, R.I.; Janjigian, Y.Y.; Gomes-DaGama, E.M.; Koren, J.; Modi, S.; et al. Heat Shock Protein 90 Inhibitors in the Treatment of Cancer: Current Status and Future Directions. *Expert Opin Investig Drugs* **2014**, *23*, 611–628, doi:10.1517/13543784.2014.902442. 400  
401  
402
18. Colak, S.; Ten Dijke, P. Targeting TGF- $\beta$  Signaling in Cancer. *Trends Cancer* **2017**, *3*, 56–71, doi:10.1016/j.trecan.2016.11.008. 403
19. Valle, M.J. de J.; González López, F.; Sánchez Navarro, A. Pulmonary versus Systemic Delivery of Levofloxacin. The Isolated Lung of the Rat as Experimental Approach for Assessing Pulmonary Inhalation. *Pulm Pharmacol Ther* **2008**, *21*, 298–303, doi:10.1016/j.pupt.2007.07.003. 404  
405  
406
20. Kaminskas, L.M.; Landersdorfer, C.B.; Bischof, R.J.; Leong, N.; Ibrahim, J.; Davies, A.N.; Pham, S.; Beck, S.; Montgomery, A.B.; Surber, M.W. Aerosol Pirfenidone Pharmacokinetics after Inhaled Delivery in Sheep: A Viable Approach to Treating Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Pharm Res* **2019**, *37*, 3, doi:10.1007/s11095-019-2732-2. 407  
408  
409
21. Surber, M.W.; Beck, S.; Pham, S.; Marsden, A.T.; Gandi, S.K.; Baily, J.; McElroy, M.C. Inhaled Nintedanib Is Well-Tolerated and Delivers Key Pharmacokinetic Parameters Required to Treat Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *Pulm Pharmacol Ther* **2020**, *63*, 101938, doi:10.1016/j.pupt.2020.101938. 410  
411  
412
22. Cipolla, D. Will Pulmonary Drug Delivery for Systemic Application Ever Fulfill Its Rich Promise? *Expert Opin Drug Deliv* **2016**, *13*, 1337–1340, doi:10.1080/17425247.2016.1218466. 413  
414
23. Decolonne, N.; Wettstein, G.; Kolb, M.; Margetts, P.; Garrido, C.; Camus, P.; Bonniaud, P. Bleomycin Induces Pleural and Subpleural Fibrosis in the Presence of Carbon Particles. *Eur Respir J* **2010**, *35*, 176–185, doi:10.1183/09031936.00181808. 415  
416
24. Decolonne, N.; Kolb, M.; Margetts, P.J.; Menetrier, F.; Artur, Y.; Garrido, C.; Gauldie, J.; Camus, P.; Bonniaud, P. TGF-Beta1 Induces Progressive Pleural Scarring and Subpleural Fibrosis. *J Immunol* **2007**, *179*, 6043–6051, doi:10.4049/jimmunol.179.9.6043. 417  
418
25. Wang, A.; Fogel, A.L.; Murphy, M.J.; Panse, G.; McGearry, M.K.; McNiff, J.M.; Bosenberg, M.; Vesely, M.D.; Cohen, J.M.; Ko, C.J.; et al. Cytokine RNA In Situ Hybridization Permits Individualized Molecular Phenotyping in Biopsies of Psoriasis and Atopic Dermatitis. *JID Innovations* **2021**, *1*, 100021, doi:10.1016/j.xjidi.2021.100021. 419  
420  
421
26. Oh, H.J.; Easton, D.; Murawski, M.; Kaneko, Y.; Subjeck, J.R. The Chaperoning Activity of Hsp110. Identification of Functional Domains by Use of Targeted Deletions. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 15712–15718, doi:10.1074/jbc.274.22.15712. 422  
423  
424

## Figures

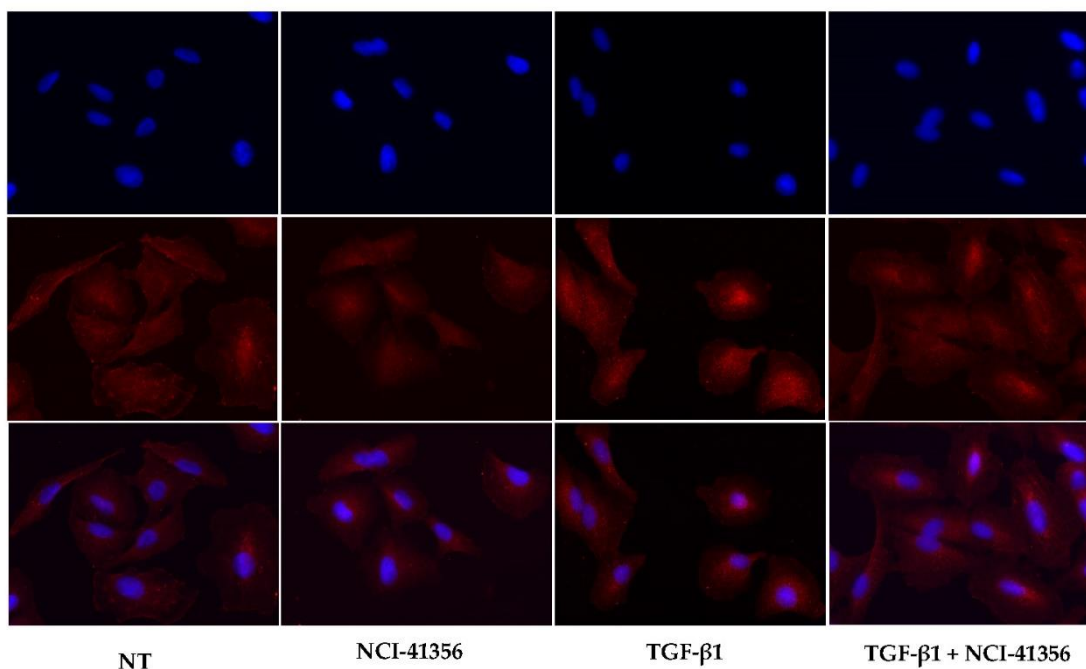


**Fig 1. NCI-41356 decreases SMAD4/HSPB5 interaction.**

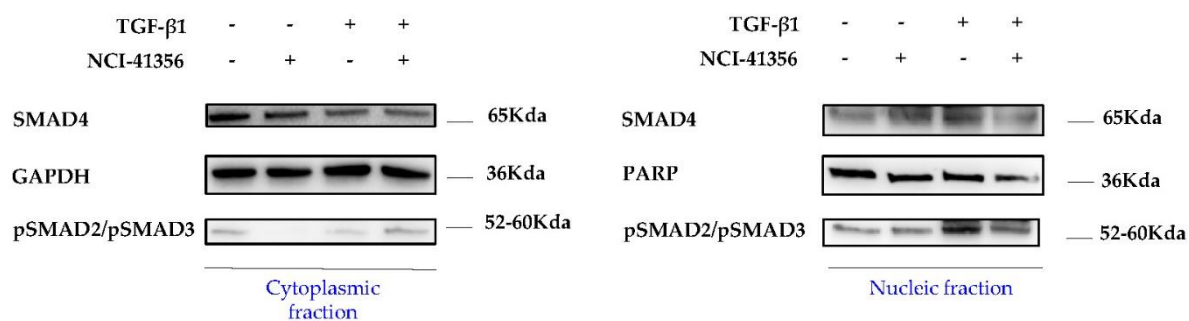
A. Anti-aggregation assay on luciferase exposed to heat shock (HS) in presence or absence of recombinant chaperone HSPB1/HSPB5 and NCI-41356 (n=3) \*\*\*\*p<0.0001.; B. Proximity ligation assay between SMAD4/HSPB5 on A549 cells treated by either NCI-41356 or TGF-β1 or both compounds. One spot match with one interaction between these two proteins (n=3) \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*\*p<0.0001).; C. Interaction measurement by thermophoresis between HSPB5 and SMAD4 proteins with or without NCI-41356 tested at 100 μM and 1 mM.

Data are expressed as means ± SEM and compared using nonparametric Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test or two-way ANOVA.

**A**

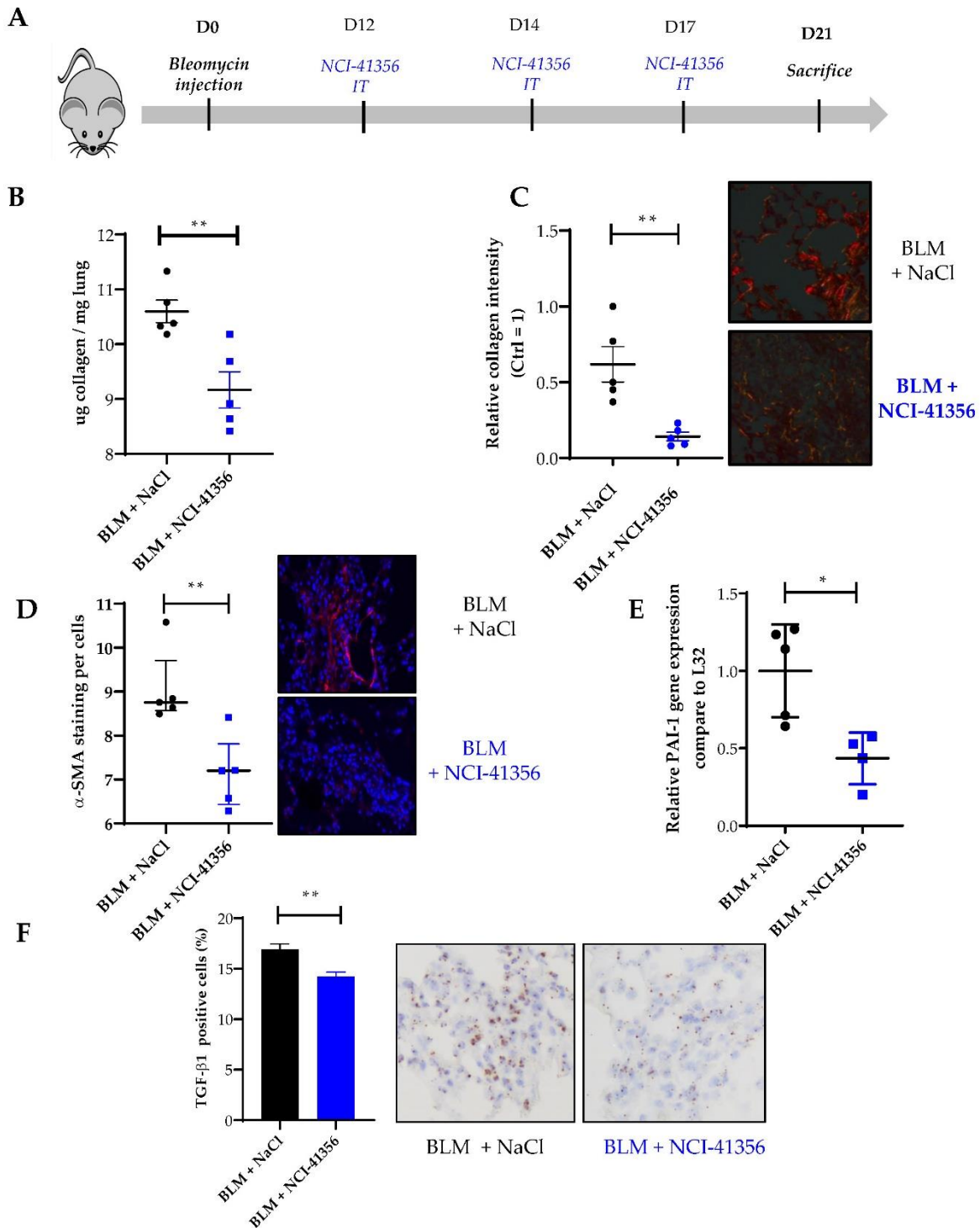


**B**



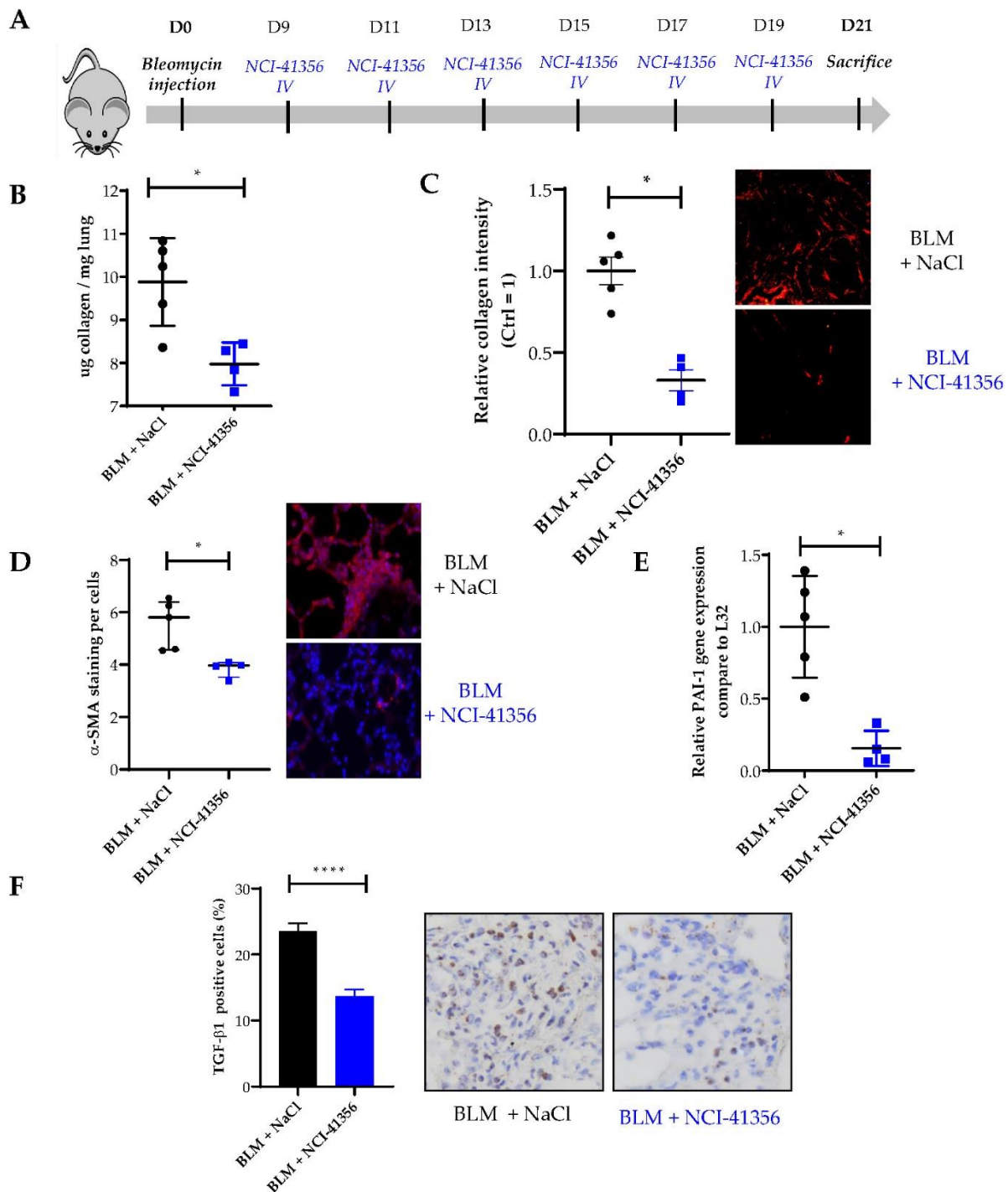
**Fig 2. NCI-41356 modulate TGF-β1 signaling.**

A. Immunofluorescence staining of SMAD4 protein on A549 cells treated with TGF-β1 with or without NCI-41356 (n=3). B. Protein expression studied by western blot of nuclear or cytoplasmic fractions of A549 cells treated with TGF-β1 with or without NCI-41356. One representative experiment out of 3 is shown.



**Fig 3. Intratracheal administration of NCI-41356 reduce pulmonary fibrosis in bleomycin treated mice.**

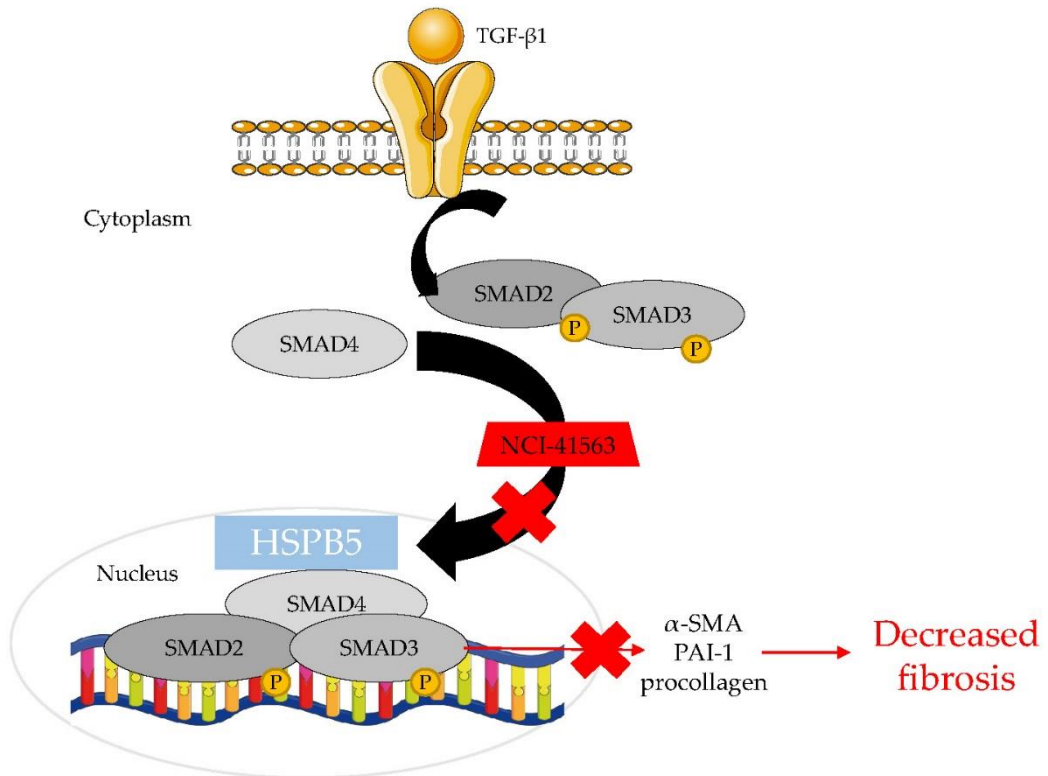
A. Mice experimental injection plan between day 0 (D0), the day of bleomycin (BLM) injection (1.5 mg/kg) and the day of sacrifice (D21). Mice have been treated with NaCl 0.9% (n=6) or NCI-41356 (n=6) (13 mg/kg) every other day between day 12 and 17; B. Collagen quantification by sircol assay (expressed as  $\mu\text{g}$  of collagen per mg of lung) of bleomycin treated mice lungs treated or not with NCI-41356 (\*\* $p < 0.0079$ ); C. Collagen semi-quantification by rouge sirius staining performed on bleomycin treated mice with or without NCI-41356 (\*\* $p < 0.0079$ ); D. Quantification of  $\alpha$ -SMA staining by immunofluorescence performed on lung tissues from bleomycin treated mice with or without NCI-41356 (\*\* $p < 0.0079$ ); E. Relative PAI-1 mRNA expression compared to control L32 in the lung of bleomycin treated mice with or without NCI-41356 (\* $p < 0.0159$ ); F. TGF- $\beta$ 1 mRNA expression on lung tissues from bleomycin treated mice with or without NCI-41356 (\*\* $p < 0.0020$ ). Data are expressed as means  $\pm$  SEM and compared using nonparametric Mann-Whitney test.



**Fig 4. Intravenous administration of NCI-41356 reduce pulmonary fibrosis in bleomycin treated mice.**

A. Mice experimental injection plan between day 0 (D0), the day of bleomycin (BLM) injection (1.5 mg/kg) and the day of sacrifice (D21). Mice have been treated with NaCl 0.9% (n=6) or NCI-41356 (n=6) (13 mg/kg) 3 times a week between day 9 and 19; B. Collagen quantification by sircol assay (expressed as  $\mu\text{g}$  of collagen per mg of lung) of bleomycin treated mice lungs treated or not with NCI-41356 ( $*p < 0.0317$ ); C. Collagen semi-quantification by rouge sirius staining performed on bleomycin treated mice with or without NCI-41356 ( $*p < 0.0159$ ); D. Quantification of  $\alpha$ -SMA staining by immunofluorescence performed on lung tissues from bleomycin treated mice with or without NCI-41356 ( $*p < 0.0159$ ); E. Relative PAI-1 mRNA expression compared to control L32 in the lung of bleomycin treated mice with or without NCI-41356 ( $*p < 0.0159$ ); F. TGF- $\beta$ 1 mRNA expression on lung tissues from bleomycin treated mice with or without NCI-41356 ( $****p < 0.0001$ ). Data are expressed as means  $\pm$  SEM and compared using nonparametric Mann-Whitney test.

A



**Fig 5. Proposition of mechanical pathway involved in inhibitory effects of NCI.**

NCI-41356 inhibits SMAD4 and his partners' translocation to the nucleus, thus limiting the synthesis of collagen, pro-fibrotic markers and fibrosis.

## Projet 3.

### Intérêt de l'inhibition d'HSP90 extracellulaire dans la fibrose pulmonaire idiopathique

La troisième partie de ma thèse, axée sur le rôle de la protéine extracellulaire HSP90 dans la fibrose pulmonaire idiopathique, est toujours en cours d'étude. Cette partie ne sera donc pas présentée sous forme d'article. J'exposerai ci-dessous, de façon chronologique, l'ensemble des résultats obtenus jusqu'alors.

### Contexte pathologique

Le rôle d'HSP90 est primordial dans de nombreux processus physiologiques comme la maturation des protéines de signalisation impliquées dans la division et le développement cellulaires, tels que les récepteurs d'hormones stéroïdes, les kinases et les protéines oncogènes clés comme le suppresseur de tumeur p53. Dans le cancer, HSP90 régule de nombreuses protéines impliquées dans la signalisation cellulaire et la promotion tumorale. A ce titre, plusieurs études précliniques ont montré que l'utilisation combinée à d'autres thérapies anti-cancéreuses ou unique du 17-AAG, un inhibiteur d'HSP90 évoqué précédemment, constituait une avancée majeure dans la prise en charge de nombreux cancers chez l'Homme. Pour autant, sa faible solubilité et sa toxicité hépatique restreignent son utilisation clinique<sup>297</sup>.

Chez les patients atteints de FPI les études ont montré que :

- les niveaux HSP90 dans le plasma des patients étaient augmentés et corrélés à la sévérité de la pathologie
- les fibroblastes des patients atteints de FPI étaient à l'origine de la sécrétion accrue d'HSP90 et présentaient une expression membranaire accrue d'HSP90 $\alpha$
- HSP90 $\alpha$  et HSP90 $\beta$  étaient retrouvés abondamment dans les myofibroblastes et foyers fibroblastiques de l'interstitium pulmonaire des poumons de patients atteints de FPI et comparativement aux témoins.

A ce titre, l'inhibition d'HSP90 dans la FPI justifie de nouvelles expérimentations précliniques pour mieux identifier leurs effets anti-fibrotiques, leurs doses optimales et leurs potentiels effets indésirables. Dans le but de limiter ces effets indésirables dus à une inhibition des fonctions chaperonnes physiologiques d'HSP90 dans la FPI, nous avons choisi de concentrer nos travaux sur l'inhibition de la forme extracellulaire (sécrétée et membranaire) d'HSP90, à savoir HSP90 $\alpha$ . De plus, la mise au point d'une sonde radioactive ciblant HSP90 $\alpha$  afin de prédire et

suivre l'évolution de la FPI constitue un second objectif de nos travaux. Nos résultats préliminaires seront décrits ci-après.

## **Matériels et Méthodes**

### **In vitro**

#### **Culture cellulaire**

La lignée de cellules fibroblastiques humaines CCL-210 (ATCC) a été cultivée dans du milieu de culture Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) high glucose (Dutscher) supplémenté par 10 % de Sérum de Veau Fœtal (SVF, Dominique Dutscher). Les cellules ont été cultivées à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont décollées par action mécanique à l'aide d'un grattoir (Dutscher) dans leur milieu de croissance.

#### **Transfection**

Les cellules sont implantées à une densité de 150 000 cellules (30-50% de confluence) en flacons de culture T25 et mises à incuber sur la nuit. Les siARN Control (Scramble) et LRP1 sont transfectés à J1 à l'aide de l'agent de transfection Interferin (Polyplus) selon les recommandations du fournisseur. Après 6 heures, le milieu complet de croissance (10% SVF) est changé vers un milieu contenant 1% de SVF pendant 12 heures.

#### **Traitements**

A J2, les cellules ont été mises en présence de TGF- $\beta$ 1 recombinant humain (R&D systems 240-, 10 ng/mL) et d'anticorps anti-HSP90 $\alpha$  (ADI-SPS-771-F enzolife, 40 ng/mL) utilisés seuls ou associés pendant 24 heures.

#### **Extraction et dosage des protéines**

Après décollement mécanique, les cellules ont été récupérées et lavées au PBS (Phosphate Buffer Salin), puis centrifugées à 300 G pendant 5 min. Les cellules sont lavées une seconde fois et culotées par centrifugation. Les protéines cytosoliques et associées à la membrane sont ensuite extraites et isolées selon les recommandations du fournisseur (Mem-PER Plus Membrane Protein Extraction Kit, ThermoScientific ref 89842). Les échantillons sont ensuite dosés par la méthode de Lowry modifiée à l'aide du kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad).



<u>Protéines</u>	<u>Fournisseur</u>	<u>Dilution</u>
<u><math>\alpha</math>-tubuline</u>	<u>Sigma aldrich Clone B-5-1-2 T5168</u>	<u>1/1000</u>
<u>HSP90<math>\alpha</math></u>	<u>Enzolife ADI-SPS-771-F</u>	<u>1/1000</u>
<u>HSP90<math>\beta</math></u>	<u>Enzolife ADI-SPS-884</u>	<u>1/1000</u>
<u>HSC70</u>	<u>Santa Cruz Biotechnologie sc-7298</u>	<u>1/1000</u>
<u><math>\alpha</math>-SMA</u>	<u>Abcam 5694</u>	<u>1/1000</u>
<u>PAI-1</u>	<u>Thermo Fischer MAS 17171</u>	<u>1/1000</u>
<u>Fibronectine</u>	<u>Novus biological NBPI-91258</u>	<u>1/1000</u>
<u>LRP1</u>	<u>Abcam [EPR3724] (ab92544)</u>	<u>1/1000</u>

**Tableau 8.** Anticorps primaires utilisés

### **Western-Blotting**

Les échantillons protéiques ont été dénaturés 5 min à 95 °C par un tampon de charge (Laemmli, contenant du SodiumDodécylSulfate (SDS), du  $\beta$ -mercaptoéthanol, du glycérol et du Tris-HCl) et une quantité 30  $\mu$ g de protéines a été déposée sur gel de polyacrylamide, le pourcentage d'acrylamide (8 à 12 %) étant déterminé selon la masse moléculaire des protéines d'intérêt. La séparation par migration dans le gel s'effectue sous l'action d'un champ électrique de 60 V (20 min), puis 120 V (1 H 40) dans un tampon de migration (Tris 25 mM, glycine 200 mM, SDS 0,01 %).

Les protéines ont ensuite été transférées du gel de migration sur une membrane de PolyVinylidene Fluoride (PVDF, GE Healthcare Europe GmbH). La migration s'effectue à 60 V pendant 2 h dans un tampon de transfert (Acide Borique 50 mM et Tris 50 mM).

Les membranes ont été saturées en présence de lait 5 % (poids/volume) pendant 45 min à température ambiante et sous agitation, puis incubées dans une solution d'anticorps primaire (**Tableau 1.**) dilué dans de la BSA ou du lait 1 %, et ce à 4 °C, toute la nuit sous agitation. Les membranes sont ensuite soumises à 3 lavages au PBS-Tween 0,1 % ou TBS-Tween 0,1 % puis incubées 45 min à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase et dilué au 1/10000 dans une solution de BSA 1 %. De nouveau, 3 lavages ont été effectués puis les membranes séchées et mises en contact 1 minute avec un réactif chemiluminescent (solution ECL, Santa-Cruz Biotechnology, et/ou Luminata Crescendo Western horseradish peroxidase substrate, Milipore) en fonction du niveau d'expression de la protéine d'intérêt. La luminescence est révélée avec l'appareil ChimiDoc XRS+ (Bio-rad) et les résultats sont analysés avec le logiciel ImageLab (version 5.1 build 8, Bio-rad laboratories).

## In vivo

### Tests in vivo des effets d'un anticorps monoclonal murin anti-HSP90 imperméable aux cellules

#### Protocole d'expérimentation animale

Des souris C57/BL6 mâles âgées de 8 semaines (Charles River) ont été utilisées pour tester les effets d'un inhibiteur extracellulaire d'HSP90 sur le développement de la fibrose. L'ensemble des expérimentations s'est déroulé à l'animalerie centrale de l'Université de Bourgogne. La nourriture enrichie et l'eau des rongeurs ont été fournies *ad libitum*. Les animaux ont été traités conformément aux lignes directrices du Ministère de la Recherche et de la Technologie et toutes les expériences ont été approuvées par le comité d'éthique du Grand Campus Dijon (protocole 20745). L'anesthésie a été pratiquée par injection intra-péritonéale de kétamine (100 mg/kg) et xylazine (10 mg/kg). Les souris ont été traitées avec de la bléomycine (Santa-Cruz) à la dose de 1,5 mg/kg ou du NaCl (0.9%) par injection intratrachéale (IT). Cet anticancéreux est connu pour sa toxicité pulmonaire. Il induit une fibrose ce qui en a fait depuis de nombreuses années un modèle internationalement utilisé pour étudier la fibrose pulmonaire chez le rongeur. Les animaux ont été pesés tous les 2 jours à partir du 3<sup>ème</sup> jour après l'injection de bléomycine. A partir de J7 et jusqu'au 21<sup>ème</sup> jour, les animaux injectés avec de la bléomycine ont reçu tous les jours, différentes concentrations d'anti-HSP90 $\alpha$  (1mg/ml, 0.5 mg/ml ou 0.25 mg/ml ; mAb4C5, BioIntron) ou d'IgG non relevant à 1mg/ml par voie intrapéritonéale (IP). Les souris ont été sacrifiées à J21.

#### Prélèvements et analyses post mortem

A J21, sous anesthésie profonde induite par le mélange kétamine-xylazine, un échantillon de sang a été prélevé au niveau de l'aorte abdominale (avant exsanguination de l'animal). La trachée a ensuite été canulée, un liquide de lavage broncho-aléolaire (LBA) a été effectué par injection puis aspiration de 600  $\mu$ l de NaCl 0,9 % dans l'arbre broncho-alvéolaire. Les poumons ont ensuite été prélevés, le poumon droit d'une part a été insufflé au formol et maintenu dans cette solution de fixation pendant 24 h afin d'être utilisé pour colorations et analyse immunohistochimique. Le reste du tissu pulmonaire a été congelé à -80 ° pour y doser le collagène par la technique du Sircol (Sircol Assay, biocolor).

L'inclusion en paraffine, la découpe tissulaire, la mise sur lames et la coloration au rouge sirius a été réalisée par la plateforme d'histologie (CellImaP, UFR des Sciences de Santé, Dijon). Les

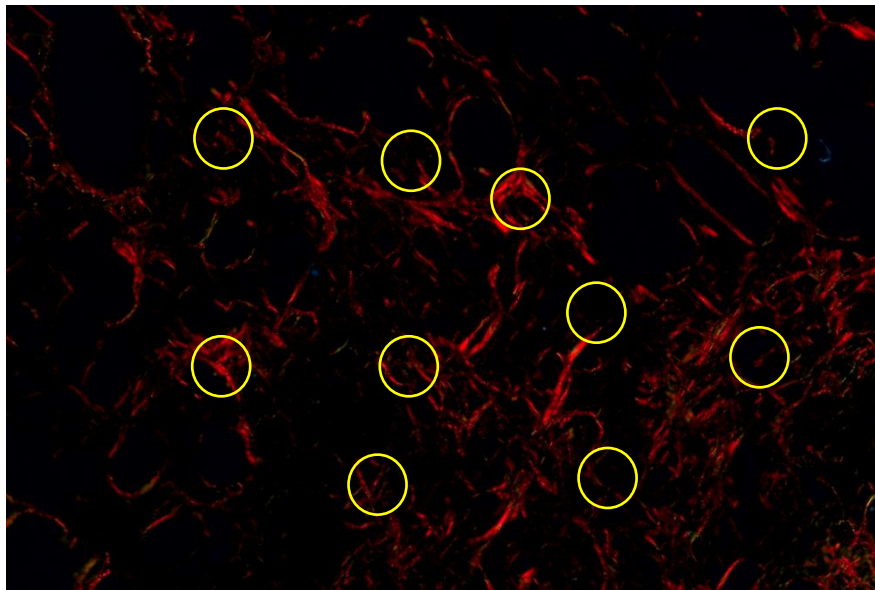
échantillons de LBA ont été centrifugés et les surnageant des LBA placés à -20°C jusqu'à analyse.

### **Quantification du collagène par le kit Sircol**

La fibrose pulmonaire se caractérisant par une accumulation de collagène dans le tissu pulmonaire, la quantification du collagène du tissu pulmonaire est essentielle pour évaluer la fibrose. Cette quantification a été réalisée dans le tissu pulmonaire du lobe droit de chaque animal à l'aide du kit Sircol Assay (Biocolor LTD). Les poumons des souris ont été broyés dans 1 ml de tampon de lyse (Tris-HCl 10 mM, NaCl 2 M, EDTA 1 mM Tween 0.01 %, cocktail d'inhibiteurs de protéases, pH 7.4) puis laissés sur roue à 4 °C pendant la nuit. Pour chaque poumon, 5 µl d'extrait protéique ont été dilués dans 95 µl de tampon de lyse. 500 µl de « Reagent Dye » ont été ajoutés à chaque échantillon et à la gamme de collagène fournie avec le kit. Les tubes ont été agités sur roue à 4 °C pendant 30 min. Après centrifugation à 13000 g pendant 10 min, les surnageants ont été éliminés et les culots rincés avec 750 µl de « Cold Acid Salt Wash Reagent ». Après un second rinçage, un culot de collagène s'est formé au fond de chaque tube. Ce culot a été repris dans 250 µl d'Alkali Reagent. Les tubes ont été laissés sur glace en vortexant régulièrement jusqu'à dissolution complète du culot. 200 µl de chaque échantillon et de la gamme ont été déposés sur une plaque 96 puits et l'absorbance a été lue à 555 nm pour déterminer la concentration en collagène de chaque échantillon. La quantité de collagène est exprimée en µg/mg de poumons.

### **Analyse histomorphométrique (Rouge Sirius)**

La quantité de collagène était analysée sur des lames marquées au rouge sirius (marquage réalisé par la plateforme d'histologie de la Faculté de Médecine de Dijon, Cellimap). Les lames ont été observées sous lumière polarisée et dix champs aléatoires ont été photographiés sur chaque lame. Le pourcentage d'émission du marquage (logiciel Histolab/Microvision Instruments) sur chaque photo correspondait au pourcentage de collagène. La quantité de collagène dans le parenchyme pulmonaire a été mesurée grâce à des cercles posés aléatoirement sur les photographies des lames (10 cercles par champs, (Figure 30)). Ces cercles, placés à l'intérieur du parenchyme pulmonaire, avaient un diamètre constant. La quantité de collagène contenue dans les cercles a été exprimée de façon arbitraire comparativement à la moyenne des mesures obtenue dans chaque groupe, rapportées à 1. Les bronches, les vaisseaux sanguins et la plèvre étaient exclus de cette quantification.



**Figure 30. Représentation des mesures histomorphométriques.** Sous lumière polarisée, le rouge Sirius marquant le collagène apparaît. Chaque cercle placé aléatoirement mesure l'intensité lumineuse correspondant à la quantité de collagène présente à cet endroit précis et comparativement à la mesure d'une première aire dépourvue de collagène.

### Cytométrie en flux

Les poumons sont récupérés et broyés par action d'un Gentelmacs (Mytlenii) dans une solution de dissociation prévue à cet effet. Ensuite, les cellules sont reprises dans une solution hémolytique afin d'éliminer les globules rouges. Puis, les cellules sont lavées avec du PBS avant marquage. Les cellules sont culotées par centrifugation 300 G, 5 min et le culot est resuspendu dans une solution saturante (Stain buffer, 554656 BD biosciences). Les cellules sont ensuite lavées et incubées 30 min avec un panel d'anticorps primaires (Tableau 9). Un marqueur de viabilité cellulaire est ajouté (FVS570). Les anticorps sont dilués dans la solution saturante. Les cellules sont ensuite lavées à deux reprises avec du PBS avant analyse au cytomètre. L'analyse s'est effectuée sur un AURORA (BD Biosciences, USA). Le poumon total a été utilisé dans cet examen. Les valeurs de compensation ont été déterminées sur 1 000 000 de cellules monomarquées. L'analyse et le calcul des compensations ont été effectués sur le logiciel FlowJo Version 10.7.2 (Treestar Inc, USA). L'expression des marqueurs est présentée par l'expression de l'intensité de la médiane de fluorescence (MFI). Les contrôles FMO (*Fluorescence Minus One*) ont été réalisés à chacune des expériences.

Cibles	Type cellulaire ciblé	Fournisseur	Référence	Clone	Hôte	Fluorochrome	Dilution
<b>CD45</b>	Cellules immunitaires	BD	752415	I3/2.3	Mouse	BUV805	1/200
<b>CD326</b>	Cellules épithéliales	BD	563214	G8.8	Mouse	BV421	1/100
<b>CD31</b>	Cellules endothéliales	BD	563089	MEC 13.3	Mouse	BV510	1/100

<b>CD49e</b>	- <b>High expression</b> : myofibrblastest - <b>Low expression</b> : fibroblastes activés	BD	743115	HM ALPHA 5- 1	Mouse	BUV395	1/50
<b>Ly-6A</b>	- <b>High expression</b> : fibroblastes résidents - <b>Low expression</b> : fibroblastes activés	BD	558162	D7	Mouse	PECY7	1/100
<b>CD146</b>	Cellules : musculaires lisses vasculaires, musculaires lisses bronchiques, péricytes	BD	558162	ME-9F1	Mouse	BV605	1/100
<b>LYVE-1</b>	cellules endothéliales lymphatiques	ThermoFisher scientific	48-0443- 82	ALY7	Rat	Ef450	1/50
<b>HSP90<math>\alpha</math></b>	Cellules concernées	Novus Bio	NBP1- 77682F		Rabbit	FITC	1/50
<b>LRP1</b>	Cellules concernées	VWR	BOSSBS- 5409R- A647		Rabbit	Alexa Fluor 647	1/100

**Tableau 9.** Liste des anticorps utilisés pour le marquage cytométrie

### **Imagerie *in vivo***

Onze souris ont été injectées avec de la bléomycine (Santa-Cruz) à la dose de 1,5 mg/kg et cinq souris ont reçu du NaCl (0.9%). 18 jours après l'injection de bléomycine, 6 souris bléomycine et 5 souris NaCl ont reçu une injection IV de traceur ciblant HSP90 (anticorps mAb4C5 bioconjugué avec un agent chélatant pour incorporation d'atomes radioactifs d'Indium-111 ( $^{111}\text{In}$ ) pour imagerie SPECT). Le traceur  $^{111}\text{In}$ -4C5 a été injecté à un rapport d'activité volumique de 15 MBq/25 $\mu\text{g}$ /100 $\mu\text{L}$  par souris correspondant à une concentration finale de  $^{111}\text{In}$ -4C5 de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  par injection IV du composé radiomarqué dans la veine caudale sous anesthésie (isoflurane 2 %). Le deuxième groupe bléomycine (groupe bloquant, n = 5) a reçu le composé radiomarqué ( $^{111}\text{In}$ -4C5, 15 MBq/25 $\mu\text{g}$ /100 $\mu\text{L}$ ) avec un excès de 20 fois d'anticorps 4C5 (BioIntron) non radioactif (froid) pour visualiser la compétition de liaison entre les sondes radioactives et non radioactives (Groupe « Blocking »). Des images SPECT/CT simultanées (NanoSPECT/CT®, Mediso, Budapest, Hongrie) ont été acquises 1 h, 4h et 24h après l'injection. Après 24 h, les souris ont été euthanasiées et les poumons et le sang ont été prélevés pour le comptage radioactif avec un compteur  $\gamma$  (Wizard® 1480, PerkinElmer, Villebon-sur-

Yvette, France). Les poumons ont été recueillis dans du formol à 10 % pendant 24 h puis transférées dans de l'éthanol à 70 % pour analyses histologiques.

#### **Analyse d'images SPECT/CT**

Toutes les images de fusion SPECT/CT ont été obtenues à l'aide du logiciel VivoQuant™ (Invicro, Needham, MA, USA). Chaque image a été interprétée visuellement et les régions d'intérêt 3D (ROI 3D) correspondant aux poumons ont été dessinées manuellement pour déterminer leur contenu radioactif. Les doses injectées par animal ont été mesurées au moment de l'injection en MBq. Le contenu de la radioactivité pulmonaire a été exprimé en MBq, converti en pourcentage de dose injectée par gramme de tissu (%ID/g). Toutes les images ont été corrigées en fonction de la décroissance radioactive pour la quantification.

### **Études d'interaction protéique**

La protéine HSP90 $\alpha$  a été marquée à l'aide du kit de marquage de protéines RED-NHS (NanoTemper Technologies). La réaction de marquage a été effectuée selon les instructions du fabricant dans le tampon de marquage fourni, en appliquant une concentration de 20  $\mu$ M de protéine (rapport molaire colorant : protéine  $\approx$  3:1) à température ambiante pendant 30 min dans l'obscurité. Le colorant n'ayant pas réagi a été éliminé avec la colonne d'élimination de colorant fournie équilibrée avec du tampon MST (TrisHCl 50 mM pH 7,8, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM). Le degré de marquage a été déterminé par spectrophotométrie UV/VIS à 650 et 280 nm. Un degré de marquage de 0,8 était généralement atteint. La protéine HSP90 $\alpha$  marquée a été ajustée à 3 nM avec du tampon MST additionné de 0,01 % de Tween 20. Le ligand (fragment Ab anti-HSP90) a été dissous dans du tampon MST additionné de 0,01 % de Tween 20, et une série de 16 dilutions 1:1 a été préparée en utilisant le même tampon, produisant des concentrations de ligand allant de 76.2 pM à 2.5  $\mu$ M. Pour la mesure, chaque dilution de ligand a été mélangée avec un volume de protéine HSP90 marquée, ce qui a conduit à une concentration finale de protéine HSP90 de 1.5 nM et des concentrations finales de ligand allant de 38.1 pM à 1.25  $\mu$ M. Après 10 min d'incubation suivie d'une centrifugation à 10 000  $\times$  g pendant 10 min, les échantillons ont été chargés dans des capillaires Monolith NT.115 [Premium] (NanoTemper Technologies). Le MST a été mesuré à l'aide d'un instrument Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies) à une température ambiante de 25°C. Les paramètres de l'instrument ont été ajustés à 100 % de puissance LED et à une puissance MST moyenne. Les données de trois mesures pipetées indépendamment ont été analysées (logiciel MO.Affinity Analysis version 2.3, NanoTemper Technologies) en utilisant le signal d'un temps MST de 1s.

### **Tests statistiques**

Les comparaisons entre les différents groupes ont été réalisées en utilisant le test ANOVA non paramétrique de Kruskal-Wallis. Les valeurs de p inférieures à 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives. Les expérimentations *in vitro* ont été répétées au moins 3 fois (sauf mention contraire) et l'expérimentation la plus représentative a été choisie pour illustrer les résultats dans les figures.

## Résultats

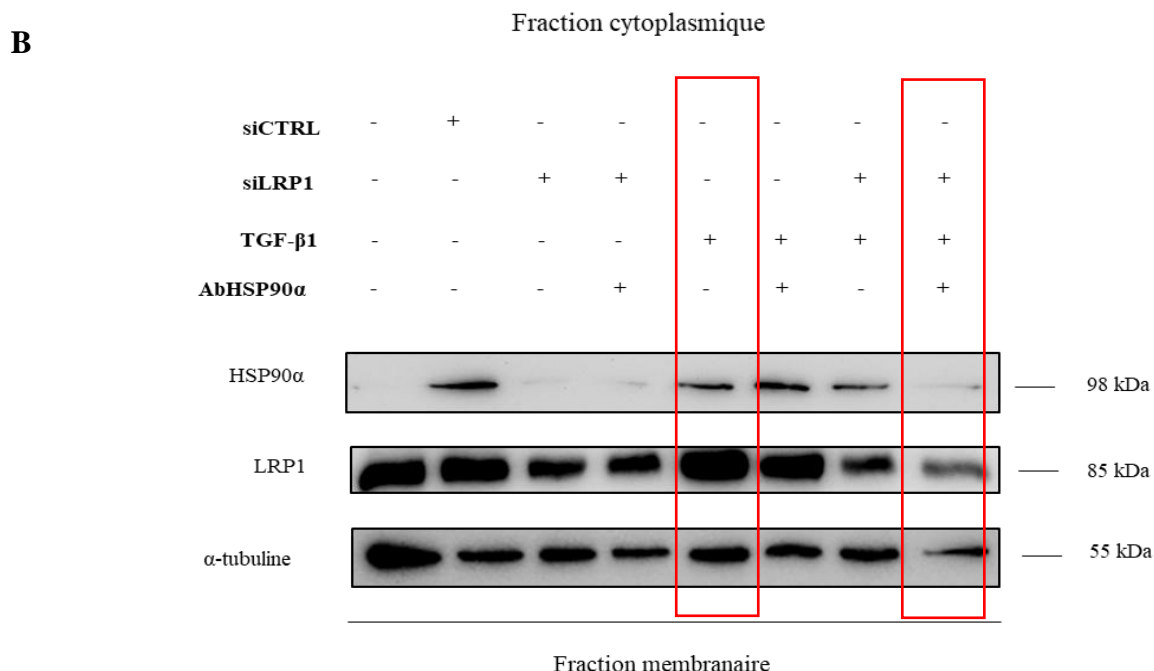
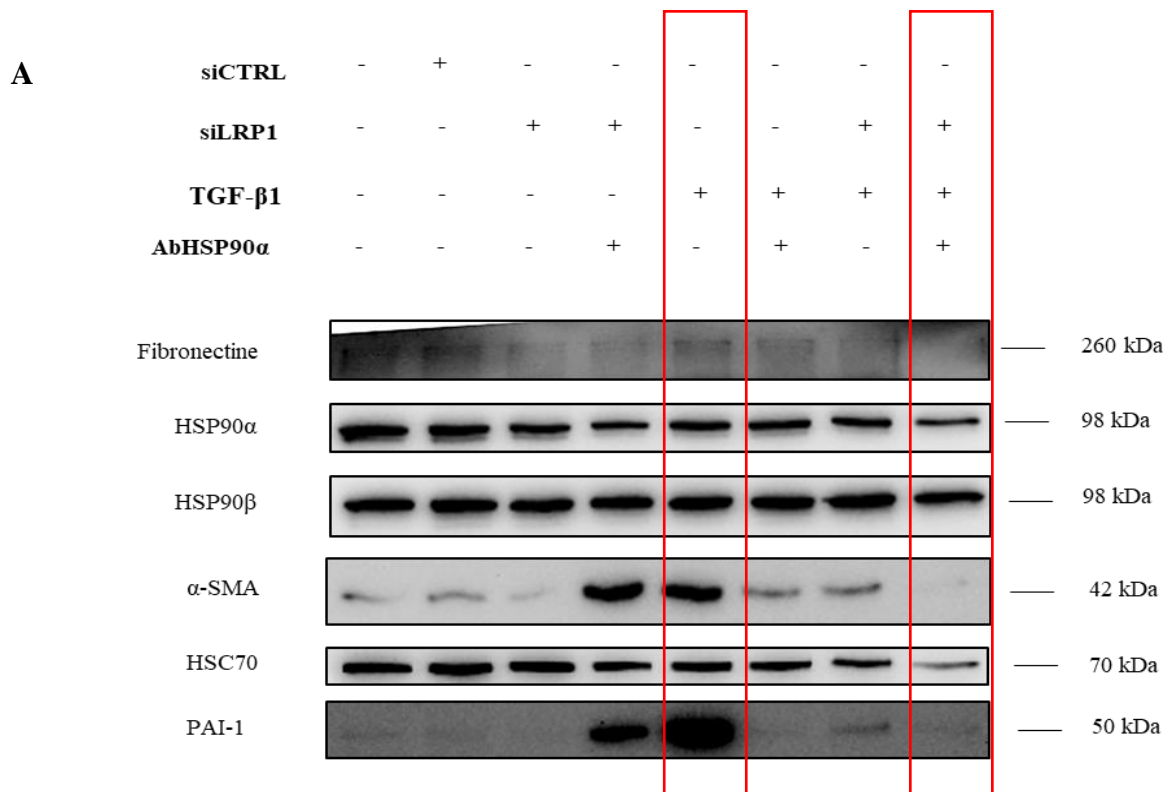
*In vitro*, sur des cellules fibroblastiques humaines, nos résultats confirment qu'en conditions de stimulation au TGF- $\beta$ 1, l'inhibition d'HSP90 $\alpha$  induit une diminution de l'expression des protéines cytosoliques de la TEM comme  $\alpha$ -SMA, fibronectine ou encore PAI-1 (Figure 1.A). L'expression des protéines du cytosol HSP90 $\beta$  et d'HSP90 $\alpha$  ne varie pas. Aussi, lors d'un traitement ciblant HSP90 $\alpha$ , l'inhibition simultanée de LRP1 en conditions profibrotiques (Figure 2.B) (un récepteur impliqué dans la voie de signalisation d'HSP90), potentialise l'inhibition induite par le traitement anti-HSP90 $\alpha$ . De façon surprenante, les cellules fibroblastiques dont seules les expressions de LRP1 et HSP90 $\alpha$  sont inhibées, présentent un niveau protéique cytosolique d' $\alpha$ -SMA et de PAI-1 augmenté. L'expérience a été réalisée 2 fois.

Dans le but d'utiliser un fragment de l'anticorps anti-HSP90 $\alpha$  comme outil de suivi et de prédiction des traitements des patients atteints de FPI, un radioélément a été couplé directement au fragment d'anticorps ciblant HSP90 $\alpha$  en collaboration avec l'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (ICMUB, UMR 6302) (Figure 2.A). *In vitro*, des mesures d'affinité entre une protéine HSP90 recombinante et le fragment d'anticorps anti-HSP90 $\alpha$  original non couplé au radioélément a permis de mettre en évidence une affinité de l'ordre de 15nM entre les deux partenaires (Figure 2.B). Dans les cas où les anticorps ont subi un couplage aux radioéléments possédant différents degrés de marquage à leur surface (DOL2.3 et DOL3.6), l'affinité entre la protéine et les anticorps décroît de façon inversement corrélée à l'augmentation des DOL à la surface des anticorps (Figure 2.C et 2.D). Dès lors, nous avons choisi de poursuivre les expériences de radioimagerie avec l'anticorps couplé au radioélément possédant 2.3 DOL dont l'affinité avec la protéine recombinante n'a pas été impacté par l'ajout du radioélément comparativement au contrôle d'interaction (liaison entre la protéine recombinante et l'anticorps non radiomarqué). L'expérience a été réalisée 3 fois. *In vivo*, dans un modèle préclinique de fibrose induite à la bléomycine (Figure 3.A), les animaux injectés par voie intraveineuse avec le fragment d'anticorps anti-HSP90 $\alpha$  radiomarqué et ayant été préalablement instillés à la bléomycine, ne présentaient pas d'augmentation significative de l'accumulation pulmonaire de la sonde anti-HSP90 $\alpha$  1h, 4h et 24h post injection et comparativement aux animaux ayant reçu l'anticorps bloquant non radiomarqué en excès (dit « blocking ») (Figure 3.B). Les comptages  $\gamma$  n'ont pas permis de montrer une différence significative d'accumulation radioactive dans les poumons des animaux des différents groupes

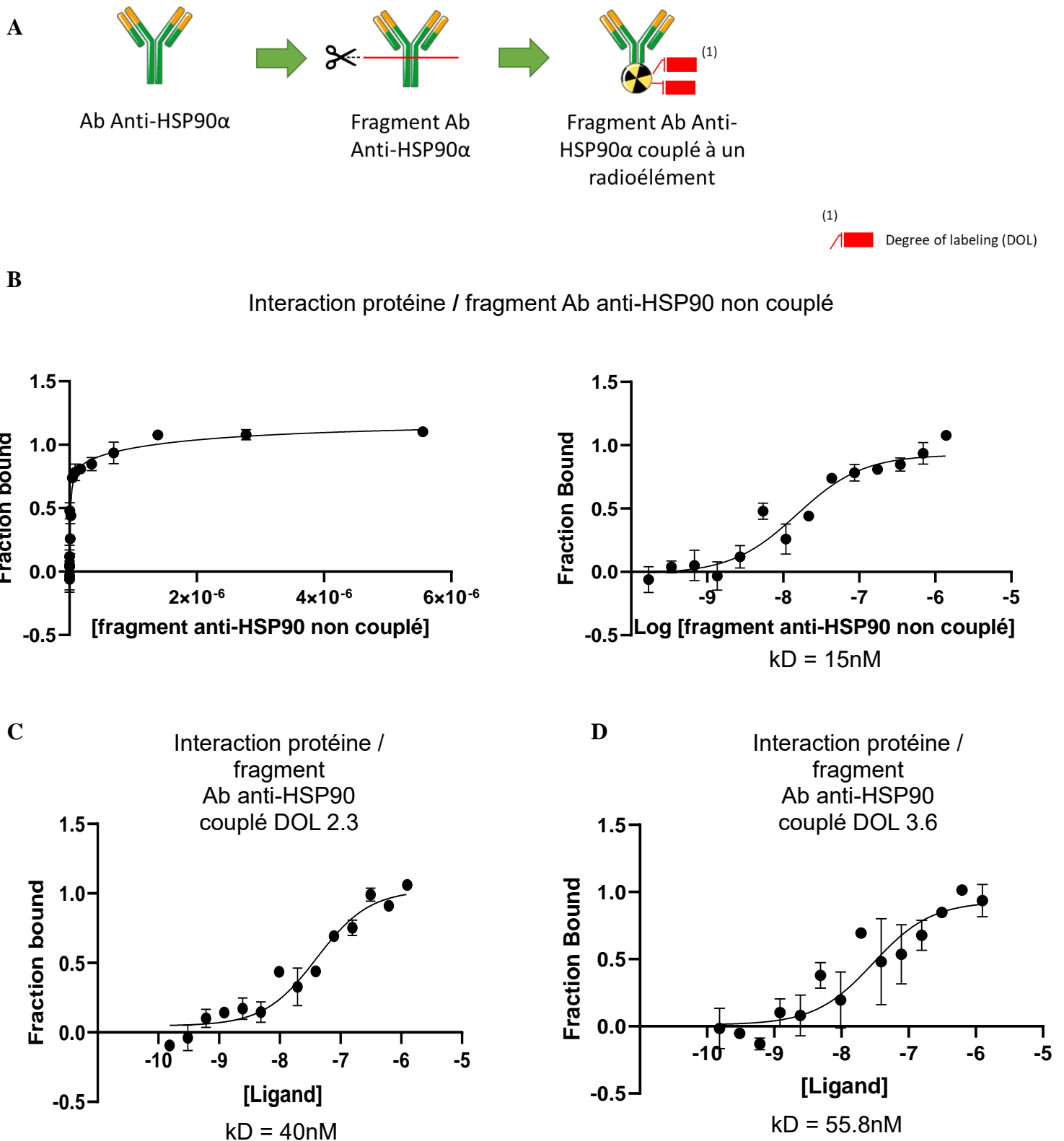


(Figure 3.C). Afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de cet anticorps, nous avons injecté quotidiennement en intrapéritonéale ce dernier à différentes concentrations dans un modèle murin expérimental de fibrose induite par la bléomycine (Figure 4.A). A partir de J10, les animaux présentaient une reprise de poids corrélée à l'injection de dose croissante d'HSP90 $\alpha$  laissant présumer d'une amélioration de leurs états de santé globaux (Figure 4.B). Aussi, un examen sircol mesurant le contenu en collagène des tissus pulmonaires d'animaux des différents groupes, montre que comparativement au groupe injecté avec l'IgG contrôle non relevant, l'injection de la plus forte concentration d'HSP90 $\alpha$  réduit significativement le collagène (Figure 4.C) (\*P<0.0327). Cependant, la quantification du collagène via l'examen histologique (coloration rouge sirius) n'a pas révélé de différence significative entre les groupes IgG contrôle et HSP90 $\alpha$  (Figure 4.D).

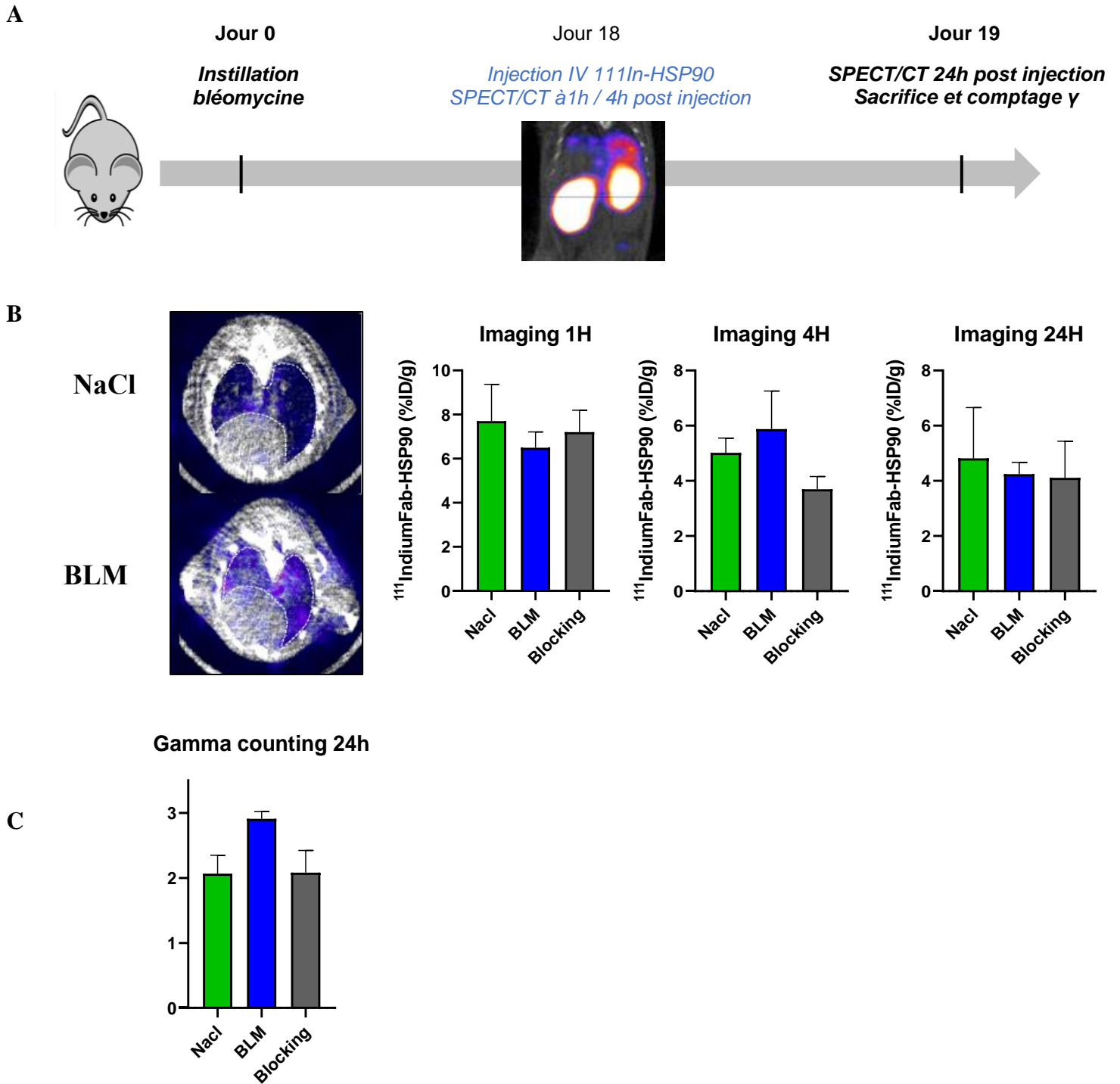
Sur modèle murin préclinique de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, nous avons par cytométrie en flux discriminer les différentes populations cellulaires du poumon afin d'évaluer l'expression d'HSP90 $\alpha$  et de LRP1 dans chacune d'entre elles. Cet examen a été réalisé 7 jours, 14 jours et 20 jours après instillation de bléomycine et nous comparions les souris instillées à la bléomycine et les souris instillées au NaCl. A J7, l'augmentation de l'expression d'HSP90 $\alpha$  était corrélée à celle de LRP1 principalement dans les cellules immunitaires (CD45+) chez des animaux bléomycine et comparativement aux animaux NaCl (Figure 5.A et 5.B ; J7). A J15 de l'instillation par la bléomycine, les cellules endothéliales (CD31+) et épithéliales (CD326+) d'animaux instillés à la bléomycine semblent conjointement exprimer davantage de HSP90 $\alpha$  et de LRP1. (Figure 5.A et 5.B ; J15). A J20, les cellules épithéliales (CD326+) et les myofibroblastes (CD49 high) sont les deux types cellulaires qui surexpriment HSP90 $\alpha$  et LRP1 chez les animaux instillés à la bléomycine. L'analyse des différents types cellulaires qui surexpriment HSP90 $\alpha$  et LRP1 dans un modèle préclinique de fibrose pulmonaire induite nous permettra de mesurer leurs implications dans la physiopathologie de la FPI et de les cibler préférentiellement en thérapie.



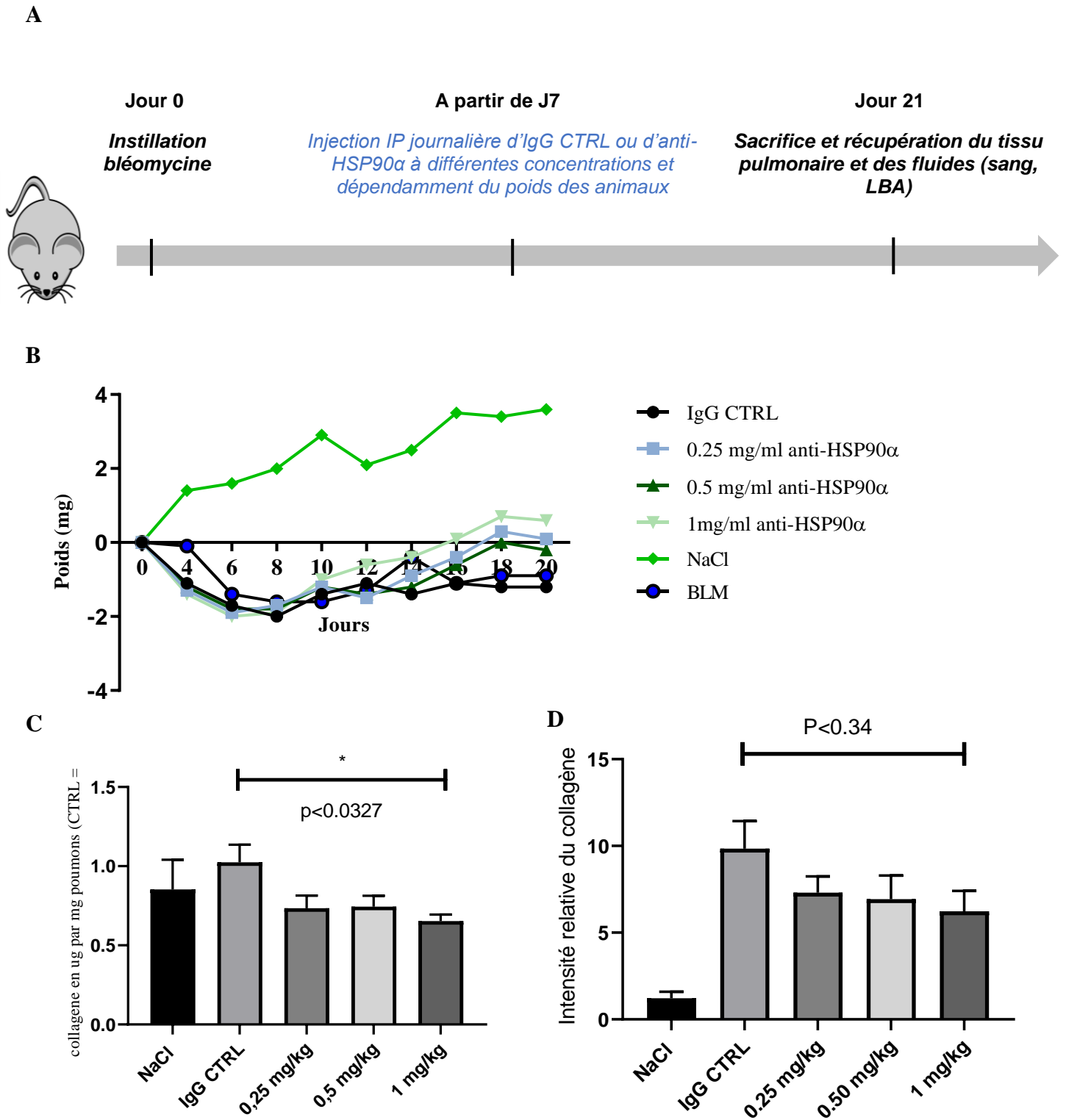
**Figure 1. Effets de l'inhibition d'HSP90 $\alpha$  et de son récepteur associé LRP1 sur l'expression de marqueurs de la TEM ( $\alpha$ -SMA, PAI-1, fibronectine) de cellules fibroblastiques humaines (CCL-210) stimulées par le TGF- $\beta$ 1. (A) Analyse par western blot du niveau protéique cytosolique des formes intra et extracellulaire d'HSP90 et des marqueurs de la TEM ( $\alpha$ -SMA, PAI-1, fibronectine) de cellules CCL-210 traitées 24h par du TGF- $\beta$ 1 (10ng/ml), Ab anti-HSP90 $\alpha$  polyclonal (40ug/ml) ou l'association des deux. Les cellules étaient préalablement transfectées ou non pendant 24h avec un siARN dirigé contre le récepteur LRP1 (50nM) (N=2) ; (B) Analyse par western blot du niveau protéique membranaire du récepteur LRP1 et de la forme extracellulaire de cellules CCL-210 traitées 24h par du TGF- $\beta$ 1 (10ng/ml), Ab anti-HSP90 $\alpha$  polyclonal (40ug/ml) ou l'association des deux. Les cellules étaient préalablement transfectées ou non pendant 24h avec un siARN dirigé contre le récepteur LRP1 (50nM) (N=2) .**



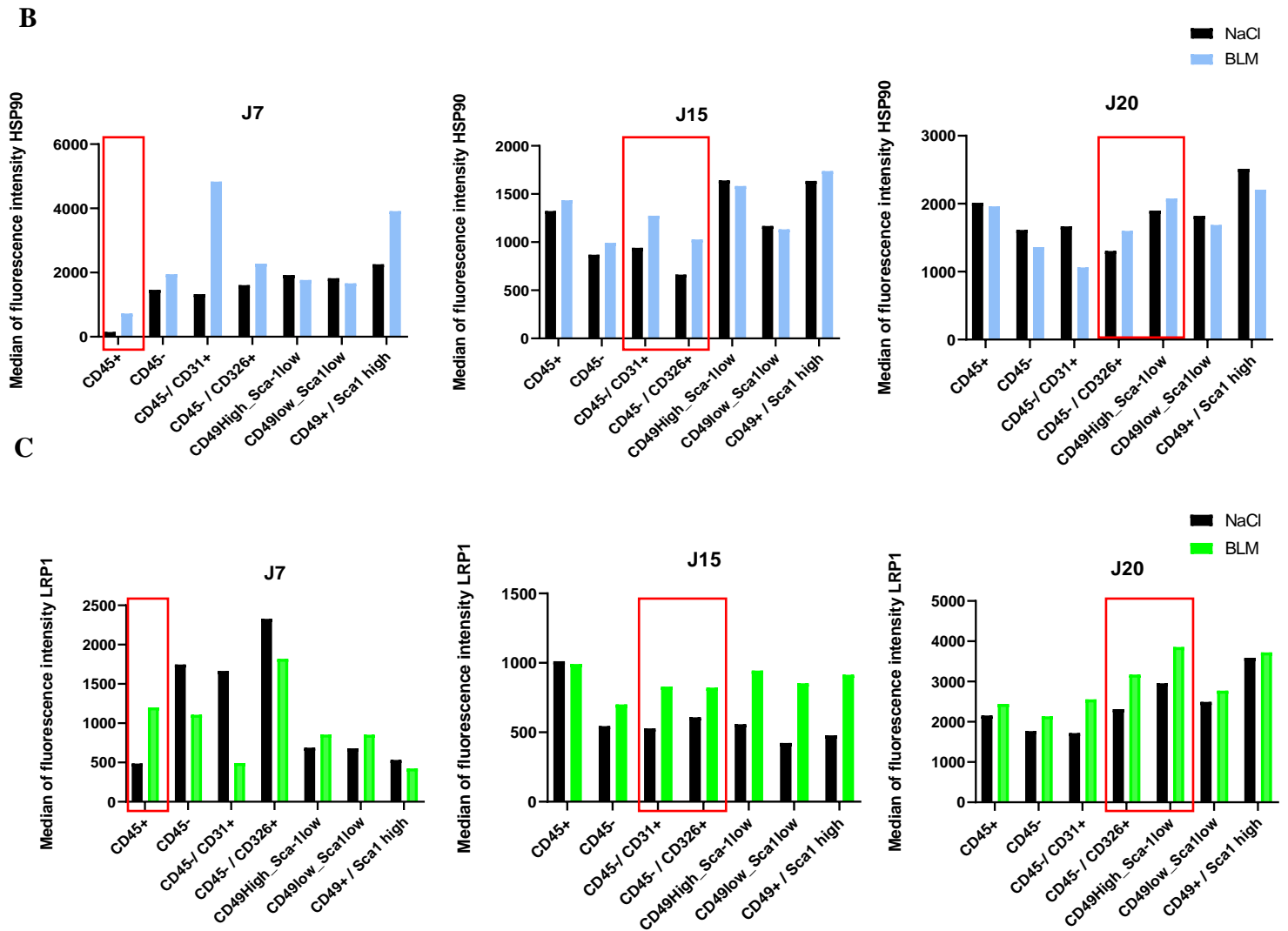
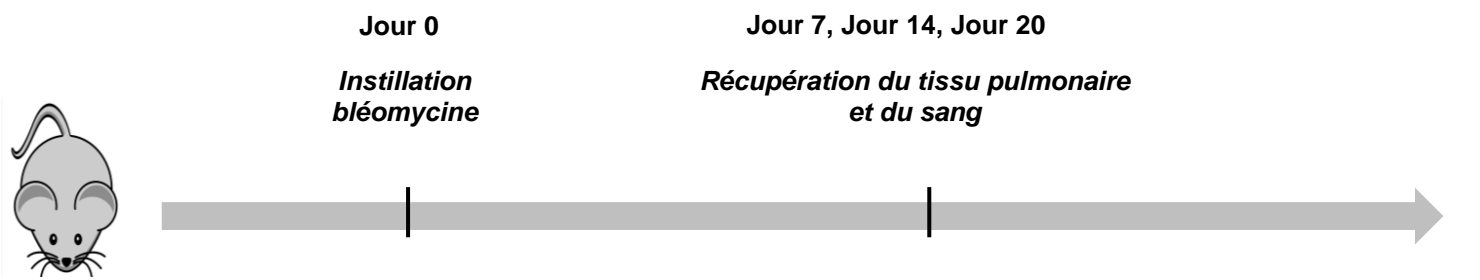
**Figure 2. Etude d'interactions entre la protéine HSP90 et un fragment d'anticorps anti-HSP90α couplé ou non à un radioélément.** (A) Processus de couplage d'un radioélément au fragment d'anticorps anti-HSP90α ; (B) Courbe de saturation et mesure d'affinité entre la protéine HSP90 et le fragment d'anticorps anti-HSP90α non couplé à un radioélément ( kD=15 nM) ; (C) mesure d'affinité entre la protéine HSP90 et le fragment d'anticorps anti-HSP90α couplé à un radioélément et possédant 2.3 DOL (kD=40 nM) ; (D) mesure d'affinité entre la protéine HSP90 et le fragment d'anticorps anti-HSP90α couplé à un radioélément et possédant 3.6 DOL (kD=55.8 nM) (N=3)



**Figure 3. Examen SPECT de la spécificité et de la fixation de la sonde  $^{111}\text{In}$ -4C5 dans un modèle expérimental de fibrose induite par la bléomycine** (A) Plan expérimental d'injection et des imagerie des animaux ; (B) Imagerie SPECT obtenues par contourage des zones pulmonaires radioactives des animaux instillés au NaCl versus les animaux instillés à la bléomycine ; l'imagerie a été réalisé 1h, 4h et 24h après l'injection du traceur par voie intraveineuse caudale ; les animaux NaCl et BLM ont reçu la même concentration de sonde radioactive  $^{111}\text{In}$ -4C5 tandis que les animaux dits « blocking » ont reçu la sonde radioactive et une concentration de sonde non radioactive 20 fois supérieure ; le contenu de la radioactivité pulmonaire a été exprimé en MBq, converti en pourcentage de dose injectée par gramme de tissu (%ID/g) ; (C) Mesure de l'activité radioactive contenu dans les pumons des animaux instillés à la bléomycine ou au NaCl en post euthanasie (comptage gamma).



**Figure 4. Mesure du collagène contenu dans les tissus pulmonaires d'animaux traités avec un anticorps ciblant HSP90α dans un modèle expérimental de fibrose induite par la bléomycine** (A) Chronologie du protocole et des injections ; (B) Evaluation de la perte de poids des animaux inhérente à l'injection de la bléomycine et de leur reprise de poids en fonction des différents traitements reçus ; (C) Evaluation quantitative du collagène (Sircol) contenu dans les tissus pulmonaires d'animaux instillés à la bléomycine et traités avec un IgG non relevant ou l'anticorps anti-HSP90α à différentes concentrations (  $*P < 0.0327$  ) ; (D) Evaluation histologique du collagène (coloration au rouge sirius) contenu dans les tissus pulmonaires d'animaux instillés à la bléomycine et traités avec un IgG non relevant ou l'anticorps anti-HSP90α à différentes concentrations (  $P < 0.34$  )



**Figure 5. Cinétique d'expression d'HSP90 $\alpha$  et LRP1 dans le tissu pulmonaire d'animaux pour lesquels la fibrose pulmonaire a été induite par la bléomycine** (A) Chronologie du protocole expérimental ; (B) Mesure de l'expression d'HSP90 $\alpha$  à J7, J14 et J20 post instillation de bléomycine et dans les différents types cellulaires du tissu pulmonaire d'animaux ; les animaux NaCl ont été instillés avec 0.9% de NaCl (C) Mesure de l'expression de LRP1 à J7, J14 et J20 post instillation de bléomycine et dans les différents types cellulaires du tissu pulmonaire d'animaux ; les mesures ont été réalisées en MFI (% of median fluorescence intensity)

## **Revue.**

Les protéines de choc thermique extracellulaires comme cibles thérapeutiques et biomarqueurs dans les maladies pulmonaires interstitielles fibrosantes

Les maladies pulmonaires interstitielles (MPI) sont nombreuses et présentent des pronostics variables souvent associés au développement d'une fibrose progressive. La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est la MPI fibrosante chronique typique associée à un déclin progressif de la fonction pulmonaire. D'autres MPI fibrosantes sont associées à des maladies du tissu conjonctif (comme la polyarthrite rhumatoïde-PI (RA-ILD) et la sclérose systémique (SSc-ILD)) ou à une exposition d'origine environnementale/médicamenteuse. Compte tenu du grand nombre de MPI fibrosantes progressives et des disparités dans les schémas cliniques et les caractéristiques de la maladie, l'évolution de ces maladies est hétérogène et ne peut pas être prédite avec précision pour chaque patient. Par conséquent, la découverte de nouveaux biomarqueurs pour ces types de maladies est un défi clinique majeur. Les protéines de choc thermique (HSP) sont des chaperons moléculaires largement décrits comme étant impliqués dans les phénomènes de fibrose. Leurs formes extracellulaires (eHSPs) ont été récemment et avec succès utilisées comme cibles thérapeutiques ou biomarqueurs circulants dans le cancer. La revue ci-dessous décrit le rôle des eHSP dans les MPI fibrosantes, soulignant l'importance de ces protéines de stress pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques et la découverte de biomarqueurs potentiels dans ces maladies.

Cette revue a été publiée le 22 août 2021 au sein de l'International Journal of Molecular Sciences.



Review

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

Julie Tanguy <sup>1,2</sup> , Lenny Pommerolle <sup>1,2</sup>, Carmen Garrido <sup>1</sup>, Martin Kolb <sup>3</sup>, Philippe Bonniaud <sup>1,2,4</sup>,  
Françoise Goirand <sup>1,2,4,†</sup> and Pierre-Simon Bellaye <sup>2,5,\*</sup>

- <sup>1</sup> Team HSP-Pathies, INSERM U1231, 21000 Dijon, France; julie\_tanguy14380@hotmail.fr (J.T.); lenny.pommerolle@u-bourgogne.fr (L.P.); Carmen.Garrido-Fleury@u-bourgogne.fr (C.G.); philippe.bonniaud@chu-dijon.fr (P.B.); francoise.goirand@u-bourgogne.fr (F.G.)  
<sup>2</sup> Centre de Référence Constitutif des Maladies Pulmonaires Rares de l'Adultes de Dijon, OrphaLung Network (RespiFil), University Hospital of Burgundy, 21000 Dijon, France  
<sup>3</sup> Firestone Institute for Respiratory Health, McMaster University, Hamilton, ON L8S 4L8, Canada; kolbm@mcmaster.ca  
<sup>4</sup> University of Burgundy and Franche-Comté, 25000 Besançon, France  
<sup>5</sup> Preclinical Imaging and Radiotherapy Platform, Nuclear Medicine Department, Centre George-François Leclerc, 21000 Dijon, France  
\* Correspondence: psbellaye@cgl.fr  
† These authors contributed equally to this work.



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

Academic Editors: Michael Roth and Fang Lei

Received: 30 July 2021  
Accepted: 26 August 2021  
Published: 27 August 2021

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



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

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

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

## 1. Introduction

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

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



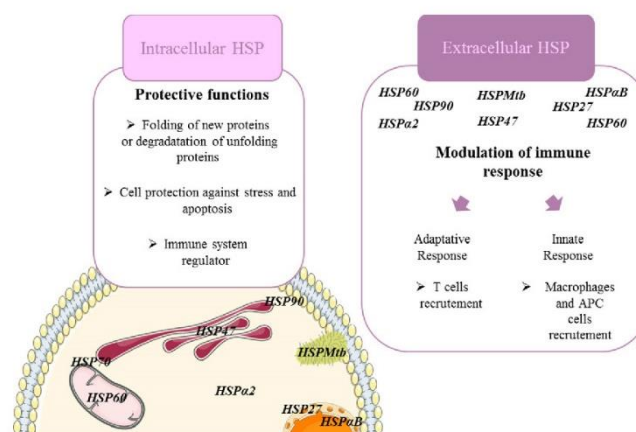
pulmonary complications of known origin that may lead to progressive fibrosing ILDs in their most severe form [3]. For instance, a significant proportion of patients with systemic inflammatory/autoimmune disorders such as rheumatoid arthritis (RA), and systemic sclerosis (SSc) can develop ILDs and pulmonary fibrosis. Among all patients with fibrotic ILDs other than IPF, 13 to 40% have a progressive fibrosing phenotype [4]. Sarcoidosis (SA) is an idiopathic granulomatous disease that affects most commonly the lung and can evolve into fibrotic ILD [5]. The prognosis of idiopathic ILDs and, particularly, IPF, is poor and fibrotic ILD complications of underlying diseases such as RA and SSc are usually a marker of poorer prognosis in comparison to patients without lung involvement. As a consequence, a better understanding of the underlying mechanisms involved in lung fibrogenesis as well as the discovery of novel biomarkers for this type of disease is a major clinical challenge.

While fibrogenesis is different depending on the initiating insult and the affected organ, many of the major steps in its pathogenesis are similar [6]. Epithelial cell damage and apoptosis are thought to be major early events during fibrogenesis with subsequent recruitment and activation of inflammatory cells and an important secretion of pro-fibrotic cytokines such as PDGF, TGF- $\beta$  and IL-10. PDGF is known to stimulate fibroblast proliferation and migration whereas IL-10 is an anti-inflammatory cytokine that promotes fibrosis by stimulating macrophage recruitment [7,8]. Such a pro-fibrotic microenvironment leads to the activation of neighboring cells and drives the progression of fibrosis. The hallmark of pulmonary fibrosis is an abnormal and massive increase in extracellular matrix (ECM) deposition, mainly collagen, which disrupts the alveolar architecture. Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) is a key cytokine involved in the process of fibrogenesis as it plays a pivotal role during fibrosis in many different organ systems. TGF- $\beta$ 1 causes myofibroblast proliferation and differentiation, and increases the synthesis of ECM components such as collagen and fibronectin. Transient adenoviral vector-mediated gene transfer of active TGF- $\beta$ 1 (AdTGF- $\beta$ 1<sup>223/225</sup>) in rat or mouse lungs leads to progressive and severe fibrosis [9]. Moreover, it has been shown that this growth factor induces the transformation of alveolar epithelial cells into cells with a myofibroblastic phenotype, a process called Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) [10]. Furthermore, TGF- $\beta$ 1 levels are increased in fibrotic lung tissue from patients affected with pulmonary fibrosis [11].

Heat shock proteins (HSPs) are upregulated in cells following various stresses (hypothermia/hyperthermia, hypoxia, ionizing radiation, cytotoxic drug exposition (alkylating agents, antibiotics, antimetabolites, etc.)). They are classified in high molecular weight HSP (HSP110/HSPH, HSP90/HSPC, HSP70/HSPA, HSP60/Cpn and HSP47/DNAI) and the small HSP (HSP27/HSPB1 and  $\alpha\beta$ -crystallin/HSPB5) [12] (Table 1). HSPs are molecular chaperones that are mainly involved in the folding of newly synthesized proteins to promote their stabilization, correct cellular location and proper turnover. During stress, the accumulation of misfolded proteins enhances the formation of aggregates, which disrupt the cellular machinery and can lead to cell death. The presence of HSPs ensures either the correct folding of misfolded proteins or, if refolding is impaired, they promote their degradation through the proteasome system [13] (Figure 1). In addition, HSPs have been extensively implicated in the pathogenesis of cancer. HSPs take part in several molecular mechanisms thereby favoring oncogenesis, tumor progression and/or cancer cell resistance. They inhibit key effectors of apoptosis machinery at the pre- and post-mitochondrial level, such as HSP27 associating cytochrome C, HSP90 inhibiting adaptor molecule apoptotic protease activation factor-1 (Apaf-1) or HSP70 associating Apaf-1 and apoptosis inducing factor (AIF). Thus, they have been implicated in cellular proliferation, immune modulation and tumor invasion, which is facilitated furthermore by their proangiogenic properties. Accordingly, HSPs appeared to be beneficial for cancerous cells and thereby deleterious for patients affected by a wide range of cancer types. Their depletion induces the regression of the tumors [14]. Therefore, the inhibition of HSPs appears to be of great interest to improve the efficiency of chemotherapy and the disease outcome, and a large number of inhibitors targeting HSP are currently developed or clinically tested for cancer treatment [15].

Table 1. HSP nomenclature and localization.

Classification	Nomenclature	Weight Discrimination	Localisation	ATP Depending
HSP27	HSPB1	Small molecular weight	Cytoplasm/nucleus	ATP-independant
$\alpha$ B-Crystallin	HSPB5		Cytoplasm/nucleus	ATP-independant
HSP90	HSPC	High molecular weight	Cytoplasm/Endoplasmic reticulum/Membrane	ATP- dependent
HSP70	HSPA1A		Cytoplasm/nucleus/ mitochondrie/ endoplasmic reticulum	ATP- dependent
HSP47	DNAJ		Endoplasmic reticulum	ATP-independant
HSP60	HSPD1		Mitochondrie	ATP- dependent
HSP65 Mtb HSP16 Mtb HSP70 Mtb	DNAK		Membrane/cytosol/envelope	ATP- dependent
Alpha-2-HS glycoprotein	Fetuin-A		Cytosol	ATP-independant



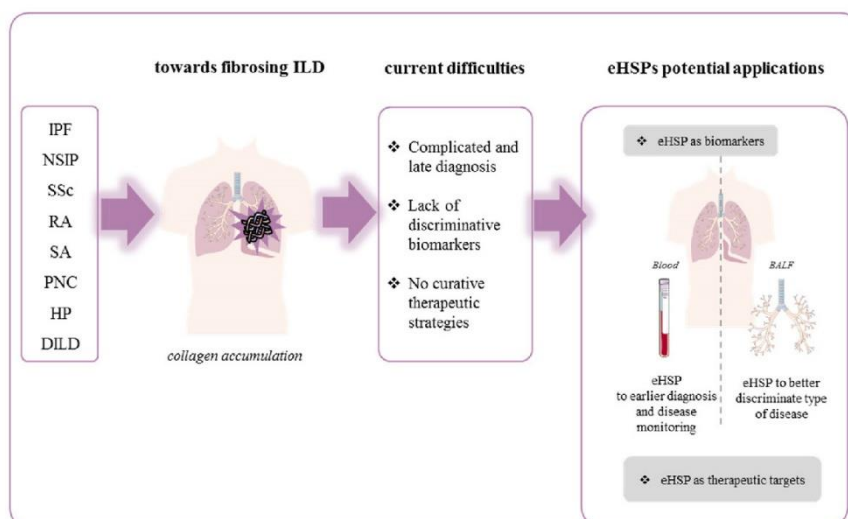
**Figure 1.** Schematic representation of HSPs' biological functions. All HSPs mentioned are found in both intracellular and extracellular compartments.

The intracellular role of HSPs in fibrogenesis has largely been investigated [16]. HSP47 is the most studied HSP in fibrogenesis due to its specific role on collagen synthesis and secretion [17–19]. Hagiwara et al. demonstrated that HSP47 inhibition by antisense-oligonucleotide reduced lung injury and collagen deposition as well as improved lung morphology and function in several experimental models [20–22]. In addition, HSP90 has been shown to favor TGF- $\beta$ 1 signaling pathway by stabilizing TGF- $\beta$ RII, thus promoting myofibroblast activation and ECM production [23,24]. Some HSP90 inhibition strategies have been shown efficient to reduce lung fibrosis in mice models [23]. On the contrary, HSP70 has been shown to protect from lung fibrosis. Knock-out mice for HSP70 presented higher sensitivity to bleomycin-induced lung fibrosis [25] and HSP70 induction via geranylgeranylacetone has been shown to prevent lung fibrosis in animal models [26]. Small HSPs have also been involved in the process of fibrogenesis. HSP27 was described as a chaperon protein to Snail, an EMT transcription factor, able to enhance the TGF- $\beta$ 1 signaling pathway [27]. Its inhibition with OGX-427, an HSP27-targeted oligonucleotide antisense, was shown to inhibit fibrosis in animal models. In addition,  $\alpha$  $\beta$ -crystallin was described to be essential for the activation of TGF- $\beta$ 1 signaling through the enhancement of the nuclear translocation of Smad4 [28] and the sequestration of TRIM33, a negative regulator of lung fibrosis [29].

Although HSPs were mainly studied for their intracellular cytoprotective and chaperon role, recent work highlighted a major role of secreted HSPs which interact with immune cells and act as immunomodulators (Figure 1).

Furthermore, growing body of evidence has shown that extracellular HSP (eHSP) could be used as circulating biomarkers, mainly in cancer [30]. Extracellular HSPs were described to be involved in tumor progression and metastasis [31]. For example, HSP70 serum level has been shown to correlate with tumor volume in non-small cell lung cancer [32]. HSP27 has also been extensively studied in various cancers including breast, ovarian, or colorectal cancer in which an increase in its extracellular level has been associated with poor prognostics [33–35]. In the tumor microenvironment, extracellular HSP27 (eHSP27) was able to activate TLR3 receptors and thereby to promote angiogenesis [36]. Recent studies showed that eHSPs could also be found in extracellular vesicles (EVs) and could represent new perspectives for diagnosis and therapeutic strategies [30]. For example, a recent study showed that the concentration of circulating HSP70-positive exosomes in lung and breast cancer patients was significantly higher compared to healthy volunteers and were useful to discriminate metastatic from non-metastatic patients [37].

The current review will describe the role of extracellular HSPs in several lung disorders involving ILDs and progressive lung fibrosis highlighting the importance of this particular stress proteins to develop new therapeutic strategies and discover potential biomarkers in fibrosing ILDs (Figure 2 and Table 2).



**Figure 2.** eHSPs are a promising biomarker and therapeutic target in ILDs. IPF: idiopathic pulmonary fibrosis; NSIP: nonspecific interstitial pneumonia; SSc: systemic sclerosis; RA: rheumatoid arthritis; SA: sarcoidosis; PNC: pneumoconiosis; HP: hypersensitivity pneumonitis; DILD: drug-induced lung disease.

**Table 2.** Incorporation of pathogenic roles of eHSP in ILDs that implicate their roles as biomarkers and as therapeutic molecules.

Pathology	eHSP	Protein	Auto-Antibody	Biological Fluids	Prognosis/Diagnosis	Authors
IPF	HSP90	+	–	Serum	Prognosis	[16]
	HSP70	–	+	Serum, BALF	Prognosis/Diagnosis	[38–40]
	HSP47	+	+	Serum	Prognosis	[41–43]
SSc	HSP70	+	–	Serum, BALF	Prognostic	[44,45]
	HSP90	+	–	Blood	Prognostic	[46]
	HSP27	+	–	Blood	Diagnosis	[47]
	α2 HSP	+	–	BALF	Diagnosis	[48]
RA	HSP90 citrullinated	+	+	Blood	Prognosis/Diagnosis	[49]
	HSP70	+	–	Blood	Under investigation	[50]
SA	HSP70	–	+	Serum	Diagnosis	[51]
	HSPMtb 16	+	–	Serum	Diagnosis	[52]
	HSPMtb 65	+	–	Serum, BALF	Diagnosis	[53]
	HSPMtb 70	+	–	Serum	Diagnosis	[54]
NSIP	HSP90 HSP60				Deserve further investigated in fibrosing ILD context	
	HSP47	+	+	Serum, BALF	Diagnosis/Prognosis	[55] [42] [56]
	HSP70	+	–	Serum	Diagnosis	[57]
PNC	HSP27	+	–	Serum	Diagnosis	[58]
	HSP90	+	–	Blood	Under investigation	[59]
	HSPMtb				Deserve further investigated in fibrosing ILD context	
HP	HSP70	+	–	BALF	Diagnosis	[60]
	α2 HSP	+	–	BALF	Diagnosis	[61]
DILD	HSPMtb 65				Deserve further investigated in fibrosing ILD context	
	HSP47	+	–	Serum	Diagnosis	[62]

## 2. Heat Shock Proteins Modulate Immune Cell Functions in Fibrosing ILDs

Even if the origin of inflammation leading to fibrosis in ILDs depends on the pathogenesis of each disease, similar sub-types of immune cells and cytokines/chemokines are involved in all cases. Briefly, it is clear that cells of both the innate and adaptive immune system such as macrophages, APC cells, CD4+ T-cells (Th1, Th2, Th17) are linked to the pathogenesis of fibrosing ILDs [63,64] (Figure 1). Oversimplified M1/M2 macrophage polarization nomenclature can help to understand how macrophages contribute to fibrosis. M1-like macrophages have been found to promote fibrosis by secreting pro-inflammatory IL-6, IL-12 and TNF-α as well as promoting the Th17 and neutrophilic immune response [65–68]. In autoimmune or inflammatory fibrosing ILDs, macrophages promote secretion of pro-inflammatory cytokines, ROS, stimulates Th1/Th17 response and inhibits regulatory cells (e.g., RA, SA, hypersensitivity pneumonitis, pneumoconiosis) [69]. M2-like macrophages have been linked to fibrotic processes through the promotion of CC ligand (CCL) 2 and CC ligand 17 and particularly by increased secretion of TGF-β, IL-10, and IL-33; three well-known pro-fibrotic cytokines. These suppressive cells, implicated in wound healing, stimulates Treg/Th2 expansion and restrains T-cell activation. In SSc-ILDs, macrophages seem to be programmed to differentiate in M2 phenotype through TLR2-TLR4 signaling and promote fibrosis [70]. In addition, in response to interactions with pathogen-associated molecular patterns or danger-associated molecular patterns and TLR2-TLR4 signaling, antigen-presenting cells (DC, neutrophils or macrophages) can also adopt fibrosing properties as seen in SA with HSPs from pathogens such as *Mycobacterium tuberculosis*. In IPF and SSc-ILD, increased production of CCL18 by APC cells promotes collagen production by lung fibroblasts [7]. On the contrary, the role of lymphocytes in fibrosing ILDs remains poorly understood. Nevertheless, an excessive accumulation of T lymphocytes has been

observed in several pulmonary fibrotic diseases (SSc-ILDs and IPF) [71]. Moreover, a disturbance in Th1/Th2 balance with abnormal profibrotic Th2-polarized T-cell response has been associated with tissue damage and fibrosis in SSc-ILD and in IPF [72,73].

Immunomodulation by regulatory immune cells is crucial in dampening pathogenic immune responses and inhibiting the transition from inflammation to fibrosis. Therefore, many current treatments against fibrosis in all ILDs are based on immunoregulators such as glucocorticoids and TNF inhibitors. It has been shown that extracellular or receptor-bound HSPs mediate immunological functions and immunomodulatory activity [74,75]. Therefore, modulating HSPs in the context of ILDs could help to restore a proper inflammatory environment and promote patients' recovery by slowing down fibrosis.

For instance, Hsp70, known to be involved in SSc-ILD, SA, RA, hypersensitivity pneumonitis or IPF promotes the production of anti-inflammatory cytokines and interacts with APC and macrophages by binding to their endocytic receptors resulting in the release of anti-inflammatory cytokine IL-10 that promotes fibrosis [76]. Moreover, eHSP70 has also been observed not only to induce the production of other pro-fibrotic cytokines such as IL-6 and TGF- $\beta$  in auto-immune diseases but also to increase Th17 response in these diseases [77]. TLR2/4 receptors' activation is the main characterized pathway through which eHSP70 may induce its inflammatory effects. Therapeutics strategies modulating HSP70 expression in tumor environment have been able to modulate regulatory phenotype of macrophages and promotes tumor regression [78]. One can imagine that in a same way, targeting eHSP70 expression in the lung could help to slow down fibrosis by modulating macrophage polarization and lung inflammation, damage and fibrosis. Similarly, Hsp90 involved in the pathogenesis of SSc/RA-ILDs or pneumoconiosis is known to promote wound healing and activate innate immune system through NF $\kappa$ B signaling [79,80]. Recently, Hsp90 inhibitors have been shown to ameliorate autoimmune RA, and lung inflammation by modulating macrophages, T and DC activity, and may contribute to develop new therapies against fibrosing ILDs [81]. Finally, HSPs from *Mycobacterium tuberculosis* that participates to fibrosing SA, and environmental ILDs, are capable of eliciting important inflammatory immune response through TLR signaling to the extent that they have been labeled as "superantigens" [82]. Their properties can explain how they promote fibrosis through inflammation-induced damage to the lung.

The complete mechanisms by which eHSPs modulate immunity and ILDs' pathogenesis are yet to be understood. However, it is clear that they are a promising therapeutic target that can not only be used as a biomarker but also to modulate immune response in fibrosing ILDs (Figure 1).

### 3. Extracellular HSP and Fibrosing Diffuse Interstitial Lung Disease

#### 3.1. Fibrosing Idiopathic Diffuse Interstitial Lung Disease

##### 3.1.1. Idiopathic Pulmonary Fibrosis

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is the most common and canonical chronic fibrosing ILD. It is a devastating disease with an unknown etiology and a median overall survival of approximately 5 years. This rare disease reaches a prevalence around 0.33 and 4.51 cases per 10,000 [83]. This pathology also affects more men than women and rather the elderly population (rarely under the age of 60) [3,84]. Aging is the main risk factor but genetic predisposition and environmental factors such as cigarette smoke, wood dust and air pollution may be involved [85]. To date, only two drugs, pirfenidone and nintedanib, have been shown to slow down disease progression and no other drug demonstrated efficiency to stop or reverse it [84,86].

HSPs and eHSPs were highlighted to take part in the pathogenesis of IPF and have been widely investigated [16]. Dong et al. demonstrated the usefulness of 1G6-D7, a monoclonal antibody specifically targeting eHSP90 $\alpha$ , to attenuate bleomycin-induced lung fibrosis by interfering with LRP1-Erk signaling [87]. In 2018, Bellaye et al. confirmed the importance of eHSP90 as a potential circulating biomarker. They demonstrated a higher level of HSP90 $\alpha$  in the sera of IPF compared to non-IPF patients in correlation with the

worsening of fibrosis assessed by respiratory parameters (TLC, FVC and Fev1). In this study, HSP90 $\alpha$  was also found increased in BALF (Broncho Alveolar Lavage Fluids) and sera from rats with AdTGF-induced lung fibrosis in correlation with collagen level in the lungs. This work also demonstrated a direct interaction between HSP90 $\beta$  (intracellular isoform) with LRP1 which seems to be essential for the stabilization of LRP1 in plasma membrane as well as to allow eHSP90 $\alpha$ /LRP1 signaling and to promote myofibroblast differentiation and persistence [88].

Wallace et al. were the first to describe circulating autoreactive IgG against a 70–90 kDa alveolar epithelial cells' antigen in IPF [38]. Recently, a higher concentration of anti-HSP70 IgG in sera of IPF patients compared to healthy volunteers was described. In this study, the presence of anti-HSP70 IgG was correlated with a poor prognosis in IPF patients and with the development of acute exacerbations [39], defined as increasing dyspnea and or hypoxemia within the preceding 30 days, and new radiographic infiltrates without other attributable cause of lung dysfunction [89]. They demonstrated that anti-HSP70 IgG isolated from IPF patients were able to induce lymphocyte and monocyte activation with an increase CXCL8 secretion associated with disease progression. In contrast, elevated HSP70 level in the serum of IPF patients compared to healthy subjects was observed by Mills et al. but without difference with other ILD patients. In this study, higher BALF levels of anti-HSP70 antibodies were also found in non-progressor IPF patients compared with progressors but no difference was observed in the antibody levels in the serum between these two groups of patients. These results support a rather beneficial role of intra-pulmonary anti-HSP70 antibodies which may promote a homeostatic immune response [40].

Regarding HSP47, the collagen-specific HSP, the level of protein and autoantibodies in the sera were not significantly elevated in IPF patients compared with RA or mixed connective tissue disease (MCTD) patients [41]. These results were further investigated by Kakugawa et al. who demonstrated that the serum level of anti-HSP47 was higher in NSIP than IPF patients. In this study, IPF patients did no longer present higher level of anti-HSP47 compared with healthy controls [42]. A study involving a small cohort showed an increase in HSP47 level in the serum of IPF patients with acute exacerbations, compared with stable IPF patients [43]. These results, which should be confirmed in a larger cohort of patients, suggest different mechanisms of regulation of circulating HSP47 between stable patients and patients with acute exacerbation. Up to date, findings are too scarce to support the usefulness of measurement of HSP47 or autoantibody against HSP47 circulating level in the monitoring of IPF patients (Figure 2 and Table 2).

### 3.1.2. Nonspecific Interstitial Pneumonia (NSIP)

Nonspecific interstitial pneumonia (NSIP) is often of unknown etiology but its development can also occur secondarily to a connective pathology or following toxin exposition [90]. Still poorly understood, the diagnosis of this disease requires the exclusion from all the other lung pathologies. Sometimes, the difference between nonspecific interstitial pneumonia and usual interstitial pneumonia (UIP), an imaging and histopathological pattern that characterized IPF, is even difficult to determine. Indeed, a recent work mentioned that an expansion of fibrotic alveolar walls and fibroblast foci could also be observed in NSIP without being immediately associated with a more deadly UIP [91]. NSIP has a better prognosis than IPF [92]. NSIP may present as an "inflammatory type" associated with an important lymphocytic tissue inflammation and good response to immunomodulating therapies including corticosteroids or a "highly fibrotic type" associated with lung fibrosis, no response to therapy, and rapid evolution towards progressive fibrosis [93]. As previously described in many fibrotic diseases, the expression of HSP47 is increased in type II pneumocytes and fibroblasts in NSIP in association with a poorer prognosis [55,56]. Additional work performed in sera of patients with different fibrosing lung diseases showed that higher levels of anti-HSP47 autoantibodies were found in idiopathic fibrosing NSIP patients than in patients with IPF or in healthy volunteers [42]. The therapeutic or prognostic value of

this marker remains to be elucidated. No other eHSP has been investigated in NSIP and, due to their involvement in other fibrotic diseases, more studies are needed to provide new information on specific markers and therapeutic strategies in this disease (Figure 2, Table 2).

### 3.2. Fibrosing Diffuse Interstitial Lung Disease Associated with Connective Tissue (CTD-ILD)

#### 3.2.1. Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease (SSc-ILD)

Systemic sclerosis (SSc) is a rare chronic autoimmune disease of unknown cause characterized by diffuse fibrosis and vascular abnormalities in the skin, joints, and internal organs. Interstitial lung disease (ILD) affects approximately 30 to 50% of SSc patients and is in its progressive fibrosing form, the leading cause of death in SSc. SSc-ILD belongs to the connective tissue diseases (CTDs) and affects mostly young and middle-aged women [94,95]. This disease is characterized by severe tissue damage, which impairs epithelial cells that release several pro-fibrotic cytokines thereby promoting the differentiation of myofibroblasts. Moreover, these myofibroblasts together with remaining resident fibroblasts generate a global immune dysregulation by aggravating inflammation, promoting immune cells' recruitment and fibrosis [96]. Some studies have shown that mesenchymal cells from SSc-ILD patients strongly upregulate the expression of collagen and other profibrotic genes' expression such as ACTA2 or WIF1 [97]. However, most studies report that dysregulation of the immune system causes an accumulation of autoantibodies [98] responsible for the onset of SSc-ILD. Due to its importance in this pathology, the immune system is a major target to develop biomarkers and therapeutic tools. Current strategies targeting the immune system have been shown to slow the progression of the disease. Indeed, immunosuppressant combination therapies such as mycophenolate mofetil and cyclophosphamide are currently used to delay disease progression [98]. Moreover, recent clinical studies have shown that antifibrotic agents approved in IPF such as nintedanib may be indicated in progressive SSc-ILD to slow down fibrosis progression [99]. In most severe cases, both hematopoietic stem cell transplantation and lung transplantation are also discussed [95]. Due to the lack of available effective treatments, biomarker discovery is the next challenge in therapeutic care of SSc-ILD patients [100]. In recent years, several potential biomarkers and therapeutic targets have been proposed. Among them, some alveolar epithelial cell damage markers such as SP-D (surfactant protein D) and KL-6 (Krebs von den Lungen-6) have been described and are directly correlated with lung disease severity [101]. In this context, some HSPs have also been defined as circulating biomarkers. Luzina et al. showed in a mouse model of bleomycin-induced SSc-ILD that extracellular HSP70 (eHSP70) levels were enhanced in association with IL33, a marker correlated with pulmonary fibrosis severity in sera of SSc patients [44]. These studies also unveiled an increase in eHSP70 levels in BALF from patients with SSc-ILD and reinforce the interest in this extracellular HSP as a therapeutic and diagnostic tool [44]. Recently, Ogawa et al. revealed that eHSP70 level in patients' sera correlated with pulmonary fibrosis and the modified Rodnan total skin thickness score (which scores the SSc stage in patients) [45].

Other studies have shown that eHSP90 was associated with increased inflammatory activity, worse lung functions, and severe skin involvement in patients with SSc. In this study, baseline HSP90 level in plasma was predictive of the 12-month change in DLCO (diffusing capacity for carbon monoxide) in SSc-ILD patients [46]. In addition, the expression of HSP27 also appears to be increased in the blood of SSc patients [47]. On the contrary, proteomic investigation performed in BALF from SSc patients with and without pulmonary fibrosis described a decrease in  $\alpha$ -2 heat shock protein, specifically in patients with lung fibrosis, suggesting that individual HSPs may be differently regulated depending on specific diseases [48]. Taken together, these findings suggest that eHSPs are promising easily accessible and detectable biomarkers for SSc-ILD patients' follow-up and could improve patient care. Nonetheless, little is known about the involvement of increased level of HSPs in SSc-ILD pathogenesis and further investigations are required to understand

whether they can be potential therapeutic targets in SSc-associated lung fibrosis (Figure 2, Table 2).

### 3.2.2. Rheumatoid Arthritis-Associated Interstitial Lung Disease (RA-ILD)

Rheumatoid arthritis (RA) is one of the main connective tissue diseases associated to ILD. Progressive lung fibrosis is a major complication of RA, which occurs in 30% of patients affected with this inflammatory joint pathology [102]. RA-ILD can further be divided according to its severity and prognosis into nonspecific interstitial pneumonia (NSIP) or usual interstitial pneumonia (UIP) which presents 1.6-fold higher risk of death. Moreover, RA is a gateway to opportunistic infections and drug toxicity which increases significantly disease-associated morbidity and mortality [103]. This pathology is characterized by a global inflammatory response in patients that progressively affects many tissues including the lungs. This disease is distinguished by the presence of autoantibodies not only in blood but also in the lungs. They are representative of a systemic inflammation characterized by the presence of inflammatory cytokines and chemokines. Increased level of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12, ROS, and other chemokines are observed with an enhanced recruitment of inflammatory macrophages and neutrophils that are also described in the pathogenesis of lung fibrosis [104]. Beyond glucocorticoids, disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) like methotrexate, TNF- $\alpha$  inhibitors, and other emerging biotherapy are indicated and often efficient to treat the rheumatologic disease. Antifibrotics (nintedanib or pirfenidone) have been recently recommended in progressive lung fibrosis associated with RA [105]. However, level of evidence of their use is low [106]. Thanks to high-resolution computed tomography (HRCT) different researchers have been able to correlate ILD progression and mortality in RA-affected patients [105]. Unfortunately, HRCT is not an early diagnosis tool and can only be used when pulmonary symptoms are seen in patients with RA. Thus, tools that allow an early detection of patients at risk to develop ILD are needed and under investigation. Recently, several biomarkers have been proposed to evaluate ILD in RA patients. Among these markers, the gain-of-function MUC5B promoter variant involved in mucin production [107], KL-6, and other glycoproteins produced by pneumocytes are described as potential ILD biomarkers [108]. In this context of discovering predictive markers in RA-ILD, the search of autoantigens containing the amino acid citrulline in inflamed fluid seems to be a promising axis [109]. Previous work have identified the presence of anti-citrullinated HSP90 antibodies in patients' sera and determined that they can help to distinguish RA-ILD from RA or IPF [49]. Furthermore, Harlow et al. have also identified the presence of citrullinated HSP90 $\beta$  that induced an autoreactive T-cell response in BALF from RA patients [110]. It has also been described that incubation of blood from RA-ILD patients with citrullinated HSP90 $\beta$ , induces IFN- $\gamma$  (Th1 like cytokine) expression compared to blood from RA patients without ILD [111]. These studies suggested that citrullinated HSP90 $\beta$  could promote inflammation and may contribute to fibrosis in a RA-ILD context. This assumption needs to be further investigated and could promote citrullinated HSP90 $\beta$  as not only a predictive biomarker but also an interesting therapeutic target to treat RA-ILD. In classical RA, many other eHSPs have been also studied for their therapeutic potential [50]. For example, the dual (immunosuppressive or pro-inflammatory) role of eHSP70 has been notably observed in human peripheral blood mononuclear cells. Tukaj et al. demonstrated that HSP70 mediated IL-6 secretion and, consequently, an increase of Th17 and Th17/Treg ratio and a decrease in Th1 and Th1/Th2 ratio [112]. As these effects are associated with the promotion of fibrosis in lung tissue, studying eHSP70 implication in RA-ILD could provide new therapeutic strategies. Furthermore, in this constant quest for predictive biomarkers, a deeper investigation of the relevance of anti-HSP autoantibodies in RA-ILD may be interesting in order to anticipate and mitigate their pulmonary manifestations (Figure 2, Table 2).



### 3.3. Sarcoidosis-Associated Interstitial Lung Disease (SA-ILD)

Lung are involved in 90 to 95% of cases of sarcoidosis, a pathology of unknown etiology, and patients present respiratory and systemic symptoms, including cough, chest pain, fatigue, musculoskeletal symptoms, fevers, and weight loss. Sarcoidosis-associated interstitial lung disease mortality is increasing over the years [113]. Even though little is known about the pathogenesis of this disease, some research showed that an unknown antigen presented by antigen-presenting cells (APCs) (such as macrophages, dendritic cells or AEC II) to naive T-cells could be responsible for its initiation. The polarization of the T lymphocytes into a Th1 phenotype might induce the recruitment of inflammatory macrophages and lymphocytes that proliferate and differentiate into a sarcoid granuloma able to initiate fibrosis. This peripheral fibrosis causes a massive deposition of collagen which obliterates the parenchymal tissue and constitutes the final stage of sarcoidosis [114]. Systemic corticosteroids are often the first line of treatment for SA but some other therapies such as methotrexate or TNF-alpha inhibitors can also be recommended [115]. Therapies used to treat SA generate multiple side effects, which is why discovery of new therapeutic agents are needed. In this context, it has been reported that some IgG against HSP70 but not HSP90 were increased in the sera of patients with pulmonary sarcoidosis [51]. Due to the similarities between sarcoidosis and tuberculosis, some studies suggested that *Mycobacterium tuberculosis* could be a promoting factor of SA-ILD [116]. Some bacterial HSP such as *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) HSP65, HSP70, and HSP16 were investigated in the context of SA. Mycobacteria antigens are recognized by the host immune system as PAMPs/DAMPs (pathogen-associated molecular patterns/damage-associated molecular patterns) and presented by antigen-presenting cells (APC). As a consequence, HSP<sub>Mtb</sub> are expressed on the surface of APC to be presented to T-cells and may promote an autoimmune response involved in SA. Dubaniewicz et al. demonstrated that HSP<sub>Mtb</sub> were present in lymph nodes from SA-ILD patients and participated at several stages of the disease's development. HSP16<sub>Mtb</sub> was expressed at early stage whereas HSP70<sub>Mtb</sub> was expressed later and HSP65<sub>Mtb</sub> was continually expressed in capillary vessels in the lymph nodes [117]. Highly expressed HSP16<sub>Mtb</sub> would be the main actor to initiate the autoimmune response in SA. Moreover, it appears that HSP16<sub>Mtb</sub> maintained *M. tuberculosis* in a genetic dormant stage in patients and is believed to further promote the development of SA [52]. Further, HSP16<sub>Mtb</sub> inhibited nitric oxide synthase's expression, antimicrobial activity, and induced monocyte apoptosis resistance, a feature of sarcoidosis, suggesting that HSP16<sub>Mtb</sub> may have a prominent role in sarcoidosis pathogenesis. Treatment of peripheral blood mononuclear cells from SA patients with Mtb-HSPs induced a strong upregulation of pro-inflammatory cytokines suggesting that these antigens could elicit the host's immune response [54]. Mtb-HSPs signaled through specific receptors, mainly TLR2 and TLR4, and induced an inflammatory cascade that damaged tissues and contributed to the release of more pro-inflammatory mediators resulting in chronic inflammation and autoimmunity. Nevertheless, the inflammatory response induced by Mtb-HSPs is dependent on the genetic predisposition of the host [116].

In another study on patients diagnosed with sarcoidosis, it was shown that high levels of HSP65 and HSP70 were found in alveolar macrophages retrieved in BALF [53].

Besides, it is worthwhile to note that several inflammatory bowel diseases, also associated with granuloma, generate pulmonary complications [118]. For example, Crohn's disease was described to mimic sarcoidosis with some patients presenting lymphocytic alveolitis in BALF with an elevated CD4/CD8 ratio, a highly specific marker of sarcoidosis [119]. As eHSP such as HSP90 $\alpha$  or HSP60 are already described to be involved in inflammatory bowel diseases [120], it should be interesting to further explore their role as new biomarkers and therapeutic targets in the development of fibrosing lung complications in these types of diseases (Figure 2, Table 2).

### 3.4. Fibrosing Environmental Interstitial Lung Disease

#### 3.4.1. Pneumoconiosis (PNC)

Pneumoconiosis are a group of disease caused by the inhalation of inorganic dust mainly observed in a professional environment. These ILDs are often associated with progressive fibrotic damage to the lung. Silicosis and asbestosis are the most common forms of pneumoconiosis [121]. Alveolar macrophages present inside the lung will respond to the inhalation of particles by inducing phagocytosis and initiating the inflammatory process, ultimately leading to collagen production and development of a fibrotic pneumoconiosis [122]. Currently, there is no effective treatment for this pathology. In this context, finding early disease markers may help to limit the evolution of pneumoconiosis into lung fibrosis. Yang et al. showed in coke oven workers that HSP70 level in plasma was increased proportionally to the dose of burned coal they were exposed to [57]. Surprisingly, in lymphocytes from coke workers, HSP70 expression was negatively proportional to patients' exposure to particles. This may suggest that a high level of particles reduces HSP70 which may have a beneficial role on the disease progression, as previously shown in other fibrotic diseases. In peripheral blood lymphocytes from coke oven workers, several studies described the existence of three polymorphic forms of the HSP70 gene: HSP70-1 G190C, HSP70-2 G1267A, and HSP70-hom T2437C. People with homozygous HSP70-1 C/C genotype were the most susceptible to develop DNA damage inside their peripheral blood lymphocytes. Expression of HSP70 and evaluation of HSP70 polymorphism in circulating lymphocyte collected from the blood may represent a novel type of "liquid biopsy" instead of direct measurement of circulating HSPs. Thus, further investigation is needed to determine if HSP70 in plasma and/or in circulating lymphocytes can be used as a biomarker to protect employees from occupational pneumoconiosis and its complications [58]. Similarly, Zhang et al. determined that HSP90 was increased in blood lymphocytes from coke oven workers and this was dependent on the exposition to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs [59]). These data suggest that HSP90 may also be involved in pneumoconiosis and may serve as a biomarker, as HSP70, in circulating lymphocytes. Interestingly, this study also highlighted that HSP60 and HSP27 expression in circulating lymphocytes were similar in coke oven workers and controls suggesting a specific interest of HSP70 and HSP90 in this disease [59]. Some others studies showed that the TGF- $\beta$ 1-dependent SMAD pathway and EMT could be promoted by exposition to silica. As EMT is one of the major processes in pneumoconiosis/fibrosis and HSPs are important regulators of EMT, one can hypothesize that modulating HSPs might limit fibrosis progression in pneumoconiosis [123]. Unfortunately, to date, no studies further investigated the role of eHSPs in silica-induced EMT. Lastly, several works have identified a relationship between coal workers' pneumoconiosis and *Mycobacterium mageritense*, a nontuberculous mycobacteria [124]. Knowing that HSPs from *Mycobacterium* have been incriminated in ILD associated with sarcoidosis, there is a potential interest, not yet investigated, to evaluate their expression and potential use as a biomarker in pneumoconiosis (Figure 2, Table 2).

#### 3.4.2. Hypersensitivity Pneumonitis (HP)

Hypersensitivity pneumonitis is an immune-mediated inflammatory lung disease caused by the inhalation of a large variety of antigens from animals, bacteria, fungi, plants, metals, and chemicals found in the environment [125]. These antigens are responsible for several specific well-described entities with, for instance, Farmer's Lung Disease Bird Fancier's Lung or metalworking-fluid hypersensitivity pneumonitis or hot tub lung. HP are classified into nonfibrotic and fibrotic phenotypes [125]. Early detection of the factors responsible for these diseases would allow to prevent their progression from acute forms to chronic fibrotic forms with poor prognosis [126]. Patients with HP present an increase in IL-17 potentially caused by a defective regulatory T-cell function that leads to an exacerbated immune response. In fibrotic HP patients, an important increase in T-helper 17 lymphocytes (CD4+) has been observed. This increase in pro-inflammatory Th17 cells, known for their implication in autoimmune disease or fibrotic mechanisms, could give additional

explanation on the development of fibrosis during HP [127]. Concerning HP's treatment or prevention, the most obvious recommendation is to limit exposure to previously described pathogens in a professional environment, but corticoids can be recommended to circumvent inflammation in patients with mild HP. In severe cases of HP, a lung transplantation can also be considered [128]. In order to improve the management and prevent serious forms of the pathology, several studies are investigating serological or BALF markers in context of HP. For example, KL-6, previously described in connective disease, was found to be increased during the acute exacerbation of HP and correlated with SP-D expression by different epithelial lung cells in this disease [129]. In this context, HSPs have been found to act as promising circulating markers. Racine et al. showed that alveolar macrophages (AMs) from challenged mice with antigens from *Saccharopolyspora rectivirgula* (SR) exhibited increased basal level of HSP70 compared to control mice. However, a second stimulation with SR-antigen on these AMs, did not further enhance HSP70 levels in sensitized mice compared to control mice, which showed much higher HSP70 levels [60]. The absence of HSP70 response to an additional stress in HP mice could be explained by the altered immunoregulatory activity observed during HP. Furthermore, AMs isolated in BALF from HP patients expressed higher levels of HSP70 than healthy patients. Altogether, these findings suggest that targeting HSP70 in circulating macrophages could modulate the dysregulated immune response. Interestingly, it has been reported that expression of  $\alpha$ -2 heat shock glycoprotein is decreased in BALF from patient with fibrotic HP compared to HP patients with usual interstitial pneumonia phenotype [61]. Therefore,  $\alpha$ -2 heat shock glycoprotein and HSP70 in circulating immune cells may be potential therapeutic targets and biomarkers that could be used to anticipate the evolution of this pathology (Figure 2, Table 2)

#### 3.4.3. Drug-Induced ILD

Drug-induced lung disease (DILD) is another set of ILD associated with an exposure. Kakugawa et al. [62] have evaluated serum HSP47 levels in patients with DILD. This study demonstrated that serum HSP47 levels were elevated in patients with DILD who had the worst outcomes among the different subgroups of DILD. Serum HSP47 levels also significantly correlated with various respiratory parameters. Interestingly, they show that serum levels of HSP47 in the group of patients requiring glucocorticoids were significantly higher than those in patients who experienced clinical improvement without glucocorticoid administration (Figure 2, Table 2).

#### 4. Conclusions

This review highlights the role of extracellular HSPs and their potential use as diagnostic and therapeutic tools in fibrosing interstitial lung disease (Figure 2 and Table 2). HSPs are ubiquitous proteins whose expression is enhanced under various stresses and diseases. HSPs have been demonstrated to be involved in numerous pathologies including fibrosing ILDs. Despite the growing body of evidence demonstrating that HSPs are largely involved in fibrosing ILDs, the diagnostic or therapeutic strategies involving HSPs' measurement or inhibition/upregulation are far from being investigated. In addition, this review uncovers autoantibodies against eHSPs as potential biomarkers as they are found in many patients with ILDs. Nevertheless, little is known about their functions and whether their upregulation in fibrogenesis is a driving factor or if an indirect marker of the evolution of disease remains unclear. Antibodies against HSPs are found in normal conditions as well as in pathological contexts and they are described to modulate positively or negatively the immune response. Further investigations are required to understand whether they are a cause or a consequence of the disease and if they could be used as a diagnostic or therapeutic tool in fibrosing ILDs (Figure 2 and Table 2). It is clear that HSPs seem involved in all ILDs and results presented here clearly point out their role in pathogenesis as well as their presence in several biological fluids. Nevertheless, the major limitation in the use of eHSPs as biomarkers may be the lack of specificity of eHSPs since there are a wide range of

conditions in which they are overexpressed. However, a growing number of studies supports their usefulness, and options for improvement exist by combining several markers. In addition, even though the use of eHSPs as biomarker of diagnosis in the context of ILDs seems unlikely, their use as biomarker of disease progression and/or therapy efficacy in fibrosing ILDs may be useful to improve patients' outcome and management.

Moreover, strategies in vivo to modulate eHSPs' expression were somehow effective to prevent, limit or stop the progression of certain types of ILDs such as IPF. Finally, the current review highlights the lack of investigations on the role of extracellular vesicles and especially HSPs in EVs in the field of fibrosing lung diseases. Today, extracellular HSPs and, in particular, HSPs in exosomes are widely studied for their theranostic potential in cancer. It is important for the respiratory research and clinical field to take advantage of this knowledge about HSPs in exosomes that are the reflection of eHSPs from cells and try to discover new therapeutic targets and diagnostic strategies to overcome the burden of lung diseases that continues to increase over the years.

**Author Contributions:** Writing—Original Draft Preparation, J.T. and L.P. Writing—Review and Editing, F.G., P.-S.B., M.K., C.G. and P.B.; Supervision: F.G. and P.-S.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** P.B. acknowledges funding from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE14-0004-01 SHOT-IPF). Support was also provided by the French Government through the French National Research Agency (ANR) under the program "Investissements d'Avenir" (ANR-10-EQPX-05-01/IMAPPI Equipex). Julie Tanguy is funded by "La Fondation du Souffle et le Fonds de Recherche en Santé Respiratoire". P.B. acknowledges funding from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-20-CE17-0005).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Olson, A.; Hartmann, N.; Patnaik, P.; Wallace, L.; Schlenker-Herceg, R.; Nasser, M.; Richeldi, L.; Hoffmann-Vold, A.-M.; Cottin, V. Estimation of the Prevalence of Progressive Fibrosing Interstitial Lung Diseases: Systematic Literature Review and Data from a Physician Survey. *Adv. Ther.* **2021**, *38*, 854–867. [\[CrossRef\]](#)
- Travis, W.D.; Costabel, U.; Hansell, D.M.; King, T.E.; Lynch, D.A.; Nicholson, A.G.; Ryerson, C.J.; Ryu, J.H.; Selman, M.; Wells, A.U.; et al. An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Update of the International Multidisciplinary Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2013**, *188*, 733–748. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Wijsenbeek, M.; Cottin, V. Spectrum of Fibrotic Lung Diseases. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 958–968. [\[CrossRef\]](#)
- Wijsenbeek, M.; Kreuter, M.; Olson, A.; Fischer, A.; Bendstrup, E.; Wells, C.D.; Denton, C.P.; Mounir, B.; Zouad-Lejour, L.; Quaresma, M.; et al. Progressive Fibrosing Interstitial Lung Diseases: Current Practice in Diagnosis and Management. *Curr. Med. Res. Opin.* **2019**, *35*, 2015–2024. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Llanos, O.; Hamzeh, N. Sarcoidosis. *Med. Clin. N. Am.* **2019**, *103*, 527–534. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kisseleva, T.; Brenner, D.A. Mechanisms of Fibrogenesis. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **2008**, *233*, 109–122. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bergeron, A.; Soler, P.; Kambouchner, M.; Loiseau, P.; Milleron, B.; Valeyre, D.; Hance, A.J.; Tazi, A. Cytokine Profiles in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Suggest an Important Role for TGF- $\beta$  and IL-10. *Eur. Respir. J.* **2003**, *22*, 69–76. [\[CrossRef\]](#)
- Sun, L.; Louie, M.C.; Vannella, K.M.; Wilke, C.A.; LeVine, A.M.; Moore, B.B.; Shanley, T.P. New Concepts of IL-10-Induced Lung Fibrosis: Fibrocyte Recruitment and M<sub>2</sub> Activation in a CCL2/CCR2 Axis. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* **2011**, *300*, L341–L353. [\[CrossRef\]](#)
- Sime, P.J.; Xing, Z.; Graham, F.L.; Csaky, K.G.; Gauldie, J. Adenovector-Mediated Gene Transfer of Active Transforming Growth Factor-Beta1 Induces Prolonged Severe Fibrosis in Rat Lung. *J. Clin. Investig.* **1997**, *100*, 768–776. [\[CrossRef\]](#)
- Kim, K.K.; Kugler, M.C.; Wolters, P.J.; Robillard, L.; Galvez, M.G.; Brumwell, A.N.; Sheppard, D.; Chapman, H.A. Alveolar Epithelial Cell Mesenchymal Transition Develops in Vivo during Pulmonary Fibrosis and Is Regulated by the Extracellular Matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 13180–13185. [\[CrossRef\]](#)
- Coker, R.K.; Laurent, G.J.; Jeffery, P.K.; du Bois, R.M.; Black, C.M.; McAnulty, R.J. Localisation of Transforming Growth Factor Beta1 and Beta3 mRNA Transcripts in Normal and Fibrotic Human Lung. *Thorax* **2001**, *56*, 549–556. [\[CrossRef\]](#)

12. Lanneau, D.; Wettstein, G.; Bonniaud, P.; Garrido, C. Heat Shock Proteins: Cell Protection through Protein Triage. *Sci. World J.* **2010**, *10*, 1543–1552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Jegou, G.; Hazoumé, A.; Seigneuric, R.; Garrido, C. Targeting Heat Shock Proteins in Cancer. *Cancer Lett.* **2013**, *332*, 275–285. [[CrossRef](#)]
14. Schmitt, E.; Maingret, L.; Puig, P.E.; Rerole, A.L.; Ghiringhelli, F.; Hammann, A.; Solary, E.; Kroemer, G.; Garrido, C. Heat Shock Protein 70 Neutralization Exerts Potent Antitumor Effects in Animal Models of Colon Cancer and Melanoma. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 4191–4197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. De Almeida, S.; Regimbeau, M.; Jegou, G.; Garrido, C.; Girodon, F.; Hemetet, F. Heat Shock Proteins and PD-1/PD-L1 as Potential Therapeutic Targets in Myeloproliferative Neoplasms. *Cancers* **2020**, *12*, 2592. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Bellaye, P.-S.; Burgy, O.; Causse, S.; Garrido, C.; Bonniaud, P. Heat Shock Proteins in Fibrosis and Wound Healing: Good or Evil? *Pharmacol. Ther.* **2014**, *143*, 119–132. [[CrossRef](#)]
17. Iwashita, T.; Kadota, J.; Naito, S.; Kaida, H.; Ishimatsu, Y.; Miyazaki, M.; Ozono, Y.; Kohno, S. Involvement of Collagen-Binding Heat Shock Protein 47 and Procollagen Type I Synthesis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Contribution of Type II Pneumocytes to Fibrosis. *Hum. Pathol.* **2000**, *31*, 1498–1505. [[CrossRef](#)]
18. Mishima, Y.; Miyazaki, M.; Abe, K.; Ozono, Y.; Shiohita, K.; Xia, Z.; Harada, T.; Taguchi, T.; Koji, T.; Kohno, S. Enhanced Expression of Heat Shock Protein 47 in Rat Model of Peritoneal Fibrosis. *Perit. Dial. Int. J. Int. Soc. Perit. Dial.* **2003**, *23*, 14–22. [[CrossRef](#)]
19. Razzaque, M.S.; Nazneen, A.; Taguchi, T. Immunolocalization of Collagen and Collagen-Binding Heat Shock Protein 47 in Fibrotic Lung Diseases. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc.* **1998**, *11*, 1183–1188.
20. Hagiwara, S.; Iwasaka, H.; Matsumoto, S.; Noguchi, T. An Antisense Oligonucleotide to HSP47 Inhibits Paraquat-Induced Pulmonary Fibrosis in Rats. *Toxicology* **2007**, *236*, 199–207. [[CrossRef](#)]
21. Hagiwara, S.; Iwasaka, H.; Matsumoto, S.; Noguchi, T. Antisense Oligonucleotide Inhibition of Heat Shock Protein (HSP) 47 Improves Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Rats. *Respir. Res.* **2007**, *8*, 37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Hagiwara, S.; Iwasaka, H.; Matsumoto, S.; Noguchi, T. Introduction of Antisense Oligonucleotides to Heat Shock Protein 47 Prevents Pulmonary Fibrosis in Lipopolysaccharide-Induced Pneumopathy of the Rat. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *564*, 174–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Sontake, V.; Wang, Y.; Kasam, R.K.; Sinner, D.; Reddy, G.B.; Naren, A.P.; McCormack, F.X.; White, E.S.; Jegga, A.G.; Madala, S.K. Hsp90 Regulation of Fibroblast Activation in Pulmonary Fibrosis. *JCI Insight* **2017**, *2*. [[CrossRef](#)]
24. Bonniaud, P.; Burgy, O.; Garrido, C. Heat Shock Protein-90 toward Theranostics: A Breath of Fresh Air in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Eur. Respir. J.* **2018**, *51*, 1702612. [[CrossRef](#)]
25. Sellares, J.; Veraldi, K.L.; Thiel, K.J.; Cárdenes, N.; Alvarez, D.; Schneider, F.; Pilewski, J.M.; Rojas, M.; Feghali-Bostwick, C.A. Intracellular Heat Shock Protein 70 Deficiency in Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2019**, *60*, 629–636. [[CrossRef](#)]
26. Fujibayashi, T.; Hashimoto, N.; Jijiwa, M.; Hasegawa, Y.; Kojima, T.; Ishiguro, N. Protective Effect of Geranylgeranylacetone, an Inducer of Heat Shock Protein 70, against Drug-Induced Lung Injury/Fibrosis in an Animal Model. *BMC Pulm Med.* **2009**, *9*, 45. [[CrossRef](#)]
27. Wettstein, G.; Bellaye, P.-S.; Kolb, M.; Hammann, A.; Crestani, B.; Soler, P.; Marchal-Somme, J.; Hazoume, A.; Gauldie, J.; Gunther, A.; et al. Inhibition of HSP27 Blocks Fibrosis Development and EMT Features by Promoting Snail Degradation. *FASEB J.* **2013**, *27*, 1549–1560. [[CrossRef](#)]
28. Bellaye, P.-S.; Wettstein, G.; Burgy, O.; Besnard, V.; Joannes, A.; Colas, J.; Causse, S.; Marchal-Somme, J.; Fabre, A.; Crestani, B.; et al. The Small Heat-Shock Protein AB-Crystallin Is Essential for the Nuclear Localization of Smad4: Impact on Pulmonary Fibrosis. *J. Pathol.* **2014**, *232*, 458–472. [[CrossRef](#)]
29. Boutanquoi, P.-M.; Burgy, O.; Beltramo, G.; Bellaye, P.-S.; Dondaine, L.; Marcion, G.; Pommerolle, L.; Vadel, A.; Spanjaard, M.; Demidov, O.; et al. TRIM33 Prevents Pulmonary Fibrosis by Impairing TGF- $\beta$ 1 Signalling. *Eur. Respir. J.* **2020**, *55*, 1901346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Albakova, Z.; Siam, M.K.S.; Sacitharan, P.K.; Ziganshin, R.H.; Ryazantsev, D.Y.; Sapozhnikov, A.M. Extracellular Heat Shock Proteins and Cancer: New Perspectives. *Transl. Oncol.* **2021**, *14*, 100995. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Hance, M.; Nolan, K.; Isaacs, J. The Double-Edged Sword: Conserved Functions of Extracellular Hsp90 in Wound Healing and Cancer. *Cancers* **2014**, *6*, 1065–1097. [[CrossRef](#)]
32. Gunther, S.; Ostheimer, C.; Stangl, S.; Specht, H.M.; Mozes, P.; Jesinghaus, M.; Vordermark, D.; Combs, S.E.; Peltz, F.; Jung, M.P.; et al. Correlation of Hsp70 Serum Levels with Gross Tumor Volume and Composition of Lymphocyte Subpopulations in Patients with Squamous Cell and Adeno Non-Small Cell Lung Cancer. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 556. [[CrossRef](#)]
33. Banerjee, S.; Lin, C.F.; Skinner, K.A.; Schiffhauer, L.M.; Peacock, J.; Hicks, D.G.; Redmond, E.M.; Morrow, D.; Huston, A.; Shayne, M.; et al. Heat Shock Protein 27 Differentiates Tolerogenic Macrophages That May Support Human Breast Cancer Progression. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 318–327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Stope, M.B.; Klinkmann, G.; Diesing, K.; Koensgen, D.; Burchardt, M.; Mustea, A. Heat Shock Protein HSP27 Secretion by Ovarian Cancer Cells Is Linked to Intracellular Expression Levels, Occurs Independently of the Endoplasmic Reticulum Pathway and HSP27's Phosphorylation Status, and Is Mediated by Exosome Liberation. *Dis. Markers* **2017**, *2017*, 1575374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Thuringer, D.; Berthenet, K.; Cronier, L.; Solary, E.; Garrido, C. Primary Tumor- and Metastasis-Derived Colon Cancer Cells Differently Modulate Connexin Expression and Function in Human Capillary Endothelial Cells. *Oncotarget* **2015**, *6*, 28800–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Thuringer, D.; Jegou, G.; Wettstein, G.; Terrier, O.; Cronier, L.; Yousfi, N.; Hébrard, S.; Bouchot, A.; Hazoume, A.; Joly, A.; et al. Extracellular HSP27 Mediates Angiogenesis through Toll-like Receptor 3. *FASEB J.* **2013**, *27*, 4169–4183. [[CrossRef](#)]
37. Chanteloup, G.; Cordonnier, M.; Isambert, N.; Bertaut, A.; Hervieu, A.; Hennequin, A.; Luu, M.; Zanetta, S.; Coudert, B.; Bengrine, L.; et al. Monitoring HSP70 Exosomes in Cancer Patients' Follow up: A Clinical Prospective Pilot Study. *J. Extracell. Vesicles* **2020**, *9*, 1766192. [[CrossRef](#)]
38. Wallace, W.A.; Roberts, S.N.; Caldwell, H.; Thornton, E.; Greening, A.P.; Lamb, D.; Howie, S.E. Circulating Antibodies to Lung Protein(s) in Patients with Cryptogenic Fibrosing Alveolitis. *Thorax* **1994**, *49*, 218–224. [[CrossRef](#)]
39. Kahloon, R.A.; Xue, J.; Bhargava, A.; Cszimadia, E.; Otterbein, L.; Kass, D.J.; Bon, J.; Soejima, M.; Levesque, M.C.; Lindell, K.O.; et al. Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis with Antibodies to Heat Shock Protein 70 Have Poor Prognoses. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2013**, *187*, 768–775. [[CrossRef](#)]
40. Mills, R.; Mathur, A.; Nicol, L.M.; Walker, J.J.; Przybylski, A.A.; Mackinnon, A.C.; Howie, S.E.M.; Wallace, W.A.H.; Dransfield, I.; Hirani, N. Intrapulmonary Autoantibodies to HSP72 Are Associated with Improved Outcomes in IPF. *J. Immunol. Res.* **2019**, *2019*, 1–11. [[CrossRef](#)]
41. Yokota, S.; Kubota, H.; Matsuoka, Y.; Naitoh, M.; Hirata, D.; Minota, S.; Takahashi, H.; Fujii, N.; Nagata, K. Prevalence of HSP47 Antigen and Autoantibodies to HSP47 in the Sera of Patients with Mixed Connective Tissue Disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *303*, 413–418. [[CrossRef](#)]
42. Kakugawa, T.; Yokota, S.; Mukae, H.; Kubota, H.; Sakamoto, N.; Mizunoe, S.; Matsuoka, Y.; Kadota, J.; Fujii, N.; Nagata, K.; et al. High Serum Concentrations of Autoantibodies to HSP47 in Nonspecific Interstitial Pneumonia Compared with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *BMC Pulm. Med.* **2008**, *8*, 23. [[CrossRef](#)]
43. Kakugawa, T.; Yokota, S.; Ishimatsu, Y.; Hayashi, T.; Nakashima, S.; Hara, S.; Sakamoto, N.; Kubota, H.; Mine, M.; Matsuoka, Y.; et al. Serum Heat Shock Protein 47 Levels Are Elevated in Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Cell Stress Chaperones* **2013**, *18*, 581–590. [[CrossRef](#)]
44. Luzina, I.G.; Kopach, P.; Lockett, V.; Kang, P.H.; Nagarsekar, A.; Burke, A.P.; Hasday, J.D.; Todd, N.W.; Atamas, S.P. Interleukin-33 Potentiates Bleomycin-Induced Lung Injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2013**, *49*, 999–1008. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Ogawa, F.; Shimizu, K.; Hara, T.; Muroi, E.; Hasegawa, M.; Takehara, K.; Sato, S. Serum Levels of Heat Shock Protein 70, a Biomarker of Cellular Stress, Are Elevated in Patients with Systemic Sclerosis: Association with Fibrosis and Vascular Damage. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2008**, *26*, 659–662. [[PubMed](#)]
46. Štorkánová, H.; Oreská, S.; Špiritović, M.; Heřmánková, B.; Bubová, K.; Komarc, M.; Pavelka, K.; Vencovský, J.; Distler, J.H.W.; Šenolt, L.; et al. Plasma Hsp90 Levels in Patients with Systemic Sclerosis and Relation to Lung and Skin Involvement: A Cross-Sectional and Longitudinal Study. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Matsuda, K.M.; Yoshizaki, A.; Kotani, H.; Norimatsu, Y.; Kuzumi, A.; Fukayama, M.; Fukasawa, T.; Ebata, S.; Yoshizaki-Ogawa, A.; Asano, Y.; et al. Serum Heat Shock Protein 27 Levels in Patients with Systemic Sclerosis: A Possible Biomarker of Skin Sclerosis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2021**, *35*, e157–e159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Shirahama, R.; Miyazaki, Y.; Okamoto, T.; Inase, N.; Yoshizawa, Y. Proteome Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid in Lung Fibrosis Associated with Systemic Sclerosis. *Allergol. Int.* **2010**, *59*, 409–415. [[CrossRef](#)]
49. Harlow, L.; Rosas, I.O.; Gochuico, B.R.; Mikuls, T.R.; Dellaripa, P.F.; Oddis, C.V.; Ascherman, D.P. Identification of Citrullinated Hsp90 Isoforms as Novel Autoantigens in Rheumatoid Arthritis-Associated Interstitial Lung Disease: Citrullinated Hsp90 in RA-ILD. *Arthritis Rheum.* **2013**, *65*, 869–879. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Mantej, J.; Polasik, K.; Piotrowska, E.; Tukaj, S. Autoantibodies to Heat Shock Proteins 60, 70, and 90 in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Cell Stress Chaperones* **2019**, *24*, 283–287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Hrycaj, P.; Wurm, K.; Mennet, P.; Müller, W. Antibodies to Heat Shock Proteins in Patients with Pulmonary Sarcoidosis. *Sarcoidosis* **1995**, *12*, 124–130. [[PubMed](#)]
52. Dubaniewicz, A.; Holownia, A.; Kalinowski, L.; Wybieralska, M.; Dobrucki, I.T.; Singh, M. Is Mycobacterial Heat Shock Protein 16kDa, a Marker of the Dormant Stage of Mycobacterium Tuberculosis, a Sarcoid Antigen? *Hum. Immunol.* **2013**, *74*, 45–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Staton, J.M.; Dench, J.E.; Fitzpatrick, D.R.; Himbeck, R.P.; Allen, R.; Bruce, J.; Robinson, B.W.S.; Bielefeldt-Ohmann, H. Expression and Immune Recognition of Stress Proteins in Sarcoidosis and Other Chronic Interstitial Lung Diseases. *Immunol. Cell Biol.* **1995**, *73*, 23–32. [[CrossRef](#)]
54. Dubaniewicz, A.; Trzonkowski, P.; Dubaniewicz-Wybieralska, M.; Dubaniewicz, A.; Singh, M.; Myśliwski, A. Mycobacterial Heat Shock Protein-Induced Blood T Lymphocytes Subsets and Cytokine Pattern: Comparison of Sarcoidosis with Tuberculosis and Healthy Controls. *Respirology* **2007**, *12*, 346–354. [[CrossRef](#)]
55. Amenomori, M.; Mukae, H.; Sakamoto, N.; Kakugawa, T.; Hayashi, T.; Hara, A.; Hara, S.; Fujita, H.; Ishimoto, H.; Ishimatsu, Y.; et al. HSP47 in Lung Fibroblasts Is a Predictor of Survival in Fibrotic Nonspecific Interstitial Pneumonia. *Respir. Med.* **2010**, *104*, 895–901. [[CrossRef](#)]

56. Kakugawa, T.; Mukae, H.; Hayashi, T.; Ishii, H.; Nakayama, S.; Sakamoto, N.; Yoshioka, S.; Sugiyama, K.; Mine, M.; Mizuta, Y.; et al. Expression of HSP47 in Usual Interstitial Pneumonia and Nonspecific Interstitial Pneumonia. *Respir. Res.* **2005**, *6*, 57. [CrossRef]
57. Yang, X.; Zheng, J.; Bai, Y.; Tian, F.; Yuan, J.; Sun, J.; Liang, H.; Guo, L.; Tan, H.; Chen, W.; et al. Using Lymphocyte and Plasma Hsp70 as Biomarkers for Assessing Coke Oven Exposure among Steel Workers. *Environ. Health Perspect.* **2007**, *115*, 1573–1577. [CrossRef] [PubMed]
58. Yang, X.; Yuan, J.; Sun, J.; Wang, H.; Liang, H.; Bai, Y.; Guo, L.; Tan, H.; Yang, M.; Wang, J.; et al. Association between Heat-Shock Protein 70 Gene Polymorphisms and DNA Damage in Peripheral Blood Lymphocytes among Coke-Oven Workers. *Mutat. Res.* **2008**, *649*, 221–229. [CrossRef]
59. Zhang, J.H.; Zhang, J.; Sun, J.Y.; Tian, L.; Niu, Q. Relationship between the Expression of Heat Shock Protein and Genetic Damage in Peripheral Blood of Workers Exposed to Coke Oven Emissions. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* **2008**, *26*, 16–19.
60. Racine, C.; Israël-Assayag, E.; Cormier, Y. Expression of Heat Shock Protein 72 by Alveolar Macrophages in Hypersensitivity Pneumonitis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **1999**, *276*, L501–L505. [CrossRef]
61. Okamoto, T. Proteome Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid in Chronic Hypersensitivity Pneumonitis. *Allergol. Int.* **2012**, *61*, 10. [CrossRef] [PubMed]
62. Kakugawa, T.; Yokota, S.; Ishimatsu, Y.; Hayashi, T.; Nakashima, S.; Hara, S.; Sakamoto, N.; Matsuoka, Y.; Kubota, H.; Mine, M.; et al. Serum Heat Shock Protein 47 Levels in Patients with Drug-Induced Lung Disease. *Respir. Res.* **2013**, *14*, 1–10. [CrossRef] [PubMed]
63. Bagnato, G.; Harari, S. Cellular Interactions in the Pathogenesis of Interstitial Lung Diseases. *Eur. Respir. Rev.* **2015**, *24*, 102–114. [CrossRef]
64. Desai, O.; Winkler, J.; Minasyan, M.; Herzog, E.L. The Role of Immune and Inflammatory Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Front. Med.* **2018**, *5*, 43. [CrossRef] [PubMed]
65. Jiang, D.; Liang, J.; Fan, J.; Yu, S.; Chen, S.; Luo, Y.; Prestwich, G.D.; Mascarenhas, M.M.; Garg, H.G.; Quinn, D.A.; et al. Regulation of Lung Injury and Repair by Toll-like Receptors and Hyaluronan. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 1173–1179. [CrossRef]
66. Kral, J.B.; Kuttke, M.; Schrottmair, W.C.; Birmecker, B.; Warszawska, J.; Wernig, C.; Paar, H.; Salzmann, M.; Sahin, E.; Brunner, J.S.; et al. Sustained PI3K Activation Exacerbates BLM-Induced Lung Fibrosis via Activation of pro-Inflammatory and pro-Fibrotic Pathways. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 23034. [CrossRef]
67. Siwik, D.A.; Chang, D.L.-F.; Colucci, W.S. Interleukin-1 $\beta$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Decrease Collagen Synthesis and Increase Matrix Metalloproteinase Activity in Cardiac Fibroblasts In Vitro. *Circ. Res.* **2000**, *86*, 1259–1265. [CrossRef]
68. Raghu, G.; Brown, K.K.; Costabel, U.; Cottin, V.; du Bois, R.M.; Lasky, J.A.; Thomeer, M.; Utz, J.P.; Khandker, R.K.; McDermott, L.; et al. Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis with Etabercept: An Exploratory, Placebo-Controlled Trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2008**, *178*, 948–955. [CrossRef]
69. Song, L.; Weng, D.; Dai, W.; Tang, W.; Chen, S.; Li, C.; Chen, Y.; Liu, F.; Chen, J. Th17 Can Regulate Silica-Induced Lung Inflammation through an IL-1 $\beta$ -Dependent Mechanism. *J. Cell Mol. Med.* **2014**, *18*, 1773–1784. [CrossRef] [PubMed]
70. Homer, R.J.; Herzog, E.L. Recent Advances in Pulmonary Fibrosis: Implications for Scleroderma. *Curr. Opin. Rheumatol.* **2010**, *22*, 683–689. [CrossRef]
71. Chizzolini, C. T Cells, B Cells, and Polarized Immune Response in the Pathogenesis of Fibrosis and Systemic Sclerosis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **2008**, *20*, 707–712. [CrossRef]
72. O'Reilly, S.; Huggle, T.; van Laar, J.M. T Cells in Systemic Sclerosis: A Reappraisal. *Rheumatology* **2012**, *51*, 1540–1549. [CrossRef]
73. Belperio, J.A.; Dy, M.; Murray, L.; Burdick, M.D.; Xue, Y.Y.; Strieter, R.M.; Keane, M.P. The Role of the Th2 CC Chemokine Ligand CCL17 in Pulmonary Fibrosis. *J. Immunol.* **2004**, *173*, 4692–4698. [CrossRef]
74. Zininga, T.; Ramatsui, L.; Shonhai, A. Heat Shock Proteins as Immunomodulators. *Molecules* **2018**, *23*, 2846. [CrossRef]
75. Calderwood, S.K.; Gong, J.; Murshid, A. Extracellular HSPs: The Complicated Roles of Extracellular HSPs in Immunity. *Front. Immunol.* **2016**, *7*. [CrossRef]
76. Borges, T.J.; Wieten, L.; van Herwijnen, M.J.C.; Broere, F.; van der Zee, R.; Bonorino, C.; van Eden, W. The Anti-Inflammatory Mechanisms of Hsp70. *Front. Immunol.* **2012**, *3*. [CrossRef] [PubMed]
77. Kottke, T.; Sanchez-Perez, L.; Diaz, R.M.; Thompson, J.; Chong, H.; Harrington, K.; Calderwood, S.K.; Pulido, J.; Georgopoulos, N.; Selby, P.; et al. Induction of Hsp70-Mediated Th17 Autoimmunity Can Be Exploited as Immunotherapy for Metastatic Prostate Cancer. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 11970–11979. [CrossRef] [PubMed]
78. Gobbo, J.; Marcion, G.; Cordonnier, M.; Dias, A.M.M.; Pernet, N.; Hammann, A.; Richaud, S.; Mjahed, H.; Isambert, N.; Clause, V.; et al. Restoring Anticancer Immune Response by Targeting Tumor-Derived Exosomes With a HSP70 Peptide Aptamer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **2016**, *108*, djv330. [CrossRef] [PubMed]
79. Multhoff, G.; Pockley, A.G.; Streffer, C.; Gaip, U.S. Dual Role of Heat Shock Proteins (HSPs) in Anti-Tumor Immunity. *CMM* **2012**, *12*, 1174–1182. [CrossRef] [PubMed]
80. Li, W.; Sahu, D.; Tsen, F. Secreted Heat Shock Protein-90 (Hsp90) in Wound Healing and Cancer. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Mol. Cell Res.* **2012**, *1823*, 730–741. [CrossRef] [PubMed]
81. Tukaj, S.; Węgrzyn, G. Anti-Hsp90 Therapy in Autoimmune and Inflammatory Diseases: A Review of Preclinical Studies. *Cell Stress Chaperones* **2016**, *21*, 213–218. [CrossRef] [PubMed]

82. Zügel, U.; Kaufmann, S.H.E. Immune Response against Heat Shock Proteins in Infectious Diseases. *Immunobiology* **1999**, *201*, 22–35. [[CrossRef](#)]
83. Maher, T.M.; Bendstrup, E.; Dron, L.; Langley, J.; Smith, G.; Khalid, J.M.; Patel, H.; Kreuter, M. Global Incidence and Prevalence of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Respir. Res.* **2021**, *22*, 197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Raghu, G.; Remy-Jardin, M.; Myers, J.L.; Richeldi, L.; Ryerson, C.J.; Lederer, D.J.; Behr, J.; Cottin, V.; Danoff, S.K.; Morell, F.; et al. Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2018**, *198*, e44–e68. [[CrossRef](#)]
85. Harari, S.; Raghu, G.; Caminati, A.; Cruciani, M.; Franchini, M.; Mannucci, P. Fibrotic Interstitial Lung Diseases and Air Pollution: A Systematic Literature Review. *Eur. Respir. Rev.* **2020**, *29*, 200093. [[CrossRef](#)]
86. Lamb, Y.N. Nintedanib: A Review in Fibrotic Interstitial Lung Diseases. *Drugs* **2021**, *81*, 575. [[CrossRef](#)]
87. Dong, H.; Luo, L.; Zou, M.; Huang, C.; Wan, X.; Hu, Y.; Le, Y.; Zhao, H.; Li, W.; Zou, F.; et al. Blockade of Extracellular Heat Shock Protein 90 $\alpha$  by 1G6-D7 Attenuates Pulmonary Fibrosis through Inhibiting ERK Signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2017**, *313*, L1006–L1015. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Bellay, P.-S.; Shimbori, C.; Yanagihara, T.; Carlson, D.A.; Hughes, P.; Upagupta, C.; Sato, S.; Wheildon, N.; Haystead, T.; Ask, K.; et al. Synergistic Role of HSP90 $\alpha$  and HSP90 $\beta$  to Promote Myofibroblast Persistence in Lung Fibrosis. *Eur. Respir. J.* **2018**, *51*, 1700386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Juarez, M.M.; Chan, A.L.; Norris, A.G.; Morrissey, B.M.; Albertson, T.E. Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis—a Review of Current and Novel Pharmacotherapies. *J. Thorac. Dis.* **2015**, *7*, 499–519. [[CrossRef](#)]
90. Belloli, E.A.; Beckford, R.; Hadley, R.; Flaherty, K.R. Idiopathic Non-specific Interstitial Pneumonia. *Respirology* **2016**, *21*, 259–268. [[CrossRef](#)]
91. Chung, A.; Bilawich, A. Confluent Fibrosis and Fibroblast Foci in Fibrotic Non-Specific Interstitial Pneumonia. *Histopathology* **2016**, *69*, 128–135. [[CrossRef](#)]
92. Poletti, V.; Romagnoli, M.; Piciucchi, S.; Chilosi, M. Current Status of Idiopathic Nonspecific Interstitial Pneumonia. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **2012**, *33*, 440–449. [[CrossRef](#)]
93. Tomassetti, S.; Ryu, J.H.; Piciucchi, S.; Chilosi, M.; Poletti, V. Nonspecific Interstitial Pneumonia: What Is the Optimal Approach to Management? *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **2016**, *37*, 378–394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Bergamasco, A.; Hartmann, N.; Wallace, L.; Verpillat, P. Epidemiology of Systemic Sclerosis and Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease. *CLEP* **2019**, *11*, 257–273. [[CrossRef](#)]
95. Perelas, A.; Silver, R.M.; Arrossi, A.V.; Highland, K.B. Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease. *Lancet Resp. Med.* **2020**, *8*, 304–320. [[CrossRef](#)]
96. Jee, A.S.; Sahhar, J.; Youssef, P.; Bleasel, J.; Adelstein, S.; Nguyen, M.; Corte, T.J. Review: Serum Biomarkers in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Systemic Sclerosis Associated Interstitial Lung Disease—Frontiers and Horizons. *Pharmacol. Ther.* **2019**, *202*, 40–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Valenzi, E.; Bulik, M.; Tabib, T.; Morse, C.; Sembrat, J.; Bittar, H.T.; Rojas, M.; Lafyatis, R. Single-Cell Analysis Reveals Fibroblast Heterogeneity and Myofibroblasts in Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease. *Ann. Rheum. Dis.* **2019**, *78*, 1379–1387. [[CrossRef](#)]
98. Cottin, V.; Brown, K.K. Interstitial Lung Disease Associated with Systemic Sclerosis (SSc-ILD). *Respir. Res.* **2019**, *20*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Distler, O.; Highland, K.B.; Gahlemann, M.; Azuma, A.; Fischer, A.; Mayes, M.D.; Raghu, G.; Sauter, W.; Girard, M.; Alves, M.; et al. Nintedanib for Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *380*, 2518–2528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Bonhomme, O.; André, B.; Gester, F.; de Seny, D.; Moermans, C.; Struman, I.; Louis, R.; Malaise, M.; Guiot, J. Biomarkers in Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease: Review of the Literature. *Rheumatology* **2019**, *58*, 1534–1546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Elhai, M.; Hoffmann-Vold, A.M.; Avouac, J.; Pezet, S.; Cauvet, A.; Leblond, A.; Fretheim, H.; Garen, T.; Kuwana, M.; Molberg, Ø.; et al. Performance of Candidate Serum Biomarkers for Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease. *Arthritis Rheumatol.* **2019**, *71*, 972–982. [[CrossRef](#)]
102. Shaw, M.; Collins, B.F.; Ho, L.A.; Raghu, G. Rheumatoid Arthritis-Associated Lung Disease. *Eur. Respir. Rev.* **2015**, *24*, 1–16. [[CrossRef](#)]
103. Spagnolo, P.; Lee, J.S.; Sverzellati, N.; Rossi, G.; Cottin, V. The Lung in Rheumatoid Arthritis: Focus on Interstitial Lung Disease. *Arthritis Rheumatol.* **2018**, *70*, 1544–1554. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Wang, D.; Zhang, J.; Lau, J.; Wang, S.; Taneja, V.; Matteson, E.L.; Vassallo, R. Mechanisms of Lung Disease Development in Rheumatoid Arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2019**, *15*, 581–596. [[CrossRef](#)]
105. England, B.R.; Hershberger, D. Management Issues in Rheumatoid Arthritis-Associated Interstitial Lung Disease. *Curr. Opin. Rheumatol.* **2020**, *32*, 255–263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Bendstrup, E.; Møller, J.; Kronborg-White, S.; Prior, T.S.; Hyldgaard, C. Interstitial Lung Disease in Rheumatoid Arthritis Remains a Challenge for Clinicians. *JCM* **2019**, *8*, 2038. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



107. Juge, P.-A.; Lee, J.S.; Ebstein, E.; Furukawa, H.; Dobrinskikh, E.; Gazal, S.; Kannengiesser, C.; Ottaviani, S.; Oka, S.; Tohma, S.; et al. *MUC5B* Promoter Variant and Rheumatoid Arthritis with Interstitial Lung Disease. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 2209–2219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Kim, H.C.; Choi, K.H.; Jacob, J.; Song, J.W. Prognostic Role of Blood KL-6 in Rheumatoid Arthritis–Associated Interstitial Lung Disease. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0229997. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Farid, S.S.; Azizi, G.; Mirshafiey, A. Anti-Citrullinated Protein Antibodies and Their Clinical Utility in Rheumatoid Arthritis. *Int. J. Rheum. Dis.* **2013**, *16*, 379–386. [[CrossRef](#)]
110. Harlow, L.; Gochuico, B.R.; Rosas, I.O.; Doyle, T.J.; Osorio, J.C.; Travers, T.S.; Camacho, C.C.; Oddis, C.V.; Ascherman, D.P. Anti-Citrullinated Heat Shock Protein 90 Antibodies Identified in Bronchoalveolar Lavage Fluid Are a Marker of Lung-Specific Immune Responses. *Clin. Immunol.* **2014**, *155*, 60–70. [[CrossRef](#)]
111. Chen, J.; Song, S.; Liu, Y.; Liu, D.; Lin, Y.; Ge, S.; Ascherman, D.P. Autoreactive T Cells to Citrullinated HSP90 Are Associated with Interstitial Lung Disease in Rheumatoid Arthritis. *Int. J. Rheum. Dis.* **2018**, *21*, 1398–1405. [[CrossRef](#)]
112. Tukaj, S.; Mantej, J.; Sobala, M.; Potrykus, K.; Sitko, K. Autologous Extracellular Hsp70 Exerts a Dual Role in Rheumatoid Arthritis. *Cell Stress Chaperon.* **2020**, *25*, 1105–1110. [[CrossRef](#)]
113. Spagnolo, P.; Rossi, G.; Trisolini, R.; Sverzellati, N.; Baughman, R.P.; Wells, A.U. Pulmonary Sarcoidosis. *Lancet Resp. Med.* **2018**, *6*, 389–402. [[CrossRef](#)]
114. Bonham, C.A.; Streck, M.E.; Patterson, K.C. From Granuloma to Fibrosis: Sarcoidosis Associated Pulmonary Fibrosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **2016**, *22*, 484–491. [[CrossRef](#)]
115. Patterson, K.C.; Chen, E.S. The Pathogenesis of Pulmonary Sarcoidosis and Implications for Treatment. *Chest* **2018**, *153*, 1432–1442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Dubaniewicz, A. Mycobacterium Tuberculosis Heat Shock Proteins and Autoimmunity in Sarcoidosis. *Autoimmun. Rev.* **2010**, *9*, 419–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Dubaniewicz, A.; Dubaniewicz-Wybieralska, M.; Sternau, A.; Zwolska, Z.; Iżycka-Świeszevska, E.; Augustynowicz-Kopeć, E.; Skokowski, J.; Singh, M.; Zimnoch, L. Mycobacterium Tuberculosis Complex and Mycobacterial Heat Shock Proteins in Lymph Node Tissue from Patients with Pulmonary Sarcoidosis. *J. Clin. Microbiol.* **2006**, *44*, 3448–3451. [[CrossRef](#)]
118. Massart, A.; Hunt, D.P. Pulmonary Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *Am. J. Med.* **2020**, *133*, 39–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Bewig, B.; Manske, I.; Böttcher, H.; Bastian, A.; Nitsche, R.; Fölsch, U.R. Crohn’s Disease Mimicking Sarcoidosis in Bronchoalveolar Lavage. *Respiration* **1999**, *66*, 467–469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Grimstad, T.; Kvivik, I.; Kvaløy, J.T.; Aabakken, L.; Omdal, R. Heat Shock Protein 90 and Inflammatory Activity in Newly Onset Crohn’s Disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **2018**, *53*, 1453–1458. [[CrossRef](#)]
121. Cullinan, P.; Reid, P. Pneumoconiosis. *Prim. Care Resp. J.* **2013**, *22*, 249–252. [[CrossRef](#)]
122. Fujimura, N. Pathology and Pathophysiology of Pneumoconiosis. *Curr. Opin. Pulmon. Med.* **2000**, *6*, 140–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Qi, X.-M.; Luo, Y.; Song, M.-Y.; Liu, Y.; Shu, T.; Liu, Y.; Pang, J.-L.; Wang, J.; Wang, C. Pneumoconiosis: Current Status and Future Prospects. *Chin. Med. J.* **2021**, *134*, 898–907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. McGrath, E.E.; Bardsley, P. An Association between Mycobacterium Malmoeense and Coal Workers’ Pneumoconiosis. *Lung* **2009**, *187*, 51–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Raghu, G.; Remy-Jardin, M.; Ryerson, C.J.; Myers, J.L.; Kreuter, M.; Vasakova, M.; Bargagli, E.; Chung, J.H.; Collins, B.F.; Bendstrup, E.; et al. Diagnosis of Hypersensitivity Pneumonitis in Adults. An Official ATS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2020**, *202*, e36–e69. [[CrossRef](#)]
126. Nogueira, R. Hypersensitivity Pneumonitis: Antigen Diversity and Disease Implications. *Hypersensitivity Pneumonitis* **2019**, *25*, 97–108. [[CrossRef](#)]
127. Pereira, C.A. Carlos AC Pereira1 Andréa Gimenez2 Lilian Kuranishi2 Karin Storrer2. *J. Asthma Allergy.* **2016**, *9*, 171. [[CrossRef](#)]
128. Miyazaki, Y. Treatment and Monitoring of Hypersensitivity Pneumonitis. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **2016**, *12*, 953–962. [[CrossRef](#)]
129. Okamoto, T. The Usefulness of KL-6 and SP-D for the Diagnosis and Management of Chronic Hypersensitivity Pneumonitis. *Respir. Med.* **2015**, *109*, 1576–1581. [[CrossRef](#)]

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---

La fibrose pulmonaire est une maladie incurable qui occasionne chaque année le décès de milliers de patients. A ce jour, plusieurs problématiques persistent dans la prise en charge des patients atteints de FPI. En effet, la prise en charge souvent tardive des patients, la complexité du diagnostic et le manque de solutions thérapeutiques sont autant de points qui expliquent le taux de mortalité élevé de cette pathologie. Bien que la FPI soit la pathologie pulmonaire interstitielle la plus fréquente, 13 à 40% des pneumopathies dites d'exposition, de causes inconnues ou acquises d'une première affection (telle que la sarcoïdose, la polyarthrite rhumatoïde, la sclérodémie systémique, etc.), évoluent aussi vers un phénotype de fibrose progressive<sup>298</sup>. Aussi, de récentes études portant sur le COVID-19 établissent qu'environ 45% des survivants à l'infection à coronavirus auraient développé une fibrose pulmonaire inhérente à l'infection virale et corrélée à sa gravité<sup>299</sup>. Dans ce contexte thérapeutique tendu, accroître l'offre thérapeutique et mieux prédire la réponse aux traitements constitue l'enjeu clinique de demain. Mes travaux de thèse nous ont dans un premier temps, permis d'évaluer le <sup>18</sup>F-FMISO ciblant les zones hypoxiques pulmonaires comme biomarqueur prédictif de la pathologie. Ce marqueur permet aussi d'anticiper et de suivre la réponse aux thérapeutiques de façon à faciliter l'accès des patients à une médecine davantage personnalisée. Ensuite, nous avons mis en évidence le potentiel intérêt d'une molécule chimique inhibitrice de la petite protéine de choc thermique HSPB5, le NCI-41356 dans la fibrose induite expérimentalement. Cette molécule pourrait venir agrandir à elle seule l'offre thérapeutique actuelle ou bien être administrée de façon combinée à une molécule existante. En effet une des stratégies d'amélioration de la prise en charge des patients FPI est d'associer plusieurs molécules médicamenteuses aux mécanismes d'action différents, donc modulant différentes voies mécanistiques profibrotiques. Enfin, nos travaux tout juste initiés et portant sur l'inhibition de la forme extracellulaire d'HSP90 et de son récepteur associé LRP1 dans la FPI montrent que l'administration de l'anticorps anti-eHSP90 diminuerait l'accumulation de collagène de façon dose-dépendante dans un modèle murin de fibrose induite à la bléomycine. De futures investigations sont nécessaires pour confirmer ces données.

## **Projet1. [<sup>18</sup>F] FMISO en tant que biomarqueur précoce de la maladie et prédictif de la réponse au traitement**

Dans le cadre de ce projet intitulé « Imagerie via le <sup>18</sup>F-FMISO PET/CT de l'hypoxie, un biomarqueur non invasif de la progression de la maladie et de l'efficacité des traitements dans un modèle préclinique de la fibrose pulmonaire : comparaison avec la TEP/CT <sup>18</sup>F-FDG », nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'utilisation du <sup>18</sup>F-FMISO en tant que biomarqueur non invasif de la progression de la maladie et de la réponse aux traitements antifibrotiques.

### **[<sup>18</sup>F]FMISO en tant que biomarqueur diagnostique précoce et prédictif de la progression de la maladie : une solution complémentaire innovante**

L'imagerie moléculaire *in vivo* est devenue un outil central dans la recherche préclinique, les essais cliniques et la pratique médicale pour le diagnostic et le suivi de nombreuses affections (tumeur du sein, cancer bronchique non à petites cellules, etc.)<sup>300</sup>. L'imagerie de la fibrose pulmonaire reste souvent limitée à la tomодensitométrie à haute résolution dans la pratique clinique à la fois pour le diagnostic et le suivi. Dans ce projet, nous avons tout d'abord confirmé les rapports précédents, en montrant que l'imagerie CT longitudinale est un outil fiable pour surveiller la gravité et la progression des zones fibrotiques pulmonaires. En effet, la quantification CT a détecté des zones fibrotiques dans les poumons des souris recevant la BLM à partir de J9 avec progression jusqu'à J23 en corrélation avec la détermination histologique classique de la teneur en collagène pulmonaire dans ce modèle préclinique. Nos résultats sont ainsi conformes aux études précédentes démontrant que la quantification médiée par la tomодensitométrie pulmonaire était corrélable aux lectures histologiques et permettaient ainsi de quantifier de manière efficace et non invasive la progression longitudinale de la maladie dans plusieurs modèles de fibrose pulmonaire<sup>301-303</sup>.

Cependant, le principal défi clinique reste l'impossibilité de prédire l'évolution de la maladie au moment du diagnostic. Cocconcelli *et al.* ont démontré que la mesure de l'étendue des zones fibrotiques pulmonaires des patients FPI par HCRT était utile pour différencier les « progressseurs » rapides des progressseurs « lents » à la présentation de la maladie<sup>304</sup>. De plus, il a été démontré que les changements structurels précoces déterminés par HRCT pouvaient également prédire la progression de la fonction pulmonaire des patients atteints de FPI<sup>305,306</sup>. Néanmoins, dans notre étude préclinique sur la fibrose pulmonaire induite par la BLM chez la souris nous n'avons pas retrouvé de corrélation entre la quantification précoce par HCRT et la progression de la maladie. Cet écart peut s'expliquer par les différences entre les lésions observables au scanner dans les modèles animaux et dans la FPI humaine. Alors que la fibrose

induite par la BLM reste un modèle robuste regroupant des caractéristiques telles que l'accumulation de collagène et la détérioration de la fonction pulmonaire, elle ne récapitule pas complètement les caractéristiques de la FPI observables en HCRT telles que les lésions en nid d'abeille caractéristiques des patients atteints de FPI. Un autre biais réside dans le schéma de progression de la fibrose induite par la BLM qui peut être plus homogène que celui survenant chez les patients atteints de FPI, et ce en raison de procédures expérimentales contrôlées. De plus, l'imagerie HRCT de diagnostic, réalisée chez les patients atteints de FPI est probablement représentative d'une fibrose pulmonaire plus avancée que dans notre modèle animal en raison des retards de diagnostic observés dans la vie courante. En conséquence, les lésions fibrotiques précoces détectées dans notre modèle à J9 peuvent ne pas être suffisamment avancées pour être corrélées à la progression de la fibrose telle qu'observée dans la FPI humaine.

Pour résumer, bien que de nombreuses études précliniques et cliniques aient montré l'intérêt de l'utilisation de la quantification HRCT à des fins diagnostiques et de suivi de la maladie, cette dernière n'est encore pas intégrée dans une pratique clinique de routine.

C'est dans ce contexte que le couplage de la tomographie à émission de positons haute résolution à l'utilisation de traceurs radiopharmaceutiques pourrait permettre un diagnostic plus précoce ainsi qu'un suivi plus robuste et précis de la maladie. En effet, les avancées réalisées ces dernières années ont permis le développement de nouvelles sondes d'imagerie ciblant le collagène ( $^{68}\text{Ga}$ -CBP8)<sup>307</sup>, les intégrines ( $^{18}\text{F}$ ]-FB-A20FMDV2)<sup>175</sup> ou encore le métabolisme du glucose ( $^{18}\text{F}$ ]-FDG)<sup>308</sup> validés avec succès lors d'essai cliniques. Ces sondes couplées à la tomographie classique devraient permettre d'améliorer la gestion de la FPI et prédire l'évolution de la maladie chez les patients. Notre étude s'inscrit dans cette recherche de marqueurs plus pertinents. Nous avons choisi d'exploiter une caractéristique clinique importante des patients atteints de FPI, l'hypoxie pulmonaire chronique, afin de diagnostiquer plus précocement et efficacement la fibrose. D'après nos résultats, le  $^{18}\text{F}$ -FMISO semble présenter une meilleure spécificité et un plus fort pouvoir diagnostique et prédictif que le  $^{18}\text{F}$ -FDG utilisé en clinique. En effet, la distribution temporelle et spatiale de l'absorption du  $^{18}\text{F}$ -FDG dans le poumon fibrotique à la fois en contexte clinique et préclinique suggère que la TEP au  $^{18}\text{F}$ -FDG ne peut que détecter des régions fibrotiques déjà visibles par HRCT, limitant ainsi son intérêt en tant que nouvel outil d'imagerie pour la fibrose pulmonaire. L'utilisation du  $^{18}\text{F}$ -FDG pose en outre un certain nombre de problèmes. Même si les transporteurs de glucose sont régulés à la hausse dans les myofibroblastes au cours de la FPI, les macrophages et les cellules cancéreuses sont également caractérisés par une absorption accrue de  $^{18}\text{F}$ -FDG, ce qui peut conduire à une mauvaise

interprétation de l'imagerie TEP au  $^{18}\text{F}$ -FDG chez les patients atteints de FPI présentant des comorbidités courantes telles qu'une infection ou un cancer du poumon. Concernant le  $^{18}\text{F}$ -FMISO nous avons démontré que contrairement au  $^{18}\text{F}$ -FDG, il était capable non seulement d'identifier des zones fibrotiques non détectables par HCRT mais également de prédire l'évolution de la maladie de manière fiable. En effet, nous avons démontré que l'augmentation de la captation pulmonaire du  $^{18}\text{F}$ -FMISO se produisait dans des zones apparaissant « normales » en tomographie par émission de positons précoce qui correspondaient aux futures lésions fibrotiques. Ces données sont conformes à d'autres études démontrant que HIF-1 $\alpha$  et CAIX, deux marqueurs de l'hypoxie, étaient régulés positivement non seulement dans les zones de fibrose active, mais également dans les zones pulmonaires de FPI qui semblent histologiquement normales<sup>309</sup>. Ces résultats suggèrent que l'activation de la signalisation de l'hypoxie entraîne le remodelage des zones du poumon FPI qui ne sont pas encore fibrotiques, favorisant ainsi la progression de la maladie. Ces données sont également étayées par le fait que la fixation du  $^{18}\text{F}$ -FMISO s'est produite à un stade précoce à partir de J9 dans notre modèle suggérant que l'imagerie de l'hypoxie au  $^{18}\text{F}$ -FMISO, contrairement aux autres sondes disponibles, pourrait représenter un marqueur précoce de la progression de la fibrose.

Bien que nos résultats obtenus dans un modèle préclinique soient prometteurs, nous devons nous assurer de leur pertinence chez l'Homme. En effet, malgré la fiabilité de notre modèle d'étude murin, il est important de rappeler qu'il existe des différences physiologiques pouvant limiter l'utilisation de notre stratégie chez l'Homme. En effet, la BLM induit une expression diffuse et massive de la protéine HIF1 $\alpha$  dans les poumons de souris, ce qui est différent du signal HIF1 $\alpha$  observé chez les patients atteints de FPI où l'expression de HIF1 $\alpha$  s'est avérée restreinte aux cellules épithéliales alvéolaires hyperplasiques et non aux (myo)fibroblastes<sup>310-312</sup>. En conséquence, nos résultats précliniques doivent être confirmés par des études cliniques de phase I évaluant la pertinence de la TEP  $^{18}\text{F}$ -FMISO chez les patients atteints de FPI. Le  $^{18}\text{F}$ -FMISO fait actuellement l'objet d'une étude clinique initiée par le service de pneumologie du CHU de Dijon en collaboration avec le service de médecine nucléaire du Centre Régional De Lutte Contre Le Cancer Georges-François Leclerc (C.G.F.L) de Dijon, chez des patients atteints de FPI. Cette étude clinique viendra appuyer l'intérêt de ce radiotracer présenté dans un modèle de fibrose expérimentale ou au contraire ne nous permettra pas de conclure favorablement quant à l'utilisation de ce dernier dans un contexte de FPI chez l'Homme. Dans une étude clinique réalisée sur 10 patients FPI, *Porter et al.* concluent que l'utilisation du  $^{18}\text{F}$ -FMISO chez les patients FPI ne présente aucun intérêt. Cependant, cette étude présente de

nombreux biais méthodologiques, notamment l'utilisation comme contrôle des zones saines au HRCT des patients FPI. Or, nos résultats tendent à montrer que les zones apparaissant saines au HRCT présentent une augmentation de captation du  $^{18}\text{F}$ -FMISO. Ainsi, nous pensons qu'une autre étude clinique est indispensable pour conclure sur le potentiel intérêt du  $^{18}\text{F}$ -FMISO en clinique et dans un contexte de fibrose pulmonaire idiopathique.

Compte tenu des contraindications à la pratique de biopsie sur les patients souffrant de FPI souvent âgés et pluri-pathologiques, la mise au point de biomarqueur non-invasif comme le  $^{18}\text{F}$ -FMISO, pourrait être un outil révolutionnaire dans la prise en charge des patients. Aussi, il pourrait permettre d'adapter les thérapeutiques en fonction des réponses observées à la suite d'une primo-thérapie. Enfin, sur des patients à risque de développer une fibrose pulmonaire (patient souffrant d'apnée du sommeil, patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, etc.), le  $^{18}\text{F}$ -FMISO pourrait être un outil de suivi régulier afin de traiter de façon préventive et ainsi limiter le développement de la FP aux conséquences létales. Dans ce cas de figure, la balance bénéfique/risque d'un traitement préventif de la fibrose reste à évaluer. Aussi, dans un but préventif ou thérapeutique, l'élargissement de l'offre de traitement apparaît primordial dans le traitement de la FPI.

### **[ $^{18}\text{F}$ ]FMISO en tant que biomarqueur dans le suivi de la réponse au traitement**

L'identification de biomarqueurs capables de prédire la réponse aux traitements antifibrotiques correspond aujourd'hui à un besoin clinique réel. Dans le cadre de ces travaux, nous avons démontré que la variation du taux de  $^{18}\text{F}$ -FMISO incorporé au sein du poumon permettait non seulement de prédire de manière précoce la progression de la FPI mais également de prédire la réponse aux traitements antifibrotiques.

Aujourd'hui deux médicaments antifibrotiques, la pirféridone et le nintédanib, sont préconisés pour le traitement des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique. Les expériences menées par notre équipe suggèrent que contrairement aux méthodes usuelles (HRCT et/ou imagerie  $^{18}\text{F}$ -FDG), l'imagerie  $^{18}\text{F}$ -FMISO permet de prédire l'efficacité du nintédanib. En effet, nous avons démontré qu'une absorption plus élevée du  $^{18}\text{F}$ -FMISO dans le tissu pulmonaire était associée à une meilleure réponse anti-fibrotique au nintédanib. La progression de la fibrose et l'efficacité du traitement ont été mesurées par la variation de la MLD (Mean Lung Density) entre le début et la fin du traitement (J9 et J23) chez les souris contrôle ou BLM traitées ou non par la pirféridone ou le nintédanib. Cette méthode suppose donc que la tomodesitométrie est

un outil précis pour quantifier la fibrose pulmonaire. Afin de valider davantage notre approche, nous avons de plus démontré que l'absorption pulmonaire précoce du  $^{18}\text{F}$ -FMISO était également corrélée à la teneur en collagène finale des poumons. Par ailleurs, nos données précliniques sont en phase avec les résultats de plusieurs études cliniques récentes montrant que l'hypoxie intracellulaire mesurée par l'imagerie au  $^{18}\text{F}$ -FMISO a un impact pronostique chez les patients atteints de cancer du sein et du pancréas<sup>313,314</sup>. De plus, Quintela-Fandino *et al.*<sup>315</sup> ont démontré un rôle prédictif de la TEP au  $^{18}\text{F}$ -FMISO chez les femmes atteintes d'un cancer du sein précoce HER2 négatif et traitées avec du nintédanib. En effet, en se basant sur des niveaux d'oxygénation tumorale initiale de patientes non traitées ou traitées avec du nintédanib, les chercheurs ont montré le  $^{18}\text{F}$ -FMISO permettait de mesurer l'efficacité du nintédanib de façon précoce.

Par ailleurs, conformément à nos résultats, une étude récente a démontré l'inefficacité de l'imagerie TEP au  $^{18}\text{F}$ -FDG pour évaluer la réponse précoce des patients atteints de FPI au nintédanib ou à la pirféridone [18], soulignant davantage le besoin crucial d'un meilleur traceur pour la détection précoce de la FPI et la surveillance de l'efficacité de la thérapie.

En conclusion, le  $^{18}\text{F}$ -FMISO est un outil prometteur dont l'utilité prédictive dans un contexte de fibrose pulmonaire, reste toutefois à évaluer chez l'Homme. Si son efficacité était prouvée, l'utilisation routinière de cette sonde non invasive, permettrait de vérifier la réponse thérapeutique et de la moduler dans les meilleurs délais dans un souci constant, d'améliorer le confort et la prise en charge des patients souffrant de FPI. D'autre part, le  $^{18}\text{F}$ -FMISO pourrait servir d'outil de screening permettant d'identifier de nouvelles thérapies dans un premier temps dans un modèle préclinique de fibrose puis chez l'Homme. Enfin, dû à sa spécificité de fixation, le  $^{18}\text{F}$ -FMISO pourrait constituer un outil théranostique de référence permettant de délivrer de façon ciblée, des drogues couplées au  $^{18}\text{F}$ -FMISO au sein des zones hypoxiques et fibrotiques exclusivement et d'éviter ainsi, les effets systémiques ou non spécifiques des médicaments. Au sein de notre laboratoire, nous pourrions imaginer coupler systématiquement le  $^{18}\text{F}$ -FMISO aux molécules anti-fibrosantes en cours de développement afin de suivre l'intérêt thérapeutique de chacune d'entre elles ou bien coupler le  $^{18}\text{F}$ -FMISO à de nouvelles molécules qui seraient utilisées en prévention du développement de la fibrose.

Dans l'intérêt du développement de nouvelles molécules inhibitrices de la fibrose, notre prochaine étude a permis de montrer que le NCI-41356, un petit inhibiteur chimique, réduisait la fibrose dans un modèle préclinique expérimental.

## **Projet 2. Approche thérapeutique utilisant le NCI-41356, un inhibiteur de la protéine HSPB5 afin de limiter la fibrose pulmonaire**

Les protéines de choc thermique (HSP) jouent un rôle crucial dans le développement et la progression des troubles fibrotiques en modulant notamment la signalisation TGF- $\beta$ 1, l'un des principaux facteurs pro-fibrotiques participant à la FPI<sup>298,316</sup>. Les données de la littérature soulignent l'intérêt de mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques combinatoires afin de lutter contre cette pathologie. Dans ce contexte, l'association d'inhibiteur des HSPs avec le nintedanib ou la pirféridone, aux mécanismes d'action différents, pourraient améliorer l'efficacité du traitement.

L'étude des HSP au cours des deux dernières décennies a conduit au développement de nombreux inhibiteurs de ces protéines en cours d'évaluation clinique, principalement chez les patients atteints de cancers<sup>317</sup>. Tandis que les travaux de recherche se concentraient majoritairement sur le blocage des fonctions d'HSPC1 dans le cancer, des inhibiteurs d'autres HSP ont récemment fait leur apparition<sup>318</sup>. L'équipe de Chen et al. a identifié un inhibiteur spécifique de la protéine HSPB5 nommé NCI-41356<sup>319</sup>. Ces auteurs ont démontré que le NCI-41356 est capable de module la prolifération cellulaire anti-tumorale et la neo-angiogénèse en perturbant l'interaction HSPB5/VEGF et la signalisation associée dans les cellules cancéreuses du sein<sup>319</sup>. Notre étude confirme les résultats de Chen et al. puisque nous avons montré que le NCI-41356 inhibe l'activité chaperonne d'HSPB5 mais régule aussi négativement les voies pro-fibrotiques médiées par la signalisation TGF- $\beta$ 1 dépendante des protéines SMAD<sup>316</sup>. En effet, nous avons montré que le NCI-41356 est capable de perturber l'interaction de HSPB5 et SMAD4 dans un contexte fibrotique conduisant à l'inhibition de la signalisation TGF- $\beta$ 1 *in vitro* et à l'inhibition de la fibrose pulmonaire *in vivo*. Néanmoins, malgré le rôle controversé de la signalisation VEGF dans la fibrose, l'impact du NCI-41356 sur l'interaction HSPB5/VEGF pourrait en partie expliquer les effets anti-fibrosants observés dans notre étude. Le rôle du VEGF dans la FPI est complexe, avec des zones pulmonaires "saines" montrant une néo-vascularisation accrue, alors que des régions fibrotiques envahies par l'accumulation de matrice extracellulaire apparaissent dépourvues de vascularisation. Ainsi, que l'hyper-vascularisation associée à la surexpression du VEGF par les cellules épithéliales alvéolaires soit la conséquence de la mise en place d'un processus de protection/régénération de la paroi alvéolaire en réponse à des stimuli pro-fibrotiques ou bien, la cause d'un remodelage tissulaire favorisant la progression de la fibrose reste une question controversée. Plusieurs études soutiennent un rôle protecteur du VEGF contre la fibrose pulmonaire, notamment via la conservation de l'intégrité



des cellules endothéliales, qui favorisent la survie des cellules épithéliales pulmonaires par un mécanisme paracrine<sup>320</sup>. Néanmoins, une augmentation de l'expression du VEGF a été mise en évidence dans les zones fibrotiques non vascularisées au sein de modèles précliniques, suggérant un rôle du VEGF indépendant du système vasculaire<sup>321</sup>. Hamada et al. ont démontré que l'inhibition du VEGF *in vivo* induisait une atténuation de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine<sup>322</sup>. Enfin, des résultats précliniques et cliniques montrant un effet anti-fibrotique du nintedanib, un inhibiteur de tyrosine kinase spécifique de plusieurs récepteurs dont les récepteurs du VEGF, sur la fibrose induite par la bléomycine d'une part et chez les patients présentant une diminution de la progression de la FPI d'autre part, suggèrent une importance de la voie de signalisation du VEGF dans la fibrogenèse<sup>323</sup>.

Nos études expérimentales chez la souris, ne nous ont pas permis de conclure sur un quelconque rôle du NCI-41356 sur la signalisation du VEGF. Toutefois, nous avons montré que le NCI-41356 diminuait l'interaction entre VEGF et HSPB5. Dans ce contexte, de futures investigations pour établir le rôle du NCI-41356 sur cette voie de signalisation semblent nécessaires. Le NCI-41356 pourrait inhiber simultanément la voie de TGF- $\beta$ 1 et limiter la néovascularisation en inhibant le VEGF. A ce titre, le NCI-41356 pourrait être une molécule de choix dans le traitement des patients atteints de FPI. Aussi, l'utilisation de la sonde <sup>18</sup>F-FMISO en parallèle pourrait nous permettre d'administrer très précocement ces composés de façon ciblée et de vérifier leur efficacité à inhiber le développement de la fibrose.

L'efficacité d'un traitement dépend principalement des techniques par lesquelles le médicament est administré et de la concentration optimale du médicament dans l'organe ciblé pour produire un bénéfice thérapeutique sans induire d'effets indésirables graves. En raison de leur rôle crucial dans l'homéostasie cellulaire, l'inhibition systémique des HSP s'accompagne souvent d'effets indésirables et d'une toxicité inacceptable<sup>324</sup> (telle que diarrhée, démangeaisons, nausées, etc.)<sup>325</sup>. Cette toxicité est le principal frein au développement d'inhibiteurs d'HSP en clinique. De même, le TGF- $\beta$ 1 étant une cytokine multifonctionnelle d'une importance clé pour le maintien de l'homéostasie tissulaire, la modulation systémique de la signalisation du TGF- $\beta$ 1 a été associée à des effets indésirables graves<sup>326</sup>. Dans ce contexte, l'administration locale dans l'arbre alvéolaire pulmonaire des molécules actives permettraient d'éviter l'apparition d'effets indésirables systémiques tout en optimisant la concentration de médicament au site où la fibrose est active<sup>327</sup>. Un exemple très courant d'administration par voie inhalée est celle des corticoïdes pour le traitement de l'asthme. Nous pouvons également citer comme autre exemple

l'administration systémique ou inhalée de lévofloxacine qui a démontré que l'administration locale améliorerait l'accès du médicament au tissu pulmonaire, soutenant la pertinence de cette approche <sup>328</sup>. On peut également noter que l'administration pulmonaire de médicaments pour traiter la FPI a suscité un intérêt au cours de la dernière décennie et les formulations inhalées de pirfénidone et de nintédanib ont été testées avec succès chez l'Homme <sup>329,330</sup>. Pour les deux médicaments, l'administration locale dans les poumons était associée à des concentrations pulmonaires plus élevées et plasmatiques plus faibles avec une efficacité anti-fibrotique conservée <sup>329,330</sup>. Récemment, Liu *et al.* <sup>331</sup>, ont synthétisé des liposomes capables de réduire le dépôt excessif de MEC et la TEM médiée par les macrophages et d'ainsi atténuer la fibrose pulmonaire en régulant à la hausse la signalisation Nrf2, capable d'inhiber l'expression des ROS et du TGF- $\beta$ . L'administration de ce liposome par inhalation pourrait permettre de réduire les effets indésirables systémiques et améliorer les effets thérapeutiques. De manière similaire, lors de nos travaux nous avons mis en évidence que les effets anti-fibrotiques du NCI-41356 étaient analogues lors d'une administration locale (i.t.) et systémique (i.v.), suggérant un intérêt potentiel de ce médicament en tant que thérapie inhalée dans la FPI. Des travaux supplémentaires sont nécessaires afin de confirmer le potentiel du NCI-41356 comme traitement aérosol inhalé de la fibrose pulmonaire.

### **Projet 3. Intérêt de l'inhibition d'HSP90 extracellulaire dans la fibrose pulmonaire idiopathique**

Les travaux sur l'inhibition partielle d'HSP90 dans le contexte de la fibrose pulmonaire idiopathique sont actuellement encore en cours.

L'inhibition d'HSP90 dans la FPI a largement été étudiée dans la fibrose et des inhibiteurs comme le 17-AAG ou le 17-DMAG ont vu le jour <sup>240,243</sup>. L'utilisation de ces molécules présente toutefois quelques limites dues à leur manque de solubilité, instabilité et leur hépatotoxicité <sup>332</sup>. De plus, l'inhibition d'HSP90, dont les fonctions physiologiques sont essentielles, pourrait annihiler les bienfaits de l'utilisation d'un tel traitement <sup>333</sup>. Dans le but de réduire les effets de la fibrose provoquée par HSP90 mais également de limiter les conséquences délétères de son inhibition totale, nous nous sommes intéressés à la mise au point d'un traitement ciblant uniquement la partie extracellulaire d'HSP90 (forme sécrétée et membranaire) et son récepteur associé LRP1. A ce titre, nous cherchons à ne cibler que la forme extracellulaire d'HSP90 (eHSP90), dont l'expression est augmentée dans la FPI. En effet, Bellaye *et al.* <sup>246</sup> ont montré que le niveau circulant d'HSP90 de 31 patients atteints de FPI était plus élevé que celui de

patients contrôles (N=9). De plus, le taux d'expression d'eHSP90 était corrélé à la sévérité de la pathologie. En parallèle, Bellaye *et al.* ont démontré que la forme intracellulaire HSP90 $\beta$  stabilise LRP1 ce qui permet d'amplifier l'action extracellulaire de HSP90 $\alpha$ . C'est dans ce contexte, que l'inhibition spécifique d'HSP90 $\alpha$  extracellulaire semble être une stratégie thérapeutique prometteuse pour réduire la signalisation pro-fibrotique dans la FPI. Dans un modèle de cancer du sein, Stivarou *et al.* ont mis en évidence, que l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-HSP90 ne pénétrant pas dans les cellules, réduisait la croissance tumorale et constituait ainsi un outil prometteur<sup>334</sup>. Dès lors, dans nos études, nous nous sommes intéressés à l'utilisation de ce même anticorps anti-HSP90 extracellulaire (mAb4C5) dans un contexte de FPI. Nos premiers résultats montrent qu'*in vitro* l'inhibition d'HSP90 extracellulaire réduirait l'expression de marqueurs de la TEM (PAI-1,  $\alpha$ -SMA, fibronectine) ; aussi, dans un modèle de fibrose préclinique, nous avons pu mettre en évidence une signature spécifique de chaque type cellulaire concernant l'expression d'HSP90 et de LRP1 en fonction de la progression de la fibrose. *In vivo*, l'administration quotidienne d'anti-HSP90 extracellulaire a diminué le taux de collagène chez les animaux ayant reçu la plus forte dose de traitement comparativement au groupe contrôle. Concernant la sonde de radioimagerie, nos résultats actuels n'ont pas montré jusque là une plus forte accumulation de la sonde ciblant HSP90 extracellulaire chez les animaux BLM comparativement aux groupes contrôles.

### **Limites et perspectives du Projet 3.**

Le Projet 3 étant toujours en cours d'étude, je ne ferai état ici que des difficultés rencontrées et des perspectives de ce dernier. Une des premières limites de ce projet concerne la répétition des différentes expériences. En effet, l'ensemble de ces expériences mérite d'être réitéré avant de pouvoir conclure quant aux réels bénéfices de l'utilisation thérapeutique de ce fragment d'anticorps dans le traitement de la FPI. Aussi, l'échec de la quantification par technique ELISA d'HSP90 $\alpha$  dans les sérums et lavage broncho alvéolaire (LBA) d'animaux traités par l'anti-HSP90 $\alpha$  et/ou bléomycine ne nous a pas permis de vérifier la spécificité de l'inhibition d'HSP90. Compte tenu de la très faible détection voir de l'absence de détection d'HSP90 $\alpha$  dans les sérums et LBA, cet échec semble être de nature technique (ELISA peu spécifique, échantillons détériorés). De plus, l'IgG contrôle seule a aggravé les effets de la bléomycine et a provoqué la mort d'un plus grand nombre de souris que la bléomycine seule. Compte tenu du faible nombre d'animaux par groupe, cette mortalité a induit un nombre final insuffisant d'animaux par groupe, ce qui peut expliquer l'absence de différence significative entre ces

groupes lors de la mesure du taux de collagène via l'examen sircol et l'analyse du rouge sirius respectivement. De plus, l'examen du poids des animaux révèle que les écarts entre les variations des poids des animaux des différents groupes, seraient davantage significatives aux 15ème jour post injection de bléomycine. En effet, les variations de collagène contenu dans les poumons des animaux pourraient suivre la même tendance que celle du poids des animaux. A ce titre et compte tenu du fait que notre modèle de fibrose est un modèle régressif, l'examen du collagène pourrait être plus opportun à J15 et non J21 après l'injection de bléomycine. L'expérience sera donc prochainement réitérée à J15 et J21, à l'aide d'un autre lot d'anticorps IgG non relevant. Les problématiques de notre modèle régressif de fibrose, du faible nombre d'animaux inclus et de l'hétérogénéité de notre mode d'injection de la bléomycine pourraient également expliquer l'absence de différence significative de l'absorption de notre sonde radioactive anti-HSP90 $\alpha$ . En effet, dans cet examen, seuls 5 animaux par groupe étaient injectés avec la sonde radioactive, 18 jours après l'injection de bléomycine. Nous pouvons également suspecter que le niveau de surexpression d'HSP90 à la surface des myofibroblastes est trop faible pour être détecté par imagerie SPECT. Cette expérience mesurant la capacité de notre sonde radioactive à détecter les zones de fibrose sera également prochainement réitérée.

Dans un premier temps, notre étude vise donc à élaborer une nouvelle thérapie anti-fibrosante pouvant être combinée aux traitements déjà existants ou utilisée seule. Dans un second temps, en complément des examens classiques permettant le diagnostic de la FPI, la mesure non invasive (prise de sang) de la quantité d'HSP90 $\alpha$  pourrait être utilisée comme outil de suivi et/ou biomarqueur de l'atteinte pulmonaire au même titre que le  $^{18}\text{F}$ -FMISO. Son utilisation pourrait aussi être couplée à celle du  $^{18}\text{F}$ -FMISO afin de combiner l'intérêt prédictif de l'un et thérapeutique de l'autre. Enfin, la mise au point d'outils ciblant HSP90 $\alpha$  dans une population cellulaire définie pourrait limiter les effets systémiques de l'inhibition. Concernant l'inhibition de LRP1, nous pensons que l'inhibition simultanée d'HSP90 $\alpha$  et de son récepteur associé pourrait avoir des effets délétères. De plus, nous ne parvenons pas à nous procurer l'inhibiteur de LRP1 qui a déjà fait l'objet de plusieurs études. Cet axe du projet fera donc l'objet de futures recherches.

## CONCLUSION GENERALE

---

Le domaine de la fibrose fait actuellement face à la progression constante du nombre de malades et à l'absence de traitements efficaces. En effet, malgré les avancées thérapeutiques de ces dernières décennies, aucune n'a permis d'enrayer la pathologie. La détection tardive de la FPI est aujourd'hui un problème majeur persistant qui nuit à la bonne prise en charge des patients. Pour autant, l'avancé régulière des recherches dans ce domaine nous permet d'imaginer mieux prédire et traiter l'atteinte de façon à en limiter les séquelles. Les récents travaux d'imagerie et les études visant à améliorer la compréhension des mécanismes sous-jacents de la FPI se multiplient et tendent à améliorer l'offre diagnostique et théranostique.

Dans ce contexte, nos travaux ont permis d'apporter des données scientifiques encourageantes sur la recherche de nouveaux traitements et outils diagnostiques/théranostiques de la fibrose pulmonaire.

Nous avons pu montrer que le  $^{18}\text{F}$ -FMISO constitue un potentiel traceur radiopharmaceutique précoce et prédictif de l'évolution de la fibrose pulmonaire et de la réponse à son traitement. Par ailleurs nous avons également montré le rôle anti-fibrotique d'un inhibiteur chimique de la voie canonique du TGF- $\beta$ , le NCI-41356. Enfin, nos résultats préliminaires concernant la protéine HSP90 nous permettent d'envisager l'utilisation théranostique d'anticorps recombinant dans ce contexte pathologique.

## REFERENCES

---

1. Olson, A. *et al.* Estimation of the Prevalence of Progressive Fibrosing Interstitial Lung Diseases: Systematic Literature Review and Data from a Physician Survey. *Adv Ther* **38**, 854–867 (2021).
2. Travis, W. D. *et al.* An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Update of the International Multidisciplinary Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* **188**, 733–748 (2013).
3. Maher, T. M. *et al.* Global incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res* **22**, 197 (2021).
4. Wijsenbeek, M. & Cottin, V. Spectrum of Fibrotic Lung Diseases. *N Engl J Med* **383**, 958–968 (2020).
5. Raghu, G. *et al.* Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med* **198**, e44–e68 (2018).
6. Harari, S. *et al.* Fibrotic interstitial lung diseases and air pollution: a systematic literature review. *Eur Respir Rev* **29**, 200093 (2020).
7. Quinn, C., Wisse, A. & Manns, S. T. Clinical course and management of idiopathic pulmonary fibrosis. *Multidiscip Respir Med* **14**, 35 (2019).
8. Raghu, G. *et al.* Idiopathic Pulmonary Fibrosis (an Update) and Progressive Pulmonary Fibrosis in Adults: An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med* **205**, e18–e47 (2022).
9. Cottin, V. *et al.* Recommandations pratiques pour le diagnostic et la prise en charge de la fibrose pulmonaire idiopathique – Actualisation 2021. Version intégrale. *Revue des Maladies Respiratoires* S0761842522000353 (2022) doi:10.1016/j.rmr.2022.01.014.
10. Puglisi, S. *et al.* New perspectives on management of idiopathic pulmonary fibrosis. *Therapeutic Advances in Chronic Disease* **7**, 108–120 (2016).
11. Ying, H. *et al.* Pirfenidone modulates macrophage polarization and ameliorates radiation-induced lung fibrosis by inhibiting the TGF- $\beta$ 1/Smad3 pathway. *J Cell Mol Med* **25**, 8662–8675 (2021).

12. Jin, J. *et al.* Pirfenidone attenuates lung fibrotic fibroblast responses to transforming growth factor- $\beta$ 1. *Respir Res* **20**, 119 (2019).
13. Huang, X. *et al.* Molecular characterization of a precision-cut rat lung slice model for the evaluation of antifibrotic drugs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **316**, L348–L357 (2019).
14. Kakugawa, T. *et al.* Pirfenidone attenuates expression of HSP47 in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* **24**, 57–65 (2004).
15. Inomata, M. *et al.* Pirfenidone inhibits fibrocyte accumulation in the lungs in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis. *Respir Res* **15**, 16 (2014).
16. Zang, C., Zheng, Y., Wang, Y. & Li, L. The effects and safety of pirfenidone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: a meta-analysis and systematic review. *Eur J Med Res* **26**, 129 (2021).
17. Wollin, L., Maillet, I., Quesniaux, V., Holweg, A. & Ryffel, B. Antifibrotic and anti-inflammatory activity of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib in experimental models of lung fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther* **349**, 209–220 (2014).
18. Wollin, L. *et al.* Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* **45**, 1434–1445 (2015).
19. Liu, F., Bayliss, G. & Zhuang, S. Application of nintedanib and other potential anti-fibrotic agents in fibrotic diseases. *Clin Sci (Lond)* **133**, 1309–1320 (2019).
20. Lamb, Y. N. Nintedanib: A Review in Fibrotic Interstitial Lung Diseases. *Drugs* **81**, 575–586 (2021).
21. Wells, A. U. *et al.* Nintedanib in patients with progressive fibrosing interstitial lung diseases-subgroup analyses by interstitial lung disease diagnosis in the INBUILD trial: a randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group trial. *Lancet Respir Med* **8**, 453–460 (2020).
22. Flaherty, K. R. *et al.* Nintedanib in Progressive Fibrosing Interstitial Lung Diseases. *N Engl J Med* **381**, 1718–1727 (2019).
23. Richeldi, L. *et al.* Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* **370**, 2071–2082 (2014).

24. Crestani, B. *et al.* Long-term safety and tolerability of nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: results from the open-label extension study, INPULSIS-ON. *Lancet Respir Med* **7**, 60–68 (2019).
25. Somogyi, V. *et al.* The therapy of idiopathic pulmonary fibrosis: what is next? *Eur Respir Rev* **28**, 190021 (2019).
26. Weill, D. *et al.* A consensus document for the selection of lung transplant candidates: 2014--an update from the Pulmonary Transplantation Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant* **34**, 1–15 (2015).
27. Paik, H. C. *et al.* The fate of patients on the waiting list for lung transplantation in Korea. *Transplant Proc* **44**, 865–869 (2012).
28. Adamali, H. I. *et al.* International collaboration: a retrospective study examining the survival of Irish citizens following lung transplantation in both the UK and Ireland. *BMJ Open* **2**, e000605 (2012).
29. Kourliouros, A. *et al.* Patient outcomes from time of listing for lung transplantation in the UK: are there disease-specific differences? *Thorax* **74**, 60–68 (2019).
30. Chambers, D. C. *et al.* The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-sixth adult lung and heart-lung transplantation Report-2019; Focus theme: Donor and recipient size match. *J Heart Lung Transplant* **38**, 1042–1055 (2019).
31. Kistler, K. D., Nalysnyk, L., Rotella, P. & Esser, D. Lung transplantation in idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review of the literature. *BMC Pulm Med* **14**, 139 (2014).
32. Kapnadak, S. G. & Raghu, G. Lung transplantation for interstitial lung disease. *Eur Respir Rev* **30**, 210017 (2021).
33. Laporta Hernandez, R., Aguilar Perez, M., Lázaro Carrasco, M. & Ussetti Gil, P. Lung Transplantation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Medical Sciences* **6**, 68 (2018).
34. Satish, L. & Kathju, S. Cellular and Molecular Characteristics of Scarless versus Fibrotic Wound Healing. *Dermatology Research and Practice* **2010**, 1–11 (2010).



35. Kelly, M., Kolb, M., Bonniaud, P. & Gauldie, J. Re-evaluation of fibrogenic cytokines in lung fibrosis. *Curr Pharm Des* **9**, 39–49 (2003).
36. Mahalanobish, S., Saha, S., Dutta, S. & Sil, P. C. Matrix metalloproteinase: An upcoming therapeutic approach for idiopathic pulmonary fibrosis. *Pharmacol Res* **152**, 104591 (2020).
37. Heukels, P., Moor, C. C., von der Thüsen, J. H., Wijsenbeek, M. S. & Kool, M. Inflammation and immunity in IPF pathogenesis and treatment. *Respiratory Medicine* **147**, 79–91 (2019).
38. Hewlett, J. C., Kropski, J. A. & Blackwell, T. S. Idiopathic pulmonary fibrosis: Epithelial-mesenchymal interactions and emerging therapeutic targets. *Matrix Biol* **71–72**, 112–127 (2018).
39. Wynn, T. A. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J. Clin. Invest.* **117**, 524–529 (2007).
40. Ruiz, V. *et al.* Unbalanced collagenases/TIMP-1 expression and epithelial apoptosis in experimental lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**, L1026-1036 (2003).
41. Holmes, D. F., Lu, Y., Starborg, T. & Kadler, K. E. Collagen Fibril Assembly and Function. *Curr Top Dev Biol* **130**, 107–142 (2018).
42. Ramshaw, J. A., Shah, N. K. & Brodsky, B. Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: a context for host-guest triple-helical peptides. *J Struct Biol* **122**, 86–91 (1998).
43. Gelse, K., Pöschl, E. & Aigner, T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* **55**, 1531–1546 (2003).
44. Takiya, C., Peyrol, S., Cordier, J. F. & Grimaud, J. A. Connective matrix organization in human pulmonary fibrosis. Collagen polymorphism analysis in fibrotic deposits by immunohistological methods. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **44**, 223–240 (1983).
45. Leeming, D. J. *et al.* Serological investigation of the collagen degradation profile of patients with chronic obstructive pulmonary disease or idiopathic pulmonary fibrosis. *Biomark Insights* **7**, 119–126 (2012).
46. Jenkins, R. G. *et al.* Longitudinal change in collagen degradation biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis: an analysis from the prospective, multicentre PROFILE study. *Lancet Respir Med* **3**, 462–472 (2015).

47. Herrera, J. *et al.* Registration of the extracellular matrix components constituting the fibroblastic focus in idiopathic pulmonary fibrosis. *JCI Insight* **4**, 125185 (2019).
48. Wahyudi, H., Reynolds, A. A., Li, Y., Owen, S. C. & Yu, S. M. Targeting collagen for diagnostic imaging and therapeutic delivery. *J Control Release* **240**, 323–331 (2016).
49. Shuvaev, S., Akam, E. & Caravan, P. Molecular MR Contrast Agents. *Invest Radiol* **56**, 20–34 (2021).
50. Désogère, P. *et al.* Type I collagen-targeted PET probe for pulmonary fibrosis detection and staging in preclinical models. *Sci Transl Med* **9**, eaaf4696 (2017).
51. Morikawa, M., Derynck, R. & Miyazono, K. TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**, a021873 (2016).
52. Jiang, F., Liu, G.-S., Dusting, G. J. & Chan, E. C. NADPH oxidase-dependent redox signaling in TGF- $\beta$ -mediated fibrotic responses. *Redox Biology* **2**, 267–272 (2014).
53. Kim, K. K., Sheppard, D. & Chapman, H. A. TGF- $\beta$ 1 Signaling and Tissue Fibrosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **10**, a022293 (2018).
54. Shi, M. *et al.* Latent TGF- $\beta$  structure and activation. *Nature* **474**, 343–349 (2011).
55. Ghahary, A., Tredget, E. E., Mi, L. & Yang, L. Cellular response to latent TGF-beta1 is facilitated by insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptors on MS-9 cells. *Exp Cell Res* **251**, 111–120 (1999).
56. Nishimura, S. L. Integrin-mediated transforming growth factor-beta activation, a potential therapeutic target in fibrogenic disorders. *Am J Pathol* **175**, 1362–1370 (2009).
57. McCarty, J. H.  $\alpha\beta$ 8 integrin adhesion and signaling pathways in development, physiology and disease. *J Cell Sci* **133**, jcs239434 (2020).
58. Koivisto, L., Bi, J., Häkkinen, L. & Larjava, H. Integrin  $\alpha\beta$ 6: Structure, function and role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* **99**, 186–196 (2018).
59. Jenkins, G. The role of proteases in transforming growth factor-beta activation. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 1068–1078 (2008).

60. Mu, D. *et al.* The integrin alpha(v)beta8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF-beta1. *J Cell Biol* **157**, 493–507 (2002).
61. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912–1934 (2002).
62. Shi, Y. & Massagué, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685–700 (2003).
63. Gauldie, J., Bonniaud, P., Sime, P., Ask, K. & Kolb, M. TGF-beta, Smad3 and the process of progressive fibrosis. *Biochem Soc Trans* **35**, 661–664 (2007).
64. Terashima, H. *et al.* Attenuation of pulmonary fibrosis in type I collagen-targeted reporter mice with ALK-5 inhibitors. *Pulm Pharmacol Ther* **54**, 31–38 (2019).
65. Martinez-Hackert, E., Sundan, A. & Holien, T. Receptor binding competition: A paradigm for regulating TGF- $\beta$  family action. *Cytokine Growth Factor Rev* **57**, 39–54 (2021).
66. Finnsen, K. W., Almadani, Y. & Philip, A. Non-canonical (non-SMAD2/3) TGF- $\beta$  signaling in fibrosis: Mechanisms and targets. *Semin Cell Dev Biol* **101**, 115–122 (2020).
67. Aashaq, S. *et al.* TGF- $\beta$  signaling: A recap of SMAD-independent and SMAD-dependent pathways. *J Cell Physiol* **237**, 59–85 (2022).
68. de Caestecker, M. P. *et al.* The Smad4 activation domain (SAD) is a proline-rich, p300-dependent transcriptional activation domain. *J Biol Chem* **275**, 2115–2122 (2000).
69. Samanta, D. Alterations in the Smad pathway in human cancers. *Front Biosci* **17**, 1281 (2012).
70. Wrana, J. L. & Attisano, L. The Smad pathway. *Cytokine Growth Factor Rev* **11**, 5–13 (2000).
71. Derynck, R. & Zhang, Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**, 577–584 (2003).
72. Hata, A. & Chen, Y.-G. TGF- $\beta$  Signaling from Receptors to Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**, a022061 (2016).
73. Massagué, J. & Wotton, D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* **19**, 1745–1754 (2000).

74. Hill, C. S. Transcriptional Control by the SMADs. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**, a022079 (2016).
75. Zhang, J. *et al.* The regulation of TGF- $\beta$ /SMAD signaling by protein deubiquitination. *Protein Cell* **5**, 503–517 (2014).
76. Hayes, S., Chawla, A. & Corvera, S. TGF beta receptor internalization into EEA1-enriched early endosomes: role in signaling to Smad2. *J Cell Biol* **158**, 1239–1249 (2002).
77. Di Guglielmo, G. M., Le Roy, C., Goodfellow, A. F. & Wrana, J. L. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol* **5**, 410–421 (2003).
78. Yan, X. & Chen, Y.-G. Smad7: not only a regulator, but also a cross-talk mediator of TGF- $\beta$  signalling. *Biochem J* **434**, 1–10 (2011).
79. Dupont, S. *et al.* FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGFbeta signaling, controls Smad4 monoubiquitination. *Cell* **136**, 123–135 (2009).
80. Bellaye, P.-S. *et al.* The small heat-shock protein  $\alpha$ B-crystallin is essential for the nuclear localization of Smad4: impact on pulmonary fibrosis. *J. Pathol.* **232**, 458–472 (2014).
81. Boutanquoi, P.-M. *et al.* TRIM33 prevents pulmonary fibrosis by impairing TGF- $\beta$ 1 signalling. *Eur Respir J* **55**, 1901346 (2020).
82. Vander Ark, A., Cao, J. & Li, X. TGF- $\beta$  receptors: In and beyond TGF- $\beta$  signaling. *Cell Signal* **52**, 112–120 (2018).
83. Morrison, D. K. MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, a011254 (2012).
84. Costanza, B., Umelo, I., Bellier, J., Castronovo, V. & Turtoi, A. Stromal Modulators of TGF- $\beta$  in Cancer. *JCM* **6**, 7 (2017).
85. Tzavlaki, K. & Moustakas, A. TGF- $\beta$  Signaling. *Biomolecules* **10**, E487 (2020).
86. Pannu, J., Nakerakanti, S., Smith, E., ten Dijke, P. & Trojanowska, M. Transforming growth factor-beta receptor type I-dependent fibrogenic gene program is mediated via activation of Smad1 and ERK1/2 pathways. *J Biol Chem* **282**, 10405–10413 (2007).
87. Kretzschmar, M., Doody, J., Timokhina, I. & Massagué, J. A mechanism of repression of TGFbeta/Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev* **13**, 804–816 (1999).

88. Yu, L., Hébert, M. C. & Zhang, Y. E. TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *EMBO J* **21**, 3749–3759 (2002).
89. Xylourgidis, N. *et al.* Role of dual-specificity protein phosphatase DUSP10/MKP-5 in pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **317**, L678–L689 (2019).
90. Alcorn, J. F. *et al.* c-Jun N-terminal kinase 1 is required for the development of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **40**, 422–432 (2009).
91. Xi, Y. *et al.* Inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition and pulmonary fibrosis by methacycline. *Am J Respir Cell Mol Biol* **50**, 51–60 (2014).
92. Xia, L. *et al.* Role of the NFκB-signaling pathway in cancer. *Onco Targets Ther* **11**, 2063–2073 (2018).
93. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S.-C. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* **2**, 17023 (2017).
94. Wright, J. G. & Christman, J. W. The role of nuclear factor kappa B in the pathogenesis of pulmonary diseases: implications for therapy. *Am J Respir Med* **2**, 211–219 (2003).
95. Hamidi, A. *et al.* Polyubiquitination of transforming growth factor β (TGFβ)-associated kinase 1 mediates nuclear factor-κB activation in response to different inflammatory stimuli. *J Biol Chem* **287**, 123–133 (2012).
96. Zou, M. *et al.* Latent Transforming Growth Factor-β Binding Protein-2 Regulates Lung Fibroblast-to-Myofibroblast Differentiation in Pulmonary Fibrosis via NF-κB Signaling. *Front Pharmacol* **12**, 788714 (2021).
97. Carnero, A., Blanco-Aparicio, C., Renner, O., Link, W. & Leal, J. F. M. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets* **8**, 187–198 (2008).
98. Zhang, X.-L., Xing, R.-G., Chen, L., Liu, C.-R. & Miao, Z.-G. PI3K/Akt signaling is involved in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis via regulation of epithelial-mesenchymal transition. *Mol Med Rep* **14**, 5699–5706 (2016).

99. Finnson, K. W., Almadani, Y. & Philip, A. Non-canonical (non-SMAD2/3) TGF- $\beta$  signaling in fibrosis: Mechanisms and targets. *Semin Cell Dev Biol* **101**, 115–122 (2020).
100. Harrison, D. A. The Jak/STAT pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, a011205 (2012).
101. Spinelli, F. R., Meylan, F., O’Shea, J. J. & Gadina, M. JAK inhibitors: Ten years after. *Eur J Immunol* **51**, 1615–1627 (2021).
102. Villarino, A. V., Kanno, Y. & O’Shea, J. J. Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system. *Nat Immunol* **18**, 374–384 (2017).
103. Montero, P., Milara, J., Roger, I. & Cortijo, J. Role of JAK/STAT in Interstitial Lung Diseases; Molecular and Cellular Mechanisms. *Int J Mol Sci* **22**, 6211 (2021).
104. Pedroza, M. *et al.* STAT-3 contributes to pulmonary fibrosis through epithelial injury and fibroblast-myofibroblast differentiation. *FASEB J* **30**, 129–140 (2016).
105. Akhmetshina, A. *et al.* Rho-associated kinases are crucial for myofibroblast differentiation and production of extracellular matrix in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum* **58**, 2553–2564 (2008).
106. Hinz, B. The role of myofibroblasts in wound healing. *Curr Res Transl Med* **64**, 171–177 (2016).
107. Wynn, T. A. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J. Clin. Invest.* **117**, 524–529 (2007).
108. Hinz, B. & Lagares, D. Evasion of apoptosis by myofibroblasts: a hallmark of fibrotic diseases. *Nat Rev Rheumatol* **16**, 11–31 (2020).
109. Gabbiani, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* **200**, 500–503 (2003).
110. Weiskirchen, R., Weiskirchen, S. & Tacke, F. Organ and tissue fibrosis: Molecular signals, cellular mechanisms and translational implications. *Molecular Aspects of Medicine* **65**, 2–15 (2019).
111. Yang, A. H., Chen, J. Y. & Lin, J. K. Myofibroblastic conversion of mesothelial cells. *Kidney Int* **63**, 1530–1539 (2003).

112. Simsir, A., Fetsch, P., Mehta, D., Zakowski, M. & Abati, A. E-cadherin, N-cadherin, and calretinin in pleural effusions: the good, the bad, the worthless. *Diagn Cytopathol* **20**, 125–130 (1999).
113. Decolonne, N. *et al.* TGF-beta1 induces progressive pleural scarring and subpleural fibrosis. *J Immunol* **179**, 6043–6051 (2007).
114. Mubarak, K. K. *et al.* Parenchymal trafficking of pleural mesothelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal* **39**, 133–140 (2012).
115. Yalcin, N. G., Choong, C. K. C. & Eizenberg, N. Anatomy and pathophysiology of the pleura and pleural space. *Thorac Surg Clin* **23**, 1–10, v (2013).
116. Decolonne, N. *et al.* Bleomycin induces pleural and subpleural fibrosis in the presence of carbon particles. *Eur Respir J* **35**, 176–185 (2010).
117. Wettstein, G. *et al.* Inhibition of HSP27 blocks fibrosis development and EMT features by promoting Snail degradation. *FASEB J* **27**, 1549–1560 (2013).
118. Jagirdar, J. *et al.* Immunohistochemical localization of transforming growth factor beta isoforms in asbestos-related diseases. *Environ Health Perspect* **105 Suppl 5**, 1197–1203 (1997).
119. Harvey, W. & Amlot, P. L. Collagen production by human mesothelial cells in vitro. *J Pathol* **139**, 337–347 (1983).
120. Bucala, R., Spiegel, L. A., Chesney, J., Hogan, M. & Cerami, A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* **1**, 71–81 (1994).
121. Herzog, E. L. & Bucala, R. Fibrocytes in health and disease. *Exp Hematol* **38**, 548–556 (2010).
122. Abe, R., Donnelly, S. C., Peng, T., Bucala, R. & Metz, C. N. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol* **166**, 7556–7562 (2001).
123. Chong, S. G., Sato, S., Kolb, M. & Gauldie, J. Fibrocytes and fibroblasts-Where are we now. *Int J Biochem Cell Biol* **116**, 105595 (2019).
124. Phillips, R. J. *et al.* Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J Clin Invest* **114**, 438–446 (2004).

125. Quan, T. E., Cowper, S., Wu, S.-P., Bockenstedt, L. K. & Bucala, R. Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 598–606 (2004).
126. Kalluri, R. & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **119**, 1420–1428 (2009).
127. Ntlios, P. *et al.* The Role of Microbiome and Virome in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Biomedicines* **9**, 442 (2021).
128. Dutta, P. *et al.* Randomised, double-blind, placebo-controlled pilot trial of omeprazole in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* **74**, 346–353 (2019).
129. Jolly, M. K. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition, a spectrum of states: Role in lung development, homeostasis, and disease. *Dev Dyn* **247**, 346–358 (2018).
130. Kalluri, R. & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **119**, 1420–1428 (2009).
131. Jimenez, S. A. & Piera-Velazquez, S. Endothelial to mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of Systemic Sclerosis-associated pulmonary fibrosis and pulmonary arterial hypertension. Myth or reality? *Matrix Biol* **51**, 26–36 (2016).
132. Piera-Velazquez, S., Mendoza, F. A. & Jimenez, S. A. Endothelial to Mesenchymal Transition (EndoMT) in the Pathogenesis of Human Fibrotic Diseases. *J Clin Med* **5**, E45 (2016).
133. Pardali, E., Sanchez-Duffhues, G., Gomez-Puerto, M. & ten Dijke, P. TGF- $\beta$ -Induced Endothelial-Mesenchymal Transition in Fibrotic Diseases. *IJMS* **18**, 2157 (2017).
134. Yamaguchi, M. *et al.* Pericyte-myofibroblast transition in the human lung. *Biochem Biophys Res Commun* **528**, 269–275 (2020).
135. Rock, J. R. *et al.* Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, E1475-1483 (2011).
136. Sava, P. *et al.* Human pericytes adopt myofibroblast properties in the microenvironment of the IPF lung. *JCI Insight* **2**, e96352 (2017).
137. Barron, L., Gharib, S. A. & Duffield, J. S. Lung Pericytes and Resident Fibroblasts. *The American Journal of Pathology* **186**, 2519–2531 (2016).



138. Hung, C. F., Wilson, C. L. & Schnapp, L. M. Pericytes in the Lung. *Adv Exp Med Biol* **1122**, 41–58 (2019).
139. Carmo-Fernandes, A., Puschkarow, M., Peters, K., Gnipp, S. & Peters, M. The Pathogenic Role of Smooth Muscle Cell-Derived Wnt5a in a Murine Model of Lung Fibrosis. *Pharmaceuticals (Basel)* **14**, 755 (2021).
140. Wynn, T. A., Chawla, A. & Pollard, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* **496**, 445–455 (2013).
141. Wynn, T. A. & Ramalingam, T. R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med* **18**, 1028–1040 (2012).
142. Bartis, D., Mise, N., Mahida, R. Y., Eickelberg, O. & Thickett, D. R. Epithelial-mesenchymal transition in lung development and disease: does it exist and is it important? *Thorax* **69**, 760–765 (2014).
143. Alidadiani, N., Ghaderi, S., Dilaver, N., Bakhshamin, S. & Bayat, M. Epithelial mesenchymal transition Transcription Factor (TF): The structure, function and microRNA feedback loop. *Gene* **674**, 115–120 (2018).
144. Zeisberg, M. & Neilson, E. G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* **119**, 1429–1437 (2009).
145. Tanjore, H. *et al.* Contribution of epithelial-derived fibroblasts to bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **180**, 657–665 (2009).
146. Hill, C. *et al.* Autophagy inhibition-mediated epithelial-mesenchymal transition augments local myofibroblast differentiation in pulmonary fibrosis. *Cell Death Dis* **10**, 591 (2019).
147. Degryse, A. L. *et al.* Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **299**, L442–452 (2010).
148. Kalluri, R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest* **119**, 1417–1419 (2009).
149. Kalluri, R. The biology and function of exosomes in cancer. *J. Clin. Invest.* **126**, 1208–1215 (2016).

150. Salton, F., Volpe, M. C. & Confalonieri, M. Epithelial-Mesenchymal Transition in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Medicina (Kaunas)* **55**, E83 (2019).
151. MacIntyre, N. R. Tissue hypoxia: implications for the respiratory clinician. *Respir Care* **59**, 1590–1596 (2014).
152. Ruthenborg, R. J., 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* **37**, 637–643 (2014).
153. Lokmic, Z., Musyoka, J., Hewitson, T. D. & Darby, I. A. Hypoxia and Hypoxia Signaling in Tissue Repair and Fibrosis. in *International Review of Cell and Molecular Biology* vol. 296 139–185 (Elsevier, 2012).
154. Darby, I. A. & Hewitson, T. D. Hypoxia in tissue repair and fibrosis. *Cell Tissue Res* **365**, 553–562 (2016).
155. Zhou, G. *et al.* Hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition requires mitochondrial ROS and hypoxia-inducible factor 1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **297**, L1120-1130 (2009).
156. Epstein Shochet, G. *et al.* Hypoxia Inducible Factor 1A Supports a Pro-Fibrotic Phenotype Loop in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Int J Mol Sci* **22**, 3331 (2021).
157. Uzunhan, Y. *et al.* Mesenchymal stem cells protect from hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **310**, L439-451 (2016).
158. Guo, L., Xu, J., Liu, L., Liu, S. & Zhu, R. Hypoxia-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition Is Involved in Bleomycin-Induced Lung Fibrosis. *Biomed Res Int* **2015**, 232791 (2015).
159. Zhu, Y. *et al.* HIF-1 $\alpha$  regulates EMT via the Snail and  $\beta$ -catenin pathways in paraquat poisoning-induced early pulmonary fibrosis. *J Cell Mol Med* **20**, 688–697 (2016).
160. Copple, B. L. Hypoxia stimulates hepatocyte epithelial to mesenchymal transition by hypoxia-inducible factor and transforming growth factor-beta-dependent mechanisms. *Liver Int* **30**, 669–682 (2010).
161. Higgins, D. F., Kimura, K., Iwano, M. & Haase, V. H. Hypoxia-inducible factor signaling in the development of tissue fibrosis. *Cell Cycle* **7**, 1128–1132 (2008).

162. Higgins, D. F. *et al.* Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **117**, 3810–3820 (2007).
163. Kabei, K. *et al.* Role of hypoxia-inducible factor-1 in the development of renal fibrosis in mouse obstructed kidney: Special references to HIF-1 dependent gene expression of profibrogenic molecules. *Journal of Pharmacological Sciences* **136**, 31–38 (2018).
164. Zhang, H., Xu, R. & Wang, Z. Contribution of Oxidative Stress to HIF-1-Mediated Profibrotic Changes during the Kidney Damage. *Oxid Med Cell Longev* **2021**, 6114132 (2021).
165. Haase, V. H. Pathophysiological Consequences of HIF Activation: HIF as a modulator of fibrosis. *Ann N Y Acad Sci* **1177**, 57–65 (2009).
166. Wei, X. *et al.* Recent advances in understanding the role of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in renal fibrosis. *Int Urol Nephrol* **52**, 1287–1295 (2020).
167. Xiong, M. *et al.* Intermittent hypoxia increases ROS/HIF-1 $\alpha$  'related oxidative stress and inflammation and worsens bleomycin-induced pulmonary fibrosis in adult male C57BL/6J mice. *Int Immunopharmacol* **100**, 108165 (2021).
168. Haine, L. *et al.* Sleep Apnea in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Molecular Investigation in an Experimental Model of Fibrosis and Intermittent Hypoxia. *Life (Basel)* **11**, 973 (2021).
169. Gille, T. *et al.* Intermittent Hypoxia Increases the Severity of Bleomycin-Induced Lung Injury in Mice. *Oxid Med Cell Longev* **2018**, 1240192 (2018).
170. Bi, W.-R., Yang, C.-Q. & Shi, Q. Transforming growth factor- $\beta$ 1 induced epithelial-mesenchymal transition in hepatic fibrosis. *Hepatogastroenterology* **59**, 1960–1963 (2012).
171. Winocour, S., Vorstenbosch, J., Trzeciak, A., Lessard, L. & Philip, A. CD109, a novel TGF- $\beta$  antagonist, decreases fibrotic responses in a hypoxic wound model. *Exp Dermatol* **23**, 475–479 (2014).
172. Delbrel, E. *et al.* ER Stress is Involved in Epithelial-To-Mesenchymal Transition of Alveolar Epithelial Cells Exposed to a Hypoxic Microenvironment. *Int J Mol Sci* **20**, E1299 (2019).
173. Shi, Z. *et al.* Attenuation of intermittent hypoxia-induced apoptosis and fibrosis in pulmonary tissues via suppression of ER stress activation. *BMC Pulm Med* **20**, 92 (2020).

174. Phan, T. H. G. *et al.* Emerging cellular and molecular determinants of idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell Mol Life Sci* **78**, 2031–2057 (2021).
175. Xie, N. *et al.* Glycolytic Reprogramming in Myofibroblast Differentiation and Lung Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **192**, 1462–1474 (2015).
176. Bargagli, E. *et al.* Metabolic Dysregulation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Int J Mol Sci* **21**, E5663 (2020).
177. Wang, Z. *et al.* Pharmaceutical targeting of succinate dehydrogenase in fibroblasts controls bleomycin-induced lung fibrosis. *Redox Biol* **46**, 102082 (2021).
178. Mao, J. *et al.* Hypoxia-induced interstitial transformation of microvascular endothelial cells by mediating HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling in systemic sclerosis. *PLoS One* **17**, e0263369 (2022).
179. Tanguy, J. *et al.* Extracellular Heat Shock Proteins as Therapeutic Targets and Biomarkers in Fibrosing Interstitial Lung Diseases. *Int J Mol Sci* **22**, 9316 (2021).
180. Barratt, S. L. *et al.* Effects of hypoxia and hyperoxia on the differential expression of VEGF-A isoforms and receptors in Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF). *Respir Res* **19**, 9 (2018).
181. Rius, J. *et al.* NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature* **453**, 807–811 (2008).
182. Bandarra, D., Biddlestone, J., Mudie, S., Müller, H.-A. J. & Rocha, S. HIF-1 $\alpha$  restricts NF- $\kappa$ B-dependent gene expression to control innate immunity signals. *Dis Model Mech* **8**, 169–181 (2015).
183. D’Ignazio, L., Bandarra, D. & Rocha, S. NF- $\kappa$ B and HIF crosstalk in immune responses. *FEBS J* **283**, 413–424 (2016).
184. Braun, R. K. *et al.* Chronic intermittent hypoxia worsens bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *Respir Physiol Neurobiol* **256**, 97–108 (2018).
185. Jiang, H., Zhu, Y. S., Xu, H., Sun, Y. & Li, Q. F. Inflammatory stimulation and hypoxia cooperatively activate HIF-1{alpha} in bronchial epithelial cells: involvement of PI3K and NF-{kappa}B. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **298**, L660-669 (2010).
186. Malkov, M. I., Lee, C. T. & Taylor, C. T. Regulation of the Hypoxia-Inducible Factor (HIF) by Pro-Inflammatory Cytokines. *Cells* **10**, 2340 (2021).

187. Acosta-Iborra, B. *et al.* Macrophage oxygen sensing modulates antigen presentation and phagocytic functions involving IFN-gamma production through the HIF-1 alpha transcription factor. *J Immunol* **182**, 3155–3164 (2009).
188. Kim, S. Y. *et al.* Hypoxic stress up-regulates the expression of Toll-like receptor 4 in macrophages via hypoxia-inducible factor. *Immunology* **129**, 516–524 (2010).
189. Frede, S., Berchner-Pfannschmidt, U. & Fandrey, J. Regulation of hypoxia-inducible factors during inflammation. *Methods Enzymol* **435**, 405–419 (2007).
190. Korbecki, J. *et al.* Chronic and Cycling Hypoxia: Drivers of Cancer Chronic Inflammation through HIF-1 and NF-κB Activation: A Review of the Molecular Mechanisms. *Int J Mol Sci* **22**, 10701 (2021).
191. Li, X. *et al.* Investigation of a Hypoxia-Immune-Related Microenvironment Gene Signature and Prediction Model for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Front Immunol* **12**, 629854 (2021).
192. Liu, J., Gu, L. & Li, W. The Prognostic Value of Integrated Analysis of Inflammation and Hypoxia-Related Genes in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Front Immunol* **13**, 730186 (2022).
193. Romero, Y. & Aquino-Gálvez, A. Hypoxia in Cancer and Fibrosis: Part of the Problem and Part of the Solution. *Int J Mol Sci* **22**, 8335 (2021).
194. Mylonis, I., Simos, G. & Paraskeva, E. Hypoxia-Inducible Factors and the Regulation of Lipid Metabolism. *Cells* **8**, E214 (2019).
195. Shay, J. E. S. & Celeste Simon, M. Hypoxia-inducible factors: crosstalk between inflammation and metabolism. *Semin Cell Dev Biol* **23**, 389–394 (2012).
196. Nakagawa, H. *et al.* Quantitative CT analysis of honeycombing area in idiopathic pulmonary fibrosis: Correlations with pulmonary function tests. *Eur J Radiol* **85**, 125–130 (2016).
197. Sverzellati, N., De Filippo, M., Bartalena, T., Piciucchi, S. & Zompatori, M. High-resolution computed tomography in the diagnosis and follow-up of idiopathic pulmonary fibrosis. *Radiol Med* **115**, 526–538 (2010).
198. Kwon, B. S. *et al.* Computed tomography patterns predict clinical course of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res* **21**, 295 (2020).

199. Salisbury, M. L. *et al.* Possible UIP pattern on high-resolution computed tomography is associated with better survival than definite UIP in IPF patients. *Respir Med* **131**, 229–235 (2017).
200. Kishaba, T. *et al.* Radiological and Physiological Predictors of IPF Mortality. *Medicina (Kaunas)* **57**, 1121 (2021).
201. Ohkubo, H. *et al.* A Volumetric Computed Tomography Analysis of the Normal Lung in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: The Relationship with the Survival. *Intern Med* **57**, 929–937 (2018).
202. Mohning, M. P., Richards, J. C. & Huie, T. J. Idiopathic pulmonary fibrosis: the radiologist's role in making the diagnosis. *Br J Radiol* **92**, 20181003 (2019).
203. Chen, L., Halai, V., Leandro, A. & Wallis, A. Interstitial Lung Disease: Update on the Role of Computed Tomography in the Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J Comput Assist Tomogr* **43**, 898–905 (2019).
204. Aliyu, S. A. *et al.* Textural analysis demonstrates heterogeneous [<sup>18</sup>F]-fluorodeoxyglucose uptake in radiologically normal lung in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* **52**, 1801138 (2018).
205. Lee, S. H. *et al.* Is 18F-FDG PET/CT useful for the differential diagnosis of solitary pulmonary nodules in patients with idiopathic pulmonary fibrosis? *Ann Nucl Med* **32**, 492–498 (2018).
206. Yoon, H.-Y., Lee, S. H., Ha, S., Ryu, J.-S. & Song, J. W. 18F-FDG PET/CT predicts acute exacerbation in idiopathic pulmonary fibrosis after thoracic surgery. *BMC Pulm Med* **21**, 294 (2021).
207. Yoon, H.-Y., Lee, S. H., Ha, S., Ryu, J.-S. & Song, J. W. The Value of 18F-FDG PET/CT in Evaluating Disease Severity and Prognosis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Patients. *J Korean Med Sci* **36**, e257 (2021).
208. Umeda, Y. *et al.* Prognostic Value of Dual-Time-Point 18F-FDG PET for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J Nucl Med* **56**, 1869–1875 (2015).
209. Justet, A. *et al.* [18F]FDG PET/CT predicts progression-free survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res* **18**, 74 (2017).

210. Bondue, B. *et al.* Absence of early metabolic response assessed by 18F-FDG PET/CT after initiation of antifibrotic drugs in IPF patients. *Respir Res* **20**, 10 (2019).
211. Thureau, S. *et al.* Comparison of Hypermetabolic and Hypoxic Volumes Delineated on [18F]FDG and [18F]Fluoromisonidazole PET/CT in Non-small-cell Lung Cancer Patients. *Mol Imaging Biol* **22**, 764–771 (2020).
212. Wang, H. *et al.* Radiosensitizing effect of irisinquinone on glioma through the downregulation of HIF-1 $\alpha$  evaluated by 18F-FDG and 18F-FMISO PET/CT. *Nucl Med Commun* **37**, 705–714 (2016).
213. Tashiro, J. *et al.* Exploring Animal Models That Resemble Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Front Med (Lausanne)* **4**, 118 (2017).
214. B Moore, B. *et al.* Animal models of fibrotic lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* **49**, 167–179 (2013).
215. Jules-Elysee, K. & White, D. A. Bleomycin-induced pulmonary toxicity. *Clin Chest Med* **11**, 1–20 (1990).
216. Martin, W. G. *et al.* Bleomycin pulmonary toxicity has a negative impact on the outcome of patients with Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* **23**, 7614–7620 (2005).
217. Shippee, B. M., Bates, J. S. & Richards, K. L. The role of screening and monitoring for bleomycin pulmonary toxicity. *J Oncol Pharm Pract* **22**, 308–312 (2016).
218. Rimmer, M. J., Dixon, A. K., Flower, C. D. & Sikora, K. Bleomycin lung: computed tomographic observations. *Br J Radiol* **58**, 1041–1045 (1985).
219. Tounekti, O., Kenani, A., Foray, N., Orłowski, S. & Mir, L. M. The ratio of single- to double-strand DNA breaks and their absolute values determine cell death pathway. *Br J Cancer* **84**, 1272–1279 (2001).
220. Lazo, J. S. & Humphreys, C. J. Lack of metabolism as the biochemical basis of bleomycin-induced pulmonary toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 3064–3068 (1983).
221. Burgy, O. *et al.* Deglycosylated bleomycin has the antitumor activity of bleomycin without pulmonary toxicity. *Sci Transl Med* **8**, 326ra20 (2016).

222. Stefanov, A. N., Fox, J., Depault, F. & Haston, C. K. Positional cloning reveals strain-dependent expression of Trim16 to alter susceptibility to bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *PLoS Genet* **9**, e1003203 (2013).
223. Hoyt, D. G. & Lazo, J. S. Alterations in pulmonary mRNA encoding procollagens, fibronectin and transforming growth factor-beta precede bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **246**, 765–771 (1988).
224. Moeller, A., Ask, K., Warburton, D., Gauldie, J. & Kolb, M. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 362–382 (2008).
225. Cross, J. *et al.* AQX-1125, small molecule SHIP1 activator inhibits bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Br J Pharmacol* **174**, 3045–3057 (2017).
226. Tanaka, K.-I. *et al.* Protective and therapeutic effect of felodipine against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Sci Rep* **7**, 3439 (2017).
227. Chua, F., Gauldie, J. & Laurent, G. J. Pulmonary fibrosis: searching for model answers. *Am J Respir Cell Mol Biol* **33**, 9–13 (2005).
228. Sime, P. J., Xing, Z., Graham, F. L., Csaky, K. G. & Gauldie, J. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J Clin Invest* **100**, 768–776 (1997).
229. Decolgne, N. *et al.* TGF-beta1 induces progressive pleural scarring and subpleural fibrosis. *J Immunol* **179**, 6043–6051 (2007).
230. Decolgne, N. *et al.* Bleomycin induces pleural and subpleural fibrosis in the presence of carbon particles. *Eur Respir J* **35**, 176–185 (2010).
231. Lanneau, D., Wettstein, G., Bonniaud, P. & Garrido, C. Heat shock proteins: cell protection through protein triage. *ScientificWorldJournal* **10**, 1543–1552 (2010).
232. Arrigo, A.-P. [Heat shock proteins as molecular chaperones]. *Med Sci (Paris)* **21**, 619–625 (2005).



233. Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M. & Hartl, F. U. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu Rev Biochem* **82**, 323–355 (2013).
234. Balch, W. E., Morimoto, R. I., Dillin, A. & Kelly, J. W. Adapting Proteostasis for Disease Intervention. *Science* **319**, 916–919 (2008).
235. Tsaytler, P. A., Krijgsveld, J., Goerdayal, S. S., Rüdiger, S. & Egmond, M. R. Novel Hsp90 partners discovered using complementary proteomic approaches. *Cell Stress Chaperones* **14**, 629–638 (2009).
236. Sreedhar, A. S., Kalmár, E., Csermely, P. & Shen, Y.-F. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett.* **562**, 11–15 (2004).
237. Pearl, L. H. & Prodromou, C. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu Rev Biochem* **75**, 271–294 (2006).
238. Backe, S. J., Sager, R. A., Woodford, M. R., Makedon, A. M. & Mollapour, M. Post-translational modifications of Hsp90 and translating the chaperone code. *Journal of Biological Chemistry* **295**, 11099–11117 (2020).
239. Jegou, G., Hazoumé, A., Seigneuric, R. & Garrido, C. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett* **332**, 275–285 (2013).
240. Sontake, V. *et al.* Hsp90 regulation of fibroblast activation in pulmonary fibrosis. *JCI Insight* **2**, e91454 (2017).
241. Li, X. *et al.* Myricetin ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by inhibiting TGF- $\beta$  signaling via targeting HSP90 $\beta$ . *Biochem Pharmacol* **178**, 114097 (2020).
242. Bellaye, P.-S., Burgy, O., Causse, S., Garrido, C. & Bonniaud, P. Heat shock proteins in fibrosis and wound healing: Good or evil? *Pharmacology & Therapeutics* **143**, 119–132 (2014).
243. Sibinska, Z. *et al.* Amplified canonical transforming growth factor- $\beta$  signalling *via* heat shock protein 90 in pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* **49**, 1501941 (2017).
244. Cheng, C.-F. *et al.* Transforming growth factor alpha (TGF $\alpha$ )-stimulated secretion of HSP90 $\alpha$ : using the receptor LRP-1/CD91 to promote human skin cell migration against a TGF $\beta$ -rich environment during wound healing. *Mol Cell Biol* **28**, 3344–3358 (2008).

245. Dong, H. *et al.* Blockade of extracellular heat shock protein 90 $\alpha$  by 1G6-D7 attenuates pulmonary fibrosis through inhibiting ERK signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **313**, L1006–L1015 (2017).
246. Bellaye, P.-S. *et al.* Synergistic role of HSP90 $\alpha$  and HSP90 $\beta$  to promote myofibroblast persistence in lung fibrosis. *Eur Respir J* **51**, 1700386 (2018).
247. Bonniaud, P., Burgy, O. & Garrido, C. Heat shock protein-90 toward theranostics: a breath of fresh air in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* **51**, 1702612 (2018).
248. Albakova, Z., Armeev, G. A., Kanevskiy, L. M., Kovalenko, E. I. & Sapozhnikov, A. M. HSP70 Multi-Functionality in Cancer. *Cells* **9**, E587 (2020).
249. Kumar, S., Tomar, M. S. & Acharya, A. HSF1-mediated regulation of tumor cell apoptosis: a novel target for cancer therapeutics. *Future Oncol* **9**, 1573–1586 (2013).
250. Rosenzweig, R., Nillegoda, N. B., Mayer, M. P. & Bukau, B. The Hsp70 chaperone network. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**, 665–680 (2019).
251. Alderson, T. R., Kim, J. H. & Markley, J. L. Dynamical Structures of Hsp70 and Hsp70-Hsp40 Complexes. *Structure* **24**, 1014–1030 (2016).
252. Abildgaard, A. B. *et al.* Co-Chaperones in Targeting and Delivery of Misfolded Proteins to the 26S Proteasome. *Biomolecules* **10**, 1141 (2020).
253. Sellares, J. *et al.* Intracellular Heat Shock Protein 70 Deficiency in Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **60**, 629–636 (2019).
254. Fujibayashi, T. *et al.* Protective effect of geranylgeranylacetone, an inducer of heat shock protein 70, against drug-induced lung injury/fibrosis in an animal model. *BMC Pulm Med* **9**, 45 (2009).
255. Yun, C.-H. *et al.* Geldanamycin inhibits TGF-beta signaling through induction of Hsp70. *Arch Biochem Biophys* **495**, 8–13 (2010).
256. Zhou, Y. *et al.* HSP72 inhibits Smad3 activation and nuclear translocation in renal epithelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* **21**, 598–609 (2010).

257. Zhang, X., Zhang, X., Huang, W. & Ge, X. The role of heat shock proteins in the regulation of fibrotic diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **135**, 111067 (2021).
258. Kahloon, R. A. *et al.* Patients with idiopathic pulmonary fibrosis with antibodies to heat shock protein 70 have poor prognoses. *Am J Respir Crit Care Med* **187**, 768–775 (2013).
259. Mills, R. *et al.* Intrapulmonary Autoantibodies to HSP72 Are Associated with Improved Outcomes in IPF. *J Immunol Res* **2019**, 1845128 (2019).
260. González-Ramos, M. *et al.* HSP70 increases extracellular matrix production by human vascular smooth muscle through TGF- $\beta$ 1 up-regulation. *Int J Biochem Cell Biol* **45**, 232–242 (2013).
261. Taguchi, T. & Razzaque, M. S. The collagen-specific molecular chaperone HSP47: is there a role in fibrosis? *Trends Mol Med* **13**, 45–53 (2007).
262. Mala, J. G. S. & Rose, C. Interactions of heat shock protein 47 with collagen and the stress response: an unconventional chaperone model? *Life Sci* **87**, 579–586 (2010).
263. Bellaye, P.-S., Burgy, O., Bonniaud, P. & Kolb, M. HSP47: a potential target for fibrotic diseases and implications for therapy. *Expert Opin Ther Targets* **25**, 49–62 (2021).
264. Ruigrok, M. J. R. *et al.* Silencing Heat Shock Protein 47 (HSP47) in Fibrogenic Precision-Cut Lung Slices: A Surprising Lack of Effects on Fibrogenesis? *Front. Med.* **8**, 607962 (2021).
265. Kakugawa, T. *et al.* Serum heat shock protein 47 levels are elevated in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell Stress Chaperones* **18**, 581–590 (2013).
266. Van Montfort, R., Slingsby, C. & Vierling, E. Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones. *Adv Protein Chem* **59**, 105–156 (2001).
267. Mymrikov, E. V., Daake, M., Richter, B., Haslbeck, M. & Buchner, J. The Chaperone Activity and Substrate Spectrum of Human Small Heat Shock Proteins. *J Biol Chem* **292**, 672–684 (2017).
268. Haslbeck, M., Weinkauff, S. & Buchner, J. Small heat shock proteins: Simplicity meets complexity. *J Biol Chem* **294**, 2121–2132 (2019).
269. Arrigo, A.-P. *et al.* Hsp27 (HspB1) and alphaB-crystallin (HspB5) as therapeutic targets. *FEBS Lett* **581**, 3665–3674 (2007).

270. Acunzo, J., Katsogiannou, M. & Rocchi, P. Small heat shock proteins HSP27 (HspB1),  $\alpha$ B-crystallin (HspB5) and HSP22 (HspB8) as regulators of cell death. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **44**, 1622–1631 (2012).
271. Sheng, B. *et al.* Increased HSP27 correlates with malignant biological behavior of non-small cell lung cancer and predicts patient's survival. *Sci Rep* **7**, 13807 (2017).
272. Bodzek, P., Damasiewicz-Bodzek, A., Janosz, I., Witek, L. & Olejek, A. Heat shock protein 27 (HSP27) in patients with ovarian cancer. *Ginekol Pol* **92**, 837–843 (2021).
273. Parcellier, A. *et al.* HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaB $\alpha$  proteasomal degradation. *Mol Cell Biol* **23**, 5790–5802 (2003).
274. Shiota, M. *et al.* Hsp27 regulates epithelial mesenchymal transition, metastasis, and circulating tumor cells in prostate cancer. *Cancer Res* **73**, 3109–3119 (2013).
275. Choi, B. *et al.* Sensitization of lung cancer cells by altered dimerization of HSP27. *Oncotarget* **8**, 105372–105382 (2017).
276. Heinrich, J. C. *et al.* New HSP27 inhibitors efficiently suppress drug resistance development in cancer cells. *Oncotarget* **7**, 68156–68169 (2016).
277. Heinrich, J.-C., Tuukkanen, A., Schroeder, M., Fahrigr, T. & Fahrigr, R. RP101 (brivudine) binds to heat shock protein HSP27 (HSPB1) and enhances survival in animals and pancreatic cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* **137**, 1349–1361 (2011).
278. Kim, J. H. *et al.* Overcoming HSP27-mediated resistance by altered dimerization of HSP27 using small molecules. *Oncotarget* **7**, 53178–53190 (2016).
279. Gibert, B. *et al.* Targeting heat shock protein 27 (HspB1) interferes with bone metastasis and tumour formation in vivo. *Br. J. Cancer* **107**, 63–70 (2012).
280. Korfei, M. *et al.* Comparative proteomic analysis of lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and lung transplant donor lungs. *J Proteome Res* **10**, 2185–2205 (2011).
281. Wang, G., Jiao, H., Zheng, J.-N. & Sun, X. HSP27 regulates TGF- $\beta$  mediated lung fibroblast differentiation through the Smad3 and ERK pathways. *Int J Mol Med* **39**, 183–190 (2017).

282. Kim, J.-Y. *et al.* The Hsp27-Mediated I $\kappa$ B $\alpha$ -NF $\kappa$ B Signaling Axis Promotes Radiation-Induced Lung Fibrosis. *Clin Cancer Res* **25**, 5364–5375 (2019).
283. Spigel, D. R. *et al.* A Randomized, Double-Blinded, Phase II Trial of Carboplatin and Pemetrexed with or without Apatorsen (OGX-427) in Patients with Previously Untreated Stage IV Non-Squamous-Non-Small-Cell Lung Cancer: The SPRUCE Trial. *Oncologist* **24**, e1409–e1416 (2019).
284. Jin, C. *et al.* Human myocardium releases heat shock protein 27 (HSP27) after global ischemia: the proinflammatory effect of extracellular HSP27 through toll-like receptor (TLR)-2 and TLR4. *Mol Med* **20**, 280–289 (2014).
285. Thuringer, D. *et al.* Extracellular HSP27 mediates angiogenesis through Toll-like receptor 3. *FASEB J* **27**, 4169–4183 (2013).
286. De, A. K., Kodys, K. M., Yeh, B. S. & Miller-Graziano, C. Exaggerated human monocyte IL-10 concomitant to minimal TNF- $\alpha$  induction by heat-shock protein 27 (Hsp27) suggests Hsp27 is primarily an antiinflammatory stimulus. *J Immunol* **165**, 3951–3958 (2000).
287. Salari, S. *et al.* Extracellular HSP27 acts as a signaling molecule to activate NF- $\kappa$ B in macrophages. *Cell Stress Chaperones* **18**, 53–63 (2013).
288. Banerjee, S. *et al.* Heat shock protein 27 differentiates tolerogenic macrophages that may support human breast cancer progression. *Cancer Res* **71**, 318–327 (2011).
289. Shi, C., Ulke-Lemée, A., Deng, J., Batulan, Z. & O'Brien, E. R. Characterization of heat shock protein 27 in extracellular vesicles: a potential anti-inflammatory therapy. *FASEB J* **33**, 1617–1630 (2019).
290. Hayashi, J. & Carver, J. A. The multifaceted nature of  $\alpha$ B-crystallin. *Cell Stress Chaperones* **25**, 639–654 (2020).
291. Mao, Y.-W., Liu, J.-P., Xiang, H. & Li, D. W.-C. Human  $\alpha$ A- and  $\alpha$ B-crystallins bind to Bax and Bcl-X(S) to sequester their translocation during staurosporine-induced apoptosis. *Cell Death Differ* **11**, 512–526 (2004).

292. Caporossi, D. *et al.* AlphaB-crystallin and breast cancer: role and possible therapeutic strategies. *Cell Stress Chaperones* **26**, 19–28 (2021).
293. van de Bovenkamp, M., Groothuis, G. M. M., Meijer, D. K. F. & Olinga, P. Liver slices as a model to study fibrogenesis and test the effects of anti-fibrotic drugs on fibrogenic cells in human liver. *Toxicol In Vitro* **22**, 771–778 (2008).
294. Lang, A. *et al.* Expression of small heat shock protein alphaB-crystallin is induced after hepatic stellate cell activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**, G1333-1342 (2000).
295. Huang, X.-Y. *et al.*  $\alpha$ B-crystallin complexes with 14-3-3 $\zeta$  to induce epithelial-mesenchymal transition and resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **57**, 2235–2247 (2013).
296. Chen, Z. *et al.* Discovery of structure-based small molecular inhibitor of  $\alpha$ B-crystallin against basal-like/triple-negative breast cancer development in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res. Treat.* **145**, 45–59 (2014).
297. Talaei, S. *et al.* Spotlight on 17-AAG as an Hsp90 inhibitor for molecular targeted cancer treatment. *Chem Biol Drug Des* **93**, 760–786 (2019).
298. Tanguy, J. *et al.* Extracellular Heat Shock Proteins as Therapeutic Targets and Biomarkers in Fibrosing Interstitial Lung Diseases. *Int J Mol Sci* **22**, 9316 (2021).
299. Hama Amin, B. J. *et al.* Post COVID-19 pulmonary fibrosis; a meta-analysis study. *Annals of Medicine and Surgery* **77**, 103590 (2022).
300. Bouchard, A. *et al.* The GRP94 Inhibitor PU-WS13 Decreases M2-like Macrophages in Murine TNBC Tumors: A Pharmacology-Imaging Study with <sup>99m</sup>Tc-Tilmanocept SPECT. *Cells* **10**, 3393 (2021).
301. Ruscitti, F. *et al.* Longitudinal assessment of bleomycin-induced lung fibrosis by Micro-CT correlates with histological evaluation in mice. *Multidiscip Respir Med* **12**, 8 (2017).
302. Vande Velde, G. *et al.* Longitudinal micro-CT provides biomarkers of lung disease and therapy in preclinical models, thereby revealing compensatory changes in lung volume. *Disease Models & Mechanisms* dmm.020321 (2015) doi:10.1242/dmm.020321.

303. Rodt, T. *et al.* Micro-computed tomography of pulmonary fibrosis in mice induced by adenoviral gene transfer of biologically active transforming growth factor- $\beta$ 1. *Respir Res* **11**, 181 (2010).
304. Cocconcelli, E. *et al.* High-Resolution Computed Tomography (HRCT) Reflects Disease Progression in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF): Relationship with Lung Pathology. *JCM* **8**, 399 (2019).
305. Kim, G. H. J. *et al.* Prediction of idiopathic pulmonary fibrosis progression using early quantitative changes on CT imaging for a short term of clinical 18–24-month follow-ups. *Eur Radiol* **30**, 726–734 (2020).
306. Loeh, B. *et al.* Lung CT Densitometry in Idiopathic Pulmonary Fibrosis for the Prediction of Natural Course, Severity, and Mortality. *Chest* **155**, 972–981 (2019).
307. Lamas, D. J. *et al.* Delayed Access and Survival in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Cohort Study. *Am J Respir Crit Care Med* **184**, 842–847 (2011).
308. Groves, A. M. *et al.* Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Diffuse Parenchymal Lung Disease: Implications from Initial Experience with  $^{18}$ F-FDG PET/CT. *J Nucl Med* **50**, 538–545 (2009).
309. Bodempudi, V. *et al.* miR-210 promotes IPF fibroblast proliferation in response to hypoxia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **307**, L283–L294 (2014).
310. Tzouvelekis, A. *et al.* Comparative Expression Profiling in Pulmonary Fibrosis Suggests a Role of Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  in Disease Pathogenesis. *Am J Respir Crit Care Med* **176**, 1108–1119 (2007).
311. Burman, A. *et al.* Localized hypoxia links ER stress to lung fibrosis through induction of C/EBP homologous protein. *JCI Insight* **3**, e99543 (2018).
312. Delbrel, E. *et al.* HIF-1 $\alpha$  triggers ER stress and CHOP-mediated apoptosis in alveolar epithelial cells, a key event in pulmonary fibrosis. *Sci Rep* **8**, 17939 (2018).
313. Hernández-Agudo, E. *et al.* Monitoring vascular normalization induced by antiangiogenic treatment with  $^{18}$ F-fluoromisonidazole-PET. *Molecular Oncology* **10**, 704–718 (2016).

314. Asano, A. *et al.* Intracellular hypoxia measured by <sup>18</sup>F-fluoromisonidazole positron emission tomography has prognostic impact in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res* **20**, 78 (2018).
315. Quintela-Fandino, M. *et al.* <sup>18</sup>F-fluoromisonidazole PET and Activity of Neoadjuvant Nintedanib in Early HER2-Negative Breast Cancer: A Window-of-Opportunity Randomized Trial. *Clin Cancer Res* **23**, 1432–1441 (2017).
316. Bellaye, P.-S., Burgy, O., Causse, S., Garrido, C. & Bonniaud, P. Heat shock proteins in fibrosis and wound healing: good or evil? *Pharmacol Ther* **143**, 119–132 (2014).
317. Chatterjee, M. *et al.* The PI3K/Akt signaling pathway regulates the expression of Hsp70, which critically contributes to Hsp90-chaperone function and tumor cell survival in multiple myeloma. *Haematologica* **98**, 1132–1141 (2013).
318. Chatterjee, S. & Burns, T. Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach. *IJMS* **18**, 1978 (2017).
319. Chen, Z. *et al.* Discovery of structure-based small molecular inhibitor of  $\alpha$ B-crystallin against basal-like/triple-negative breast cancer development in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat* **145**, 45–59 (2014).
320. Murray, L. A. *et al.* Antifibrotic role of vascular endothelial growth factor in pulmonary fibrosis. *JCI Insight* **2**, e92192 (2017).
321. Fehrenbach, H., Kasper, M., Haase, M., Schuh, D. & Müller, M. Differential immunolocalization of VEGF in rat and human adult lung, and in experimental rat lung fibrosis: Light, fluorescence, and electron microscopy. *Anat. Rec.* **254**, 61–73 (1999).
322. Hamada, N. *et al.* Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Gene Therapy Attenuates Lung Injury and Fibrosis in Mice. *J Immunol* **175**, 1224–1231 (2005).
323. Richeldi, L. *et al.* Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* **370**, 2071–2082 (2014).
324. Hayton, C. & Chaudhuri, N. Managing Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Which Drug for Which Patient? *Drugs Aging* **34**, 647–653 (2017).



325. Jhaveri, K. *et al.* Heat shock protein 90 inhibitors in the treatment of cancer: current status and future directions. *Expert Opin Investig Drugs* **23**, 611–628 (2014).
326. Colak, S. & ten Dijke, P. Targeting TGF- $\beta$  Signaling in Cancer. *Trends in Cancer* **3**, 56–71 (2017).
327. Spagnolo, P. *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis: Disease mechanisms and drug development. *Pharmacology & Therapeutics* **222**, 107798 (2021).
328. Jesús Valle, M. J. de, González López, F. & Sánchez Navarro, A. Pulmonary versus systemic delivery of levofloxacin. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* **21**, 298–303 (2008).
329. Kaminskas, L. M. *et al.* Aerosol Pirfenidone Pharmacokinetics after Inhaled Delivery in Sheep: a Viable Approach to Treating Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Pharm Res* **37**, 3 (2020).
330. Surber, M. W. *et al.* Inhaled nintedanib is well-tolerated and delivers key pharmacokinetic parameters required to treat bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* **63**, 101938 (2020).
331. Liu, J. *et al.* ROS-responsive liposomes as an inhaled drug delivery nanopatform for idiopathic pulmonary fibrosis treatment via Nrf2 signaling. *J Nanobiotechnol* **20**, 213 (2022).
332. Sharp, S. & Workman, P. Inhibitors of the HSP90 Molecular Chaperone: Current Status. in *Advances in Cancer Research* vol. 95 323–348 (Elsevier, 2006).
333. Yun, B.-G. & Matts, R. L. Differential effects of Hsp90 inhibition on protein kinases regulating signal transduction pathways required for myoblast differentiation. *Experimental Cell Research* **307**, 212–223 (2005).
334. Stivarou, T., Stellas, D., Vartzi, G., Thomaidou, D. & Patsavoudi, E. Targeting highly expressed extracellular HSP90 in breast cancer stem cells inhibits tumor growth *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Biology & Therapy* **17**, 799–812 (2016).

## Résumé

La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie chronique, évolutive et mortelle d'origine inconnue. En France, elle figure parmi les pathologies interstitielles (PI) les plus fréquentes et touche 4400 nouvelles personnes chaque année. La FPI est caractérisée par des mécanismes de cicatrisation dérégulés qui induisent l'accumulation de grandes quantités de collagène dans le tissu pulmonaire et provoquent une désorganisation de l'architecture alvéolaire. Elle se manifeste par une détérioration progressive de la fonction respiratoire, conduisant en quelques années à une insuffisance respiratoire chronique puis au décès. Le taux de survie de la fibrose pulmonaire idiopathique est inférieur à celui de nombreux cancers avec une survie médiane de 2 à 5 ans à partir du diagnostic. Cette pathologie, dont le principal facteur de risque outre les facteurs génétiques et environnementaux (cigarette, pollution, etc.) reste l'âge, se manifeste rarement avant 60 ans. Malgré les avancées thérapeutiques récentes réalisées dans le domaine de la fibrose, la FPI reste une maladie incurable et létale. La prise en charge tardive des patients, la complexité du diagnostic et le manque de solutions thérapeutiques et diagnostiques précoces sont autant de points qui expliquent la mortalité associée à cette pathologie. Aujourd'hui, il reste crucial de continuer à identifier les acteurs cellulaires et moléculaires du développement de la FPI afin, d'une part, de développer de nouveaux traitements inhibiteurs et d'autre part, de mettre au point de nouveaux outils diagnostiques plus précoces.

Dans ce contexte, l'étude du rôle des protéines de choc thermique HSPB5 et HSP90 dans la FPI ainsi que des marqueurs de l'hypoxie pourraient apporter de nouvelles solutions thérapeutiques et diagnostiques. L'imagerie de la FPI est en pratique limitée à la tomodesitométrie à haute résolution (HRCT). Cet examen reste souvent insuffisant pour un diagnostic définitif de la maladie et a un impact limité sur la décision thérapeutique et la prise en charge des patients. L'hypoxie pulmonaire est une caractéristique importante de la FPI, mais son rôle sur la progression de la maladie reste méconnu. Ainsi à l'aide d'un modèle préclinique de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine nous avons déterminé *in vivo* que l'imagerie de l'hypoxie au 18F-FMISO pouvait constituer un biomarqueur prédictif de la progression de la maladie et de l'efficacité des traitements par rapport à un autre marqueur utilisé en clinique le 18F-FDG. Nous avons également montré *in vivo* dans notre modèle murin que l'administration d'un inhibiteur (le NCI-41356) de HSPB5, une protéine de choc thermique de bas poids moléculaire connue pour être impliquée dans le développement de la fibrose, permet de réduire la fibrose en modulant l'expression de plusieurs facteurs pro-fibrotiques dont le TGF- $\beta$ . De plus, nous avons montré qu'inhiber la protéine HSP90, surexprimée à la fois au niveau circulant et au sein des tissus fibrotiques des patients atteints de FPI, présente un potentiel intérêt théranostique.

En conclusion, ce travail de thèse a permis de caractériser un potentiel traceur radiopharmaceutique précoce et prédictif de l'évolution de la fibrose pulmonaire ainsi que le rôle anti-fibrotique d'un inhibiteur chimique de la voie canonique du TGF- $\beta$ . Par ailleurs nous espérons que nos résultats concernant la protéine HSP90 pourraient permettre d'envisager l'utilisation théranostique d'anticorps recombinant dirigés contre HSP90 dans le contexte de la FPI.

**Mots clés :** Fibrose pulmonaire, Idiopathique, Hypoxie, HSPB5, HSP90, Biomarqueur, Thérapie, Imagerie moléculaire

## Abstract

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic, progressive and fatal disease of unknown origin. In France, it is one of the most common interstitial pathologies (IP) and affects 4,400 new people each year. IPF is characterized by dysregulated healing mechanisms that lead to the accumulation of large amounts of collagen in the lung tissue and cause disorganization of the alveolar architecture. It results in progressive deterioration of the respiratory function, leading in a few years to chronic respiratory failure and then to death. Idiopathic pulmonary fibrosis has a lower survival rate than many cancers with a median survival of 2 to 5 years from diagnosis. This pathology whose main risk factor, in addition to genetic and environmental factors (cigarettes, pollution, etc.), remains age, rarely occurs before the age of 60. Despite the therapeutic advances made in recent years in the field of fibrosis, IPF remains an incurable and lethal disease. The late management of patients, the complexity of the diagnosis and the lack of therapeutic solutions or early diagnosis strategies are all issues that explain the mortality associated with this pathology. Today, the identification of signaling pathways and key cellular actors involved in IPF development remains crucial in order, on the one hand, to develop new treatments and, on the other hand, to identify new tools for earlier diagnoses.

In this context, the study of the roles of heat shock proteins HSPB5 and HSP90 in idiopathic pulmonary fibrosis as well as markers of hypoxia could provide new therapeutic and diagnostic targets. IPF imaging is in practice limited to high-resolution computed tomography (HRCT). This examination is often insufficient for a definitive diagnosis of the disease and has a limited impact on the therapeutic decision and management of IPF patients. Pulmonary hypoxia is an important feature of IPF, but its role in disease progression remains unknown. Thus, using a preclinical model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis, we have determined *in vivo* that hypoxia imaging with 18F-FMISO could constitute a predictive biomarker of disease progression and treatment efficacy compared to another clinically used marker 18F-FDG. We have also shown *in vivo* in our mouse model that inhibition of HSPB5, a low molecular weight heat shock protein known to be involved in the development of fibrosis, using NCI-41356 allows to reduce fibrosis by modulating the expression of several pro-fibrotic factors including TGF- $\beta$ . In addition, we have also demonstrated that targeting the extracellular HSP90 protein overexpressed in plasma as well as in fibrotic tissues of IPF patients could constitute a potential theranostic tool for fibrosis.

In conclusion, this thesis work has made it possible to characterize a potential early and predictive radiopharmaceutical tracer of the evolution of pulmonary fibrosis as well as the anti-fibrotic role of a chemical inhibitor of the canonical TGF- $\beta$  pathway. Furthermore, we hope that our results concerning the HSP90 protein will make it possible to envisage the theranostic use of recombinant antibodies against HSP90 in the context of IPF.

**Keywords :** Idiopathic pulmonary fibrosis, Hypoxia, HSPB5, HSP90, Biomarker, Therapy, Molecular imaging