



HAL
open science

Étude in vitro des effets de la vitamine D sur le phénotype des fibroblastes pulmonaires humains dans un contexte de pneumopathie interstitielle diffuse

Tom Voisin

► To cite this version:

Tom Voisin. Étude in vitro des effets de la vitamine D sur le phénotype des fibroblastes pulmonaires humains dans un contexte de pneumopathie interstitielle diffuse. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2023. Français. NNT : 2023URENB044 . tel-04439542

HAL Id: tel-04439542

<https://theses.hal.science/tel-04439542v1>

Submitted on 5 Feb 2024

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

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

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES

ECOLE DOCTORALE N° 637
Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : *Sciences pharmaceutiques*

Par

Tom VOISIN

Étude *in vitro* des effets de la vitamine D sur le phénotype des fibroblastes pulmonaires humains dans un contexte de pneumopathie interstitielle diffuse

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 02 novembre 2023

Unité de recherche : UMR Inserm 1085 - Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail (IRSET)

Rapporteurs avant soutenance :

Françoise GOIRAND Maître de conférences - Praticien hospitalier, Université de Bourgogne

Arnaud MAILLEUX Chargé de recherche, Université Paris Cité

Composition du Jury :

Présidente : Sophie LANGOUET-PRIGENT Directrice de recherche, Université de Rennes

Rapporteurs : Françoise GOIRAND Maître de conférences - Praticien hospitalier, Université de Bourgogne

Arnaud MAILLEUX Chargé de recherche, Université Paris Cité

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

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

Invitée : Audrey JOANNES Maître de conférences, Université de Rennes

Remerciements

Je souhaite d'abord remercier les membres de mon jury de thèse qui ont accepté de prendre le temps de lire et d'évaluer mon travail. Je remercie le Dr Françoise Goirand et le Dr Arnaud Mailleux d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs, ainsi que le Dr. Sophie Langouet-Prigent pour sa participation en tant qu'examinatrice et présidente de jury.

J'adresse également mes remerciements à la compagnie pharmaceutique Boehringer Ingelheim qui ont financé ce projet.

Merci au Pr Olivier Fardel et à tous les membres de l'équipe 1 de l'IRSET « Xénobiotiques et barrières » pour votre accueil et votre bienveillance depuis mon arrivée dans l'équipe en Master.

Je souhaite ensuite remercier le Pr Laurent Vernhet d'avoir été mon directeur de thèse. Merci de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail et d'avoir toujours été disponible pendant ces 3 années. Votre encadrement a toujours été agréable et vos conseils/commentaires m'ont appris la rigueur nécessaire à une recherche de qualité.

Je remercie le Dr Stéphane Jouneau d'avoir co-encadré ce travail, en apportant son expertise et ses connaissances cliniques au projet.

Je remercie également le Dr Audrey Joannes pour avoir encadré ma recherche, c'était un plaisir de travailler (et de voyager à en Italie) avec toi. Je te remercie pour tous tes conseils professionnels comme personnels.

Merci encore à vous trois, Audrey, Laurent, Stéphane, pour le temps que vous avez consacré à la relecture de mes travaux et de ce manuscrit.

Je souhaite aussi remercier le Dr Valérie Lecqueur qui m'a toujours encouragé dans mes projets, qui m'a fait découvrir la recherche en santé pulmonaire et avec qui j'ai commencé mon aventure dans l'équipe il y a 4 ans.

Merci à Claudie, indétrônable reine des western blots et sans qui le labo serait en feu. Merci pour ton aide et pour les quelques techniques que tu m'as apprises au laboratoire (c'est-à-dire toutes ?).

Je remercie le Dr Jeremy Amosse avec qui j'ai partagé le meilleur (80^{ème} minute) comme le pire (123^{ème} minute). Merci pour tes conseils de post doctorant et pour les soirées bizarres autour d'une pizza 4 fromages ou dans un resto fermé. Merci aussi à Laura qui est la prochaine sur la liste, ou presque.

Merci au bureau de la team des COPS, Marie K, Valentin et Jen, vous allez devoir faire le check de l'amitié sans moi maintenant.

Merci au bureau du 4^{ème} : Floriantino et ses masterclass, Joan et ses compilations de sub, Rima pour les soirées ciné et la découverte du monde libanais.

Merci à Melany Juavez qui a réchauffé nos cœurs et mis l'ambiance latino pendant trop peu de temps.

Merci à Lili qui m'a beaucoup aidé et soutenu ces 3 années et ces derniers mois. Je serai aussi là pour te soutenir lors de ta thèse et nous pourrons bientôt faire notre grande randonnée le cœur léger.

Enfin merci à ma soeur, mon père et ma mère qui ont participé au bon déroulement de mes études, de ma thèse, et de ma vie au travers de leur soutien et de leur amour inconditionnel.

Table des matières

Liste des figures.....	8
Liste des tableaux.....	10
Liste des abréviations.....	11
Avant-propos.....	12
PARTIE I : INTRODUCTION.....	14
CHAPITRE I : LA FPI.....	14
I. Classification.....	15
II. Définition.....	17
III. Épidémiologie.....	18
IV. Diagnostic.....	18
V. Physiopathologie.....	21
i. Stade 1 : Les cellules épithéliales alvéolaires.....	21
ii. Stade 2 : Les cellules immunitaires.....	22
a. Système immunitaire inné.....	22
b. Système immunitaire adaptatif.....	23
iii. Stade 3 : Développement de la fibrose.....	24
VI. Facteurs de risques.....	25
i. Facteurs environnementaux.....	25
ii. Facteurs génétiques.....	26
iii. Infections.....	26
VII. Biomarqueurs.....	27
VIII. Comorbidités.....	28
i. Hypertension pulmonaire.....	28
ii. Cancer bronchopulmonaire.....	29
iii. Dénutrition.....	29
IX. Traitement de la FPI.....	30
i. Le nintedanib.....	31
ii. La pirfenidone.....	32
iii. Autres traitements.....	33
X. Modèles d'études de la FPI.....	34
CHAPITRE II : Du fibroblaste au myofibroblaste.....	37
I. Rôle des fibroblastes.....	38
II. Rôle des myofibroblastes.....	39

III.	Recrutement et activation des myofibroblastes	40
i.	Origine des myofibroblastes	40
ii.	Le TGF- β	43
a.	Définition	43
b.	Sécrétion.....	43
c.	Activation.....	43
1.	Activation mécanique.....	43
2.	Activation protéolytique	44
3.	Activation par les ERO	45
4.	Activation par le pH.....	45
d.	Différenciation des fibroblastes en myofibroblastes	45
1.	Voie de signalisation.....	45
2.	Sécrétion de matrice extracellulaire (MEC).....	47
3.	Activité contractile	48
4.	La glycolyse aérobie.....	49
iii.	Le PDGF-BB	51
a.	Définition.....	51
b.	Voie de signalisation.....	51
c.	Le cycle cellulaire.....	53
d.	La migration cellulaire	55
iv.	Autres médiateurs impliqués dans l'activation des fibroblastes	55
a.	Les FGF et VEGF	55
b.	La voie Wnt/ β -catenin.....	56
c.	La voie Notch	56
CHAPITRE III : La vitamine D		57
I.	Définition.....	58
i.	Généralités	58
ii.	Pharmacocinétique	59
iii.	Voie de signalisation.....	62
iv.	Effets classiques de la vitamine D : Minéralisation	62
v.	Effets non classiques de la vitamine D	63
a.	Vitamine D et maladies immunitaires	63
b.	Vitamine D et cancer	64
1.	Prolifération.....	64
2.	Métabolisme.....	65
II.	Vitamine D et Fibrogenèse	66

i.	Etudes clinique	66
a.	FPI	66
b.	Sclérodémie systémique	67
c.	Fibrose hépatique.....	67
d.	Autre maladie pulmonaire	67
ii.	Études expérimentales.....	68
iii.	Mécanisme d'action	69
III.	Objectifs de la thèse	72
PARTIE II : Matériels & Méthodes		74
I.	Obtention des biopsies pulmonaires	75
II.	Isolement des fibroblastes pulmonaires	75
III.	Traitements	76
IV.	Étude de la prolifération	77
V.	Étude du cycle cellulaire.....	78
VI.	Étude de la migration cellulaire	79
VII.	Mesure de l'activité contractile.....	79
VIII.	Transfection de siRNA	80
IX.	Analyse de l'expression protéique par Western blot.....	80
X.	Analyse de l'expression des ARNm par RT-qPCR	82
XI.	Étude du métabolisme cellulaire.....	84
XII.	Mesure des concentrations de lactates	86
XIII.	Mesure de l'activité LDH	86
XIV.	Mesure de la concentration sérique en vitamine D.....	86
XV.	Analyses statistiques	87
PARTIE III : Résultats.....		88
I.	Le récepteur à la vitamine D	89
i.	Expression.....	89
ii.	Activité.....	89
II.	Impact de la vitamine D sur la migration des fibroblastes.....	90
III.	Impact de la vitamine D sur la prolifération des fibroblastes	91
i.	Effets sur la prolifération.....	91
ii.	Effets sur le cycle cellulaire	93
iii.	Effets sur les cyclines et CDK	94
iv.	Voie de signalisation.....	95
IV.	Impact de la vitamine D sur la différenciation myofibroblastique.....	96
i.	Les marqueurs de la différenciation.....	96

a.	Effets sur les gènes pro-fibrosants	96
b.	Effets sur la voie de signalisation du TGF- β 1.....	99
ii.	Effets sur l'activité contractile.....	100
V.	Impact de la vitamine D sur le métabolisme des fibroblastes	101
i.	Effets sur la respiration mitochondriale.....	101
ii.	Effets sur la respiration glycolytique	103
a.	Effets sur l'expression des enzymes de la glycolyse.....	106
b.	Effets sur la sécrétion de lactates et l'activité LDH	107
VI.	Statut vitaminique des patients FPI	108
VII.	Effets de la vitamine D sur d'autres PID fibrosantes.....	108
i.	Prolifération.....	109
ii.	Différenciation.....	110
	PARTIE IV : DISCUSSION ET CONCLUSION	112
	ARTICLES.....	121
	RÉFÉRENCES	202

Liste des figures

Figure 1 : Classification des pneumopathies interstitielles diffuses. _____	15
Figure 2 : Pneumopathies interstitielles (PI) fibrosantes ayant un risque élevé (rouge) ou faible (vert) d'évoluer en PI fibrosante progressive. _____	16
Figure 3 : Le pronostic de la FPI est plus sombre que celui de la PINS et des autres PID idiopathiques. _____	17
Figure 4 : Aspect tomodensitométrique de la FPI. _____	18
Figure 5 : Aspect histologique de la FPI. _____	19
Figure 6 : Algorithme diagnostic chez un patient suspecté de FPI. _____	20
Figure 7 : Pathogenèse de la FPI. _____	21
Figure 8 : Le nintedanib et la pirfénidone ont des effets similaires sur la survie des patients. _____	33
Figure 9 : Résumé de l'activité et des fonctions des fibroblastes. _____	39
Figure 10 : Les différents types cellulaires à l'origine des myofibroblastes au cours de la FPI. _____	42
Figure 11 : Activation du TGF- β par interaction de l' α v β 6-intégrine avec le LAP. _____	44
Figure 12 : Activation de la voie de signalisation SMAD par le TGF- β . _____	46
Figure 13 : Représentation de la matrice extracellulaire (MEC) pulmonaire. _____	47
Figure 14 : Stimulation du métabolisme glycolytique par le TGF- β . _____	50
Figure 15 : Activation de la voie de signalisation ERK et AKT par le PDGF-BB. _____	52
Figure 16 : Phases et régulation du cycle cellulaire par les couples cycline/CDK. _____	53
Figure 17 : Voie métabolique de la vitamine D. _____	59
Figure 18 : Effets immunomodulateurs de la vitamine D (1,25(OH) $_2$ D) sur plusieurs lignées de cellules immunitaires. _____	64
Figure 19 : Le taux de vitamine D des patients FPI est inversement corrélé à leur survie. _____	66
Figure 20 : Mécanisme d'interaction entre la voie de signalisation de la vitamine D et du TGF- β . _____	70
Figure 21 : Illustration graphique des objectifs de la thèse. _____	73
Figure 22 : Isolement des fibroblastes pulmonaires humain à partir d'une biopsie chirurgicale. _____	76
Figure 23 : Modèle expérimental utilisé pour étudier les effets de la vitamine D sur les fibroblastes pulmonaires. _____	77
Figure 24 : Illustration de la coloration de du masque de comptage utilisé pour crée une cinétique de prolifération avec le logiciel Incucyte [®] . _____	78
Figure 25 : Spectre de fluorescence obtenu pour étudier le cycle cellulaire (marquage à l'iode de propidium). _____	78
Figure 26 : Principe de fonctionnement de la Chambre de Boyden modifiée. _____	79
Figure 27 : Fonctionnement du Seahorse [®] XF Glycolysis Stress Test et des différents inhibiteurs injectés. _____	85
Figure 28 : Fonctionnement du kit Seahorse [®] XF Glycolysis Stress Test et des différents inhibiteurs injectés. _____	85
Figure 29 : Le VDR est exprimé dans les cultures de fibroblastes pulmonaires humains. _____	89

Figure 30 : Le VDR est actif dans les cultures de fibroblastes FPI. _____	90
Figure 31 : La VD ne prévient pas la migration des fibroblastes FPI. _____	91
Figure 32 : La VD inhibe la prolifération des fibroblastes FPI et contrôle. _____	92
Figure 33 : La VD inhibe la prolifération de façon VDR-dépendante. _____	93
Figure 34 : La VD altère le cycle cellulaire des fibroblastes FPI. _____	94
Figure 35 : La VD altère l'expression protéique des cyclines et des CDK dans les fibroblastes FPI. _____	95
Figure 36 : La VD n'a pas d'effet sur la voie de signalisation canonique du PDGF-BB dans les fibroblastes FPI. _____	96
Figure 37 : Effets de la VD sur les niveaux d'ARNm de gènes pro-fibrosants chez les fibroblastes FPI. _____	97
Figure 38 : La VD diminue les niveaux d'ARNm d'ACTA2 et de COL4A2 dans les fibroblastes FPI et contrôle. _____	97
Figure 39 : Effets de la VD sur l'expression protéique de gènes pro-fibrosants chez les fibroblastes FPI. _____	98
Figure 40 : La VD diminue l'expression protéique d' α -SMA dans les fibroblastes FPI. _____	99
Figure 41 : Effets de la VD sur la voie de signalisation du TGF- β 1 dans les fibroblastes FPI. _____	99
Figure 42 : La VD diminue la phosphorylation de SMAD2 dans les fibroblastes FPI et contrôle. _____	100
Figure 43 : La VD n'a pas d'effet significatif sur l'activité contractile des fibroblastes FPI. _____	101
Figure 44 : La VD n'a pas d'effet sur les paramètres de la chaîne respiratoire mitochondriale. _____	102
Figure 45 : La VD diminue l'acidification basale et l'altération métabolique induites par le TGF- β 1 chez les fibroblastes FPI. _____	103
Figure 46 : La VD inhibe la glycolyse induite par le TGF- β 1 chez les fibroblastes FPI. _____	104
Figure 47 : La VD tend à inhiber la glycolyse induite par le TGF- β 1 chez les fibroblastes contrôle. _____	105
Figure 48 : La VD inhibe la glycolyse de façon VDR-dépendante chez les fibroblastes FPI. _____	105
Figure 49 : La VD diminue l'expression de l'ARNm de LDHA, SLC2A3 et PDK1. _____	106
Figure 50 : La VD inhibe la production de lactate et l'activité de la LDH. _____	107
Figure 51 : Les patients FPI sont carencés en 25(OH) Vitamine D. _____	108
Figure 52 : La VD inhibe la prolifération des fibroblastes de patients PHS (N = 6) et de FEPP (N = 3). _____	109
Figure 53 : La VD diminue les niveaux d'ARNm d'ACTA2 chez les fibroblastes PHS et FEPP. _____	110
Figure 54 : La VD n'a pas d'effet sur l'expression protéique d' α -SMA dans les fibroblastes PHS et FEPP. _____	111
Figure 55 : La VD n'a pas d'effet sur la phosphorylation de SMAD chez les fibroblastes PHS et FEPP. _____	111

Liste des tableaux

Tableau 1 : Avantages et inconvénients des modèles animaux permettant d'étudier les PID.	36
Tableau 2 : Valeurs de référence (nmol/L) définissant la carence, l'insuffisance, les taux recommandés et la toxicité de la vitamine D retrouvées dans la littérature.	58
Tableau 3 : Résumé des effets protecteur de la vitamine D sur la fibrogenèse induite in vitro.	69
Tableau 4 : Liste des anticorps primaires utilisés pour détecter des protéines d'intérêts par western-blot	82
Tableau 5 : Séquences nucléotidiques sens et anti-sens utilisées pour amplifier les ARNm de différents gènes d'intérêt par qPCR.	83

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique	kDa : Kilo Dalton
ANGII : Angiotensine 2	LAP : Latent associated protein
ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament	LBA : Lavage broncho-alvéolaire
ARNm : Acide ribonucléique messenger	LDH : Lactase déshydrogénase
BPCO : Bronchopneumopathie chronique obstructive	MEC : Matrice extracellulaire
BSA : Bovin serum albumin	MMP : Matrix metalloproteinase
CCL : Chemokine ligand	OCR : Oxygen consumption rate
CD : Cellule dendritique	PDC : Pyruvate Dehydrogenase Complex
CDK : Cyclin-Dependent Kinase	PDGF : Platelet-derived growth factor
CEA : Cellule épithéliale alvéolaire	PDK : phosphoinositide 3-kinase
COL : Collagène	PFKB3 : 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Biphosphatase 3
CVF : Capacité vitale forcée	PI : Pneumopathie interstielle
CXCL : Chemiokine ligand	PI3K : Phosphoinositide 3-kinases
DBP : Vitamin D binding protein	PIC : Pneumopathie interstitielle commune
DHA : Acide docosahexaénoïque	PID : Pneumopathies interstitielles diffuses
DLCO : Capacité de diffusion du monoxyde de carbone	PINS : Pneumopathies interstitielles non spécifiques
DMEM : Dubelcco's modified Eagle medium	PKM2 : Pyruvate dehydrogenase kinase
ECAR : Extracellular acidification rate	RT-PCR : Reverse transcription-polymerase chain reaction
EPA : Acide eicosapentaénoïque	siRNA : Small interferent RNA
ERK : Extracellular signal-regulated kinase	SSC : Sclérodémie systémique
ERO : Espèce réactive de l'oxygène	SVF : Sérum de veau fœtal
EtOH : Ethanol	TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse
FDA : Food and drug administration	TGF-β : Transforming growth factor bêta
FFMI : Fat Free Mass Index	TIMP : Tissue Inhibitor of MMP
FGF : Fibroblast growth factor	TNF : Tumor Necrosis Factor
FN : Fibronectine	VD : Vitamine D
FPI : Fibrose pulmonaire idiopathique	VDR : Vitamin D receptor
GAPDH : Glyceraldehyde 3-phosphate déshydrogénase	VEF : Volume expiratoire forcé
GLUT : Glucose transporters	VEGF : Vascular endothelial growth factor
HK2 : Hexokinase-2	α-SMA : Smooth Muscle Actin- α
IL : Interleukine	
ILD : Intertitial lung disease	
IMC : Indice de masse corporelle	

Avant-propos

La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie rare, principalement observée chez les personnes de plus de 60 ans, et dont la prévalence en France est estimée à 8,2 malades pour 100.000 personnes. Cette maladie irréversible est associée à de nombreuses comorbidités et conduit au décès 3 à 5 ans après son diagnostic. La prise en charge thérapeutique actuelle de la FPI permet de ralentir le déclin des fonctions respiratoires mais pas de stopper la maladie. L'équipe 1 « Xénobiotiques et barrières (Xenobar) » de l'Institut de recherche en santé, environnement et travail (IRSET-INSERM UMRS_1085) s'intéresse à la physiopathologie de la FPI depuis plusieurs années. Dans ce cadre, elle a notamment démontré que près d'un tiers des patients souffrant de FPI sont dénutris et que cette dénutrition est associée à une progression plus rapide de la maladie. Par ailleurs, la littérature a mis en évidence les effets bénéfiques de différents nutriments tels que les acides gras polyinsaturés oméga-3 ou la vitamine D sur des modèles murins de fibrose pulmonaire ou hépatique.

Dans ce contexte, l'objectif initial de ma thèse était d'étudier les effets des oméga-3 et de la vitamine D sur le phénotype des fibroblastes pulmonaires humains de patients présentant une FPI. Concernant les oméga-3, l'hypothèse de ce projet était que l'exposition des fibroblastes à l'acide docosahexaénoïque (DHA) et l'acide éicosapentaénoïque (EPA) pourrait modifier leur phénotype myofibroblastique, en induisant leur trans-différenciation en lipofibroblastes. Cependant, nous avons constaté que le DHA et l'EPA étaient toxiques sur notre modèle d'étude, que ce soit à des concentrations physiologiques (25-50 μM) mais également à de très faibles doses (1-5 μM). Associée à cette toxicité, nous avons observé une diminution des marqueurs de la fibrogenèse et une augmentation de l'expression du gène perilipin2 (PLIN2) qui permet la formation et le stockage des gouttelettes lipidiques. Malgré ces résultats suggérant une activité de lipogenèse, nous n'avons pas pu nous affranchir de la toxicité des oméga-3 quel que soit le modèle cellulaire testé. Nous avons donc arrêté d'explorer cette hypothèse.

Nous avons ensuite choisi d'étudier les effets de la vitamine D, qui ne présente pas de toxicité et dont la carence pourrait-être associée à une réduction de la survie des patients atteints de FPI. L'hypothèse de travail ainsi que les résultats de cette étude sont développés tout au long de ce manuscrit. Ce travail fait l'objet d'un article en 1er auteur actuellement

soumis à *The Journal of Nutritional Biochemistry* : « Antifibrotic effects of vitamin D3 on human lung fibroblasts derived from patients with idiopathic pulmonary fibrosis » (Voisin et al.2023).

Par ailleurs, l'équipe s'intéresse au phénotype des fibroblastes d'autres PID fibrosantes non FPI. Dans ce cadre, l'équipe possède une bio-banque de fibroblastes issus de patients présentant notamment une pneumopathie d'hypersensibilité fibrosante et progressive, une sarcoïdose fibrosante progressive ou une fibro-élastose pleuroparenchymateuse. J'ai participé aux travaux visant à caractériser le phénotype de ces fibroblastes primaires via la réalisation de leur séquençage ARN à haut débit dont les résultats sont actuellement en cours d'analyse. J'ai aussi participé à un projet visant à étudier les effets du nintédanib sur les fonctions pro-fibrosantes des fibroblastes issus de ces PID fibrosantes progressives non FPI. Ce projet a fait l'objet d'un article qui est en cours de révision dans *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, sur lequel je suis 2ème auteur et qui est présenté en annexe : « Anti-fibrotic effects of nintedanib on lung fibroblasts derived from patients with Progressive Fibrosing Interstitial Lung Diseases (PF-ILDs) » (Joannes et al.2023).

PARTIE I : INTRODUCTION

CHAPITRE I : LA FPI

I. Classification

Les pneumopathies interstitielles diffuses (PID) regroupent un large spectre de plus de 200 maladies rares. Elles sont définies par des altérations inflammatoires et fibrotiques du parenchyme pulmonaire responsables de lésions des voies respiratoires. Les connaissances cliniques actuelles permettent de distinguer 5 groupes principaux de PID (Figure 1) (Cottin et al., 2022) :

- 1) Les PID idiopathiques qui sont majoritairement représentées par la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) et les pneumopathies interstitielles non spécifiques (PINS) ;
- 2) Les PID auto-immunes qui sont associées à des maladies immunitaires généralisées telles que la sclérodémie systémique ou la polyarthrite rhumatoïde ;
- 3) Les pneumopathies d'hypersensibilité (PHS) qui sont d'origine immuno-allergique et causées par l'inhalation répétée d'antigènes organiques (moisissures, protéines aviaires...) ;
- 4) Les granulomatoses comme la sarcoïdose qui sont caractérisées par une forte accumulation de cellules immunitaires sous forme d'amas appelés « granulomes » ;
- 5) Les autres PID dont notamment les PID causées par des expositions médicamenteuses (traitements anticancéreux) ou professionnelles comme la silicose (silice) et l'asbestose (amiante).

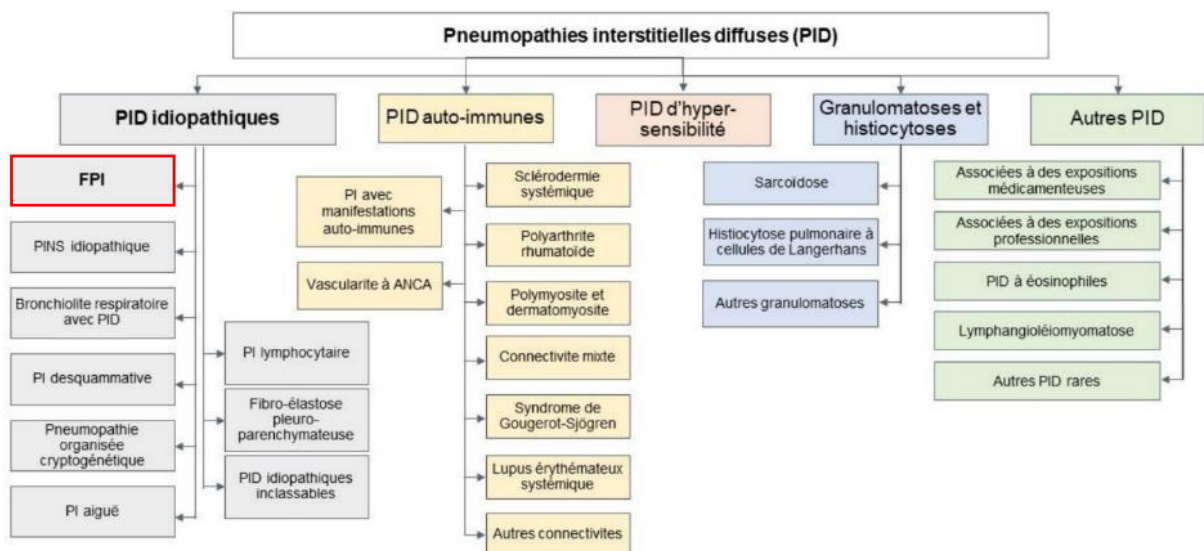


Figure 1: Classification des pneumopathies interstitielles diffuses (Cottin et al ; 2022).

Parmi les différentes PID, certaines se caractérisent par une composante fibrosante progressive qui mène à un déclin très rapide de la qualité de vie des patients (Figure 2). Ces affections partagent des similitudes dans leur évolution clinique, où l'on observe une perte des fonctions pulmonaires et une progression des altérations radiologiques même après une ou deux années de traitements médicamenteux déjà établis (Guler, 2021).

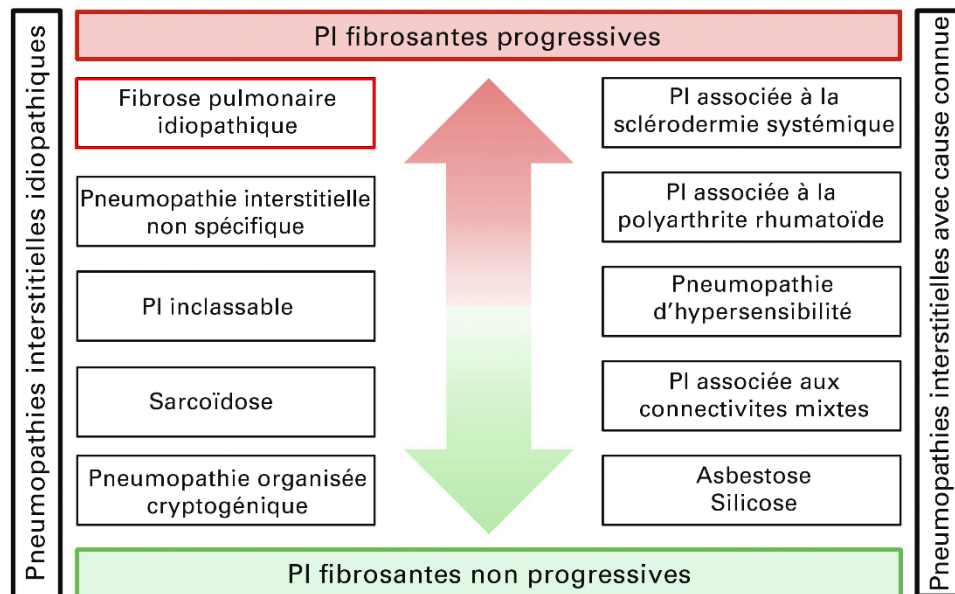


Figure 2: Pneumopathies interstitielles (PI) fibrosantes ayant un risque élevé (rouge) ou faible (vert) d'évoluer en PI fibrosante progressive (Guler 2021).

Ces sous-types de PID sont de plus en plus décrits sous la terminologie de « PID fibrosantes progressives » et rassemblent principalement les pneumopathies associées à la sclérodermie systémique, la polyarthrite rhumatoïde, les PINS et la FPI (Cottin, 2019; Guler, 2021). Cette dernière est la plus fréquente et sévère des PID fibrosantes progressives, avec une composante inflammatoire nécessaire à son déclenchement mais qui est moins décrite dans la progression de la maladie (Hennion et al., 2022).

II. Définition

La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est la forme la plus fréquente de PID fibrosante. Elle présente également le pronostic le plus défavorable, avec une survie moyenne de 2 à 5 ans après diagnostic et un taux de survie à 5 ans aux alentours de 25% (Figure 3) (du Bois, 2012). Bien que les origines et les mécanismes responsables de la FPI ne soient pas encore entièrement compris, la recherche a fait des progrès significatifs dans ce domaine au cours de la dernière décennie. Selon le paradigme actuel, la FPI est causée par une lésion soutenue et répétée de l'épithélium pulmonaire, suivie de l'activation des fibroblastes et de leur différenciation en myofibroblastes (Mei et al., 2022). Ce phénotype myofibroblastique persistant entraîne le dépôt excessif de la matrice extracellulaire (MEC) et une réparation anormale des poumons, conduisant à la formation de cicatrices tissulaires, une distorsion de la structure alvéolaire et une perte de la fonction pulmonaire (Herrera, Henke, et Bitterman 2018). Des traitements tels que la pirfénidone et le nintedanib ont montré une réduction significative du déclin de la fonction pulmonaire et un ralentissement de la progression de la maladie, mais ne sont pas curatifs (Glass et al., 2022).

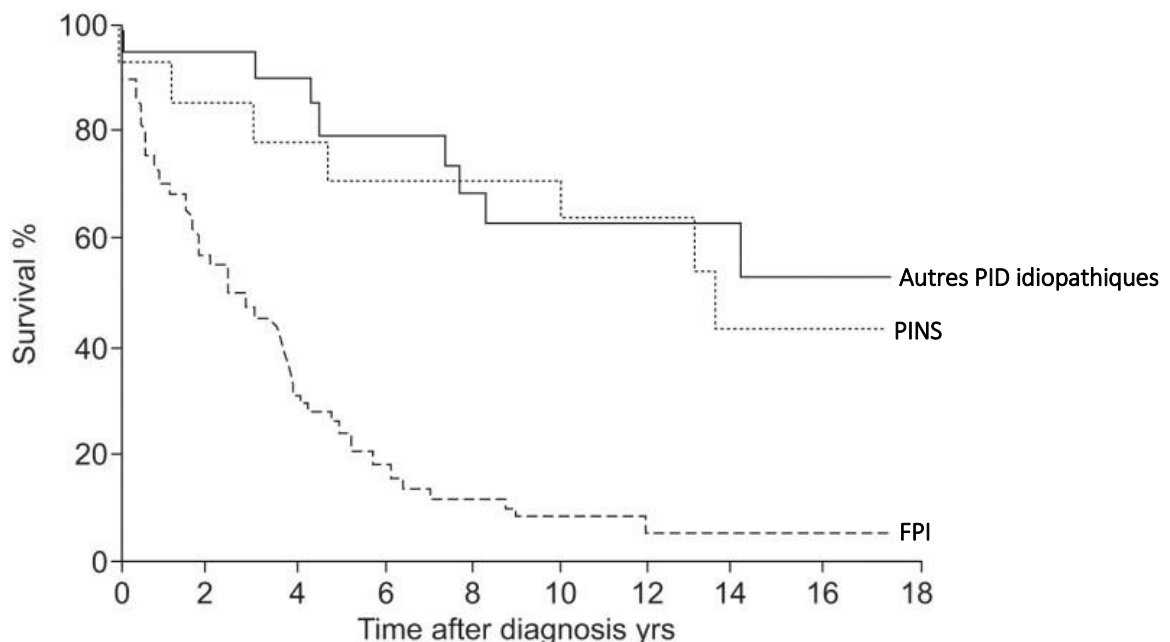


Figure 3 : Le pronostic de la FPI est plus sombre que celui de la PINS et des autres PID idiopathiques. PID : Pneumopathie interstitielle diffuse ; PINS : Pneumopathie interstitielle non spécifiques ; FPI : Fibrose pulmonaire idiopathique (du Bois 2012).

III. Épidémiologie

La FPI se développe à partir de 55 ans majoritairement chez les hommes, avec une moyenne d'âge de 65 ans au diagnostic. Actuellement, trois millions de personnes seraient affectées dans le monde (Hennion et al., 2022). En Europe, sa prévalence est très variable, allant de 1,25 à 23,4 cas pour 100 000 habitants (Funke and Geiser, 2015). En France, elle est estimée à 8,2 cas pour 100 000 habitants, ce qui en fait une maladie rare d'après la définition européenne (Duchemann et al., 2017). Il est important de noter que la prévalence de la FPI augmente fortement avec l'âge, notamment à partir de 65 ans où elle dépasse les 400 cas pour 100 000 habitants, à laquelle s'additionne un taux de survie plus faible (Raghu et al., 2014a). Par conséquent, avec l'allongement général de l'espérance de vie, l'incidence de la FPI devrait continuer à augmenter dans les prochaines années.

IV. Diagnostic

Le patient peut présenter des symptômes respiratoires tels qu'une toux ou une dyspnée d'effort chronique et l'auscultation retrouve des râles crépitants. Pour envisager un diagnostic de FPI, il faut éliminer les causes de PID, les maladies systémiques (connectivites et vascularites), les PID liées à une exposition professionnelle avec antigènes inhalés ou les causes médicamenteuses. Cliniquement, une diminution des fonctions respiratoires est mesurée via un déclin de la capacité vitale forcée (CVF) et de la capacité de diffusion du monoxyde de carbone (DLCO). En parallèle, une tomodensitométrie est indispensable pour détecter un aspect de pneumopathie interstitielle commune (PIC) caractérisées par des kystes sous-

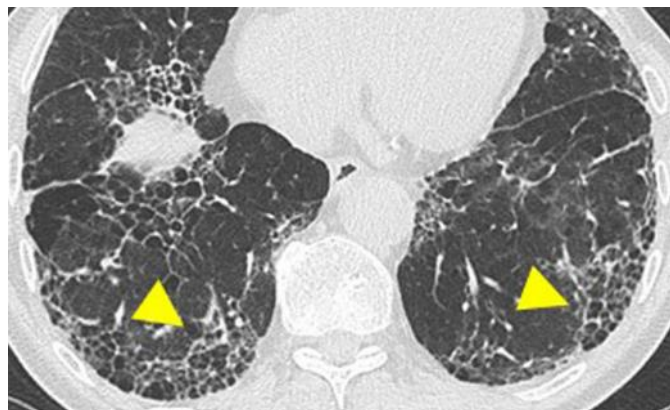


Figure 4: Aspect tomodensitométrique de la FPI. On observe des lésions sous-pleurales en rayon de miel (têtes de flèches) caractéristiques d'une FPI (Cottin et al. 2022).

pleuraux en rayons de miel (PIC certaine, Figure 4) ou des bronchiolectasies de traction distale (PIC probable).

Si ce scanner présente des lésions évocatrices de PIC, PIC certaine ou PIC probable, le diagnostic peut être retenu sans avoir recours à la biopsie pulmonaire. En cas de PIC indéterminée (réticulations sous pleurales mais sans rayon de miel ni bronchiolectasies distales), une biopsie pulmonaire chirurgicale peut être réalisée dans le but de confirmer ou infirmer le diagnostic en histologie. Les lésions histologiques typiques d'une FPI sont caractérisées par une fibrose dense constituée de dépôts de collagène et par la présence de foyers fibroblastiques en périphérie des plages de fibrose (figure 5) (Spagnolo et al., 2015).

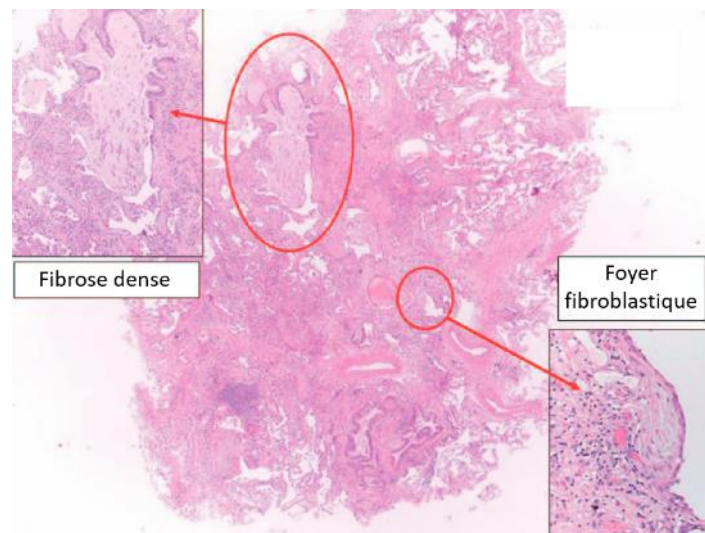


Figure 5: Aspect histologique de la FPI. On observe une fibrose dense bordée par des foyers fibroblastiques. Les dépôts de collagène (rose pâle) et les fibroblastes (noyaux pourpres) sont marqués à l'hématoxyline-éosine (Spagnolo et. al ; 2015).

Un lavage broncho-alvéolaire (LBA) peut également être réalisé pour étudier les populations cellulaires directement présentes dans les alvéoles. Ainsi, un taux élevé de neutrophiles et d'éosinophiles dans le LBA est caractéristique de la FPI (Pesci et al., 2010). Cette numération cellulaire permet de conforter un diagnostic FPI et est recommandée pour les patients suspectés d'infection, de tumeur ou d'exacerbation aiguë. Une hyperlymphocytose sur le LBA doit faire éliminer un diagnostic de PHS fibrosante.

Le diagnostic définitif repose sur une discussion multidisciplinaire entre les cliniciens, anatomopathologistes et radiologues. La figure 6 présente les recommandations à suivre pour poser le diagnostic clinique d'une FPI à partir d'un scanner thoracique seul ou en croisant l'aspect du scanner avec l'aspect histopathologique.

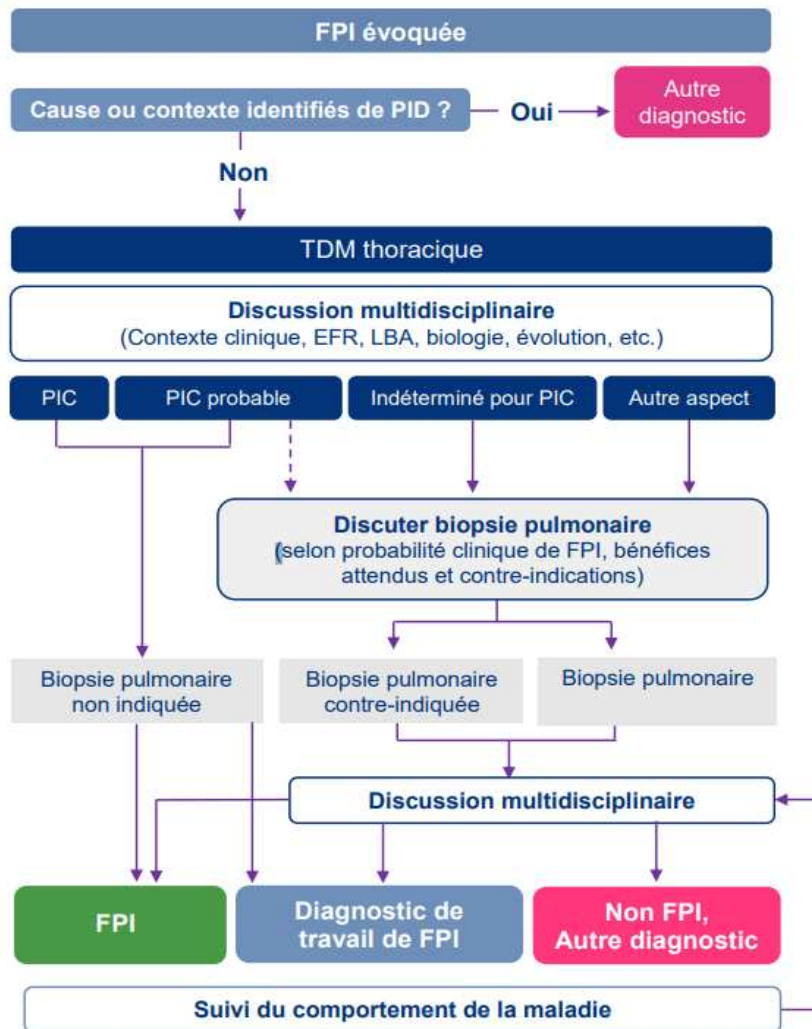


Figure 6 : Algorithme diagnostique chez un patient suspecté de FPI. EFR : exploration fonctionnelle respiratoire ; LBA : lavage broncho-alvéolaire ; PIC : pneumopathie interstitielle commune ; TDM : tomodensitométrie (Cottin 2022)

V. Physiopathologie

La FPI est une maladie complexe régulée par de nombreuses voies de signalisation. Bien que le mécanisme complet de la FPI n'ait pas été élucidé, le paradigme actuel décrit un processus multicellulaire impliquant les cellules épithéliales alvéolaires (CEA), les monocytes/macrophages et les fibroblastes pulmonaires. Ces acteurs cellulaires jouent un rôle déterminant dans le développement de la maladie qui peut être divisé en 3 stades (Figure 7).

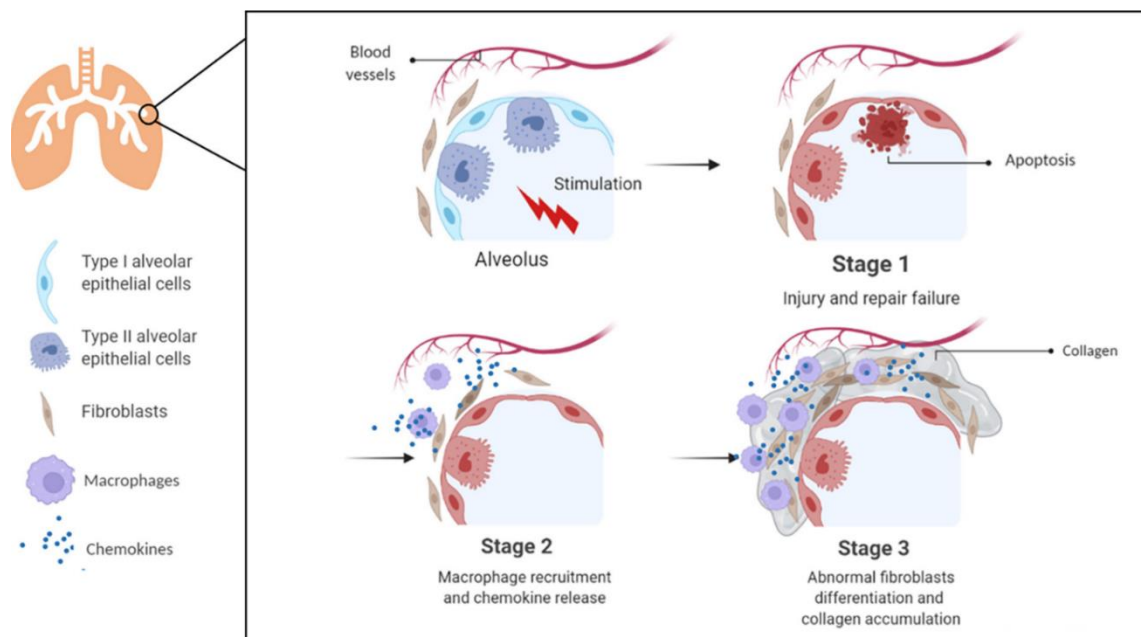


Figure 7: Pathogenèse de la FPI. Suite à des agressions répétées de l'épithélium, les cellules alvéolaires entrent en apoptose (Stade 1), ce qui active le système immunitaire (Stade 2) et entraîne une réponse cicatricielle aberrante (Stade 3). Par Rui Li et al. 2022.

i. Stade 1 : Les cellules épithéliales alvéolaires

Le premier stade se caractérise par une inflammation et des lésions continues du tissu pulmonaire. Les déclencheurs de cette inflammation ne sont pas tous connus, mais divers facteurs tels que les prédispositions génétiques et les expositions environnementales pourraient jouer un rôle (voir partie Facteurs de risques). L'épithélium alvéolaire est constitué à 95% de cellules épithéliales alvéolaires de type I (CEAI) et à 5% de cellules épithéliales alvéolaires de type II (CEAII) (Wang et al., 2018). Les CEAI sont très étendues et tapissent les alvéoles pour effectuer les échanges gazeux depuis l'espace aériens vers les capillaires sanguins. Les CEAII sont plus petites et de forme cubique, avec pour rôle la sécrétion de surfactant mais aussi le renouvellement des CEAI (Ruaro et al., 2021). En effet, les CEAI sont

très sensibles aux agressions extérieures et la différenciation des CEAll en CEAl permet leur remplacement pour maintenir l'homéostasie alvéolaire (Barkauskas et al., 2013; Desai et al., 2014). Dans le cas de la FPI, les CEAll sont souvent endommagées, dysfonctionnelles ou en apoptose suite à un stress persistant (Chakraborty et al., 2022; Selman and Pardo, 2020). C'est en particulier le stress du réticulum endoplasmique causé par les agressions extérieures qui est responsable des lésions des CEAll, car il stimule leur apoptose, une réponse inflammatoire et la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Burman et al., 2018; Cameli et al., 2020; Cheresh et al., 2013). Ainsi, chez la souris, il a été montré que l'induction génétique d'un stress du réticulum endoplasmique induit à lui seul l'apoptose des CEAll, de la fibrose pulmonaire et exacerbe également la fibrose induite par la bléomycine (Burman et al., 2018). La sénescence des CEAll pourrait aussi être un mécanisme responsable de leur apoptose, puisque les souris âgées (24 mois) présentent plus de CEAll apoptotiques et développent une fibrose plus importante que les souris jeunes (2 mois) (Pardo and Selman, 2016; Sueblinvong et al., 2012). Chez les patients FPI, le marqueur de sénescence SA- β -gal (senescence-associated beta-galactosidase) est aussi surexprimé dans les tissus pulmonaires (Minagawa et al., 2011). À ce stade de la maladie, on observe donc une accumulation de cellules apoptotiques non renouvelées, ce qui entraîne la libération de molécules pro-inflammatoires responsables de l'activation du système immunitaire et des fibroblastes locaux.

ii. **Stade 2 : Les cellules immunitaires**

Le second stade de la maladie correspond à une réponse inflammatoire mal contrôlée qui déclenche l'activation des fibroblastes. Cette réponse implique le système immunitaire inné comme adaptatif.

a. *Système immunitaire inné*

Les premières cellules à répondre aux dommages tissulaires sont les neutrophiles et macrophages. Une fois activés, ces derniers sécrètent des chimiokines responsables du recrutement d'autres cellules immunitaires ainsi que des cytokines stimulant la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (Shenderov et al., 2021). Ainsi, le nombre de neutrophiles dans le lavage broncho-alvéolaire (LBA) des patients FPI est inversement corrélé à leurs capacités respiratoires, ce qui suggère un rôle pro-fibrosant du recrutement de ce type cellulaire (Schupp et al., 2015).

En fonction du microenvironnement local, les macrophages pulmonaires jouent aussi un rôle en se polarisant pour avoir une activité soit pro-inflammatoire (polarisation M1) ou anti-inflammatoire/pro-fibrosante (polarisation M2) (Zhang et al., 2018). Les macrophages M2 sécrètent plusieurs facteurs de croissance stimulant l'activation des fibroblastes dont notamment du TGF- β , des FGF, du PDGF ou du VEGF (Braga et al., 2015). Chez les patients FPI présentant une exacerbation aiguë, des concentrations élevées de CCL18, une chimiokine principalement produite par les macrophage M2, ont été mesurées dans leur LBA (Schupp et al., 2015). D'autres études cliniques ont montré une forte augmentation de l'expression génétique des marqueurs M2 et une forte infiltration de ce type de macrophage sur des coupes histologiques de poumons de patients FPI (Hou et al., 2018; Pechkovsky et al., 2010). Enfin, il a été confirmé chez la souris que les macrophages pulmonaires ont une polarisation majoritairement M2 suite à l'induction de la fibrose pulmonaire par la bléomycine, et que ces derniers sont capables *in vitro* d'activer la différenciation des myofibroblastes (Hou et al., 2018).

Les cellules dendritiques (CDs) font le lien entre l'immunité innée et adaptative via la présentation d'antigènes aux lymphocytes T (Vermaelen and Pauwels, 2005). La FPI est souvent associée à une infiltration pulmonaire de CDs que ce soit cliniquement ou dans les modèles animaux (Chakraborty et al., 2017; Marchal-Sommé et al., 2007; Tsoumakidou et al., 2009). Cependant, le rôle des CDs au cours de la maladie est encore discuté (Bocchino et al., 2021; Shin, 2019). Ainsi, dans le modèle bléomycine, une étude chez la souris a montré que l'inactivation pharmacologique des CDs atténue la fibrose pulmonaire (Bantsimba-Malanda et al., 2010), tandis qu'une autre étude a montré que l'activation des CDs par le ligand FMS-like tyrosine kinase 3 l'atténue (Tarrés et al., 2019).

b. Système immunitaire adaptatif

Les lymphocytes B et les lymphocytes T sont également impliqués dans le développement de la FPI. Il a été observé que les lymphocytes B s'accumulent à un stade non-prolifératif dans les poumons des patients, ce qui suggère qu'une inflammation active est toujours présente pendant le développement de la maladie (Marchal-Sommé et al., 2006; Todd et al., 2013). Il a également été rapporté que le sérum comme le LBA des patients FPI contient des anticorps dirigés contre les CEA, ce qui participerait aux lésions continues de l'épithélium alvéolaire (Boustani et al., 2022; Hoyne et al., 2017; Magro et al., 2006).

La balance des lymphocytes Th1 et Th2 est également déséquilibrée pendant la FPI (Wynn, 2004). Classiquement, les lymphocytes Th1 sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (interferon gamma, IL-12) tandis que les Th2 sécrètent des médiateurs pro-fibrosants (IL-4, IL-5, IL-13) (Romagnani, 2000). Ainsi, dans le contexte de la FPI, il a été rapporté que l'IL-4 et l'IL-13 sont capables d'activer la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes *in vitro* comme *in vivo* (Huaux et al., 2003; Jakubzick et al., 2004). A l'inverse, simuler une réponse Th1 via l'administration d'interferon gamma ou d'IL-12 a montré des effets protecteurs de la fibrose pulmonaire *in vivo* (C.-J. Chang et al., 2021; Keane et al., 2001). Cependant, un essai clinique a conclu qu'un traitement à l'interferon gamma n'est pas suffisant pour améliorer les fonctions respiratoires ni l'espérance de vie des patients FPI (King et al., 2009). Les lymphocytes Th17 ont également un rôle pro-inflammatoire via la sécrétion d'IL-17, et il a été rapporté que les infiltrats inflammatoires des poumons de patients FPI sont enrichis en IL-17 (Nuovo et al., 2012). De plus, chez la souris, ce type cellulaire ainsi que l'IL-17 amplifient la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (Lei et al., 2016). Cependant, le rôle exact de l'IL-17 au cours de la fibrogenèse n'est pas encore déterminé, et ses mécanismes de signalisation précis doivent être étudiés pour envisager des applications thérapeutiques (Nie et al., 2022).

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont généralement impliqués dans le maintien de la prévention de l'auto-immunité mais sécrètent des cytokines pro-fibrosantes comme le TGF- β et l'IL-10 (Vignali et al., 2008). Ainsi, l'augmentation du nombre de lymphocytes Treg est corrélée avec la sévérité de la FPI, et ces cellules sont responsables de l'aggravation de la fibrose pulmonaire *in vivo* (Birjandi et al., 2016; Hou et al., 2017; Reilkoff et al., 2013).

iii. Stade 3 : Développement de la fibrose

En réponse aux lésions épithéliales et à l'inflammation décrite précédemment, des médiateurs moléculaires nécessaires à la cicatrisation sont sécrétés en excès, avec pour conséquence le recrutement et l'activation des fibroblastes pulmonaires. C'est finalement l'emballement de l'activation des fibroblastes résidents ou recrutés qui sera responsable d'un dépôt excessif de composants de la matrice extracellulaire (MEC) tels que le collagène dans le tissu pulmonaire. Cette cicatrisation aberrante entraînera une perte progressive de l'architecture normale des poumons accompagnée d'une diminution des surfaces d'échanges gazeux alvéolaires. La fonction et le rôle des fibroblastes au cours de la FPI sont abordés en détail dans le chapitre II : Du fibroblaste au myofibroblaste.

Enfin, il est important de noter que certaines cytokines vont jouer un rôle à tous les stades de la maladie, comme notamment le TGF- β 1. En effet, au stade précoce de la lésion des CEAll, il agit en synergie avec d'autres voies de signalisation pour inhiber la prolifération des CEAll et amplifier les lésions pulmonaires (Ryan et al. 1994; Cameli et al. 2020). Au stade inflammatoire, le TGF- β 1 favorise la polarisation des lymphocytes Th17, induit le recrutement des monocytes circulants et favorise la polarisation des macrophages M2 (Prud'homme, 2007; Stolfi et al., 2021). Enfin, le TGF- β 1 est la principale cytokine responsable de l'activation des fibroblastes et de la production de matrice extracellulaire (Ye and Hu, 2021). Ainsi, cette cytokine va agir au niveau des trois stades de la maladie, que ce soit en favorisant l'apoptose et la TEM des CEAll (stade 1), en activant les cellules immunitaires (stade 2) ou en induisant la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (stade 3) (Frangogiannis, 2020).

VI. Facteurs de risques

Au cours des dernières décennies, des facteurs conduisant au développement et à la progression de la FPI ont été identifiés. Ces facteurs participent aux microlésions et l'activation continue de l'épithélium alvéolaire qui sont les événements initiateurs au développement de la fibrose.

i. Facteurs environnementaux

Plusieurs études épidémiologiques ont montré que l'exercice de certains métiers augmente le risque de développer une FPI. Parmi les expositions professionnelles à risque, nous pouvons citer les poussières organiques liées à l'élevage et l'agriculture, les poussières métalliques (aluminium, cuivre) et minérales (amiante, silice) ou encore les poussières de bois et les pesticides (Barber and Fishwick, 2012; Raghu et al., 2014b; Taskar and Coultas, 2006). Ainsi, une méta-analyse regroupant 12 études épidémiologiques a conclu que toute exposition professionnelle ou environnementale à la poussière de métal, à la poussière de bois et aux pesticides est associée à un risque accru de FPI (Park et al., 2021). Dans cette étude, les métiers de l'agriculture étaient globalement associés à un risque plus élevé de FPI.

Un autre facteur de risque bien identifié est le tabagisme (Park et al., 2021). Les études expérimentales suggèrent que le stress oxydant chronique induit par la fumée de tabac participe aux lésions de l'épithélium alvéolaire (Oh et al., 2012). Il a également été démontré

que la fumée de cigarette induit une polarisation M2 pro-fibrosante des macrophages alvéolaires (Hodge et al., 2011). Ainsi, les fumeurs développent la FPI à un âge plus jeune que les non-fumeurs et ex-fumeurs (Kärkkäinen et al., 2017). De plus, le tabagisme impact négativement l'évolution de la maladie puisque les patients ayant des antécédents de tabagisme ont une espérance de vie plus faible que les non-fumeurs (Taskar and Coultas, 2006).

ii. Facteurs génétiques

Conjointement aux agressions environnementales de l'épithélium alvéolaire, un fond génétique défavorable est retrouvé dans 5 à 10% des FPI. Cette prédisposition héréditaire est causée par des polymorphismes ou mutations de gènes impliqués dans le bon fonctionnement des cellules épithéliales alvéolaire de type II (CEAII). Les mutations se trouvent au niveau de gènes codants des protéines du surfactant *SFTPC* (surfactant protein C) et *SFTPA2* (surfactant protein A2) ainsi que des protéines liées au fonctionnement des télomères *TERT* (telomerase reverse transcriptase), *TERC* (human telomerase RNA component), *DKC1* (dyskerin), *TINF2* (telomere interacting factor 2) et *RTEL1* (regulator of telomere elongation helicase) (Kropski et al., 2015). Deux polymorphismes ont été associés au risque de développer une FPI et à la mortalité des patients : les variants de la séquence promotrice de *MUC5B* (mucin 5B) et de *TOLLIP* (toll interacting protein) (Noth et al., 2013). Le rôle de ces variants dans la maladies n'est pas encore identifié, mais tester leur présence par séquençage pourra être envisagé afin de repérer les personnes à risque (Kropski et al., 2017).

iii. Infections

Les infections pulmonaires sont une forme d'agression pouvant aggraver la FPI et participer à son développement. Un exemple récent est l'épidémie de COVID-19 où il a été rapporté que les patients FPI forment une population particulièrement vulnérable (Cilli et al., 2022). En effet, les patients infectés par le SARS-CoV-2 ont présenté un taux de survie plus faible et une nécessité d'hospitalisation plus fréquente que les patient non infectés (Naqvi et al., 2021). Le SARS-CoV-2 a aussi été identifié comme facteur déclencheur d'exacerbations aiguës chez les patients FPI infectés (Goto et al., 2022). Puisque la cible cellulaire privilégiée du SARS-CoV-2 est la CEAII, une infection pourrait aussi participer au développement de la fibrose via le déclenchement de l'apoptose et de la réponse inflammatoire impliquée dans l'activation des fibroblastes (Patrucco et al., 2023). Les infections virales et bactériennes chroniques sont aussi

une source de stress pouvant déclencher ou aggraver la FPI. Une méta-analyse a montré qu'une infection au virus d'Epstein-Barr, au cytomégalovirus ou à différents variants de l'herpès augmente le risque de FPI (Sheng et al., 2020). De plus, un microbiome pulmonaire enrichi en streptocoques et staphylocoques a été associé à une progression plus rapide de la maladie (Han et al., 2014). La charge bactérienne totale présente dans les alvéoles pulmonaires permet également de prédire le déclin des fonctions respiratoires et la survie des patients (Molyneaux et al., 2014).

VII. Biomarqueurs

Il n'existe pas encore de biomarqueurs cliniques spécifiques de la FPI. Cependant, plusieurs études ont soulevé des pistes prometteuses qui pourraient donner des indications diagnostiques comme pronostiques sur l'évolution la maladie. Ces marqueurs peuvent être moléculaires, cellulaires ou encore sécrétés sous forme de micro ARN régulateurs.

Certaines protéines sanguines dosées dans le sérum des patients peuvent être liées à l'évolution de la maladie. Les suivis de cohortes observationnelles ont mis en évidence des biomarqueurs pronostiques associés à des lésions des CEA (Surfactant protein D, KL6, CA-125), à l'activation des fibroblastes et au remodelage de la MEC (MMP-3, MMP-7, périostine, VEGF) ou encore au dysfonctionnement du système immunitaire (CCL18, CXCL13, YKL-40, IL-6, IL-8) (Drakopanagiotakis et al., 2018; Jee et al., 2019). Il est démontré que les concentrations sériques de ces biomarqueurs pronostiques sont significativement plus élevées chez les patients atteints de FPI que celles mesurées chez des individus sains, et qu'elles sont toutes associées à une augmentation significative de la mortalité (Guiot et al., 2017; Ley et al., 2014). Les concentrations sériques de SP-D, CA-125, MMP-3, MMP-7, périostine, CCL18 et d'IL-8 sont également inversement corrélées aux valeurs des paramètres de la fonction respiratoire des patients (Drakopanagiotakis et al., 2018; Jee et al., 2019; Maher et al., 2017). Pour l'instant, les données mécanistiques et cliniques de ces biomarqueurs sont insuffisantes mais ils ont été validés dans différentes cohortes de patients, et leur rôle profibrosant est confirmé *in vitro* et/ou *in vivo*, ce qui en fait de potentiels candidats pour une future transposition clinique.

Les fibrocytes circulants sont les précurseurs des myofibroblastes et leur recrutement est connu pour participer directement au processus de fibrogenèse. Chez les patients atteints de FPI, un nombre élevé de fibrocytes circulants est retrouvé dans le sang ainsi que dans les tissus

pulmonaires comparé aux individus sains (Alhamad et al., 2015; Heukels et al., 2018). Leur nombre est encore plus augmenté chez les patients à exacerbation aiguë et leur quantification a été indicatrice d'une mortalité précoce dans une autre cohorte de 51 patients (Moeller et al., 2009).

Les micro ARN (miRNA) miR-155 et miR-21 sont les plus décrits chez l'homme et la souris comme ayant une action profibrosante, mais une vingtaine d'autres miRNA sont étudiés *in vitro* et *in vivo* dans les modèles FPI pour leur rôle régulateur de la maladie (Pandit et al., 2011; Takagi et al., 2019). D'un point de vue pronostic, un panel de 88 micro ARN a été analysé dans les biopsies de patients FPI qui présentent une évolution rapide ou lente de la maladie. Dans les biopsies de patients à progression rapide, 5 micro-ARN (miR-302c, miR-423-5p, miR-210, miR-376c et miR-185) ont augmenté de manière significative comparé à une progression lente. Les cibles de ces micro-ARN suggèrent qu'ils ont un effet régulateur de la TEM (Oak et al., 2011).

VIII. Comorbidités

i. Hypertension pulmonaire

L'hypertension pulmonaire est retrouvée chez 30 à plus de 60% des patients FPI à un stade avancé de la maladie (Sakao et al., 2019), et les patients souffrant d'hypertension pulmonaire ont un pronostic plus défavorable que ceux qui n'en développent pas (Raghu et al., 2015). Cette comorbidité pourrait être liée à une dérégulation du système de réponse à l'adénosine. En effet, il a été démontré que l'expression d'ADORA2B, un récepteur de l'adénosine, est augmentée chez les patients atteints de FPI ayant reçu un diagnostic d'hypertension (Garcia-Morales et al., 2016), tandis que les souris dépourvues d'ADORA2B dans les cellules musculaires lisses vasculaires sont protégées contre le développement de l'hypertension après une exposition à de la bléomycine (Rajagopal et al., 2021). Une autre cause de l'hypertension pourrait être une forte production du peptide de l'angiotensine II (ANG II) responsable de la vasoconstriction. L'enzyme de dégradation de l'ANG II (ACE-2) est sous exprimée dans les poumons de patients FPI ainsi que dans les poumons du modèle murin induit à la bléomycine (Li et al., 2008, 2006). De plus, l'expression d'ACE-2 permet de limiter l'accumulation des dépôts de collagène dans les poumons du modèle bléomycine (Li et al., 2008). L'apoptose des cellules épithéliales étant décrite comme un événement précurseur du développement de la fibrose, il a été montré que l'ANG II est nécessaire à l'induction de cette apoptose dans le modèle

bléomycine (Lee et al., 2010; Li et al., 2003). L'ANG II et le TGF- β 1 exercent également une action profibrosante sur les fibroblastes pulmonaires en stimulant mutuellement leur expression (Uhal et al., 2012, 2007). Cliniquement, une étude post-hoc de patients ayant reçu un traitement antihypertenseur inhibant la production d'ANG II a montré une progression plus lente de la maladie comparé aux patients non traités (Kreuter et al., 2019). Cependant, des données complémentaires sont nécessaires pour clarifier les relations entre les traitements antihypertenseurs et l'évolution clinique à long terme de la FPI, en particulier chez les patients qui reçoivent des thérapies anti-fibrosantes.

ii. Cancer bronchopulmonaire

Les patients atteints de FPI présentent un risque accru de cancer du poumon, avec une incidence de ce cancer plus élevée que dans la population générale (JafariNezhad and YektaKooshali, 2018). Ainsi, dans une étude comprenant 890 patients FPI, l'incidence du cancer du poumon des patients FPI a été multipliée par sept comparée à un groupe témoin (Hubbard et al., 2000). Le tabagisme et l'exposition professionnelle à certaines poussières étant des facteurs de risque favorisant la FPI, ils pourraient être une source de confusion lorsque les deux maladies sont associées. Cependant, la fibrose pourrait elle-même contribuer au développement du cancer. En effet, il a été proposé que l'apparition de changements épithéliaux atypiques ou dysplasiques dans la fibrose pulmonaire peut évoluer vers une tumeur maligne invasive (Park et al., 2001).

iii. Dénutrition

La perte de poids est fréquemment signalée chez les patients atteints de FPI, ce qui semble impacter négativement l'évolution de la maladie et parfois la réponse aux traitements. Cet état de dénutrition peut être évalué à l'aide des valeurs d'indice de masse corporelle (IMC) qui correspond au rapport $(\text{poids})/(\text{taille})^2$ et celles de d'indice de masse maigre (FFMI) par impédancemétrie bioélectrique (Cederholm et al., 2017). Les valeurs limites d'IMC et de FFMI définissant une dénutrition ont été établies pour les patients atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) : les patients sont considérés dénutris si leur valeur d'IMC est inférieure à 21 kg/m² et si leur valeur de FFMI est inférieure à 15 kg/m² chez les femmes ou 17 kg/m² chez les hommes (Boustani et al., 2022; Schols et al., 1993). En analysant ces deux paramètres, l'équipe a récemment démontré que 28 % des patients atteints de FPI sont

dénutris dans une cohorte de 81 puis de 185 malades (Jouneau et al., 2019a, 2019b). Les patients dénutris sont généralement plus âgés, non-fumeurs et de sexe féminin. La mise en évidence de cette comorbidité est importante à prendre en compte puisque les valeurs basses de FFMI, mais également d'IMC peuvent être associées à une progression du déclin de la fonction respiratoire et/ou à une réduction de la survie des patients souffrant de FPI. En effet, l'étude de 153 patients FPI a rapporté que ces marqueurs de dénutrition ainsi que la diminution de l'apport alimentaire au moment du diagnostic sont associés à une augmentation de l'hospitalisation toutes causes confondues et à une diminution de la survie chez les patients nouvellement diagnostiqués (Jouneau et al., 2022b). Une autre étude a montré que la perte de poids est associée de manière indépendante à la survie des patients FPI, même lorsqu'aucune baisse de la CVF n'est observée (Nakatsuka et al., 2018), et un faible indice de masse maigre a été identifié comme un prédicteur négatif indépendant de la survie des patients (Nishiyama et al., 2017). Enfin, une analyse post hoc regroupant les résultats de 5 cohortes de patients traités par un placebo ou par de la pifrénidone a croisé les résultats cliniques avec l'IMC et l'évolution du poids (Jouneau et al., 2022a). Cette étude a mis en évidence qu'un IMC inférieur à 25 kg/m² et qu'une perte de poids supérieure ou égale à 5 % des patients FPI sont associés à un taux de survie plus faible et à une diminution plus rapide de leur CVF. Il est ainsi suggéré que dépister cette comorbidité en mesurant l'IMC devrait être systématique pour mieux prendre en charge les patients. En cohérence avec ces observations, une carence en vitamine D est rapportée dans des cohortes de patients et pourrait être associée à un mauvais pronostic, cet aspect sera développé dans le chapitre III (Faverio et al., 2022; Tzilas et al., 2019). De manière générale, il devrait être recommandé de maintenir un régime approprié chez ces patients, et des interventions spécifiques visant à améliorer leur apport alimentaire et leur état nutritionnel pourraient potentiellement améliorer leur pronostic. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour comprendre les mécanismes qui sous-tendent la perte de poids et l'impact du statut nutritionnel dans la FPI.

IX. Traitement de la FPI

A ce jour, les traitements autorisés pour prendre en charge la FPI ne permettent pas de stopper la maladie mais seulement de ralentir l'évolution de la fibrose. Deux molécules anti fibrosantes sont autorisées pour traiter la FPI : Le nintedanib (Ofev, Boehringer Ingelheim) et la

pirfénidone (Esbriet, InterMune). La FDA (Food and Drug Administration) a approuvé ces deux médicaments aux États-Unis en 2014 (Raghu and Selman, 2015). En France, l'ANSM a autorisé l'utilisation du nintedanib en 2015 et celle de la pirfénidone en 2012.

i. Le nintedanib

Le nintedanib est un inhibiteur compétitif des récepteurs à tyrosine kinase. Ses cibles sont les récepteurs α et β du PDGF (PDGFR), les récepteurs au facteur de croissance des fibroblastes (FGFR) et les récepteurs du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR) (Wollin et al., 2015). Il a également été rapporté que le nintedanib peut inhiber l'activation du récepteur au TGF- β (TGFR) (Rangarajan et al., 2016). Dans la FPI, ces récepteurs sont responsables de l'angiogenèse (VEGFR), de la migration et de la prolifération (PDGFR et FGFR) ainsi que de la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (TGFR). L'activité inhibitrice du nintedanib au niveau des voies de signalisation de ces récepteurs a été confirmée chez des fibroblastes pulmonaires humains primaires provenant de patients atteints de FPI et de témoins (Hostettler et al., 2014). *In vivo* dans le modèle bléomycine, le nintedanib inhibe également ces médiateurs profibrotiques et réduit la migration, la prolifération et les dépôts de matrice extracellulaire générés par les fibroblastes (Wollin et al., 2014; W. Yang et al., 2022). Différents essais cliniques ont confirmé une certaine efficacité du nintedanib chez les patients FPI, chez qui on observe un ralentissement du déclin de la capacité vitale forcée et une diminution des exacerbations aiguës comparé aux groupes placebo (Brunnemer et al., 2016; Collard et al., 2017; Harari et al., 2022; Kolb et al., 2017). La conclusion de ces études est que le nintedanib ne permet pas de stopper la FPI mais seulement de ralentir le déclin des fonctions respiratoires. Cependant, la compilation des résultats de 6 essais cliniques a permis d'estimer que la survie médiane des patients traités passe à 8,5 années contre 3,3 années pour le groupe placebo (Lancaster et al., 2019). Le nintedanib a aussi été évalué chez les patients atteints de PID de sclérodémie systémique (SSc) (Distler et al., 2019) et chez les patients atteints de PID fibrosantes progressives (Flaherty et al., 2019). Dans ces deux études, le nintedanib ralentit significativement le déclin de la CVF. Ainsi, en plus de la prise en charge de la FPI, les recommandations récentes suggèrent d'utiliser le nintedanib dans le cadre de toutes les autres PID fibrosantes progressives nouvellement diagnostiquées (Raghu et al., 2022). Concernant les effets indésirables liés au traitement au nintedanib, une étude rétrospective de plusieurs essais

cliniques a mis en évidence que les diarrhées (52,6 %) et les nausées (29,8 %) sont les plus fréquemment rapportés (Galli et al., 2017).

ii. La pirfenidone

La pirfenidone possède des propriétés antifibrotiques et anti-inflammatoires. Dans de nombreux modèles précliniques de pathologies fibrosantes pouvant toucher les poumons, les reins, le foie, le cœur ou les yeux, la pirfenidone inhibe *in vitro* comme *in vivo* l'inflammation et le développement de la fibrose (Conte et al., 2014; Dixon et al., 2018; Lopez-de la Mora et al., 2015; Ma et al., 2018). Le mécanisme de fonctionnement de cette molécule n'est pas encore complètement élucidé, mais il a été rapporté dans le modèle bléomycine une inhibition de l'expression du TGF- β 1 en plus d'un blocage de sa voie de signalisation via une réduction de la phosphorylation de son effecteur SMAD3 (Lv et al., 2020). Par conséquent, l'expression de ses gènes cibles α -SMA, collagène et fibronectine est diminuée ainsi que les dépôts de tissus cicatriciels dans les poumons des souris (Liu et al., 2005; Ma et al., 2018; Oku et al., 2008). La pirfenidone inhibe également la production de PDGF (Gurujeyalakshmi et al., 1999) ainsi que la prolifération et la migration des fibroblastes médiée par le TGF- β et le PDGF (Conte et al., 2014; Gurujeyalakshmi et al., 1999; Shi et al., 2011). En plus de ses effets antifibrotiques, la pirfenidone est décrite comme anti-inflammatoire via l'inhibition de la production d'IL-1 β , d'IL-6 et de (TNF)- α (Oku et al., 2008) et l'augmentation de la production de médiateurs anti-inflammatoires comme l'IL-10 dans les modèles animaux de fibrose pulmonaire (Oku et al., 2002). Cliniquement, la pirfenidone présente des résultats similaires à ceux du nintedanib avec un ralentissement du déclin de la CVF ainsi qu'une meilleure résistance à l'effort (King et al., 2014). Bien que ces études cliniques indépendantes ne permettent pas de conclure sur une augmentation de l'espérance de vie des patients, une méta-analyse compilant les résultats de 6 essais cliniques, avec un total de 1247 patients, a montré une diminution significative de la mortalité toute cause confondue à 120 semaines dans le groupe pirfenidone comparé au groupe placebo (Nathan et al., 2017). Les effets secondaires les plus souvent rapportés chez les patients traités à la pirfenidone sont les nausées (26,4 %), les éruptions cutanées/la photosensibilité (14,7 %) et la dyspepsie/le reflux gastro-œsophagien (12,4 %) (Galli et al., 2017).

Finalement, une étude rétrospective comparant deux groupes de patients traités au nintedanib (n = 713) ou à la pirfenidone (n = 840) a montré que ces deux molécules sont

associées à des taux équivalents de mortalité toutes causes confondues et d'hospitalisations pour cause de troubles respiratoires (Figure 8) (Marijic et al., 2021). Une autre étude comparant des plus petits groupes de patients (nintedanib, n = 28 ; pirfénidone, n = 78) a également montré que le déclin de la CFV et de la DLCO sont identiques entre les deux groupes après 24 mois de traitement (Cerri et al., 2019). Le coût de prise en charge et les effets secondaires étant similaires entre ces deux traitements, la décision de traiter les patients avec du nintedanib ou de la pirfénidone devrait se faire au cas par cas en tenant compte des interactions médicamenteuses possibles, du risque individuel d'effets indésirables et des préférences du patient (Marijic et al., 2021).

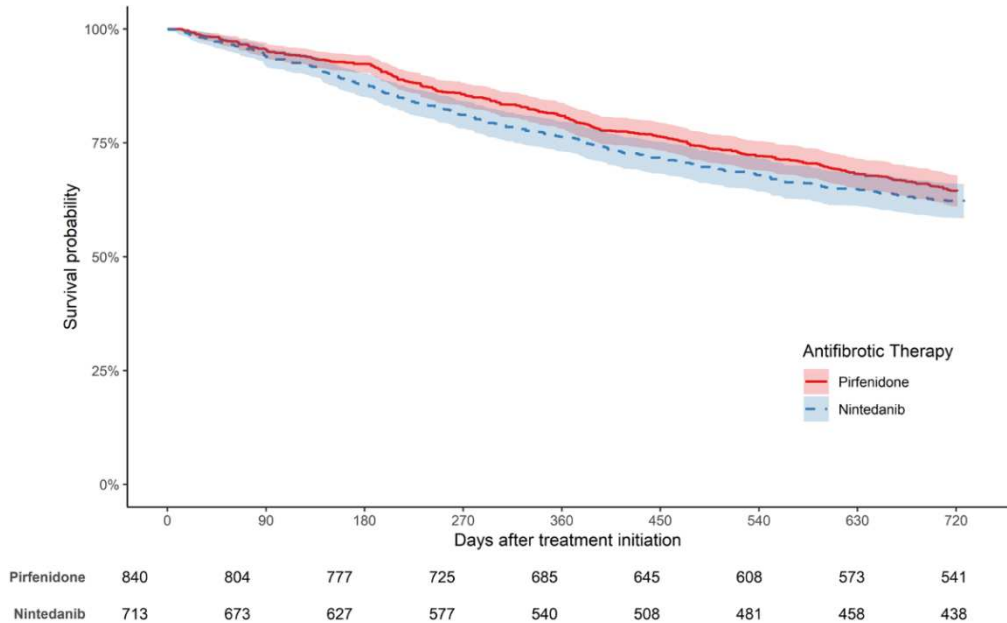


Figure 8 : Le nintedanib et la pirfénidone ont des effets similaires sur la survie des patients. Diagrammes de Kaplan-Meier représentant la mortalité toutes causes confondues à deux ans chez les patients FPI traités à la pirfénidone ou au nintédanib. Les zones colorées représentent les intervalles de confiance à 95 %. D’après Marijic et al. 2021.

iii. Autres traitements

La transplantation pulmonaire est la seule intervention permettant d’augmenter significativement l’espérance de vie des patients (Swaminathan et al., 2022). La survie à 5 ans chez les patients transplantés est estimée à 50-56% contre environ 25% chez les patients non transplantés (du Bois, 2012; Raghu et al., 2011). Cette opération est envisageable en tenant compte de l’âge et du profil de comorbidités déjà présentes chez le patient pour éviter les

risques de complications. La limite d'âge recommandée pour cette opération est de 65 ans, mais elle ne constitue pas une contre-indication et peut aller jusqu'à 70 ans en absence de comorbidités (Cottin et al., 2022). La technique de transplantation monopulmonaire était initialement la procédure la plus commune, mais la transplantation bipulmonaire permet de mieux rétablir les fonctions respiratoires et de diminuer l'incidence du cancer bronchopulmonaire sans montrer de différence de survie entre les deux techniques (Li et al., 2020). Cependant, la quantité de donneurs compatibles est largement insuffisante pour répondre à la demande croissante de transplants (Balestro et al., 2019).

L'oxygénothérapie permet d'améliorer la capacité d'effort et la qualité de vie de patients. Elle est recommandée lorsque le taux de saturation en oxygène est inférieur à 88% ou en présence d'hypertension pulmonaire (Johannson et al., 2017).

Les traitements palliatifs contre la toux et la dyspnée permettraient d'améliorer la qualité de vie des patients mais sont globalement peu efficaces. En effet, les corticoïdes sont souvent utilisés contre la toux mais aucune étude n'a montré leur efficacité, et la condition des patients à un stade avancé augmente le risque d'effets indésirables liés à la prise de médicaments (Munson et al., 2010). Il a ainsi été montré cliniquement que les corticostéroïdes augmentent la mortalité hospitalière des patients FPI, et ce que la maladie soit stable ou en présence d'exacerbations aiguës, ce qui rend ce traitement critiqué (Cuerpo et al., 2019; Papiris et al., 2012).

Enfin, un programme de réhabilitation respiratoire personnalisé a montré des effets positifs sur la dyspnée et la qualité de vie des patients, en améliorant également leur capacité à l'effort (Huppmann et al., 2013). Les modalités de ce type de programme restent à préciser mais elles reposent globalement sur un sevrage tabagique, des entraînements à l'effort et une aide psychosociale (Cottin et al., 2022).

X. Modèles d'études de la FPI

Bien qu'aucun modèle animal ne puisse récapituler toutes les composantes de la fibrose pulmonaire, plusieurs sont disponibles pour étudier certaines caractéristiques de la FPI et d'autres ILD fibrosantes (Tableau 1). Historiquement, l'un des premiers à avoir été développé et largement utilisé est le modèle bléomycine chez la souris, en raison de sa capacité à

reproduire certains aspects de la FPI avec une bonne reproductibilité et une induction rapides des lésions. Cette molécule forme des complexes avec les ions métalliques, ce qui augmente la production d'espèces réactives de l'oxygène et provoque une peroxydation lipidique, une oxydation des glucides ainsi que des cassures simples et double brin dans l'ADN. Il existe plusieurs méthodes d'induction de la fibrose pulmonaire par la bléomycine, comme l'injection sous-cutanée, intrapéritonéale, intraveineuse ou intratrachéale (Tashiro et al., 2017). Pour étudier la FPI, l'induction de la fibrose pulmonaire par injection intratrachéale est la plus fréquemment utilisée puisqu'elle expose majoritairement l'organe pulmonaire à la bléomycine (Degryse et al., 2010; Moore and Hogaboam, 2008). Son mécanisme d'action commence par une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène entraînant l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires (jours 1-3), puis survient une importante infiltration de cellules inflammatoires (jours 3-9) qui activera les fibroblastes et la production excessive de tissus cicatriciels (jours 10-21) (Tashiro et al., 2017). Les études utilisant le modèle bléomycine ont permis d'identifier de nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires aujourd'hui reconnus dans la pathogenèse de la FPI et d'autres PID fibrosantes, ainsi que de nouvelles thérapies comme le nintedanib et la pirfénidone. Cependant, la fibrose induite par la bléomycine est ponctuelle en réponse à une inflammation aiguë et s'auto-guérit après 3 semaines. Ces paramètres sont en contraste avec la fibrose typique progressive et irréversible de la FPI humaine, qui est une réponse à une inflammation chronique et silencieuse des poumons (Borzzone et al., 2001; Moore and Hogaboam, 2008). Ainsi, une étude a montré que la signature génétique précoce du modèle bléomycine présente des caractéristiques similaires à celle de fibroblastes isolés d'une FPI aiguë et accélérée chez l'homme, notamment au niveau du processus mitotique (Peng et al., 2013). D'autres modèles basés sur l'administration de composés inorganiques tels que la silice et l'amiante permettent d'induire une fibrose pulmonaire ayant certains mécanismes moléculaires transposables à la FPI (Kim et al., 2015; Sugimoto et al., 2019), mais les lésions obtenues n'ont pas le même aspect ni la même localisation que celles d'une FPI (B. Moore et al., 2013; Tashiro et al., 2017). L'instillation intratrachéale d'isothiocyanate fluorescent permet également d'entraîner une infiltration des cellules immunitaires et une fibrose pulmonaire persistante 3 semaines après l'injection, mais sans présenter d'aspect de PIC (Christensen et al., 1999; Roberts et al., 1995). Une exposition aux radiations conduit au développement d'une fibrose qui peut être locale ou systémique si d'autres organes ne sont pas protégés. Il s'agit d'une procédure lente qui aboutit à une fibrose

mature après 24 semaines, cependant, cette fibrose dépend plus des dommages à l'ADN et de la production de radicaux libres que de la sécrétion de TGF- β (Haston, 2012; Jin et al., 2020). Enfin, des méthodes plus sophistiquées ont été utilisées pour étudier les voies de signalisation impliquées dans la fibrose pulmonaire en stimulant l'expression de TGF- β 1 (Bonniaud et al., 2005; Sime et al., 1997), de TNF- α (Sime et al., 1998) et d'IL-1 β (Kolb et al., 2001) par transfection d'adénovirus. Une surexpression transgénique de l'IL-13 localisée spécifiquement dans les poumons a également entraîné une réponse inflammatoire précoce et un dépôt de collagène qui dépend de la voie de signalisation du TGF- β 1 (Lee et al., 2001). Néanmoins, ces modèles ne sont pas bien établis et permettent seulement de décrire les voies pertinentes de la fibrogenèse sans reproduire la complexité de la maladie humaine.

Tableau 1 : Avantages et inconvénients des modèles animaux permettant d'étudier les PID.

Modèles murins	Avantages	Inconvénients
Bléomycine	signature génétique précoce similaire à celle de fibroblastes isolés d'une FPI aiguë et accélérée chez l'homme (processus mitotique)	Fibrose ponctuelle, résolution spontanée après 3 semaines
Silice	Persistance des lésions fibrotiques	Manque de reproductibilité, administration difficile, absence de lésions semblables à une PIC
Amiante	Reproduit la fibrose pulmonaire humaine en cas d'exposition à l'amiante	Induit une fibrose centrale plutôt que sous-pleurale, inégalement répartie entre les poumons, peu de foyers fibroblastiques
Isothiocyanate fluorescent	Persistance des lésions fibrotiques	Absence de PIC et présence d'infiltrats inflammatoires précédant la fibrose
Radiation	Développement d'une fibrose locale si les autres organes sont bien protégés	Fibrose qui dépend des dommages causés à l'ADN par les radicaux libres et moins du TGF- β
Surexpression de cytokines	Comprendre les événements de signalisation relatifs à des cytokines spécifiques induisant la fibrose	Modèles limités à l'étude de voies spécifiques sans récapituler la complexité de la maladie humaine

CHAPITRE II : Du fibroblaste au myofibroblaste

I. Rôle des fibroblastes

Les fibroblastes sont des cellules d'origine mésenchymateuse dont le rôle principal est le maintien de la structure anatomique. Une fois activés, ils produisent de la MEC en réponse à une lésion. Ce type cellulaire est présent dans pratiquement tous les tissus mais sa signature moléculaire varie d'un organe à l'autre (Swonger et al., 2016). La production comme le maintien structurel des tissus conjonctifs par les fibroblastes sont essentiels. Au niveau de la peau, cela permet de résister aux microtraumatismes comme l'étirement ou le contact avec des objets tranchants. Au niveau pulmonaire, les fibroblastes permettent le maintien de l'élasticité et de la structure des poumons pendant les mouvements respiratoires. Au-delà de ce rôle structurel (Figure 9A), les fibroblastes ont de nombreuses autres fonctions comme la sécrétion de facteurs de signalisation pour les cellules environnantes (chimiokines, interleukines) (Figure 9B), la génération de forces mécaniques (Figure 9C) ou encore la régulation du métabolisme tissulaire et de la sécrétion de métabolites (Figure 9D). Les fibroblastes jouent également un rôle de cellules progénitrices mésenchymateuses pour maintenir le pool de fibroblastes pulmonaires, ou peuvent aussi développer un phénotype adipocytaire spécialisé dans le stockage des lipides (Sowa et al., 2021) (Figure 9E). Ils sont aussi les producteurs de nouveaux tissus au cours de la morphogenèse des organes (embryogenèse) et responsables de la réparation des tissus dans diverses conditions pathologiques (Figure 9F). Etant situés dans des régions distinctes de différents organes, ils servent de source d'information géographique pour les autres types cellulaires, en constituant par exemple la lame basale des cellules épithéliales alvéolaires (Figure 9G). Enfin, ce sont des cellules cibles ainsi que des modulateurs de diverses fonctions immunitaires innées comme adaptatives (H).

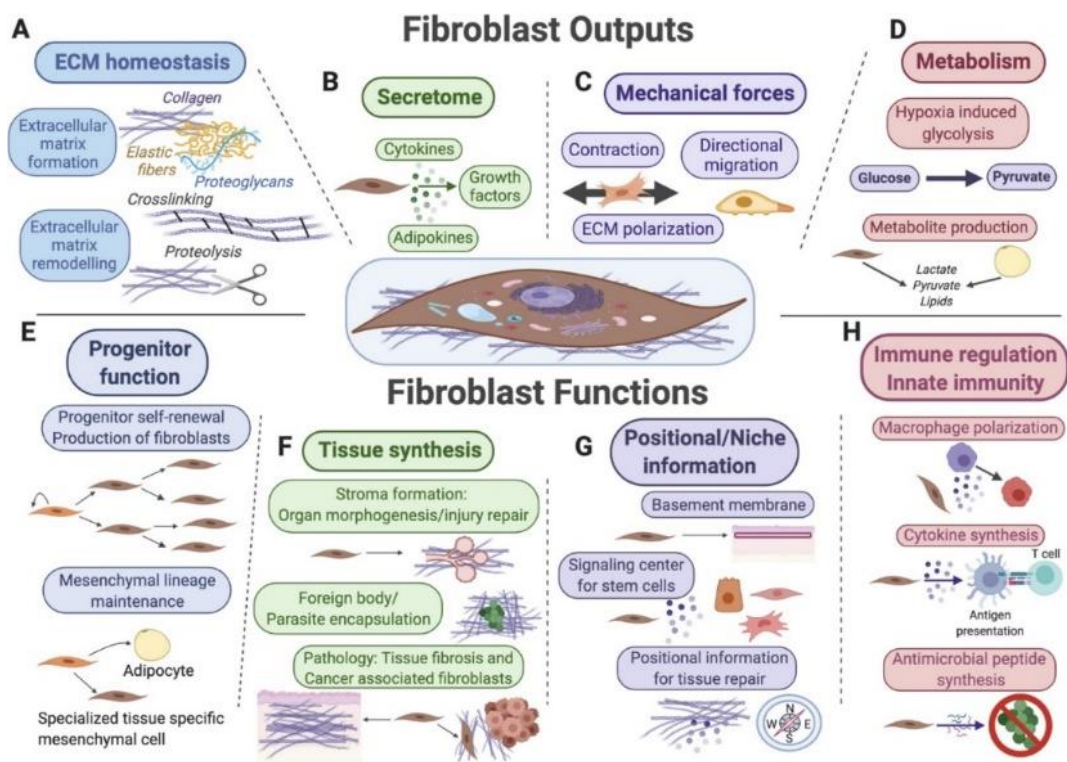


Figure 9 : Résumé de l'activité et des fonctions des fibroblastes. D'après (Plikus et al. 2021)

II. Rôle des myofibroblastes

Lorsqu'un tissu est agressé, le relargage de médiateurs moléculaires par les cellules lésées ainsi que la réponse inflammatoire associée sont responsables du recrutement et de la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. Comparé à ses homologues non activés, le phénotype myofibroblastique est défini par une forte expression de marqueurs du cytosquelette comme l' α -actine du muscle lisse (α -SMA), une forte activité contractile, un niveau plus élevé de synthèse et de sécrétion de MEC ainsi qu'une résistance à l'apoptose (Kendall and Feghali-Bostwick, 2014). Les myofibroblastes ne sont pas retrouvés en condition physiologique saine, mais ils sont fortement régulés après une blessure et jouent un rôle essentiel dans le processus de cicatrisation (Gabbiani, 2003; Midwood et al., 2004). Dans de nombreuses maladies fibrosantes dont la FPI fait partie, les myofibroblastes sont les cellules clés responsables de l'accumulation aberrante et incontrôlée de MEC.

III. Recrutement et activation des myofibroblastes

i. Origine des myofibroblastes

Bien que l'origine des myofibroblastes au cours de la FPI reste incertaine et débattue, de nombreuses voies de recrutement ont été identifiées, notamment *in vivo* via le traçage de lignées cellulaires et la cartographie transcriptomique des sous populations cellulaires dans un contexte pathologique (Homps-Legrand et al., 2023) (Figure 10). Il est important de noter que les proportions de ces différents progéniteurs sont variables en fonction des études et qu'il existe souvent de grandes différences entre les observations cliniques et expérimentales. En effet, les études expérimentales reposent sur le modèle bléomycine en injection unique pour induire des lésions fibrotiques. Ces lésions ont certes un aspect proche de la FPI avec l'accumulation de foyers myofibroblastiques, mais ces derniers n'ont pas forcément la même origine cellulaire que la pathologie humaine.

Les fibroblastes et lipofibroblastes interstitiels résidents proches du site lésé font partie des premiers acteurs répondant aux cytokines et facteurs de croissance pro-fibrosants comme le TGF- β 1, l'IL-1 β ou l'IL-6 (Kendall et Feghali-Bostwick 2014). Dans le modèle bléomycine, le traçage des fibroblastes résidents PDGFRa+ a montré qu'ils s'accumulent et s'activent sous forme de foyer dans les poumons lésés (Li et al., 2018.; Tsukui et al., 2015). Cependant, une autre étude a montré que ces fibroblastes ne participent que partiellement au pool de myofibroblastes activés, à hauteur de seulement 20% d'après le traçage de fibroblastes résidents ACTA2+PDGFRa+ tandis que 50% provenaient de cellules mésenchymateuses ACTA2+Axin2+ (Zepp et al., 2017). Toujours dans le modèle bléomycine, une étude montre que les lipofibroblastes résidents *Fgf10+* représentent 30% à 53.9% des cellules ACTA2+, ce qui suggère que ce type de fibroblaste est un acteur important du développement de la FPI (Agha et al., 2017).

Les péricytes, aussi décrits comme des cellules mésenchymateuses qui enveloppent les capillaires sanguins, ont la capacité de se différencier en myofibroblastes en présence de TGF- β 1 (Sava et al., 2017; Wang et al., 2019). Ainsi, il a été montré que les péricytes s'activent et s'accumulent dans les foyers fibroblastiques des poumons de patients FPI (Sava et al., 2017), et que 45% des myofibroblastes α SMA+ étaient issus de péricytes Foxd1+ dans les foyers fibroblastiques du modèle murin bléomycine (Hung et al., 2013).

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) résidentes et circulantes sont également sensibles aux stimulus inflammatoires et peuvent être activées pour se différencier en myofibroblastes (Xia et al. 2014). En effet, le marquage des CSM circulantes a montré que ces précurseurs sont recrutés et activés pour représenter jusqu'à 30% des myofibroblastes dans les régions fibrotiques du modèle bléomycine (Tang et al., 2014). L'analyse transcriptomique de cellules uniques a aussi permis d'identifier des CSM résidentes pathologiques dans les foyers fibrotiques des poumons des patients FPI (Beisang et al., 2020).

Les fibrocytes circulants sont recrutés par chimiotactisme lors de la phase inflammatoire en réponse au facteur de croissance PDGF-BB (Andersson-Sjöland et al., 2008). Une augmentation de la quantité de fibrocytes a été détectée dans le lavage broncho-alvéolaire et dans le sang des patients FPI (Borie et al., 2013; Mehrad et al., 2007). Chez la souris, la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine entraîne le recrutement des fibrocytes circulants CD45+Col I+CXCR4+ dans les poumons, et leur recrutement maximal est corrélé avec l'augmentation des dépôts de collagène (Phillips et al., 2004). De plus, l'inhibition *in vivo* du recrutement des fibrocytes a permis de réduire la fibrose induite par la bléomycine (Chi et al., 2022). En contraste avec ces résultats, une étude a montré que les fibrocytes ont une activité mineure de sécrétion de collagène dans le modèle bléomycine (Kleaveland et al., 2014).

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) des CEA2 pourrait également participer au pool de myofibroblastes dans la FPI. En effet, les microlésions pulmonaires peuvent activer la TEM des cellules épithéliales qui prendront un phénotype myofibroblastique (Ohbayashi et al., 2014). Ainsi, les cellules épithéliales de rat exposées chroniquement au TGF- β 1 subissent une TEM suivie d'une augmentation des marqueurs myofibroblastiques (Kasai et al., 2005; Willis and Borok, 2007). De plus, chez les patients FPI, il a été rapporté une abondance de cellules co-exprimant les marqueurs épithéliaux et d' α -SMA au niveau des tissus pulmonaires (Willis et al., 2005). Cependant, des études basées sur le traçage des cellules épithéliales dans le modèle bléomycine ont soit montré qu'elles ne subissaient pas de TEM (Rock et al., 2011), soit montré que seulement 4% de cellule épithéliales étaient positives à α -SMA au niveau des lésions fibrotiques (DeMaio et al., 2012).

Enfin, des études utilisant l'analyse transcriptomique à l'échelle cellulaire (single-cell RNAseq) ont permis de mieux comprendre les différentes sous-populations présentes dans le poumon normal et de patients atteints de FPI. Ces études ont révélé une grande hétérogénéité

de groupes cellulaires présentant des marqueurs pro-fibrosants au cours de la FPI, incluant de multiples sous-types de fibroblastes activés mais aussi des cellules épithéliales et mésenchymateuses productrices de MEC (Adams et al., 2020; Habermann et al., 2020; Jia et al., 2023). L'une de ces études a notamment montré que les fibroblastes pulmonaires issus du stade précoce de la FPI présentent certaines altérations transcriptomiques identiques à celles du stade avancé de la maladie (Jia et al., 2023). Ces observations ont permis d'identifier la protéine de fixation du cuivre FOXD1 et de l'associer à la sénescence des fibroblastes pathologiques chez les patients, pour ainsi en faire un potentiel biomarqueur du déclenchement de la maladie (Jia et al., 2023; Rosas et al., 2022). En parallèle de l'étude du transcriptome et toujours à l'échelle de la cellule unique, il est maintenant possible de séquencer les régions accessibles de l'ADN avec la technologie snATAC-seq (single nucleus Assay for Transposase Accessible Chromatin-sequencing) dans le but de repérer des enrichissements en motifs de liaison de facteurs de transcription (Burgy and Maillieux, 2023). Ainsi, l'intégration de l'expression différentielle des ARNm avec ces enrichissements de motifs ont permis d'identifier l'implication du facteur de transcription TWIST1 dans les myofibroblastes isolés de patients FPI. TWIST1 est connu pour son rôle inducteur de la TEM et se retrouve plus actif dans le contexte de la FPI mais aussi dans le modèle murin bléomycine en comparaison avec des fibroblastes contrôles (Valenzi et al., 2023).

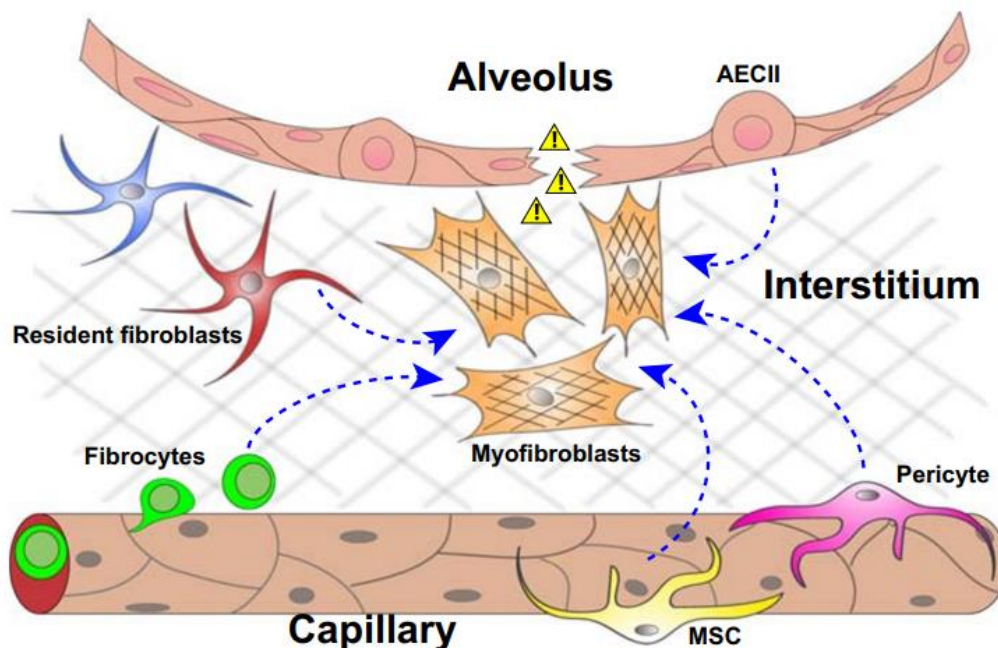


Figure 10 : Les différents types cellulaires à l'origine des myofibroblastes au cours de la FPI. Les principaux types cellulaires identifiés comme étant à l'origine des myofibroblastes sont les fibroblastes résidents, les fibrocytes, les CEAll, les péricytes et les cellules souches mésenchymateuses (MSC). D'après Kletukhina et al. 2022.

ii. Le TGF- β

a. Définition

Le TGF- β (transforming growth factor-beta) existe sous trois isoformes chez les mammifères : le TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3. Le TGF- β 2 et le TGF- β 3 sont des cytokines impliquées dans la différenciation et le développement des cellules embryonnaires, tandis que le TGF- β 1 est largement décrit comme inducteur de la fibrose. Son rôle pivot est connu dans de nombreuses maladies fibrosantes, et le sérum comme les poumons des patients FPI sont enrichis en TGF- β 1, mais pas en TGF- β 2 ni en TGF- β 3 (Broekelmann et al., 1991; Khalil et al., 1996; Molina-Molina et al., 2006). Enfin, le blocage de la voie de signalisation du TGF- β 1 protège de la fibrogenèse dans de nombreux modèles cellulaires humains, ainsi que dans les modèles murins (Ye and Hu, 2021).

b. Sécrétion

Durant le développement de la fibrose, les principales sources de production de TGF- β 1 sont les CEAlI, les macrophages alvéolaires et les myofibroblastes (Frangogiannis, 2020). Cette sécrétion témoigne d'un stress chronique des cellules alvéolaires. Le TGF- β 1 est d'abord sécrété sous forme latente, complexé au peptide LAP (latency-associated peptide), ce qui permet de prévenir sa fixation à son récepteur membranaire (Robertson and Rifkin, 2016). Une fois sécrété, le LAP se fixe aux protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine et les fibrines via une protéine adaptatrice (Robertson et al., 2015). De cette manière, des quantités importantes de TGF- β 1 latent s'accumulent dans nos tissus, et l'activation d'une petite fraction de TGF- β 1 entrainera une forte réponse cellulaire. La dégradation ou la dénaturation du LAP étant nécessaire à la libération du TGF- β 1, différents mécanismes physiques et chimiques ont été décrits comme initiateurs de ce phénomène.

c. Activation

1. Activation mécanique

Le schéma classique de libération du TGF- β 1 est basé sur la fixation de l'intégrine de surface membranaire α β 6 au LAP (Figure 11). Au travers de cette intégrine, la force de contraction cellulaire médiée par le cytosquelette d'actine/myosine est transmise à un site de liaison RGD (motif tripeptide Arg-Gly-Asp) dans le LAP, ce qui induit un changement de sa conformation et libère le TGF- β 1 actif. Ainsi, dans des conditions permettant la tension de la

matrice extracellulaire, il a été montré *in vitro* que des myofibroblastes peuvent activer directement le TGF- β 1 auto-généré (Wipff et al., 2007). De plus, l'expression de l'intégrine $\alpha\beta$ 6 est normalement faible, mais elle augmente en réponse à une blessure ou à une inflammation (Miller et al., 2001). Chez les souris traitées à la bléomycine, la déplétion de l'intégrine β 6 entraîne une réponse fibrotique mineure comparée aux souris sauvages, ce qui suggère que la fibrose résulte d'un excès de TGF- β 1, lié à une expression accrue d' $\alpha\beta$ 6 en réponse au stimulus inflammatoire. Enfin, les poumons de souris KO pour l'intégrine β 6 traitées avec de la bléomycine montrent une nette incapacité à induire l'expression de gènes régulés par le TGF- β 1 (Munger et al., 1999).

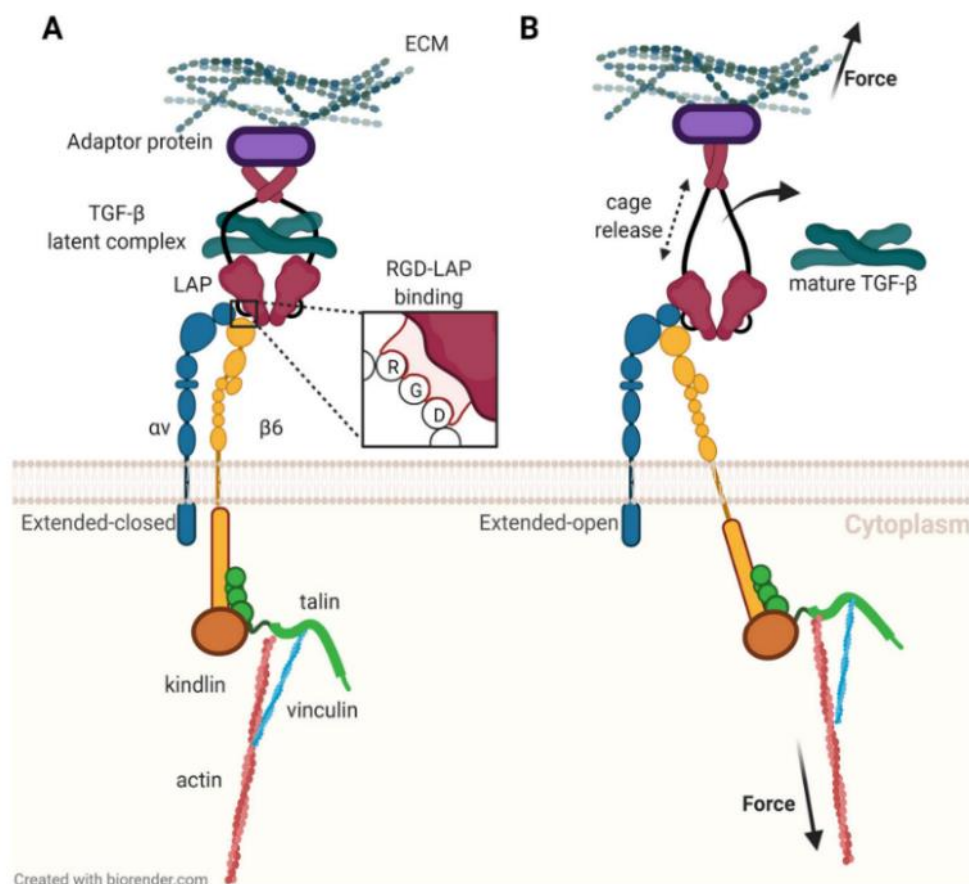


Figure 11 : Activation du TGF- β par interaction de l' $\alpha\beta$ 6-intégrine avec le LAP (latency associated protein). (A) L' $\alpha\beta$ 6-intégrine se lie à un motif RGD dans le LAP. (B) La force de traction transmise par la sous-unité β 6 déforme le LAP et libère le TGF- β . D'après Kossatz, Beer, et Notni 2021.

2. Activation protéolytique

Plusieurs protéases ont été identifiées comme induisant l'activation du TGF- β latent. Ce sont les MMP-2/9 (matricoprotéase-2/9) et la plasmine qui appartiennent respectivement à la famille des métalloprotéases et des sérine-transférases. Les MMP-2/9 ont la capacité de

dégrader la protéine adaptatrice du LAP ce qui permet une libération indirecte du TGF- β latent (Dallas et al., 2002). Pour ce qui est de la plasmine, elle a la capacité de libérer le TGF- β latent en dégradant directement le LAP (Lyons et al., 1988) .

3. **Activation par les ERO**

Il existe un cercle vicieux de régulation positive entre le TGF- β et les espèces réactives de l'oxygène (ERO). D'une part, les ERO peuvent influencer la signalisation du TGF- β en renforçant son expression et son activation (Chung et al., 2021). D'autre part, le TGF- β est capable de réguler les niveaux d'ERO en augmentant leur production et en inhibant l'activité des systèmes antioxydants (Hagler et al., 2013). Les ERO peuvent également activer le TGF- β latent directement via l'oxydation du LAP et indirectement par l'activation des MMP-2 et MMP-9 qui, à leur tour, clivent le LAP pour libérer le TGF- β actif (Liu and Desai, 2015). Ainsi, la signalisation du TGF- β et des ROS pourraient se coordonner de manière réciproque pour participer au processus de fibrogenèse (Hagler et al., 2013).

4. **Activation par le pH**

Le LAP est directement dénaturé *in vitro* dans un milieu conditionné à un pH acide doux (pH 4,5), perturbant ainsi son interaction avec le TGF- β (Annes et al., 2003; Lyons et al., 1988). *In vivo*, un pH similaire est généré par les cellules ayant un métabolisme glycolytique, comme les cellules cancéreuses (effet Warburg) mais aussi les fibroblastes différenciés par le TGF- β (voir partie II.4.g. La glycolyse aerobique).

d. Différenciation des fibroblastes en myofibroblastes

1. **Voie de signalisation**

Les récepteurs membranaires au TGF- β comprennent un domaine extracellulaire et un domaine intracellulaire à activité serine/thréonine kinase très conservé (Schmierer and Hill, 2007). Le TGF- β se lie à un dimère de récepteur de type II, qui recrute ensuite un dimère de récepteur de type I formant un complexe hétéro-tétramérique avec le ligand (Wrana et al., 1992). La fixation du ligand entraîne la rotation des récepteurs de sorte que leurs domaines kinases cytoplasmiques prennent une orientation favorable à la catalyse. Le récepteur de type II phosphoryle ensuite les résidus de sérine du récepteur de type I, ce qui le rend actif et permet la phosphorylation des protéines SMAD2 et SMAD3. En temps normal, les SMAD inactives se déplacent librement dans le cytoplasme et dans le noyau. Une fois activées par phosphorylation, les SMAD2/3 se complexent avec SMAD4 pour former un complexe à activité

transcriptionnelle régulant les gènes de fibrogenèse (Figure 12). Ce complexe va se transloquer dans le noyau et exercer son activité transcriptionnelle jusqu'à ce que les phosphatases nucléaires l'inactivent. Ainsi, un équilibre continue de protéines SMAD activées et non activées circule en faisant la navette entre le noyau et le cytoplasme. Plus le récepteur au TGF- β sera activé, plus un pool de SMAD phosphorylées s'accumulera dans le noyau et stimulera une activité pro-fibrosante (Schmierer and Hill, 2007).

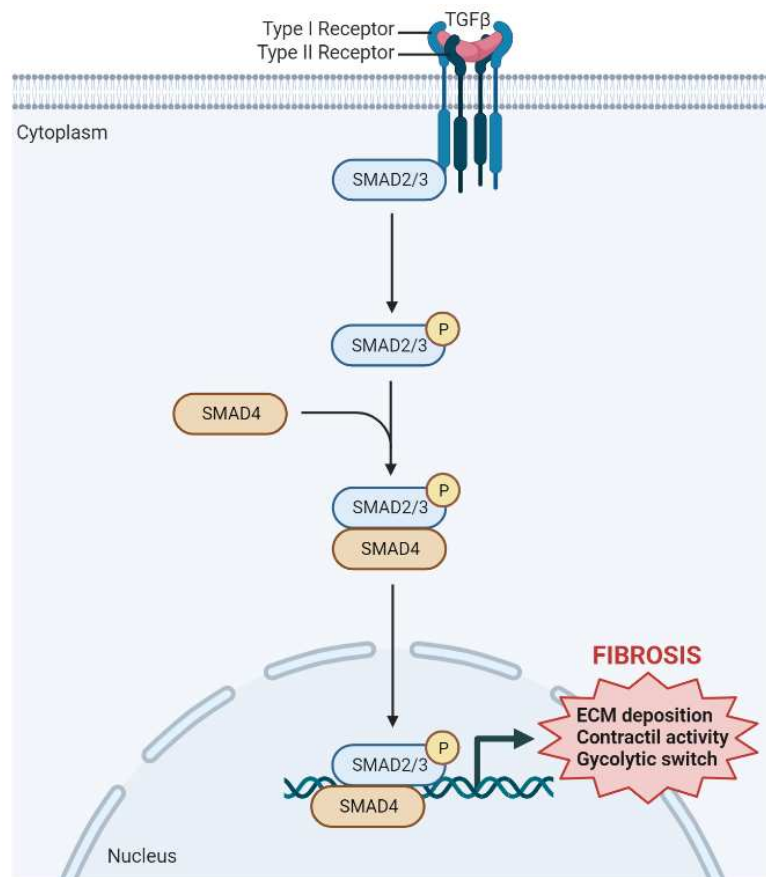


Figure 12 : Activation de la voie de signalisation SMAD par le TGF- β . Le TGF- β se fixe à son récepteur transmembranaire pour activer les protéines SMAD2/3 par phosphorylation. Le complexe transcriptionnel SMAD4/2/3 transloque dans le noyau pour activer l'expression de gènes impliqués dans le dépôt de MEC, l'activité contractile et le métabolisme glycolytique. Par Tom Voisin, Biorender.

2. Sécrétion de matrice extracellulaire (MEC)

Les fibroblastes produisent un réseau interconnecté de MEC fournissant une structure stable aux tissus ainsi qu'un support aux cellules (figure 13) (Wijsman et al., 2021). Les protéines de la MEC ont des propriétés plus ou moins élastiques. Ainsi, le collagène de type I est très rigide à cause de sa structure tertiaire hélicoïdale en triple brin. De manière similaire à une corde, cette protéine est très résistante à la traction, empêchant tout étirement excessif. D'un autre côté, les protéines d'élastines forment des réseaux hautement réticulés, mais non

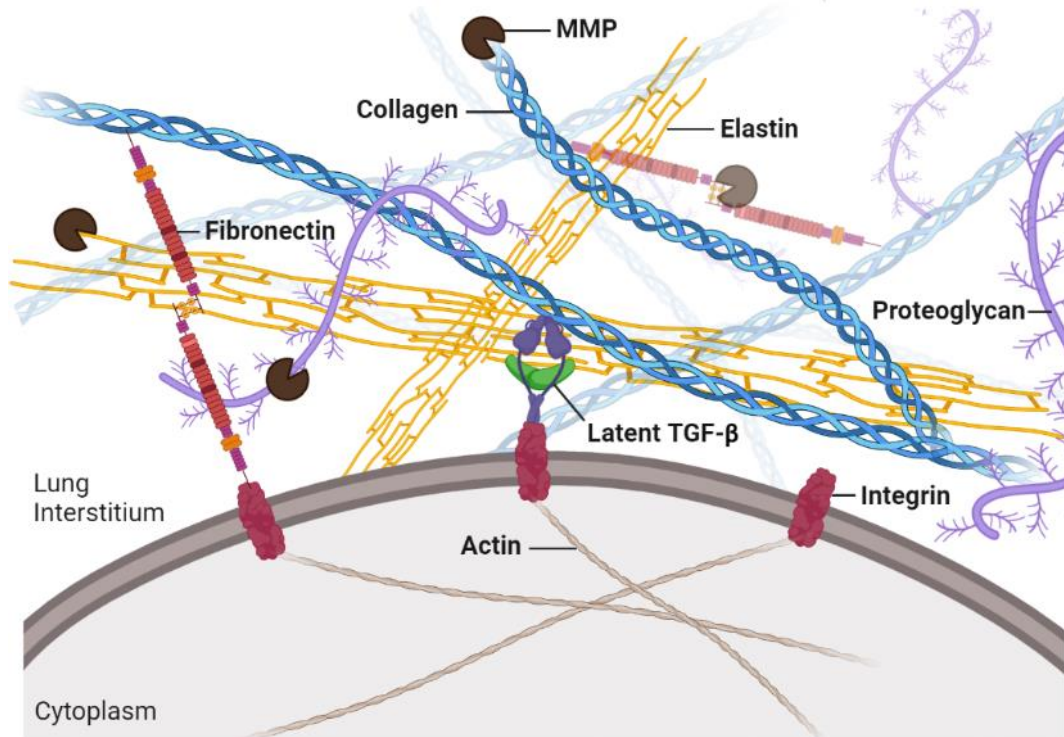


Figure 13 : Représentation de la matrice extracellulaire (MEC) pulmonaire. Toutes les composantes de la MEC ne sont pas représentées (fibrilines, fibulines, hyaluronan). MMP : Matrix metalloprotéinase. Par Tom Voisin, Biorender. Inspiré de Wijsman et al. 2021.

structurés, qui permettent un étirement expansif mais sans rupture. Enfin, des glycoprotéines comme la fibronectine permettent de faire le lien structurel entre les cellules et la MEC puisqu'elles ont des récepteurs de surface cellulaire comme les intégrines, tout en pouvant se lier au collagène ou aux fibrines. Pour réguler la densité de ce réseau de MEC, les fibroblastes sécrètent également des métalloprotéases matricielles (MMPs) qui ont pour fonction de dégrader la MEC, ainsi que leurs inhibiteurs tissulaires (TIMPs). Il existe une vingtaine de MMPs qui peuvent dégrader toutes les composantes de la MEC. Leur expression basale est normalement faible mais certaines voies de régulation transcriptionnelle comme la voie SMAD stimulent leur expression (Vincenti and Brinckerhoff, 2007).

Ainsi, les fibroblastes ont pour rôle le maintien de l'équilibre structurel et de la densité de la MEC. Lors du processus de fibrogenèse, cet équilibre est rompu et les myofibroblastes activés par le TGF- β vont présenter une expression excessive des composantes les plus rigides de la MEC. En effet, la voie SMAD stimule l'expression de tous les types de collagènes (COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL4A2, COL5A2, COL6A1, COL6A3) et de la fibronectine (Schiller et al., 2004). Le collagène de type IV est également le constituant principal de la membrane basale des cellules épithéliales alvéolaires, et la concentration sérique de ce collagène est augmentée chez les patients FPI et est associée à un mauvais pronostic (Urushiyama et al., 2015). En réponse à cet excès de MEC, il a été rapporté que les fibroblastes peuvent entrer dans un cercle vicieux d'auto-stimulation qui aggrave la maladie (Parker et al., 2014). Dans le contexte de la FPI, l'équilibre entre les MMPs et leurs inhibiteurs TIMPs est également rompu. Ainsi, de manière surprenante, de nombreuses MMP surexprimées dans les poumons ont été associées au développement de la maladie en favorisant la TEM (MMP-3 et MMP-7), une cicatrisation incontrôlée (MMP-3 et MMP-9) ou une migration anormale des fibroblastes (MMP-8) (Craig et al., 2015).

3. **Activité contractile**

Les myofibroblastes activés par le TGF- β ont des caractéristiques similaires aux cellules du muscle lisse. Ils sont identifiables via leur contraction cytosquelletique très développée associée à une forte expression d'alpha-smooth-muscle actin (α -SMA) et de vimentine (Hinz et al., 2001). Ainsi, l' α -SMA peut être dosée dans le sérum et utilisée comme biomarqueur non invasif de fibrose pulmonaire incluant la FPI, la BPCO ou même certains cancers (Holm Nielsen et al., 2018). Au sein de la MEC, l'activité contractile des myofibroblastes génère une tension mécanique qui a pour rôle initial la fermeture des plaies pendant le processus de cicatrisation. Cependant, la contraction des myofibroblastes est irréversible, ce qui contribue à rigidifier la MEC et donc la structure pulmonaire dans le cadre de la FPI. De plus, le TGF- β latent stocké dans la MEC va être libéré du LAP en captant les contractions mécaniques du cytosquelette d'actine via les intégrines (voir partie activation mécanique du TGF- β). Cette libération additionnelle de TGF- β va donc participer au cercle vicieux d'auto-activation des foyers fibroblastiques au cours de la maladie.

4. La glycolyse aérobie

Différentes altérations métaboliques sont retrouvées dans la FPI, avec des dérégulations impliquant le système rénine/angiotensine, l'hypoxie, le métabolisme lipidique et la respiration mitochondriale comme glycolytique (Bargagli et al., 2020). L'augmentation du métabolisme glycolytique, appelé effet Warburg, a été rapporté chez les fibroblastes activés par le TGF- β (Hewitson and Smith, 2021; Maher, 2015; O'Leary et al., 2020; Schruf et al., 2019). D'abord décrit en oncologie, l'effet Warburg est le constat que la plupart des cellules cancéreuses produisent de l'énergie par un processus moins efficace que la respiration mitochondriale et le cycle de Krebs. En effet, ces cellules favorisent une glycolyse aérobie consistant en un niveau élevé d'absorption de glucose et d'activité glycolytique suivie d'une forte production d'acide lactique même en présence d'oxygène (Alfarouk et al., 2014). Cependant, dans le contexte de la FPI, la voie SMAD induit l'expression de nombreuses enzymes de la glycolyse comme GLUT1 (Glucose transporter 1), GLUT3 (Glucose transporter 3), HK2 (Hexokinase 2), PKM2 (Pyruvate kinase M2) et PFKB3 (6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Biphosphatase 3) ce qui stimule un switch du métabolisme mitochondrial vers la glycolyse aérobie (Figure 14) (Liu and Chen, 2022). Ainsi, dans les tissus pulmonaires des patients FPI, la production d'acides lactiques et l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) sont supérieures à la normale (Kottmann et al., 2012). Il a également été rapporté *in vitro* que le TGF- β induit l'expression et l'activité de la LDH5 mais que la différenciation myofibroblastique n'est pas dépendante de ce phénomène (Schruf et al., 2019). Or, un excès d'acide lactique et l'acidification du milieu extracellulaire est capable d'activer le TGF- β latent via la dénaturation de la LAP, ce qui participe à la boucle d'auto-activation des fibroblastes (Kottmann et al., 2012). Le TGF- β stimule également l'absorption du glucose dans les cellules mésangiales et dans la lignée fibroblastique NH/3T3 via l'induction de l'expression des transporteurs GLUT (Inoki et al., 1999; Kitagawa et al., 1991). Or, un taux élevé de glucose induit la production de TGF- β ainsi que l'expression à la membrane et l'activité de ses récepteurs TGF β RI et TGF β RII (Wu and Derynck, 2009). Ensemble, ces observations suggèrent qu'une inhibition de l'effet Warburg pourrait interférer avec le processus de fibrogénèse. Ainsi, *in vivo* dans le modèle bléomycine, l'utilisation d'un inhibiteur de PFKB3, une enzyme clé de la glycolyse induite pendant la différenciation myofibroblastique, permet de réduire la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (Xie et al., 2015). Enfin, chez les patients FPI, un index pronostic basé sur l'augmentation de l'expression des gènes de la glycolyse (stanniocalcine 2, transketolase like 1, artemin) au sein des tissus pulmonaires des

patients a été proposé, et cet index a eu une bonne performance prédictive de la survie des patients sur deux cohortes (Li et al., 2023).

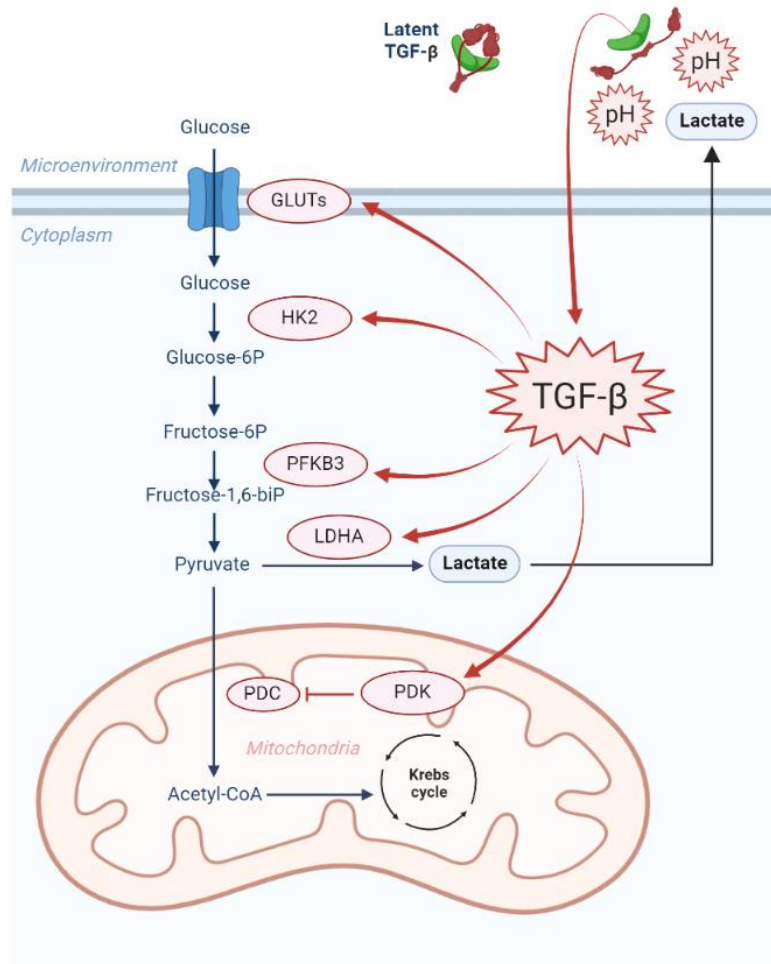


Figure 14 : Stimulation du métabolisme glycolytique par le TGF-β. Le TGF-β induit l'expression de plusieurs enzymes glycolytiques qui entraînent une forte production et sécrétion de lactates. L'acidification engendrée active le TGF-β latent en dénaturant le complexe LAP (Latent associated protein). GLUTs : Glucose transporters ; HK2 : Hexokinase-2 ; LDHA : lactate déshydrogénase A ; PFKB3 : 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Biphosphatase 3 ; PDC : Pyruvate Dehydrogenase Complex ; PDK : Pyruvate dehydrogenase kinase. Par Tom Voisin, Biorender.

iii. Le PDGF-BB

a. Définition

Le PDGF (Platelet-derived growth factor) ou facteur de croissance dérivé des plaquettes est une famille de facteurs de croissance qui devient actif en homo ou hétéro-dimère. Le PDGF est produit par les plaquettes activées, les cellules du muscle lisse, les macrophages activés et les cellules endothéliales (Deng et al., 2015). Il existe quatre monomères polypeptidiques de PDGF qui peuvent se dimériser: Le PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C et le PDGF-D (Andrae et al., 2008). Le PDGF agit via ses récepteurs à tyrosine kinase transmembranaires PDGFR- α et PDGFR- β . Un fois qu'un ligand est fixé à ce récepteur, le PDGFR se dimérise pour activer sa voie de signalisation (Andrae et al., 2008). Dans le cas de la FPI, le PDGF-BB est le plus associé à la maladie en jouant un rôle de puissant chimio-attractant pour les fibroblastes et les fibrocytes circulants (Aono et al., 2014; Rieg et al., 2022). L'activité chimiotactiques de trois isoformes différents du PDGF a été testée sur les fibroblastes, les monocytes et les granulocytes humains. Le PDGF-AB et le PDGF-BB induisent des réponses fortes et dose-dépendantes à la fois dans les fibroblastes et les monocytes, alors que le PDGF-AA n'a pas stimulé le chimiotactisme de ces types de cellules (Siegbahn et al. 1990). Une autre étude *in vivo* dans le modèle bléomycine a montré que le PDGF-BB est un chimioattractant plus puissant que les autres PDGF, puisque l'utilisation d'un anticorps anti-PDGFR- β a plus diminué le nombre de fibrocytes dans les poumons des souris comparé à l'anticorps anti-PDGFR- α (Aono et al., 2014). Cliniquement, le sérum des patients FPI est enrichi en PDGF-BB et une concentration plus élevée est prédictive d'exacerbations ainsi que d'un taux de survie plus faible (Arai et al., 2022). Chez la souris, l'inhibition du récepteur au PDGF-BB et de sa voie de signalisation atténue la progression de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (Abdollahi et al., 2005). Enfin, chez les patients FPI, l'utilisation clinique du nintédanib, un inhibiteur des récepteurs à tyrosine kinase dont le PDGFR fait partie, diminue le déclin des fonctions respiratoires (Lancaster et al., 2019).

b. Voie de signalisation

La chaîne d'activation Raf/MEK/ERK est l'une des voies principales activée par le PDGF-BB (Figure 15). En effet, la GTPase Ras est activée par le PDGFR et est un commutateur moléculaire pour toute un ensemble de voies de signalisations. La protéine possède une activité enzymatique GTP endogène, facilitant la signalisation extracellulaire-intracellulaire, et est en outre une protéine en amont de la voie Raf-MEK-ERK (Hennig et al., 2015). Le PDGF-BB induit

la phosphorylation des résidus tyrosine intracellulaire du PDGFR, ce qui permet de convertir la Ras-GDP quiescente en Ras-GTP active. La Ras activée peut alors déclencher la cascade de phosphorylations des protéines Raf, MEK puis finalement ERK. ERK pourra ensuite se transloquer dans le noyau et activer de nombreux substrats par phosphorylation (125 substrats nucléaires identifiés) impliquant un grand nombre de facteurs de transcription, des enzymes de remodelage de la chromatine, ou des protéines structurales (Maik-Rachline et al., 2019). Dans la fibrogenèse, l'activité de ERK induit l'expression des cyclines et CDK permettant la progression du cycle cellulaire, ce qui stimule la prolifération des fibroblastes (voir partie « Le cycle cellulaire ») (Chambard et al., 2007; Villanueva et al., 2007). Ainsi, l'activité de ERK stimule directement la mitose et la chemotaxie dans les modèles de fibrose pulmonaire comme

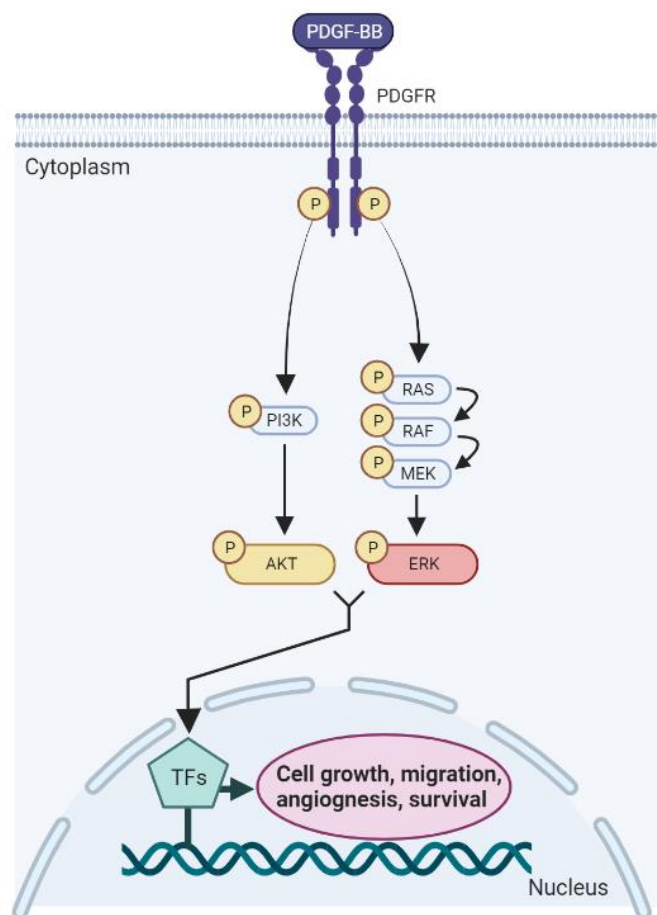


Figure 15 : Activation de la voie de signalisation ERK et AKT par le PDGF-BB. Le PDGF-BB se fixe à son récepteur transmembranaire pour activer les protéines PI3K/AKT ou RAS/RAF/MEK/ERK par phosphorylation. Les complexes transcriptionnels actifs transloquent dans le noyau pour stimuler l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la migration, l'angiogenèse et la survie cellulaire. Par Tom Voisin, Biorender.

hépatique (Y. Hu et al., 2020; Ying et al., 2017). La voie PI3K (phosphoinositide 3-kinase)/AKT est également activée par le PDGF-BB. Cette voie est impliquée dans la fibrose pulmonaire

induite par la bléomycine via la régulation de la TEM, de la survie et de la prolifération des fibroblastes (Wang et al., 2022; Zhang et al., 2016). Une activation de cette voie a été observée dans les foyers fibroblastiques des patients FPI (Cully, 2020; Mercer et al., 2016), et un traitement par inhibiteur de PI3K permet d'améliorer les fonctions pulmonaires du modèle murin bléomycine via un blocage de la prolifération et de la TEM (Hsu et al., 2017; Hu et al., 2022). Il a également été rapporté que la voie PI3K/Akt/mTOR est impliquée dans la reprogrammation glycolytique de la lignée de fibroblastes pulmonaires MRC-5, ce qui suggère que le ciblage de cette voie pourrait contribuer à atténuer la FPI au niveau métabolique (X. Hu et al., 2020).

c. Le cycle cellulaire

Le processus de croissance cellulaire est hautement régulé et contrôlé au cours d'un cycle divisé en quatre phases séquentielles (Figure 16) (Vermeulen et al., 2003). Ces quatre étapes sont appelées G₀/G₁ (Gap 0/1), S (Synthèse), G₂ (Gap2) et M (Mitose). La phase G₀ est un stade quiescent résultant soit de stimuli externes indiquant à la cellule de ne pas se diviser, soit d'une diminution des signaux mitogènes provenant de l'environnement tissulaire. En présence d'une signalisation mitogénique appropriées, la cellule passe en phase G₁ pour se préparer à la division cellulaire, ce qui se traduit par une augmentation de la transcription et de la traduction des protéines essentielles à la synthèse de l'ADN. La cellule peut ensuite passer en phase S, qui aboutit à une réplification complète du génome par les ADN polymérases. Une fois que deux

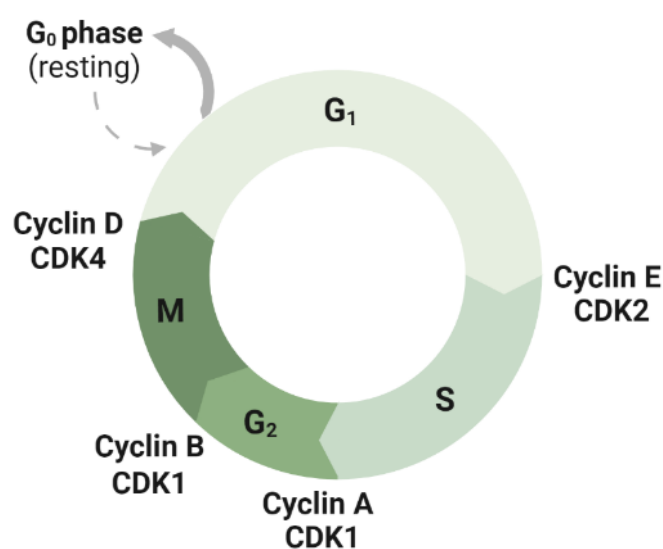


Figure 16 : Phases et régulation du cycle cellulaire par les couples cycline/CDK. Le couple cycline E/CDK2 permet le passage en phase de synthèse (S), cycline A/CDK1 en phase G₂, cycline B/CDK1 en phase de mitose (M) et cycline D/CDK4 en phase G₀/G₁.

copies complètes du matériel génétique sont présentes dans le noyau, la cellule passe en phase G2, où elle organise et condense le matériel génétique pour préparer la division. La dernière phase est la mitose (M) où la cellule répartit les deux copies du matériel génétique dans deux cellules filles. Une fois la phase M terminée, la cellule peut recommencer un cycle ou s'en retirer transitoirement en passant en phase quiescente G0.

Les kinases dépendantes des cyclines (CDK) sont une famille de protéines kinases hétérodimériques à sérine/thréonine qui permettent à la cellule de progresser dans chaque phase du cycle cellulaire (Sánchez and Dynlacht, 2005). Les CDK sont exprimées de manière constitutive et sont activées lorsqu'elles sont liées à leurs cyclines partenaires respectives. Les cyclines sont des sous-unités régulatrices qui sont exprimées de manière séquentielle tout au long du cycle cellulaire. Une fois complexés, les cyclines-CDK ont une forte activité kinase permettant d'activer les facteurs nécessaires au passage des différentes phases du cycle cellulaire. Leur rôle est comparable à celui d'un interrupteur, avec par exemple les complexes cycline D-CDK4 et cycline D-CDK6 qui assurent la progression de la phase G1, et le complexe cycline E-CDK2 permettant le passage en phase S. Une fois que la cellule a franchi la phase G1, elle n'est plus sensible aux signaux de croissance externes et est engagée jusqu'à la mitose (Malumbres, 2020). La cellule passe la phase S grâce aux complexes cycline A-CDK2. En G2, les complexes cycline B-CDK1 régulent l'entrée en mitose. Puisque les cyclines sont exprimées séquentiellement, les enzymes CDK ne sont activées qu'à des moments précis du cycle pendant les périodes d'expression abondante de leur cycline partenaire.

Le PDGF-BB agit tôt dans le cycle cellulaire pour stimuler la transition de G0 à G1 et rendre les cellules aptes à répondre aux facteurs de croissance. L'exposition de fibroblastes quiescents au PDGF-BB est également suffisante pour stimuler la synthèse de l'ADN. Ainsi, une exposition au PDGF-BB induit l'expression des cycline D1, cycline E, cycline A, CDK2 et CDK4 dans la lignée de fibroblastes Balb/c 3T3 comme dans les cellules du muscle lisse (Hwang et al., 2020; Winston et al., 1996; Winston and Pledger, 1993). Chez les fibroblastes humains isolés de patients FPI, le PDGF-BB induit également l'expression des cyclines D1, A, B et des CDK 1, 2, et 4 (Joannes et al., 2019).

d. La migration cellulaire

Au cours de la FPI, Le PDGF-BB agit aussi comme puissant chemoattractant des fibrocytes et fibroblastes vers les poumons et les sites lésés. Ainsi, l'utilisation d'un anticorps bloquant le PDGFR a permis de diminuer la migration des fibrocytes *in vitro* et de réduire le nombre de fibrocytes dans les poumons des souris traitées par bléomycine (Aono et al., 2014). Le PDGF-BB induit également une forte migration des fibroblastes pulmonaires issus de patients FPI mais aussi celle des fibroblastes cutanés humains (Joannes et al. 2019; W. Li et al. 2004).

iv. Autres médiateurs impliqués dans l'activation des fibroblastes

a. Les FGF et VEGF

Les facteurs de croissance de la famille des FGF et VEGF sont également impliqués dans la pathogenèse de la FPI et sont capable d'activer les mêmes voies de signalisation que le PDGF-BB.

Les FGF (famille de 20 protéines) et leurs récepteurs à tyrosine kinase FGFR (FGFR1-4) régulent d'importantes fonctions telles que la prolifération, la différenciation, la migration et la survie cellulaire (Boilly et al., 2000). Certains membres de la famille des FGF ont des propriétés pro-fibrosantes comme notamment le FGF-2 qui a de forte propriétés mitogéniques dans les fibroblastes pulmonaires issus de patients FPI (Shi et al., 2016; Xiao, 2012). De la même façon que le PDGF, les FGFR reconnaissent leurs ligands et subissent une dimérisation suivie d'une autophosphorylation qui va activer la signalisation PI3K/AKT et Raf/MEK/ERK (Nathan et al., 2022). A l'inverse, certains FGF comme les FGF-1/9/7/10/18 semblent avoir des propriété anti-fibrosantes en antagonisant la signalisation du TGF- β 1 ou en prévenant l'apoptose des CEAll (Gupte et al., 2009; Joannes et al., 2016; Justet et al., 2017; Shimbori et al., 2016). Il a également été rapporté que la concentration en FGF-19 est plus faible dans le sérum des patients FPI, et que sa surexpression *in vivo* permet de limiter la fibrose pulmonaire, tout en diminuant *in vitro* la différenciation des myofibroblastes induite par le TGF- β (Justet et al., 2022).

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) est un puissant facteur angiogénique qui est abondamment produit les CEAll et les myofibroblastes de poumons FPI, et le TGF- β 1 stimule son expression (Ebina et al., 2004; Fang et al., 2020). La fonction biologique du VEGF passe par sa liaison aux récepteurs tyrosine kinase VEGFR1 et VEGFR2 qui régulent la migration et la prolifération cellulaire par la voie PI3K/AKT et Raf/MEK/ERK. La concentration

de VEGF dans le sérum des patients FPI est associée à la gravité et à la progression de la maladie (Simler et al., 2004). L'expression du VEGF augmente dans les poumons du modèle bléomycine, et l'inhibition du VEGF à l'aide d'un anticorps anti-VEGF atténue l'évolution de la fibrose (Iyer et al., 2015).

b. La voie Wnt/ β -catenin

La liaison de Wnt (famille de 19 glycoprotéines) à ses récepteurs membranaires entraîne la phosphorylation puis la translocation de la β -catenine dans le noyau, ce qui va induire l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le cycle cellulaire comme la cycline D1, mais aussi la différenciation et la synthèse de matrice extracellulaire (Hamburg-Shields et al., 2015; Vuga et al., 2009). Les lésions prolifératives des patients FPI présentent une expression et une accumulation aberrante de β -catenine nucléaire dans les foyers fibroblastiques (Chilosi et al., 2003). L'inhibition de cette voie *in vitro* et dans le modèle bléomycine a permis de réduire la différenciation des cellules souches mésenchymateuses résidentes tout en atténuant les lésions pulmonaires (Cao et al., 2018).

c. La voie Notch

Dans le poumon adulte, la voie Notch préserve les niches de cellules progénitrices alvéolaires en coordination avec d'autres voies de développement, et participe à la réparation des lésions tissulaires (Xu et al., 2012). L'activation de la voie Notch stimule l'expression d' α -SMA dans les cellules musculaires lisses et au cours de la transition endothélio-mésenchymateuse (Nosedà et al., 2006). Certaines études suggèrent que la voie Notch induit la différenciation des myofibroblastes en synergie avec la voie TGF- β -Smad3 (Aoyagi-Ikeda et al., 2011; Zavadil et al., 2004). Dans le modèle bléomycine, l'inhibition de la signalisation Notch dans les cellules stromales mésenchymateuses a permis d'atténuer la fibrose pulmonaire (Hu et al., 2015; Zhou et al., 2016).

CHAPITRE III : La vitamine D

I. Définition

i. Généralités

La vitamine D est une molécule liposoluble qui, malgré son nom, est considérée comme une hormone stéroïdienne. Son rôle vital a été largement décrit et associé au maintien de la concentration physiologique en calcium sérique qui servira à la minéralisation osseuse. Contrairement à d'autres vitamines, la vitamine D peut être synthétisée par notre corps lorsqu'il est exposé à la lumière du soleil. Elle peut également être obtenue à partir de certaines sources alimentaires ou de suppléments. Outre son rôle dans la santé osseuse, la vitamine D est également impliquée dans de nombreux autres processus biologiques, notamment dans le fonctionnement du système immunitaire, en aidant à combattre les infections et à réguler l'inflammation. Des études ont également suggéré un lien entre la vitamine D et la prévention de certaines maladies chroniques, telles que les maladies auto-immunitaires, cardiovasculaires, le diabète, les cancers, l'ostéoporose et la fibrose (Álvarez-Mercado et al., 2023; Aranow, 2011; Ma and Peng, 2019a; Wang et al., 2017).

Différents organismes internationaux de santé ont défini les concentrations sériques optimales en vitamine D, ainsi que celles correspondant à une insuffisance ou une carence vitaminique (Tableau 2).

Tableau 2 : Valeurs de référence (nmol/L) définissant la carence, l'insuffisance, les taux recommandés et la toxicité de la vitamine D retrouvées dans la littérature. La carence est décrite entre 12,5 et 50 nM et le taux recommandé entre 50 et 250 nM.

Définitions	ANZBMS, ESA, OA ⁴ , 2005 (34)	ENNS ⁵ , 2006 (35)	Conseil supérieur de la santé (Belgique), 2009 (17)	IOF ³ , 2010 (36)	Canadian medical association Osteoporosis Canada, 2010 (18)	IOM ¹ , 2011 (1)	GRIO ² , 2011 (13)	US Endocrine society, 2011 (37)	Académie nationale de médecine, 2012 (8)
Carence	< 12,5 [†]	< 12,5 [†]	NR	NR	< 25	NR	< 25	< 50	< 30
Insuffisance	12,5 – 25 [‡]	12,5 - 25 [‡]	< 30	NR	25 - 75	NR	25 - 75	52,5-72,5	NR
	25 - 50 [§]	25 – 50 [§]							
Taux recommandé.	> 50	NR	> 50	> 75 [¶]	> 75	> 50	75 -175	75 - 250	≈ 50 ^{**} 75 - 80 ^{††}
Toxicité	NR	NR	NR	NR	> 250	125*	> 375	> 250	> 250

1 : Australian New Zealand bone and mineral society, Endocrine society of Australia osteoporosis Australia ; 2 : Groupe de recherche et d'information sur les ostéoporoses ; 3 : International osteoporosis foundation ; 4 : Institute of medicine ; 5 : Etude nationale nutrition santé. D'après la Haute Autorité de Santé, 2013.

Malheureusement, à partir de ces valeurs de référence, les études estiment que près de 50 % de la population mondiale présente une insuffisance en vitamine D et qu'un milliard de personnes sont carencés, toutes ethnies et tranche d'âge confondues (Bruyère et al., 2007; Holick, 2007). Cette globalisation d'hypovitaminose D est principalement attribuée au mode de vie sédentaire qui limite l'exposition au soleil, et le statut en vitamine D peut aussi être impacté par la localisation géographique ou les variations saisonnières d'ensoleillement (Khoo et al., 2012; Rostand, 1997; Yeum et al., 2016).

ii. Pharmacocinétique

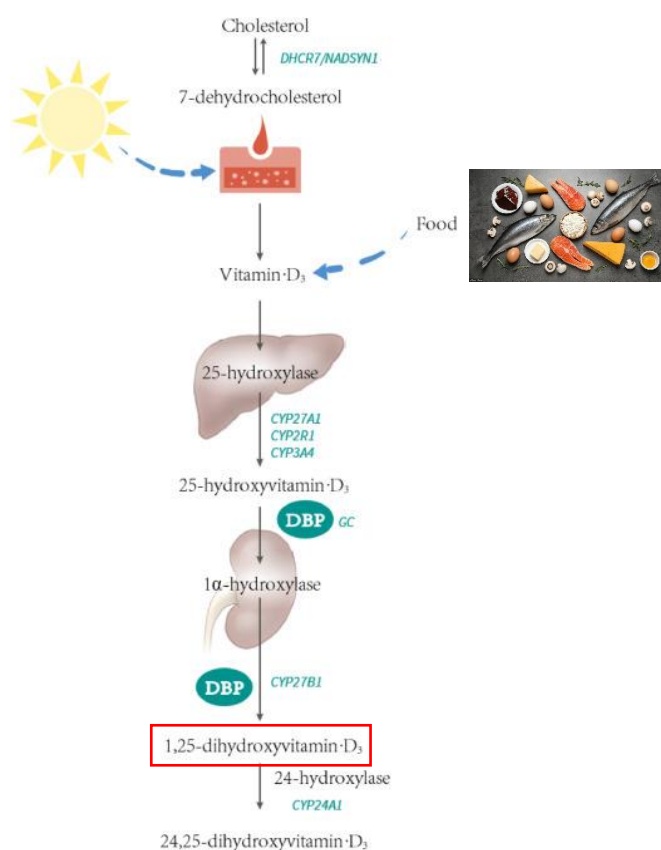


Figure 17 : Voie métabolique de la vitamine D. La vitamine D3 est produite par la peau ou déjà présente dans certains aliments. Elle est ensuite métabolisée par le foie et les reins pour produire son métabolite actif, la 1,25-dihydroxyvitamine D3 encadrée en rouge (1,25(OH)₂D). D'après Borsche, Glauner, et von Mendel 2021.

Absorption

La vitamine D est produite au niveau cutané lors d'une exposition au soleil. Les rayonnements ultraviolets B (UVB) (290-315 nm) sont absorbés par le 7-déhydrocholestérol stocké dans l'épiderme pour former la prévitamine D3 (MacLaughlin et al., 1982). La

prévitamine D3 est intrinsèquement instable et se transforme rapidement en vitamine D3 par un processus dépendant de la température (Figure 17). L'intensité, la fréquence d'exposition aux UVB et le niveau de pigmentation de la peau impactent donc la production de vitamine D3, et le taux de mélanine cutanée ou encore la crème solaire diminuent fortement sa production (Holick, 2006; Webb et al., 1988). La vitamine D3 peut aussi être directement absorbée via l'alimentation où on la retrouve concentrée dans les poissons gras comme le saumon, la morue ou la truite (Dominguez et al., 2021). Cependant, ces aliments n'étant pas consommés quotidiennement ou en grande quantité, cet apport nutritionnel a une faible contribution au taux vitaminique comparé à l'exposition aux UVB. A ce stade, la vitamine D3 n'est pas biologiquement active et devra subir deux étapes de métabolisation pour exercer son rôle d'hormone.

Distribution

Une fois formée dans l'épiderme, la vitamine D3 est éjectée des cellules cutanées dans l'espace extracellulaire, où elle sera captée par sa protéine de liaison DBP (vitamin D binding protein) et transportée jusqu'au foie puis les reins. Une première hydroxylation dans le foie formera la 25-hydroxyvitamine D3 (25(OH)D) et une deuxième hydroxylation dans les reins formera la 1,25-dihydroxyvitamine D3 (1,25(OH)₂D) qui est son métabolite actif. Pour permettre ces étapes de transformation dans différents organes, la DBP a pour fonction la fixation et le transport de tous les métabolites de la vitamine D, avec une très forte affinité pour la 25(OH)D (20 fois plus que pour la 1,25(OH)₂D). La DBP est très polymorphique, ses 3 variants majoritaires sont le GC1F, GC1S et GC2 qui n'ont pas la même capacité de fixation à la 25(OH)D. Ainsi, le variant GC1F (fréquent dans les populations asiatiques et africaines) a une plus grande affinité pour la vitamine D que les variants GC1S et GC2 (fréquent dans les populations européennes) (Constans et al., 1985; Kamboh and Ferrell, 1986). Ces polymorphismes pourraient impacter la biodisponibilité de la 25(OH)D, puisqu'une étude *in vitro* sur des monocytes a montré que la DBP ayant la plus forte affinité (GC1F) réduit l'effet génétique de la vitamine D comparé à une DBP à plus faible affinité (GC1S ou GC2) (Chun et al., 2014). Enfin, la 25(OH)D possède une demi-vie de 15 jours, ce qui est nettement supérieur à celle de la 1,25(OH)₂D avec seulement 10-20 h de demi-vie (Fakih et al., 2007; Jones et al., 2014). Ainsi, la 25(OH)D est la forme circulante la plus abondante et stable de vitamine D, et sa concentration

sérique est le bioindicateur le plus fiable concernant le statut vitaminique d'un individu (Dominguez et al., 2021).

Métabolisme

La première hydroxylation de la vitamine D3 a lieu dans le foie au niveau du carbone 25, et est catalysée majoritairement par la 25-hydroxylase CYP2R1 du réticulum endoplasmique ou dans une moindre mesure par le CYP27B1 mitochondrial des hépatocytes. Ainsi, il a été rapporté chez des souris double KO homozygotes pour les CYP2R1 et CYP27B1 une inhibition de plus de 80 % de la 25(OH)D circulante (Zhu et al., 2013). D'autres 25-hydroxylases sont donc certainement impliquées dans la production de 25(OH)D mais ne sont pas encore connues. La 25(OH)D est ensuite transportée par la DBP jusqu'au niveau des cellules épithéliales tubulaires rénales, où elle sera endocytée via le récepteur à protéine de masse moléculaire élevée (600kDa) mégaline (Chun et al., 2014). Cette étape est essentielle à l'activation de la 25(OH)D puisque les souris KO pour la mégaline présentent un phénotype rachitique et ont un défaut du métabolisme osseux (Nykjaer et al., 1999). Dans le tubule proximal rénal, le CYP27B1 hydroxyle le carbone en position 1 de la 25(OH)D pour produire la 1,25(OH)₂D. L'inactivation de cette enzyme dans les souris est aussi responsable de rachitisme et d'un niveau indétectable de 1,25(OH)₂D sérique (Dardenne et al., 2001).

Elimination

La principale voie d'élimination de la vitamine D nécessite l'hydroxylation de son carbone en position 24 par le CYP24A1 mitochondrial. Le CYP24A1 est capable de convertir la 25(OH)D comme la 1,25(OH)₂D en 24,25(OH)₂D. Sous cette forme hydroxylée, la 24,25(OH)₂D va pouvoir être ciblée par le système d'excrétion et éliminée par la bile. Les souris KO pour le CYP24A1 ont un très faible taux de survie (50% à 3 semaines) et souffrent d'hypercalcémie généralisée à cause de l'accumulation de 1,25(OH)₂D ne pouvant pas être éliminée. De manière intéressante, les souris double KO pour le CYP24A1 et le VDR ne présentent plus ces symptômes, ce qui suggère que l'effet toxique de la 1,25(OH)₂D passe bien spécifiquement par l'activation de son récepteur (St-Arnaud et al., 2000). Toutes les cellules exprimant le récepteur à la vitamine D expriment également le CYP24A1, et la 1,25(OH)₂D stimule l'expression de ce cytochrome (Jones et al., 2012; Pike and Meyer, 2012). Ainsi, le CYP24A1 permet de réguler finement la production et l'accumulation de 1,25(OH)₂D pour contrôler ses effets hormonaux dans ses cellules cibles. Bien que la 24,25(OH)₂D semblait à priori n'être qu'un déchet de la

1,25(OH)₂D, son rôle régulateur dans la cicatrisation osseuse est de plus en plus mis en évidence (Martineau et al., 2018; René St-Arnaud 2010).

iii. Voie de signalisation

L'activité biologique de la 1,25(OH)₂D passe par l'activation du VDR (Vitamin D Receptor). Le VDR est un récepteur nucléaire stéroïdien de la famille des facteurs de transcription. La fixation de la 1,25(OH)₂D sur le VDR induit son changement de conformation, ce qui lui permet de se lier en hétérodimère avec le récepteur X de rétinoïdes (RXR) ainsi qu'à différents co-facteurs nécessaires à la régulation transcriptomique de gènes cibles. Une fois activé et transloqué dans le noyau, l'hétérodimère VDR/RXR va se lier à des séquences spécifiques de l'ADN appelées VDRE (vitamin D responsive elements). Ces éléments de réponses sont définis par une répétition directe de 6 nucléotides séparée par 3 nucléotides aléatoires, un motif dit de répétition directe 3 (DR3). D'autres motifs structurels VDRE ont également été décrits, mais le motif DR3 est le plus courant. Ainsi, la séquence consensus la plus fréquente pour le VDRE de l'homme est AGGTCAXxxAGGTCA. Ces VDRE peuvent se situer à plus d'un million de paires de bases du gène qu'ils régulent. Avec plus de 2700 positions génomiques pouvant être occupées par le VDR, il est rapporté que ce récepteur peut réguler l'expression d'environ 200 gènes (Ramagopalan et al., 2010). Il est important de noter qu'il existe des VDRE négatifs (nVDRE), qui ressemblent aux séquences consensus VDRE mais qui régulent à la baisse l'expression des gènes. Ainsi, les gènes cibles de la vitamine D codent pour des protéines ayant une grande variété de fonctions physiologiques, allant du contrôle de l'homéostasie du calcium, de l'immunité innée et adaptative, à la différenciation cellulaire.

iv. Effets classiques de la vitamine D : Minéralisation

La vitamine D joue un rôle crucial dans l'homéostasie calcique osseuse et le maintien d'une concentration stable de calcium dans le sang. Cette fonction passe par la régulation transcriptomique des transporteurs du calcium, stimulant à la fois son absorption intestinale et sa réabsorption rénale (van de Peppel and van Leeuwen, 2014). Le VDR est exprimé dans les ostéoblastes pour que la 1,25(OH)₂D stimule l'expression de divers gènes liés à leur différenciation permettant la minéralisation osseuse, tels que la phosphatase alcaline (ALPL), l'ostéocalcine (BGLAP) et l'ostéopontine (SPP1). Ainsi, il a été démontré que les souris dépourvues de VDR présentent un retard de croissance, une grave déficience osseuse, des

anomalies immunitaires et une mort prématurée à l'âge de 15 semaines en raison d'une hypocalcémie (Mathieu et al., 2001; Yoshizawa et al., 1997). Un régime riche en calcium a rétabli tous ces effets pathologiques, ce qui suggère que tant que l'homéostasie calcique est sous contrôle, les os ne sont pas affectés par une déficience en VDR (Mathieu et al., 2001).

v. Effets non classiques de la vitamine D

a. Vitamine D et maladies immunitaires

Il existe de plus en plus de preuves épidémiologiques établissant un lien entre la carence en vitamine D et les maladies liées au système immunitaire telles que l'asthme, la sclérose en plaques, la polyarthrite rhumatoïde, le diabète, l'athérosclérose, les maladies inflammatoires de l'intestin et le lupus érythémateux (Aranow, 2011; Littorin et al., 2006; Merlino et al., 2004; Munger et al., 2006). Ces études établissent par exemple une association inverse entre les niveaux circulants de 25(OH)D et les marqueurs inflammatoires comme la protéine C réactive et l'interleukine 6 (Liu et al., 2011). Chez les individus sains, les marqueurs inflammatoires systémiques tels que le TNF- α , l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12 et MCP-1 sont d'ailleurs nettement régulés à la baisse en été comparé à l'hiver (Calton et al., 2017). L'effet immunomodulateur de la vitamine D a ainsi été démontré *in vitro* sur les acteurs cellulaires de l'immunité innée comme adaptative (Figure 18) (Cyprian et al., 2019). Globalement, la vitamine D inhibe la production des médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-2, IL-6, IL-8, IL-17, IL-21, IFN- γ et TNF- α tout en stimulant la production de médiateurs anti-inflammatoires et régulateurs de l'inflammation tels que l'IL-10, IL-4 et IL-5 (Cyprian et al., 2019). Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont aussi démontré une diminution du niveau d'expression des costimulateurs (CD80, CD40, CD86) du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II et d'autres marqueurs de surface induits par la maturation des cellules dendritiques (Bartels et al., 2010). La vitamine D régule également la différenciation et l'activité des cellules T CD4+, entraînant une réponse Th1/Th2 plus équilibrée et une activation des cellules T régulatrices, ce qui limite le développement de cellules T autoréactives et prévient l'inflammation comme l'auto-immunité (BHALLA et al., 1983; Cantorna et al., 2015; Yang et al., 2013). Enfin, la vitamine D amoindrit la réponse immunitaire humorale des lymphocytes B en limitant leur différenciation, leur prolifération et la production d'immunoglobulines (Rolf et al., 2016).

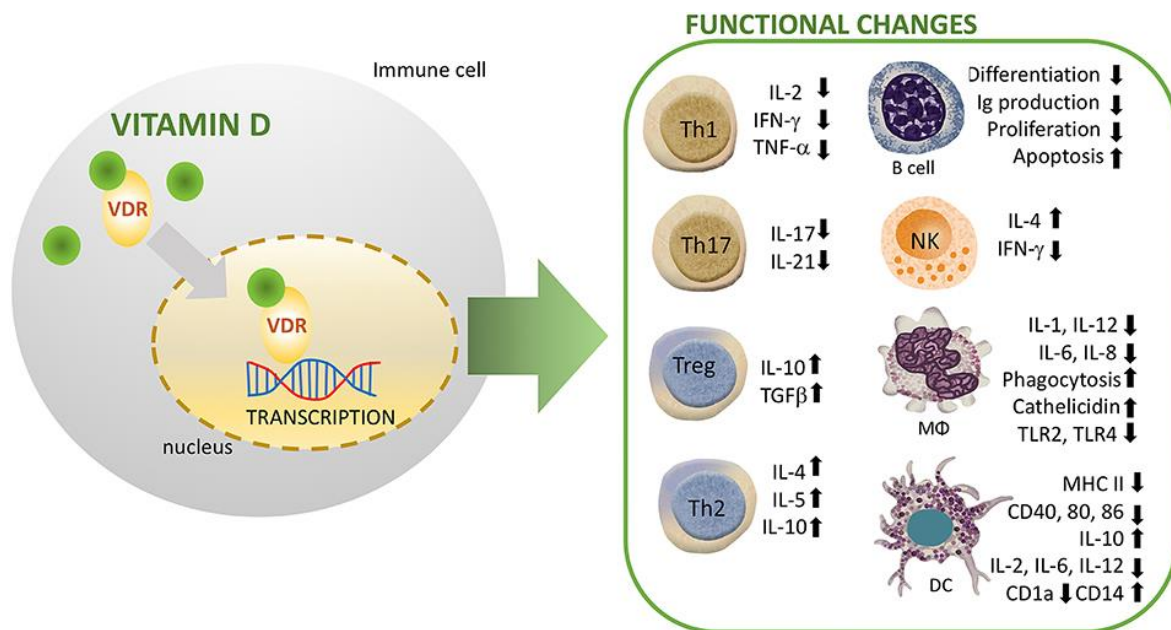


Figure 18: Effets immunomodulateurs de la vitamine D (1,25(OH)₂D) sur plusieurs lignées de cellules immunitaires. NK, natural killer ; DC, cellule dendritique ; R, récepteur ; VDR, récepteur de la vitamine D ; MΦ, macrophage. D'après Cyprian et al. 2019.

La FPI étant une maladie d'origine inflammatoire causée par des agressions multiples de l'épithélium, la vitamine D pourrait jouer un rôle non négligeable dans cette phase en amont de la cascade fibrotique. En effet, dans le contexte de la FPI, les cellules épithéliales alvéolaires sont connues pour sécréter certains médiateurs cités précédemment responsables d'une infiltration et d'une activation des neutrophiles, macrophages et lymphocytes. En réponse à ces signaux, les macrophages sécrètent de grandes quantités de TGF-β, PDGF-BB et de FGF favorisant la fibrose (Liu et al., 2017). Maintenir un taux physiologique stable de vitamine D permettrait donc d'empêcher une réponse aberrante des acteurs immunitaires déclencheurs de la maladie (Ma and Peng, 2019b).

b. Vitamine D et cancer

1. Prolifération

L'effet inhibiteur de la vitamine D sur la prolifération a été étudié *in vitro* sur de nombreuses lignées cellulaires provenant de cancers du sein, de l'ovaire, de la thyroïde, de la prostate, de mélanome ou de leucémie (Bhoora and Punchoo, 2020). Ces études font souvent état d'une réduction de la prolifération médiée par un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1. L'arrêt en G2/M est rarement signalé, et les mécanismes de cet arrêt sont mal décrits (Spath et

al. 2017). Dans ces lignées cancéreuses, l'arrêt en G0/G1 est médié par l'augmentation de l'expression de p21 et p27, qui sont des inhibiteurs de l'activité des cyclines D et E. En effet, un élément de réponse au VDR a été retrouvé dans la région promotrice de p21 dans les cellules de cancer de la prostate et du sein (Moffatt et al., 2001; Verlinden et al., 1998). Contrairement à p21 qui est régulé au niveau génomique, le calcitriol semble inhiber p27 au niveau protéique en favorisant sa stabilisation et sa non dégradation par le protéasome (Scaglione-Sewell et al., 2000; Yang and Burnstein, 2003). La stabilisation de p27 par un traitement au calcitriol a ainsi induit une inhibition des CDK4 et CDK6 dans une lignée de cellules leucémiques (Wang et al., 1997).

2. Métabolisme

Comme décrit précédemment, l'effet Warburg est un phénomène où la plupart des cellules cancéreuses ne produisent plus d'énergie via le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative, même si les mitochondries sont en parfait état de fonctionnement. Les cellules cancéreuses passent par un processus moins efficace de glycolyse aérobie correspondant à une forte absorption de glucose, une augmentation de la glycolyse suivie d'une forte production et sécrétion d'acide lactique (Liberti and Locasale, 2016). Ce changement métabolique participe à la progression tumorale de différentes manières, notamment en augmentant l'apport énergétique en cas de manque d'oxygène, en stimulant la production de nucléotides, ou en limitant l'apport en glucose des cellules saines (Chang et al., 2015; Ho et al., 2015). Ce mécanisme étant décrit et associé au cancer depuis 90 ans, les premiers effets métaboliques de la vitamine D sur la glycolyse ont été observés dans les lignées cancéreuses. Ainsi, il a été constaté que le traitement avec de la vitamine D entraîne une diminution de l'expression des enzymes glycolytiques GLUT1, HK2, LDHA ainsi qu'une diminution de l'absorption du glucose dans les cellules de cancer du sein MCF-7 (Santos et al., 2018). La vitamine D affecte également l'effet Warburg dans des lignées de cancer du poumon A549 et NCI-H1975 via l'inactivation de la signalisation PI3K/AKT/mTOR et une diminution de l'expression des enzymes glycolytiques GLUT1, LDHA, HK2 et PKM2 (Yiyan et al., 2022). Il a aussi été rapporté dans 4 lignées leucémiques qu'un traitement à la vitamine D diminue la sécrétion de lactate tout en augmentant l'expression de FBP1, une enzyme régulant négativement la chaîne glycolytique (Xu et al., 2022; Zhang et al., 2021). Chez la souris, le calcitriol a réduit le volume et le poids de

xénogreffes de tumeurs colorectales tout en inhibant l'expression de GLUT1, HK2 et LDHA, et ce de manière proportionnelle à la dose de calcitriol administrée (Huang et al., 2021).

II. Vitamine D et Fibrogenèse

i. Etudes clinique

a. FPI

Aux États-Unis, une étude nutritionnelle sur 14 091 individus sains a montré que la concentration sérique en vitamine D est fortement corrélée avec la CVF et au VEF, ce qui a suggéré l'intérêt d'étudier l'effet d'une supplémentation en vitamine D chez les patients développant des maladies respiratoires telles que la FPI (Black and Scragg, 2005). De plus, une étude Grecque sur 93 patients FPI a montré que le taux sérique en vitamine D est prédictif de la mortalité toutes causes confondues (Figure 19 D) (Tzilas et al., 2019). Les patients de cette étude présentaient de faibles concentrations sériques de vitamine D (Figure 19 A) avec une moyenne de 18,76 ng/ml qui correspond à 44,93 nM. De plus, les concentrations sériques des patients étaient inversement corrélées avec le déclin de leur CVF (Figure 19 B) et de leur DLCO (Figure 19 C). Ces résultats ont récemment été appuyés par une étude Chinoise sur 72 patients

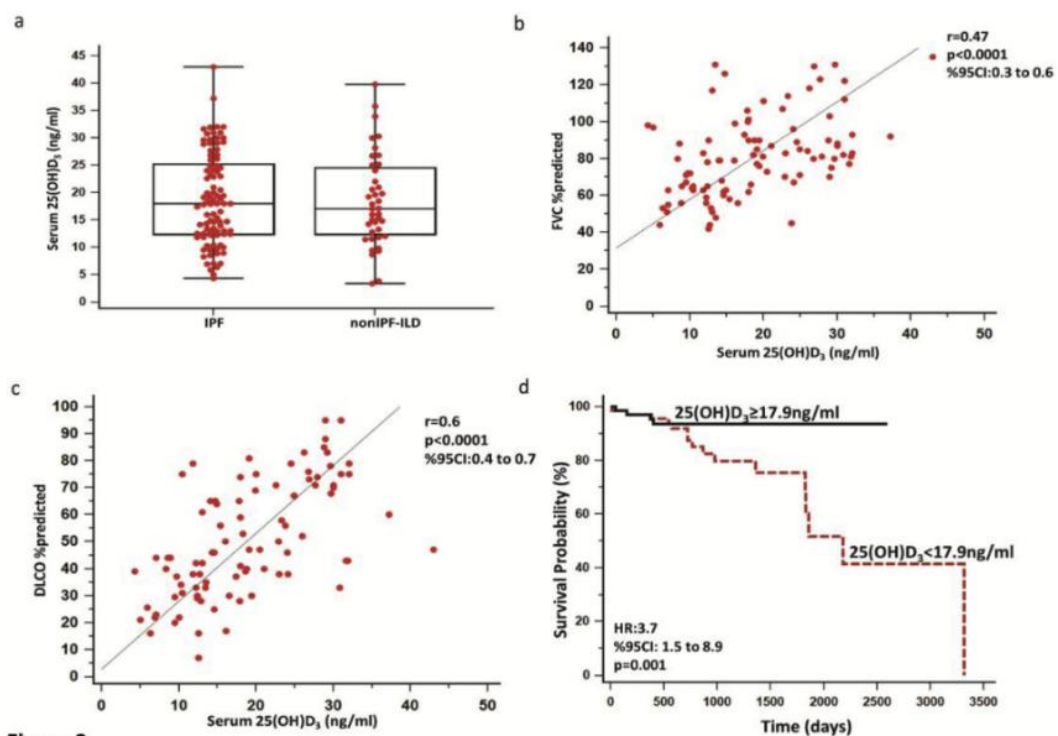


Figure 19 : Le taux de vitamine D des patients FPI est inversement corrélé à leur survie. Les taux sériques de vitamine D sont en corrélation avec les indicateurs cliniques et fonctionnels de la gravité de la maladie et sont prédictifs de la mortalité toutes causes confondues chez les patients atteints de FPI. D'après Tzilas et al. 2019.

qui a rapporté qu'une diminution du taux sérique en $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ est associée à un risque accru d'exacerbation aiguë (L. Yang et al., 2022). La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pourrait donc aussi être un biomarqueur prédictif potentiel du risque d'exacerbations chez les patients.

b. Sclérodémie systémique

La sclérodémie systémique est une maladie auto-immune qui a pour complication fréquente une fibrose interstitielle pulmonaire semblable à celle de la FPI. Il a été montré que l'expression du VDR est diminuée dans les fibroblastes de patients sclérodermiques comme dans les modèles murins de sclérodémie systémique (Zerr et al., 2015), et un faible taux de vitamine D est souvent mesurée dans cette maladie. Ce mauvais statut vitaminique est lié à une évolution plus agressive de la maladie avec une atteinte multiviscérale et sévère des organes, en particulier pulmonaire et cardiaque (Arnson et al., 2011; Groseanu et al., 2016).

c. Fibrose hépatique

Il a été rapporté que les souris $\text{VDR}^{-/-}$ développent spontanément une fibrose hépatique (Ding et al., 2013). La déficience en vitamine D est associée au développement de la fibrose hépatique chez les patients atteints de nombreuses maladies chroniques du foie telles que la stéatose hépatique non alcoolique, l'hépatite B chronique ou l'hépatite auto-immune (Efe et al., 2014; Kim et al., 2017; Yu et al., 2015). Dans ces maladies, le taux de vitamine D est négativement corrélé à l'évolution de la fibrose (Gerova et al., 2014; Udomsinprasert and Jittikoon, 2019).

d. Autre maladie pulmonaire

La BPCO (bronchopneumopathie chronique obstructive) est un autre type de maladie pulmonaire progressive caractérisée par des symptômes respiratoires à long terme et une limitation du débit d'air. Une étude sur 414 patients atteints de BPCO a montré que la carence en vitamine D est très fréquente et que sa concentration corrèle négativement avec le déclin des fonctions respiratoires (Janssens et al., 2010). Dans cette même étude, la carence en vitamine D des patients était liée spécifiquement à un variant muté de la DBP. Ainsi, un essai clinique a montré des effets bénéfiques d'une supplémentation de patients BPCO gravement carencés en vitamine D (taux sérique $< 10 \text{ ng/mL}$) en réduisant significativement les exacerbations dans le groupe supplémenté en vitamine D comparé au groupe placebo (Lehouck et al., 2012). Un autre essai clinique a montré des résultats similaires, avec une supplémentation en vitamine D qui protégeait contre les exacerbations modérées ou sévères

chez les patients dont la concentration sérique initiale était inférieure à 50 nmol/L. Cependant, l'effet protecteur de la supplémentation en vitamine D n'était plus présent chez les patients dont la concentration initiale était supérieure à 50 nmol/L (Martineau et al., 2015).

ii. Études expérimentales

Dans le but d'expliquer ces observations cliniques, différentes études expérimentales *in vitro* et *in vivo* ont étudié l'impact de la vitamine D sur les différentes étapes de la fibrogenèse. Le Tableau 3 présente un résumé de la littérature et des traitements effectués *in vitro* pour étudier les effets protecteurs de la vitamine D vis-à-vis du TGF- β 1. Il a été rapporté qu'une carence en vitamine D exacerbe la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine en aggravant partiellement la TEM médiée par le TGF- β /Smad2/3 (Li et al., 2019). Une autre étude a effectivement montré *in vitro* que la vitamine D diminue la TEM induite par le TGF- β sur une lignée cellulaire épithéliale alvéolaire (Fischer and Agrawal, 2014). Ces résultats sont confirmés chez la souris via une inhibition des effets pro-fibrotiques médiés par le TGF- β 1 dans les fibroblastes et les cellules épithéliales isolés de leurs poumons (Ramirez et al., 2010). La vitamine D atténue également la voie de signalisation smad2/3 chez les myofibroblastes dérivés des polypes nasaux, ce qui permet de diminuer l'accumulation de la matrice extracellulaire (Lee et al., 2017). Cet effet inhibiteur de la sécrétion de MEC a aussi été observé chez des myofibroblastes cardiaques humains (Meredith et al., 2015). D'autres études ont cherché à identifier les voies de signalisation qui pourraient être régulées par la vitamine D au cours de la fibrose induite par la bléomycine. Ces études ont rapporté que la vitamine D a un effet régulateur de la voie MAPK et en ciblant spécifiquement l'expression de PSAT1 (Zhu et al., 2021) et qu'elle serait aussi capable de cibler le système rénine-angiotensine local dans le poumon (J. Chang et al., 2021). Dans les cellules mésenchymateuses multipotentes, qui font partie des niches cellulaires activables dans la FPI, il a été rapporté que la vitamine D est capable de réduire directement l'expression du collagène et du TGF- β 1 en induisant un phénotype antifibrotique (Artaza and Norris, 2009). De manière surprenante, les effets de la vitamine D sur la physiologie des cellules de patients FPI n'ont jamais été rapportés.

Tableau 3: Résumé des effets protecteur de la vitamine D sur la fibrogenèse induite *in vitro*. « < » : Diminution

Modèle cellulaire	[Vitamine D]	[TGF- β 1]	Effets	Référence
Fibroblastes pulmonaires normaux humains	250 nM	10 ng/mL	< α -SMA, Col-1, p-SMAD3 < p-p38, p-ERK	(Zhu et al., 2021)
Fibroblastes pulmonaires murins	2 μ M	10 ng/mL	< α -SMA, Col-1a1/1a3, p-SMAD3	(Tzilas et al., 2019)
Fibroblastes de peau humains	100 nM	10 ng/mL	< α -SMA, Col-1, p-SMAD3	(Zerr et al., 2015)
Fibroblastes pulmonaires murins + lignée NIH/3T3	0.1 - 1 μ M	10 ng/mL	< Procollagène 1, fibronectine < Prolifération	(Ramirez et al., 2010)
Fibroblastes de polypes nasaux humains	100 nM	5 ng/mL	< α -SMA, fibronectine, collagène < Activité contractile < Migration	(Lee et al., 2017)
Fibroblastes cardiaques humains	1 μ M	10 ng/mL	< α -SMA, pSMAD2 < Activité contractile	(Meredith et al., 2015)
Lignée BEAS-2B (CEAll)	100 nM	10 ng/mL	< TEM	(Fischer and Agrawal, 2014)
Lignée LX-2	16 μ M	2.5 ng/mL	< α -SMA, Col-1, p-SMAD3	(Shi et al., 2023)
Lignée LX-2	10 nM	10 ng/mL	< Col-1	(Potter et al., 2013)

iii. Mécanisme d'action

Des études *in vitro* et *in vivo* ont révélé que la vitamine D est capable de bloquer la voie de signalisation du TGF- β (Figure 20) (Artaza and Norris, 2009; Fischer and Agrawal, 2015; Wang et al., 2014). Cet effet inhibiteur semble passer par une interférence directe ou indirecte entre le VDR activé et les protéines SMAD, et notamment SMAD3. En effet, dans un modèle murin de fibrose rénale ainsi que dans la lignée cellulaire LX-2, la 1,25(OH) $_2$ D empêche la fixation de SMAD3 sur ses éléments de réponses et donc la transduction d'un signal pro-fibrosant (Ding et al., 2013; Ito et al., 2013). Des expériences de co-immunoprécipitation sur des fibroblastes de peau de patients sclérodermiques ont montrés que l'activation du VDR par le paricalcitol induit la liaison du VDR à phosphoSMAD3. Ainsi, l'activation du VDR semble pouvoir inhiber directement la signalisation du TGF- β en permettant la liaison physique du VDR à

phosphoSMAD3 (Zerr et al., 2015). D'un autre côté, une étude suggère que l'effet protecteur de la vitamine D passe par une compétition génomique entre le VDR et les protéines SMAD. En effet, dans la lignée cellulaire LX-2 exposée au calcipotriol, une immunoprécipitation couplée au séquençage profond a permis d'identifier les sites de liaison du VDR et de SMAD3 pour révéler que leurs sites de liaison étaient parfois très proches d'une distance de seulement un nucléosome, ce qui suggère une proximité étroite des deux complexes transcriptionnels. Les auteurs ont donc proposé que l'hétérodimère VDR/RXR antagonise la liaison de SMAD3 par compétition au niveau de leurs cibles génomiques, en démontrant ce phénomène sur la région régulatrice du gène COL1A1 (Ding et al., 2013).

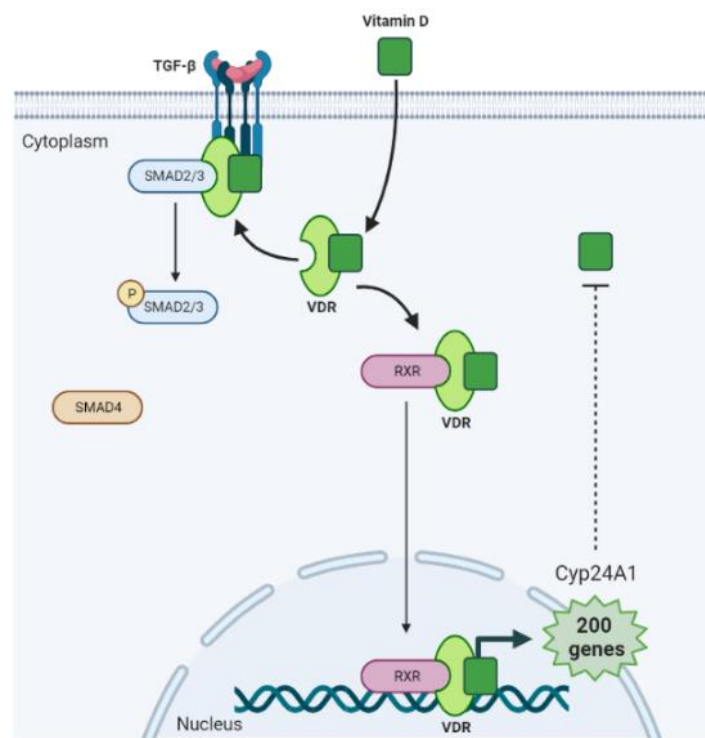


Figure 20: Mécanisme d'interaction entre la voie de signalisation de la vitamine D et du TGF-β. La vitamine D forme un complexe avec le VDR, puis le complexe interagit directement avec les SMAD et empêche leur liaison à l'ADN. Le VDR actif se complexifie également avec RXR pour réguler l'expression de 200 gènes, dont le CYP24A1 qui régule la concentration cytoplasmique de vitamine D. Par Tom Voisin, Biorender.

Une autre hypothèse suggère que la vitamine D est capable d'inhiber la voie du TGF-β en ciblant le système rénine-angiotensine (voir partie hypertension). Les souris CYP27B1^{-/-} ne pouvant pas synthétiser de 1,25(OH)₂D développent de l'hypertension sans qu'un rééquilibrage des taux de calcium et phosphore ne permette de rétablir une pression normale (Zhou et al., 2008). Seul un traitement des souris à la 1,25(OH)₂D a permis de retrouver une pression

sanguine normale via la régulation du système rénine-angiotensine (Zhou et al., 2008). D'autre part, une activation chronique du système rénine-angiotensine chez la souris est capable d'induire la fibrose pulmonaire, ce qui suggère que ce déséquilibre est une composante importante du développement de la fibrose (Wang et al., 2015). Cette hypothèse a été confirmée dans le modèle bléomycine, où un traitement au paricalcitol permet de réduire la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine en ciblant le système rénine-angiotensine local des poumons (J. Chang et al., 2021)

III. Objectifs de la thèse

La recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant d'améliorer l'espérance de vie des patients atteints de FPI représente un enjeu majeur de santé publique. La prise en charge thérapeutique actuelle par le nintedanib ou la pirfénidone permettent de ralentir l'aggravation de la maladie mais ne permettent pas sa guérison. Récemment, il a été démontré qu'une part significative des patients atteints de FPI sont dénutris et que cet état de dénutrition est associé à une augmentation de l'hospitalisation et du décès de ces patients. De plus, les patients souffrant de FPI présenteraient plus fréquemment une carence en vitamine D, et ce déficit pourrait être associée à une réduction de leur survie. Dans ce contexte, une supplémentation en vitamine D pourrait être intéressante à envisager en complément de la prise en charge thérapeutique actuelle de la FPI. Pour conforter cette hypothèse, des études chez la souris et *in vitro* ont montré que la vitamine D réduit la fibrose pulmonaire expérimentale et prévient l'activation des fibroblastes pulmonaires murins. Toutefois, aucune étude n'a évalué les effets de la vitamine D sur les fibroblastes pulmonaires isolés de patients atteints de FPI.

Ainsi, l'objectif de ce projet de thèse (Figure 21) est de savoir si la vitamine D joue un rôle dans le contrôle de l'activation des fibroblastes pulmonaires isolés de patients atteints de FPI, en étudiant ses effets sur des fonctions majeures des fibroblastes telles que la prolifération/migration cellulaire et l'expression des marqueurs myofibroblastiques. Nous avons également caractérisé les effets de la vitamine D sur les altérations métaboliques des myofibroblastes, car des études récentes suggèrent que la reprogrammation glycolytique des fibroblastes pulmonaires participe à la progression de la FPI, et que la prévention de cette altération réduirait le développement des maladies fibrosantes. Enfin, nous avons étudié la signalisation intracellulaire responsable des effets de la vitamine D sur ces différents paramètres.

Afin de rester cohérent avec les concentrations de 25(OH)-vitamine D mesurées chez les patients supplémentés en vitamine D, nous avons utilisé de faibles concentrations en 1,25(OH)-Vitamine D3 (3-100 nM) qui se situent dans la fourchette des taux plasmatiques observés dans la population.

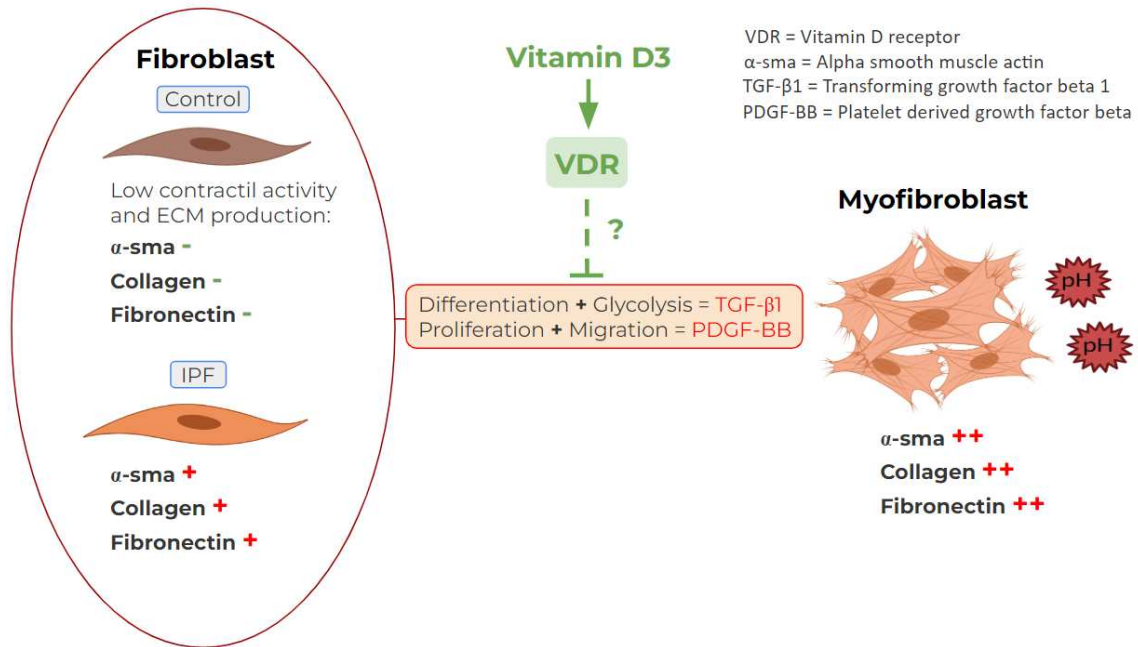


Figure 21 : Illustration graphique des objectifs de la thèse.

PARTIE II : Matériels & Méthodes

I. Obtention des biopsies pulmonaires

Les fibroblastes primaires utilisés lors de cette étude proviennent de biopsies pulmonaires chirurgicales effectuées chez des patients atteints de différentes PID fibrosantes. Le service de Pneumologie du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Rennes (Pr S. Jouneau) avec lequel nous travaillons est actuellement reconnu comme centre de compétences pour les maladies pulmonaires rares en Région Bretagne. Dans ce cadre, le CHU reçoit en consultations plus de 300 patients par an dont une vingtaine requerront une biopsie pulmonaire chirurgicale afin d'obtenir le diagnostic final. Des collaborations avec les services de Chirurgie Thoracique (Pr B. De Latour) et d'Anatomie et Cytologie Pathologiques (Dr D. Chiforeanu et Dr C. Le Naoures) nous permettent de recueillir des fragments de ces biopsies pulmonaires. Le diagnostic FPI est évalué suivant les critères définis par le comité international regroupant l'ATS (American Thoracic Society), l'ERS (European Respiratory Society), la JRS (Japanese Respiratory Society) et l'ALAT (Asociación Latinoamericana de Tórax) (Raghu et al., 2022, 2018). Brièvement, ces critères sont basés sur l'aspect tomодensitométrique des lésions pulmonaires (PIC probable) croisé avec l'aspect histologique des biopsies (fibrose dense sous pleurale et présence de foyers fibroblastiques). L'âge médian des 24 patients FPI dont proviennent les biopsies est de 68 ans avec un intervalle de 51 à 77 ans, comprenant 19 hommes (âge médian 67 ans) et 5 femmes (âge médian 68 ans). Les fibroblastes contrôles utilisés proviennent de résections de chirurgie pulmonaire thoracique réalisée dans le cadre de lobectomies ou de pneumonectomie pour cancer. Les 8 patients dont proviennent les biopsies contrôles sont de sexe masculin et ont un âge médian de 64,5 ans, avec un intervalle de 59 à 74 ans. Les prélèvements ont été effectués à distance de la tumeur et l'absence de tissu tumoral dans les échantillons contrôles a été vérifiée histologiquement. La morphologie cellulaire a été vérifiée par microscopie à contraste de phase. L'utilisation des prélèvements pulmonaires de patients a été approuvée par le comité d'éthique local (CPP, n° 16123) et le consentement éclairé de tous les patients a été recueilli.

II. Isolement des fibroblastes pulmonaires

La culture de fibroblastes FPI et contrôles a été réalisée par culture d'explants suivant les protocoles établis dans la littérature (Akamine et al., 1992; Marchand-Adam et al., 2003). Les biopsies pulmonaires sont d'abord découpées en fragment de quelques millimètres (Figure 22) puis disposés sous une lamelle de verre dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium

(DMEM) (Gibco™, Life Technologies, Courtaboeuf, France) supplémenté avec 20 % de sérum de veau fœtal (SVF) (Eurobio scientifique, Evry, France) pendant 4 jours puis à 10% pendant 10 à 12 jours. Le milieu est aussi additionné d'antibiotiques et d'antifongiques dont la gentamycine (Life Technologies), du Fungizone (Life Technologies), de la vancomycine (Sigma Aldrich) et de la ceftazidime (Sigma Aldrich). Après 10 à 12 jours de culture, les fibroblastes ayant quitté les explants pulmonaires et proliférés sont rincés avec du PBS puis décollés avec de la trypsine-EDTA 0,05 % (Gibco™, Life Technologies, Courtaboeuf, France). Ces fibroblastes sont ensuite amplifiés sur 3 passages avant congélation et conservation dans de l'azote liquide.

Dans cette étude, les fibroblastes FPI et contrôles ont été cultivés dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de SVF, de la L-glutamine, une solution antibiotique-antimycotique (Gibco™, Life Technologies) et utilisés entre le 5^{ème} et 6^{ème} passage.

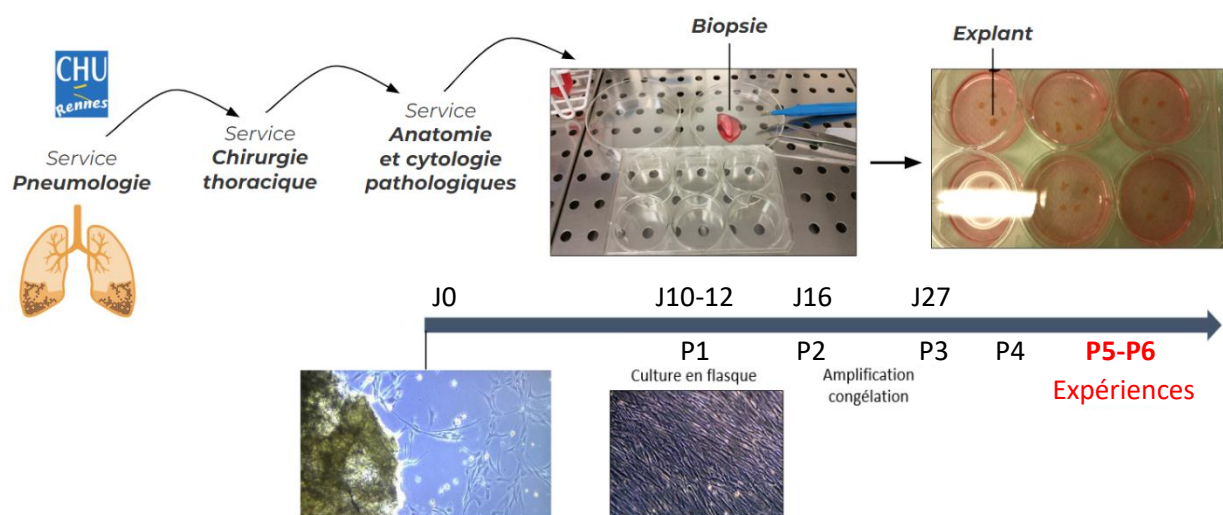


Figure 22 : Isolement des fibroblastes pulmonaires humain à partir d'une biopsie chirurgicale. Les fibroblastes sortent des explants pendant 10-12 jours et sont passés en flasque de culture (P1). Ils sont ensuite amplifiés sur deux passages (P2, P3) pour être utilisés en expérimentations (P5-P6) ou congelés dans de l'azote liquide.

III. Traitements

Les cellules ont été cultivées en absence ou en présence de vitamine D (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). La vitamine D a d'abord été reprise dans de l'éthanol (EtOH) pour constituer une solution mère, et l'EtOH a été utilisé comme contrôle véhicule dans chaque expérience de façon à correspondre à la plus forte concentration en vitamine D : 100 nM de vitamine D correspond à 0,42 % d'EtOH dans le milieu contrôle. Les fibroblastes utilisés pour extraire l'ARN total et les protéines ont été ensemencés dans des plaques 6 puits pendant 24 h, puis déprivés dans du DMEM sans SVF pendant 16 h. Pour induire la différenciation des

fibroblastes en myofibroblastes, les fibroblastes déprivés de sérum ont d'abord été cultivés en absence ou en présence de vitamine D (3-100 nM) pendant 1 h, puis stimulées avec du TGF- β 1 (1-5 ng/ml ; Preprotech, Neuilly-sur-Seine, France) pendant 24 h. Les fibroblastes utilisés pour les études de croissance et de cycle cellulaire ont été privés de sérum pendant 16 heures, cultivés dans du DMEM contenant 1 % de SVF avec 3-100 nM de vitamine D pendant 1 heure, et stimulées avec du PDGF-BB (25-50 ng/ml) (R&D Systems, Bio-Technology, Lille, France) pendant les 96 heures de suivi de la prolifération. La figure 23 illustre le protocole expérimental utilisé pour étudier les effets de la vitamine D sur les différentes fonctions physiologiques des fibroblastes.

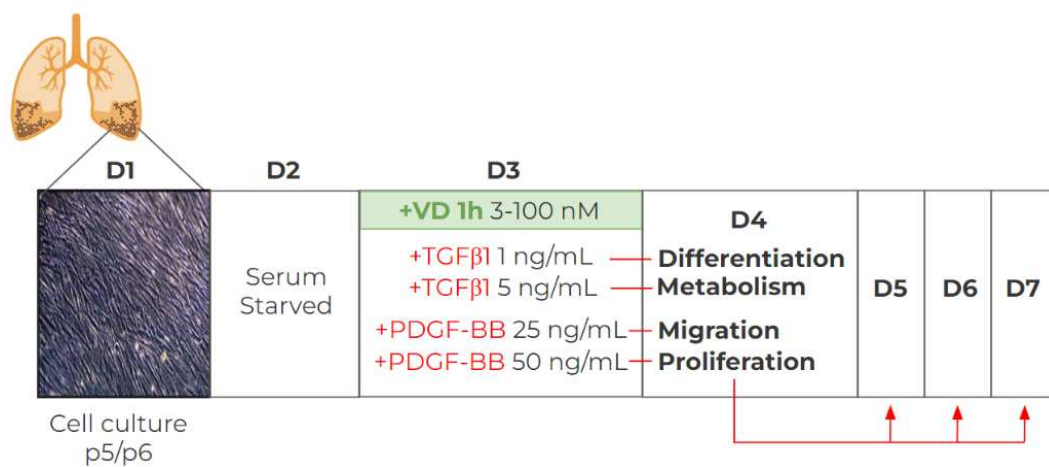


Figure 23 : Modèle expérimental utilisé pour étudier les effets de la vitamine D sur les fibroblastes pulmonaires.

IV. Étude de la prolifération

Le système de microscopie à fluorescence en temps réel Incucyte[®] (Essen BioScience, Sartorius, USA) a été utilisé pour quantifier la prolifération cellulaire dans un environnement de culture stable (37°C et 5% CO₂). Les cellules ont été ensemencées en plaque 96 puits à une concentration de 4000 cellules/puit et le colorant fluorescent NRR[®] (Nuclight Rapid Red Dye[®], dilué au 1/1000) a marqué spécifiquement le noyau des fibroblastes vivants. Le nombre de fibroblastes a ensuite été déterminé à l'aide du logiciel d'analyse Incucyte[®] en créant un masque de comptage spécifique qui identifie et délimite les noyaux à chaque acquisition. Les paramètres à définir dans le masque pour détourner chaque noyau sont l'intensité de fluorescence, l'excentricité, l'aire minimum/maximum des noyaux (élimine les débris fluorescents) ainsi qu'une valeur de segmentation permettant de distinguer deux noyaux très

proches l'un de l'autre. L'acquisition a été réalisée toutes les 8 heures pendant 96 heures à l'aide du microscope Incucyte®, objectif X10 et chaque condition a été et réalisée en triplicats. L'indice de prolifération a été calculé à partir du nombre de cellules comptées à 8 h, et fixé arbitrairement à 1 (Figure 24).

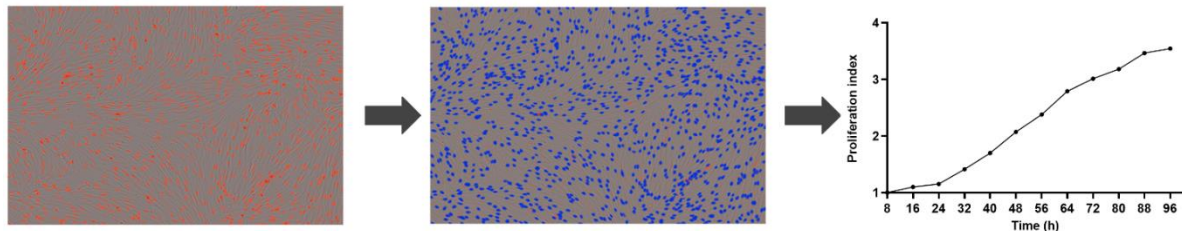


Figure 24 : Illustration de la coloration du masque de comptage utilisé pour créer une cinétique de prolifération avec le logiciel Incucyte®.

V. Étude du cycle cellulaire

Les fibroblastes utilisés pour les études sur le cycle cellulaire ont été fixés dans de l'éthanol à 70 % (v/v) pendant 30 minutes à 4°C et collectés par centrifugation (900g/5 min). Les culots cellulaires ont été lavés, suspendus dans du PBS (pH 7,4) contenant de l'iodure de propidium (50 µg/mL) et de la RNase A sans DNase (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France), puis incubés à 4°C pendant 1 h. La quantité d'ADN a ensuite été quantifiée par cytométrie de flux à l'aide du cytomètre LRSFortessa™X20 (BD Biosciences, Paris, France). Les données ont été analysées avec le logiciel d'analyse FlowLogic (Miltenyi Biotech, Paris, France) en utilisant la méthode améliorée de Watson (Figure 25).

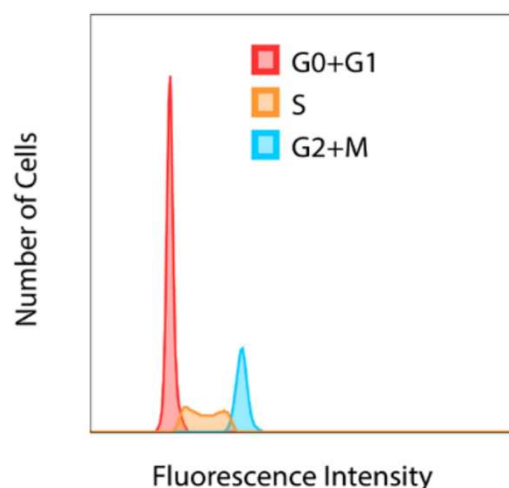


Figure 25 : Spectre de fluorescence obtenu pour étudier le cycle cellulaire (marquage à l'iodure de propidium). L'iodure de propidium s'intercale dans l'ADN des cellules et l'intensité de fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'ADN nucléaire. Ainsi, les cellules en fin de cycle cellulaire (G2/M) qui possèdent deux jeux d'ADN sont deux fois plus fluorescentes que les cellules en G0/G1. D'après www.cancer.wisc.edu

VI. Étude de la migration cellulaire

La migration des fibroblastes a été évaluée dans une chambre de Boyden modifiée, en utilisant un support perméable ThinCert® (6,5 mm, 8 µm) (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Autriche) recouvert de fibronectine (0,1 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Fallavier) (Figure 26). Le milieu du compartiment supérieur (DMEM-0% SVF) contient 100 nM de vitamine D et le milieu dans le compartiment inférieur (DMEM-1% SVF) contient 25 ng/ml PDGF-BB. Les cellules ont été incubées dans la chambre de Boyden pendant 16 heures à 37°C puis fixées dans de l'éthanol à 70 % et marquées au DAPI. La migration a été évaluée en comptant le nombre de cellules ayant migré sur la surface inférieure du filtre avec le microscope à fluorescence CELENA® S Digital Imaging System, objectif X10.

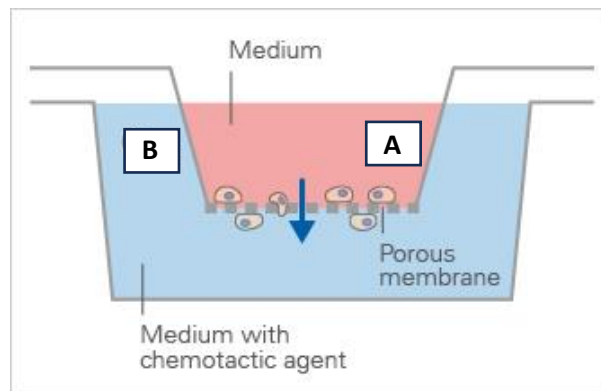


Figure 26 : Principe de fonctionnement de la Chambre de Boyden modifiée. A : Milieu DMEM-0% SVF + 100 nM de vitamine D ; B : Milieu DMEM-1% SVF + 25 ng/mL de PDGF-BB

VII. Mesure de l'activité contractile

Un test de contractilité au collagène a été utilisé pour évaluer l'activité contractile des fibroblastes cultivés conformément aux instructions du fabricant. Les cellules ont d'abord été mises en suspension dans du milieu DMEM sans SVF. Une solution de collagène (CBA-201, Cell Biolabs, CA, USA) a ensuite été combinée avec les cellules pour obtenir une densité cellulaire de 2 millions de cellules/mL et une concentration finale de collagène de 2,0 mg/mL. Le mélange cellules-collagène a été traité directement avec 100 nM de VD et/ou 1 ng/mL de TGF-β1, déposé dans une plaque de 24 puits, et incubé pendant 1 h à 37°C pour permettre la polymérisation de la matrice de collagène. Après polymérisation, 1 mL de milieu DMEM sans

SVF contenant le même traitement que le mélange cellules-collagène a été déposé au-dessus de chaque gel. Après une incubation de 2 jours, les gels ont été délicatement détachés des parois à l'aide d'une spatule et l'évolution de la contraction du gel a été photographiée après 5 heures à l'aide du microscope Incucyte®. L'aire relative de chaque gel a ensuite été quantifiée à l'aide de l'outil de détourage du logiciel ImageJ.

VIII. Transfection de siRNA

Les fibroblastes ont été transfectés dans du milieu optiMEM (Gibco, Waltham, USA) pendant 24 h avec 25 nM de siRNA VDR (J-003448-07-0005, ONTARGETplus siRNA Human VDR (7421) 5 nmol ; Dharmacon, Horizon discovery) ou 25 nM de siRNA contrôle non ciblé (ONTARGETplus Non-targeting Pool, 5nmol ; Dharmacon, Horizon discovery) dans des boîtes de culture P60. L'agent réactif de transfection utilisé était la Lipofectamine™ RNAimax (Invitrogen™) à hauteur de 2,5 µL par boîte. Les cellules ont été transfectées à 60-70% de confluence pendant 24h, puis lavées et cultivées dans du DMEM sans antibiotique 1X Glutamax pendant 18 h avant l'étude de la prolifération ou du métabolisme cellulaire.

IX. Analyse de l'expression protéique par Western blot

Les fibroblastes ont été lysés à 4°C dans un tampon RIPA (Triton 1% ; détergent ionique NaDOC 1%, SDS 0,2% ; tampon tris pH 7.5-20 mM ; NaCl-150 mM ; EDTA-1 mM) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéase complete™ (Roche, Sigma-Aldrich) et un cocktail d'inhibiteurs de phosphatase (Sigma-Aldrich). Les suspensions ont ensuite été fragmentées par sonication et les lysats centrifugés pendant 30 min à 12500 g. Après avoir récupéré les surnageants contenant les protéines, la concentration protéique a été mesurée à l'aide de la méthode BCA (acide bicinchoninique) (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, thermoscientific). Entre 8 et 12 µg de protéines ont été utilisé par conditions pour les séparer en condition dénaturante selon la méthode SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). Avant le dépôt sur gel, les protéines ont été dénaturées 5 min à 95°C en présence d'un tampon de charge (Tris-HCl 0,5 M ; glycérol 25% ; bleu de Bromophénol 0,01% ; SDS 2% ; β-mercaptoéthanol 5%). Elles ont ensuite été séparées par électrophorèse sur des gels de polyacrylamide Tris-glycine SDS à 10 % (20 min à 80 V, 1h30 à 130 V) et transférées sur des membranes de nitrocellulose (30 V à 4 °C pendant la nuit). Les sites de liaison libres ont été

bloqués par incubation dans 5 % de lait ou d'albumine de sérum bovin (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) pendant 2 heures à température ambiante. Les membranes ont ensuite été incubées avec l'anticorps humain primaire approprié pendant une nuit à 4°C. Les anticorps primaires utilisés sont listés dans le Tableau 3. Les images numériques ont été acquises sur un système d'imagerie de gel (Chemi doc, BIO-RAD Laboratories, Marnes-La-Coquette, France) équipé d'une caméra CCD. Les Western blots ont été quantifiés par densitométrie à l'aide du logiciel Image Lab™ (BIO-RAD) et normalisés par rapport à la GAPDH. L'expression protéique relative dans les cellules stimulées a été déterminée en fixant arbitrairement à 1 l'expression protéique des cellules non traitées en présence du véhicule (EtOH).

Tableau 4 : Liste des anticorps primaires utilisés pour détecter des protéines d'intérêts par western-blot

Anticorps primaire	Fournisseur et référence	Espèce	Poids moléculaire
α -SMA	Sigma-Aldrich (A5228)	Souris	42 kDa
Collagène I	Southern Biotechnology (1310-01)	Chèvre	150 kDa
Fibronectine	Abcam (ab2413)	Lapin	300 kDa
GAPDH	Covalab (mab90009-P)	Souris	37 kDa
VDR	Cell Signaling Technology (12550)	Lapin	60 kDa
Phospho-SMAD2	Cell Signaling Technology (3104)	Souris	60 kDa
Phospho-SMAD3	Cell Signaling Technology (9520)	Souris	52 kDa
Phospho-PDGFR	Cell Signaling Technology (3161)	Souris	190 kDa
Phospho-ERK	Cell Signaling Technology (9101)	Souris	42/44 kDa
Phospho-AKT	Cell Signaling Technology (9271)	Souris	60 kDa
SMAD2	Cell Signaling Technology (12584)	Souris	60 kDa
SMAD3	Cell Signaling Technology (9523)	Souris	52 kDa
PDGFR	Cell Signaling Technology (3169)	Souris	190 kDa
ERK	Cell Signaling Technology (9102)	Souris	42/44 kDa
AKT	Cell Signaling Technology (9272)	Souris	60 kDa
CDK1	Cell Signaling Technology (91125)	Souris	34 kDa
CDK2	Cell Signaling Technology (2546)	Souris	33 kDa
CDK4	Cell Signaling Technology (12790)	Souris	30 kDa
Cycline A	Santa Cruz Biotechnology (sc-751)	Souris	55 kDa
Cycline B1	Santa Cruz Biotechnology (sc-245)	Souris	55 kDa
Cycline D1	Cell Signaling Technology (55506)	Souris	36 kDa
Cycline E	Santa Cruz Biotechnology (sc-56311)	Souris	50 kDa

X. Analyse de l'expression des ARNm par RT-qPCR

Les ARNm totaux à queue poly-A ont été extraits à l'aide du kit d'extraction d'ARNm de Macherey Nagel (Hoerdet, France) selon les instructions du fabricant. Les concentrations d'ARNm ont été mesurées par spectrofluorimétrie à l'aide d'un NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Saint-Herblain, France). Les ARNm ont été reverse-transcrit à l'aide du kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), et la PCR quantitative (qPCR) a été réalisée en utilisant la méthodologie SYBR Green sur un système de

PCR en temps réel CFX384 (Bio-Rad Laboratories) en duplicat pour chaque condition. Toutes les amorces proviennent de Sigma-Aldrich (KiCqStart™ SYBR® Green Primers, St. Quentin Fallavier, France) (Tableau 5). La spécificité de l'amplification des gènes a été vérifiée à la fin de la PCR en utilisant la méthode du seuil comparatif (logiciel CFX Manager). Les valeurs moyennes de Cq ont été utilisées pour normaliser les concentrations d'ARNm cible par rapport à celles de la protéine ribosomale 18S avec la méthode $2^{-\Delta\Delta Cq}$. Les niveaux d'ARNm ont été définis par rapport à ceux mesurés dans les cellules non traitées (EtOH) fixés arbitrairement à 1.

Tableau 5 : Séquences nucléotidiques sens et anti-sens utilisées pour amplifier les ARNm de différents gènes d'intérêt par qPCR.

Gène	Séquences sens (S) et anti-sens (AS)
18S	S= 5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTC AS= 5'-TTGGCAAATGCTTTTCGCTC
VDR	S= 5'-ATCTGGATCTGAGTGAAGAAG AS= 5'-TCTCTGAATCCTGGTATCATC
CYP24A1	S= 5'-ATCAGTCAAAGCTTGATATCG AS= 5'-CCGATTCTGGTGATAAATGTC
ACTA2	S= 5'-AGATCAAGATCATTGCCCC AS= 5'-TTCATCGTATTCCTGTTTGC
COL4A2	S= 5'-AAAAGGAGATAGAGGCTCAC AS= 5'-GTATTCCGAAAAATCCAGCC
COL1A1	S= 5'-GCTATGATGAGAAATCAACCG AS= 5'-TCATCTCCATTCTTCCAGG
COL1A2	S= 5'-CTGCCAGCATTGATTGATAGTTTC AS= 5'-GTGGTTACTACTGGATTGAC
FN1	S= 5'-CCATAGCTGAGAAGTGTTTTG AS= 5'-CAAGTACAATCTACCATCATCC
LDHA	S= 5'-CACCATGATTAAGGGTCTTTAC AS= 5'-AGGTCTGAGATTCCATTCTG
SLC2A3	S= 5'-GGATAACTATAATGGGATGAGC AS= CCACAATAAACCAGGGAATG
PDK1	S= 5'-ATGATGTCATTCCCACAATG AS= 5'-AAGAGTGCTGATTGAGTAAC
HK2	S= 5'-CTAAACTAGACGAGAGTTTCC AS= 5'-CATCATAACCACAGGTCATC
PFKB3	S= 5'-TGGAAAGTTAAAATCTCCAGC AS= 5'-CATAGCAACTGATCCTCTTC
SIRT1	S= 5'-AAGGAAAATACTTCGCAAC AS= 5'-GGAACCATGACACTGAATTATC

XI. Étude du métabolisme cellulaire

La technologie Seahorse XFe24® (Agilent Technologies) a été utilisée pour déterminer la respiration mitochondriale basale et la glycolyse basale en mesurant directement le taux de consommation d'oxygène (OCR) et le taux d'acidification extracellulaire (ECAR) dans les fibroblastes FPI et contrôles. Les mesures en temps réel d'OCR et d'ECAR sont effectuées en isolant un très petit volume (environ 2 µL), aussi appelé « microchambre transitoire », de milieu au-dessus de la couche de cellules cultivées dans une microplaque. La consommation d'oxygène cellulaire (respiration) et la libération de protons (glycolyse) entraînent des modifications rapides et facilement mesurables des concentrations d'oxygène dissous et de protons libres qui sont quantifiées par des sondes semi-conductrices situées à 200 microns au-dessus des cellules.

Les fibroblastes ont été ensemencés à la concentration de 14 000 cellules par puits, déprivés pendant 16h et prétraités pendant 1 h avec de la vitamine D (100 nM), puis stimulées pendant 24h en présence de TGF-β1 (5 ng/mL). Les paramètres de la respiration mitochondriale ont été déterminés à l'aide du kit Seahorse XF Cell Mito Stress, d'abord en condition basale puis après l'injection d'inhibiteurs de la respiration mitochondriale dans le système (Figure 27). Le premier inhibiteur injecté est l'oligomycine (1 µM ; Sigma-Aldrich) qui bloque l'ATP synthase ce qui permet de quantifier la consommation d'ATP et la fuite de protons. Ensuite, le FCCP (cyanure de carbonyle p-trifluorométhoxyphénylhydrazone) injecté (3 µM ; Sigma-Aldrich) est un agent de découplage qui empêche le gradient de protons et perturbe le potentiel de la membrane mitochondriale, ce qui permet de quantifier la respiration maximale. Enfin, l'antimycine A (0,5 µM ; Sigma-Aldrich) inhibe le complexe III et la roténone (0,5 µM ; Sigma-Aldrich) le complexe I pour complètement bloquer la chaîne respiratoire et permettre de quantifier la capacité respiratoire (Figure 27). Les données ont été calculées avec le logiciel Seahorse Wave Pro software et normalisées avec la concentration en protéine de chaque puit (dosage BCA).

Seahorse XF Cell Mito Stress Test Profile Mitochondrial Respiration

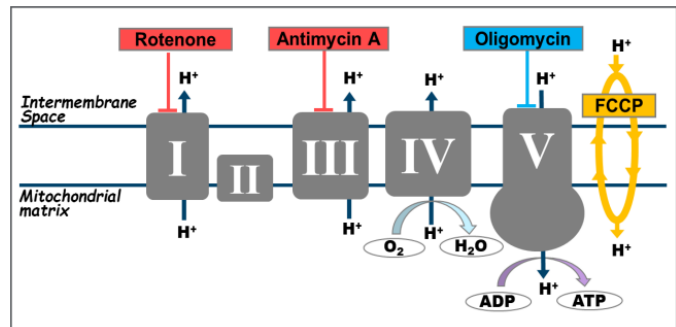
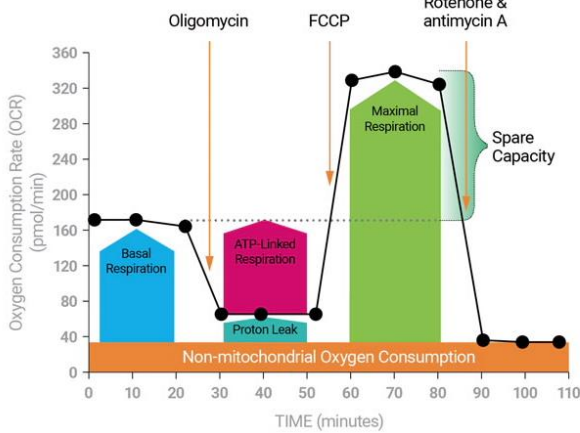


Figure 27 : Fonctionnement du Seahorse® XF Cell Mito Stress Test et des différents inhibiteurs injectés.

La fonction glycolytique a été déterminée à l'aide du kit Seahorse® XF Glycolysis Stress Test, qui évalue le taux d'acidification extracellulaire basal (ECAR) en l'absence de glucose dans les milieux de culture. Les principaux paramètres du flux glycolytique, à savoir la glycolyse, la capacité glycolytique et la réserve glycolytique, ont ensuite été déterminés après l'injection de glucose (10 mM ; Sigma-Aldrich) qui induit la glycolyse, d'oligomycine (1 μ M ; Sigma-Aldrich) qui inhibe l'ATP synthase pour déplacer la production d'énergie vers la glycolyse, et de 2-désoxy-glucose (50 mM ; Sigma-Aldrich) qui est un inhibiteur de la glycolyse par liaison compétitive à la glucose hexokinase (Figure 28). Les données ont été calculées avec le logiciel Seahorse Wave Pro software et normalisées avec la concentration en protéine de chaque puit (dosage BCA).

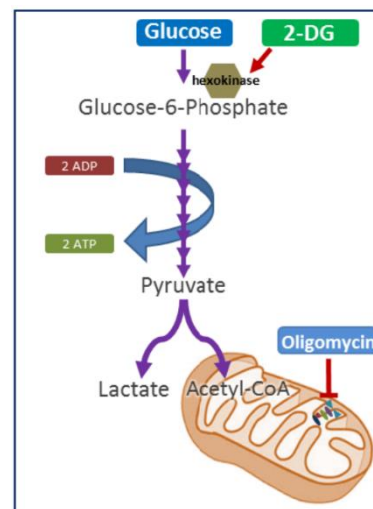
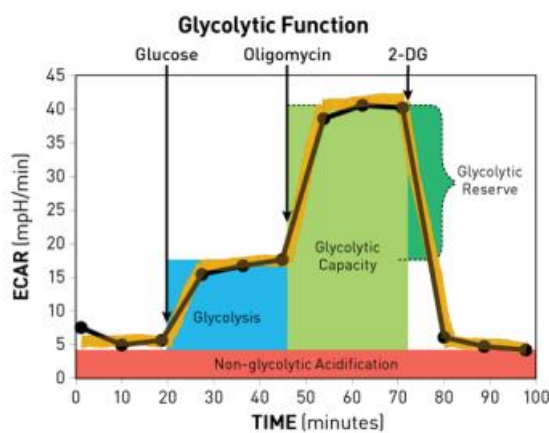


Figure 28: Fonctionnement du kit Seahorse® XF Glycolysis Stress Test et des différents inhibiteurs injectés.

XII. Mesure des concentrations de lactates

Les fibroblastes ont étéensemencés à la concentration de 200 000 cellules dans une plaque 6 puits, déprivés pendant 16h et prétraités pendant 1 h avec de la vitamine D (100 nM), puis stimulés pendant 24h avec du TGF- β 1 (5 ng/mL). Les cellules ont ensuite été lavées deux fois au PBS et remise dans du milieu propre pendant 4h. Enfin, la sécrétion de lactates dans le surnageant de culture a été quantifiée avec l'analyseur Roche Cobas 8000 c502 (Hoffmann-La Roche, Bâle, Suisse). Les concentrations en lactate ont été déterminées par une méthode spectrophotométrique enzymatique catalysée par une réaction lactate oxydase-peroxydase qui produit un chromogène quinone-imine à 552 nm. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de lactate dans l'échantillon.

XIII. Mesure de l'activité LDH

Les fibroblastes ont étéensemencés à la concentration de 200 000 cellules dans une plaque 6 puits, déprivés pendant 16h et prétraités pendant 1 h avec de la vitamine D (100 nM), puis stimulés pendant 24h avec du TGF- β 1 (5 ng/mL). Les cellules ont ensuite été lavées au PBS et directement lysées dans de l'eau distillée (500 μ L). L'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) intracellulaire a été mesurée à l'aide du test Cobas Lactate déshydrogénase IFCC (Sigma-Aldrich, MAK066) en duplicats. La LDH catalyse la conversion des lactates en pyruvate en présence de NAD⁺ qui est réduit en NADH au cours de cette réaction. Le taux de formation de NADH est directement proportionnel à l'activité catalytique de la LDH et a été déterminé en mesurant l'augmentation de l'absorbance à 340 nm.

XIV. Mesure de la concentration sérique en vitamine D

La 25(OH) Vitamine D totale des sérums de patients atteints de FPI a été dosée avec un kit spécifique par immuno-chimiluminescence sur l'automate LIAISON[®] XL basé sur le principe de liaison compétitive. Une première incubation avec le réactif du fournisseur permet de dissocier la 25(OH) Vitamine D de sa protéine de transport ainsi que sa liaison à un anticorps primaire fixé au fond du puit. Après lavage, de la 25(OH) Vitamine D conjuguée à de la biotine fluorescente est ajoutée dans le puit en excès pour se fixer et saturer les anticorps restants.

Enfin, une dernière étape de lavage et de lecture permet de mesurer les valeurs de fluorescence de biotine-25(OH) Vitamine D qui sont inversement proportionnelles à la concentration de 25(OH) Vitamine D initialement présente dans le sérum.

XV. Analyses statistiques

Tous les résultats sont présentés en moyennes \pm SEM du nombre d'expériences indépendantes. Chaque expérience a été réalisée avec différentes cultures cellulaires provenant de différents patients. Les analyses statistiques ont été réalisées avec Prism 8.0.2 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Les différences significatives ont été déterminées par le test t de Student lorsque deux groupes étaient comparés, ou par une ANOVA répétée suivie du test t de comparaison multiple de Dunnett pour étudier les effets des différentes concentrations de vitamine D. #, * $p < 0,05$; ##, ** $p < 0,01$; ###, *** $p < 0,001$.

PARTIE III : Résultats

I. Le récepteur à la vitamine D

i. Expression

Nous avons d'abord déterminé si l'expression du VDR peut être détectée dans les fibroblastes contrôles et FPI. L'expression du VDR a été quantifiée par western blot dans les fibroblastes isolés de 17 biopsies FPI et 7 biopsies contrôles (Figure 29). Nous avons observé que le VDR est exprimé dans les fibroblastes FPI et contrôles et ce de manière hétérogène. En comparant les deux types de cultures, nous n'avons pas observé de différence significative entre l'expression moyenne du VDR des deux groupes.

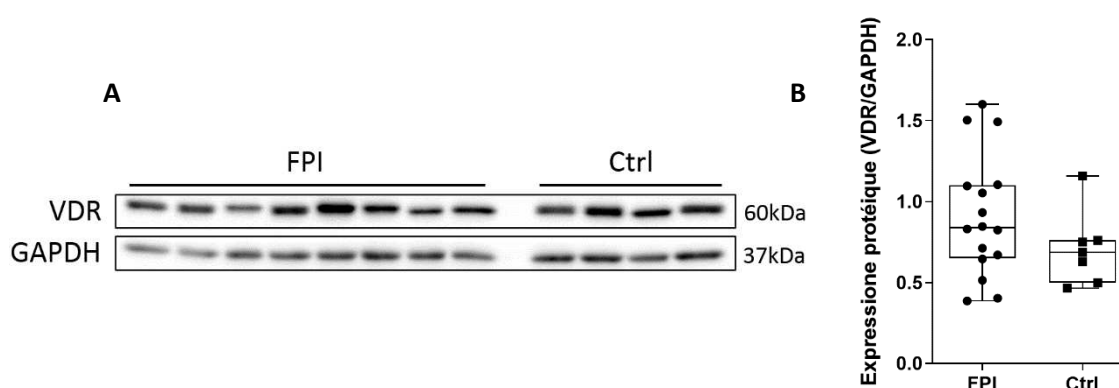


Figure 29 : Le VDR est exprimé dans les cultures de fibroblastes pulmonaires humains. Le niveau d'expression du VDR dans les cultures de fibroblastes FPI (FPI) et contrôles (Ctrl) a été quantifié par western blot. A) Western blot représentatif de l'expression protéique du VDR ; B) Quantification de l'expression du VDR par densitométrie.

ii. Activité

Afin de savoir si le VDR est actif dans les cultures de fibroblastes pulmonaires, nous nous sommes intéressés à l'expression du cytochrome P450 24A1 (CYP24A1), dont l'expression est fortement induite lorsque le VDR est activé par son ligand. De plus, nous avons vérifié si cette induction était spécifiquement liée à l'activation du VDR. Pour cela, nous avons inhibé l'expression du VDR par une technologie d'ARN interférents (siRNA VDR) que nous avons comparés à un siRNA contrôle (scramble) (Figure 30 A-B). Ainsi, le siVDR diminue de 93% l'expression de l'ARNm du VDR et de 95% l'expression protéique. Les fibroblastes ont ensuite été traités 24 h avec de la vitamine D (100 nM) afin d'induire l'expression de l'ARNm du CYP24A1 (Fig 30 C). Chez les fibroblastes déficients en VDR, le traitement à la vitamine D n'induit plus l'expression de l'ARNm du CYP24A1. Ce résultat confirme que l'effet de la vitamine D est contrôlé spécifiquement par l'activation de son récepteur. Après avoir confirmé que le

VDR est exprimé et actif dans notre modèle d'étude, nous nous sommes donc intéressés aux effets de la vitamine D sur les différents mécanismes impliqués dans le phénotype pro-fibrosant des fibroblastes.

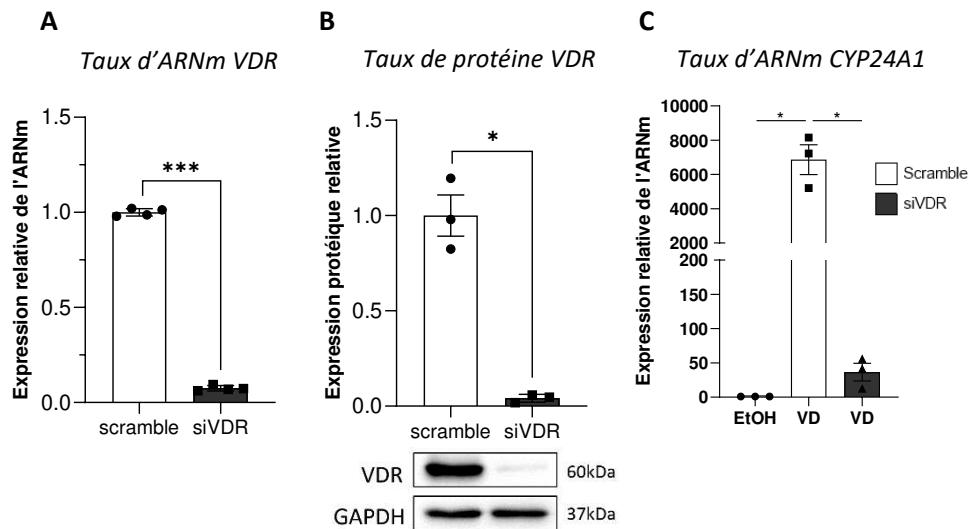


Figure 30 : Le VDR est actif dans les cultures de fibroblastes FPI. Les fibroblastes FPI ont été transfectés avec un siRNA contrôle (scramble) ou un siRNA VDR (siVDR) pendant 24 h puis traités avec le véhicule (EtOH) ou 100 nM de VD pendant 24 h. Les niveaux relatifs d'ARNm du VDR et du CYP24A1 ont été quantifiés par RT-qPCR (A, C). L'expression protéique du VDR a été analysée par western blot (B). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

II. Impact de la vitamine D sur la migration des fibroblastes

Au cours du développement de la FPI, la migration des fibroblastes pulmonaires vers l'interstitium lésé participe à l'apparition de foyers fibroblastiques. Nous avons donc étudié ce paramètre en chambre de Boyden modifiée (Figure 31). L'effet de la vitamine D a été quantifié en condition basale ainsi qu'en condition stimulée via la création d'un gradient de PDGF-BB. Comme attendu, le gradient de PDGF-BB stimule fortement la migration cellulaire en multipliant par deux la quantité de cellules ayant traversé la membrane poreuse. Cependant, nous n'avons pas observé d'effet de la vitamine D sur la migration basale ou stimulée par le PDGF-BB.

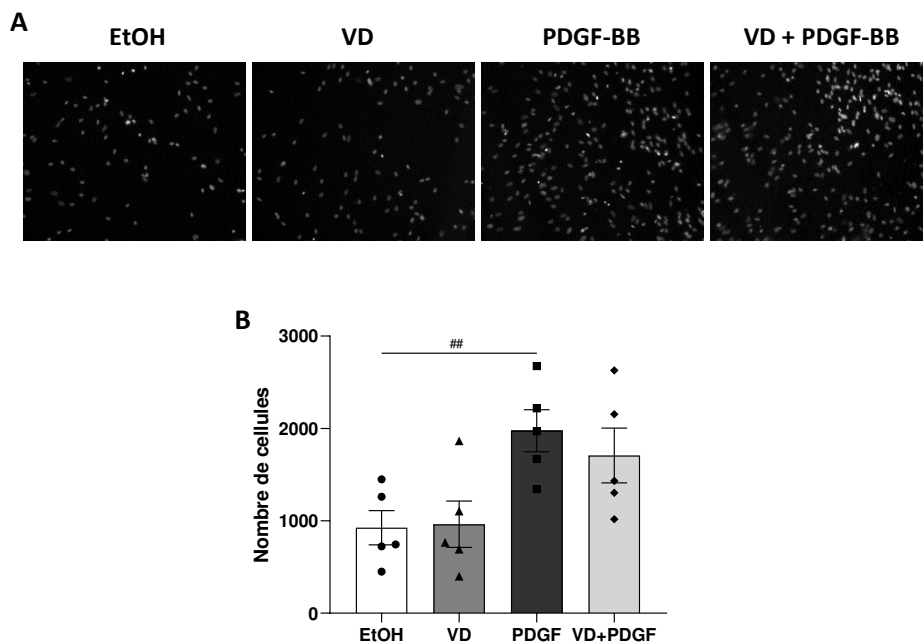


Figure 31: La VD ne prévient pas la migration des fibroblastes FPI. Les fibroblastes FPI ont été traitées avec le véhicule (EtOH) ou 100 nM de vitamine D (VD) pendant 16 h en absence ou en présence de 25 ng/ml de PDGF-BB utilisé comme chemoattractant. Les noyaux ont été marqués au DAPI et comptés au microscope à fluorescence CELENA® S Digital Imaging System, grossissement x10 (A), puis comparés graphiquement (B). ## p<0,01.

III. Impact de la vitamine D sur la prolifération des fibroblastes

i. Effets sur la prolifération

Après leur recrutement, les fibroblastes prolifèrent de manière excessive notamment sous l'influence du PDGF-BB pour former les foyers fibroblastiques. Nous avons donc évalué l'effet de la vitamine D sur la prolifération cellulaire des fibroblastes pulmonaires de patients FPI et contrôles. Les cellules ont été exposées à la vitamine D pendant 96 h en présence ou non de PDGF-BB, et leur prolifération quantifiée en temps réel (Figure 32). Ainsi, nous avons observé que la vitamine D inhibe fortement la prolifération basale des deux types de fibroblastes dès 3 nM, et ce de manière dose-dépendante jusqu'à la diminuer de 50 % en passant d'un index de prolifération à 96 h de 2,9 à 1,8 pour les fibroblastes FPI (Figure 32 A) et de 3,6 à 2,3 pour les fibroblastes contrôles (Figure 32 B), en présence de 100 nM de vitamine D. Comme attendu, le PDGF-BB augmente de manière significative la prolifération des fibroblastes FPI (index à 96 h de 3,1 vs. 4,3) et contrôles (index à 96 h de 3,6 vs. 4,8) (Figure 32 C-D). Enfin, la vitamine D a

fortement inhibé cette induction de façon similaire à la dose-réponse observée en prolifération basale. De plus, nous observons que le PDGF-BB n'a plus d'effet inducteur de la prolifération des fibroblastes FPI et contrôles lorsque les cellules sont pré-traitées avec 100 nM de vitamine D.

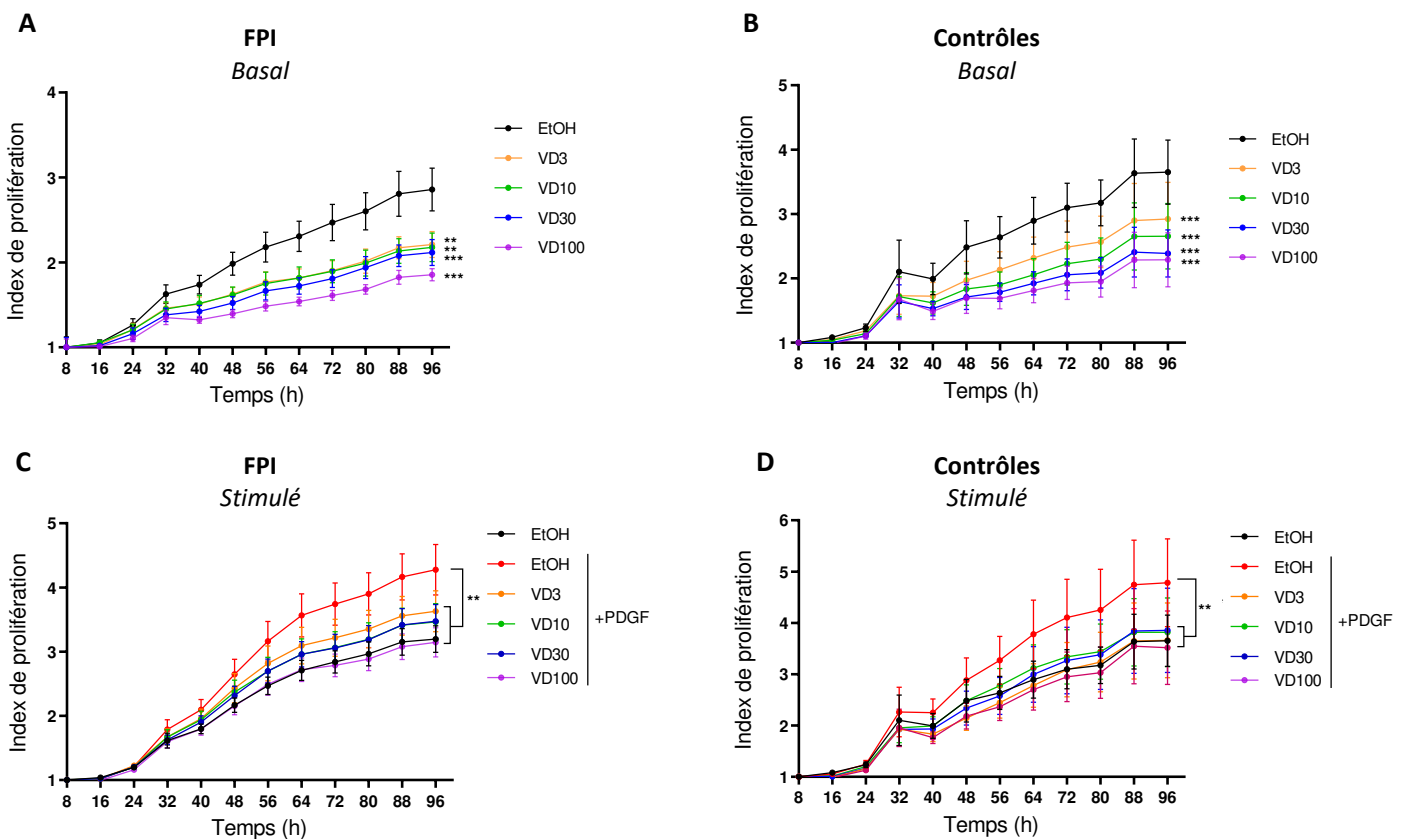


Figure 32: La VD inhibe la prolifération des fibroblastes FPI et contrôles. Les fibroblastes FPI et contrôles ont été traités avec le véhicule (EtOH) ou 3-100 nM de vitamine D (VD) pendant 96 h en absence (A-B) ou en présence de 50 ng/ml de PDGF-BB (C-D). La prolifération a été quantifiée toutes les 8 h à l'aide du microscope à fluorescence Incucyte®. L'indice de prolifération a été calculé en fixant arbitrairement la première acquisition (8 h) du nombre de cellules à 1. Les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm SEM de 8 (A) et 6 (B) expériences indépendantes. Les différences significatives ont été déterminées par ANOVA suivi d'un test Dunnett de comparaisons multiples. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Nous avons également voulu confirmer que le VDR est nécessaire à l'effet inhibiteur de la vitamine D sur la prolifération des fibroblastes. Comme décrit précédemment (Figure 30), nous avons invalidé génétiquement l'expression du VDR par transfection d'un siRNA VDR ou siRNA contrôle (scramble). L'inhibition de l'expression du VDR n'a pas d'effet significatif sur la prolifération des fibroblastes (Figure 33 A). En parallèle, nous avons observé que cette inhibition bloque la capacité de la vitamine D à réduire la prolifération basale de fibroblastes FPI, ainsi que celle induite par le PDGF-BB (Figure 33 B). La vitamine D bloque donc la croissance

cellulaire par un mécanisme moléculaire qui semble dépendre spécifiquement de l'activation de son récepteur.

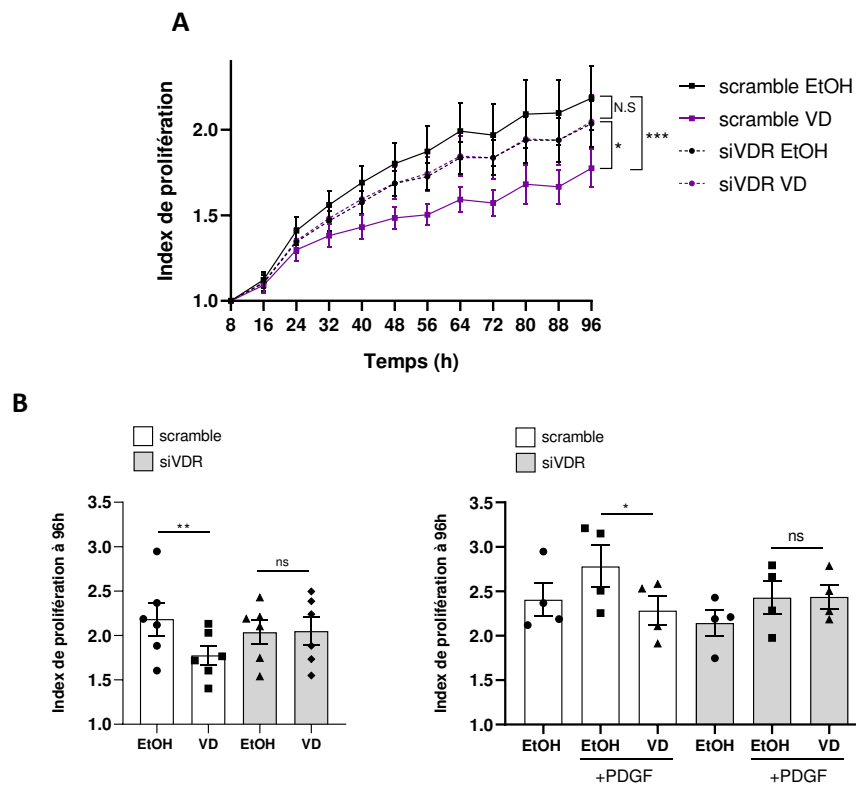


Figure 33: La VD inhibe la prolifération de façon VDR-dépendante. Les fibroblastes FPI ont été transfectés avec un siRNA contrôle (scramble) ou un siRNA VDR (siVDR) pendant 24 h puis traités avec le véhicule (EtOH) ou 100 nM de vitamine D (VD) en présence ou non de 50 ng/ml de PDGF-BB pendant 96 h. La prolifération a été quantifiée toutes les 8 h à l'aide du microscope à fluorescence Incucyte®. En (A), Les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm SEM de 6 expériences indépendantes. L'indice de prolifération a été calculé en fixant arbitrairement la première acquisition du nombre de cellules à 1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; N.S = non significatif.

ii. Effets sur le cycle cellulaire

La prolifération des fibroblastes est régulée par les différentes phases du cycle cellulaire, nous avons donc voulu étudier les effets de la vitamine D sur la régulation de ce cycle. Pour étudier ce paramètre, le marquage des cellules à l'iodure de propidium permet de quantifier les cellules en début de cycle (phase G0/G1), en phase de synthèse de l'ADN (phase S) et en fin de cycle (phase G2/M) (Figure 34). En condition non stimulée par le PDGF-BB, nous avons constaté que la vitamine D augmente la quantité de cellules en phase G0/G1, et tend à diminuer la quantité de cellules en phase S et G2/M (Figure 34 B). En condition stimulée par le PDGF-BB, nous avons constaté dans un premier temps que la quantité de cellules en phase G0/G1 diminue significativement au profit d'une augmentation de la quantité de cellules en phase S

et G2/M. Ce résultat est en cohérence avec l'effet stimulateur du PDGF-BB sur la prolifération observée précédemment. Enfin, nous avons observé que la vitamine D augmente aussi la quantité de cellules en phase G0/G1 en présence de PDGF-BB, accompagné d'une tendance non significative à la diminution de la quantité de cellules en phase S et G2/M.

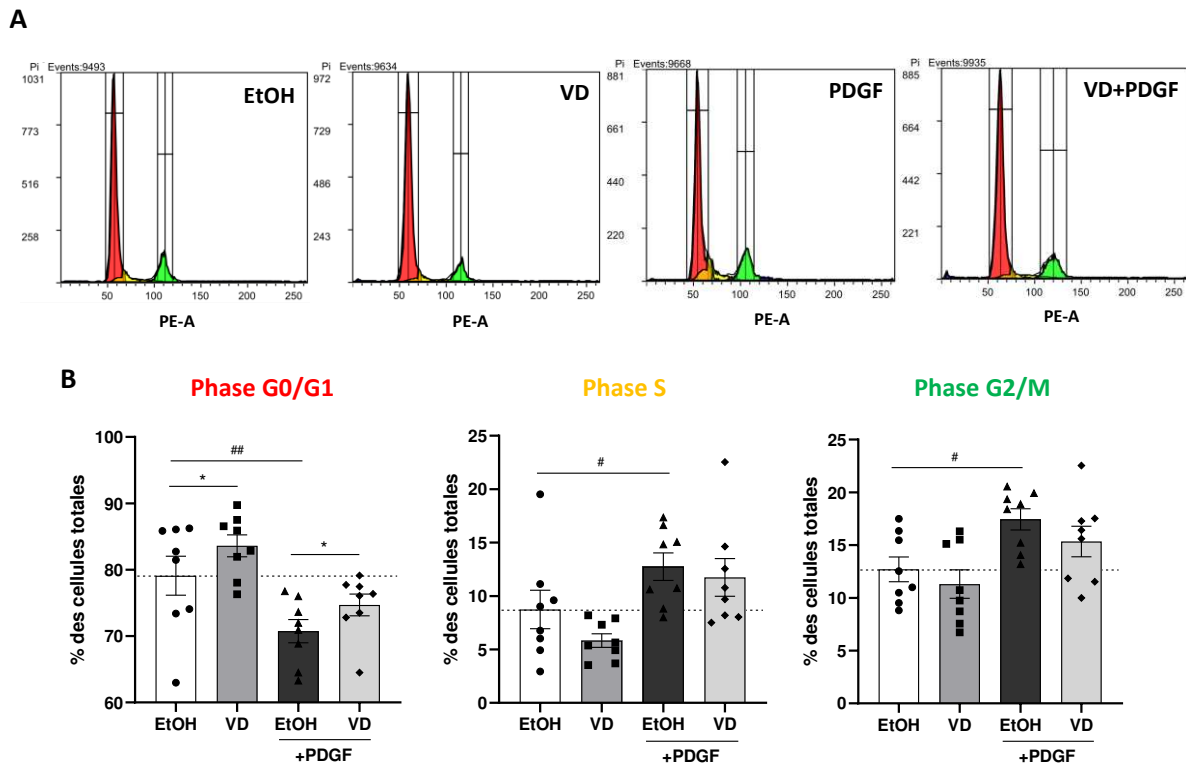


Figure 34: La VD altère le cycle cellulaire des fibroblastes FPI. Les fibroblastes FPI ont été traités avec le véhicule (EtOH) ou 100 nM de vitamine D (VD) pendant 48 h en absence ou en présence de 50 ng/ml de PDGF-BB. Les cellules ont été lavées, fixées et marquées à l'iodure de propidium pour analyser le cycle cellulaire en cytométrie en flux (A) et quantifier le nombre de cellules dans chaque phase (B). *, # p<0,05 ; ## p<0,01.

iii. Effets sur les cyclines et CDK

Afin d'expliquer l'effet de la vitamine D observé sur le cycle cellulaire, nous nous sommes intéressés aux cyclines et kinases dépendantes des cyclines (CDK) dont l'expression contrôle le passage des différents stades du cycle cellulaire (Figure 35). Ainsi, par western blot, et d'abord en condition non stimulée par le PDGF-BB, nous avons observé que la vitamine D inhibe significativement l'expression de la cycline D1 et de la cycline A, mais n'a pas d'effet sur l'expression des autres cyclines et CDK. En condition stimulée par le PDGF-BB, nous avons observé que le PDGF-BB seul tend à augmenter l'expression de la cycline E et de CDK4, et augmente significativement l'expression de toutes les autres cyclines et CDK. Enfin, nous avons

observé que la vitamine D diminue significativement l'induction de l'expression protéique de toutes les cyclines et CDK induite par le PDGF-BB, et ce de manière similaire quelle que soit la protéine étudiée.

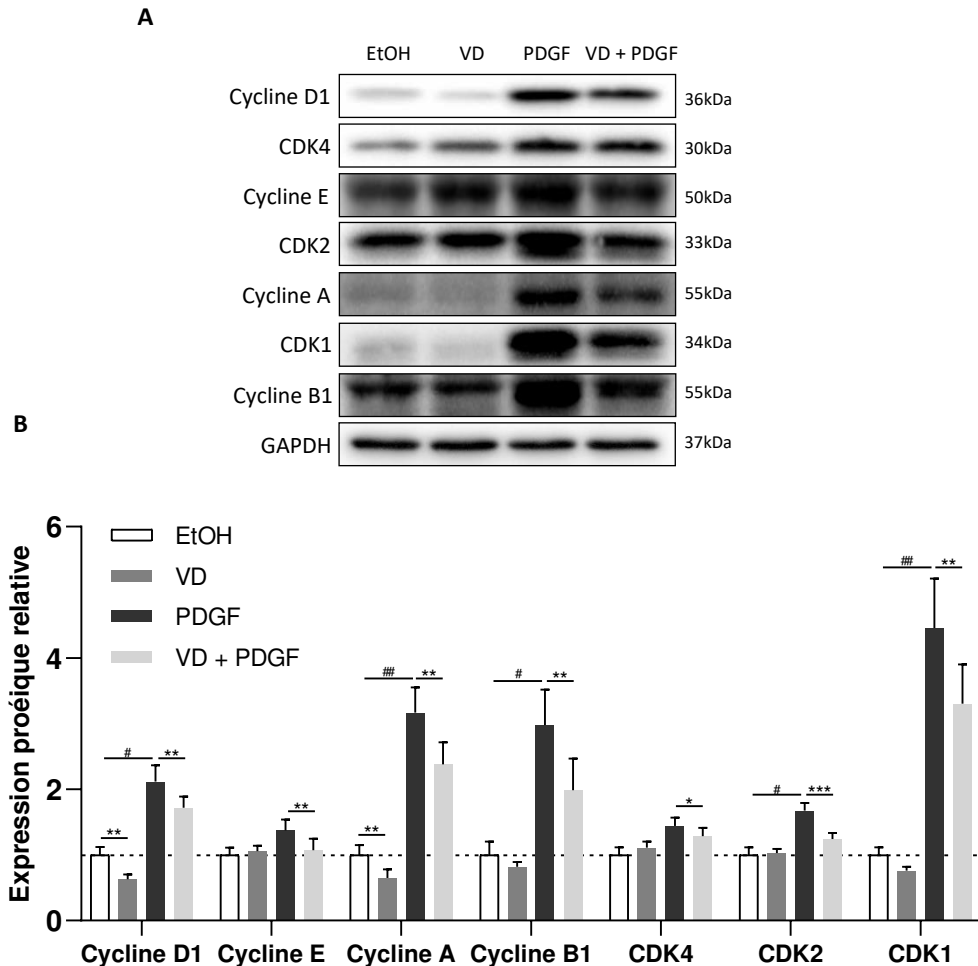


Figure 35 : La VD altère l'expression protéique des cyclines et des CDK dans les fibroblastes FPI. Les cellules ont été traitées avec le véhicule (EtOH) ou 100 nM de vitamine D (VD) en absence ou en présence de 50 ng/mL de PDGF-BB pendant 48 h. (A) Western blot représentatif montrant l'expression des protéines liées au cycle cellulaire dans les fibroblastes FPI. (B) L'expression des protéines a été quantifiée par densitométrie et normalisée par rapport à la GAPDH. Les expressions protéiques basales mesurées dans les cellules traitées à l'EtOH (ligne en pointillées) ont été arbitrairement fixées à 1. Les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm SEM de 8 expériences indépendantes. Les différences significatives ont été déterminées par des tests t par paires. *, # $p < 0,05$; **, ## $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

iv. Voie de signalisation

Afin de savoir si l'inhibition de la prolifération par la vitamine D résulte d'une altération de la voie de signalisation induite par le PDGF-BB, nous avons quantifié par western blot la phosphorylation des effecteurs principaux de cette voie : PDGFR, ERK et AKT (Figure 36). Comme attendu, nous avons observé que le PDGF-BB augmente fortement l'expression de p-

PDGFR, p-ERK et p-AKT. Cependant, la vitamine D n'a pas impacté la phosphorylation de ces effecteurs canoniques du PDGF-BB, il semble donc que ses effets ne soient pas dépendants de ces voies de signalisation.

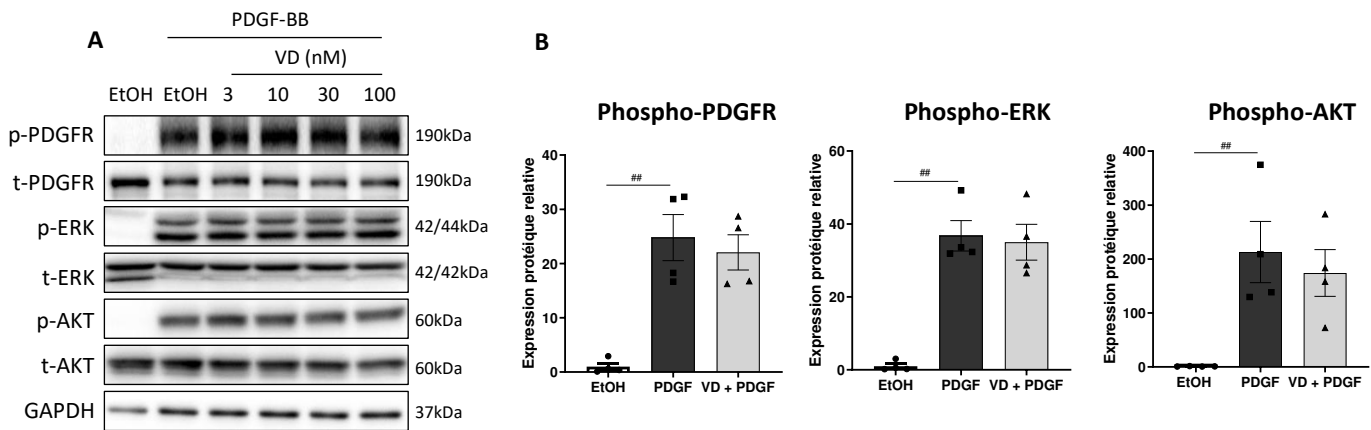


Figure 36 : La VD n'a pas d'effet sur la voie de signalisation canonique du PDGF-BB dans les fibroblastes FPI. Les cellules ont été traitées avec le véhicule (EtOH) ou avec 3-100 nM de vitamine D (VD) pendant 1 h, puis stimulées ou non avec 25 ng/mL de PDGF-BB pendant 10 min. Le Western blot représentatif (A) montre la phosphorylation du PDGFR, de ERK et de AKT. Les expressions protéiques dans les cellules traitées en absence ou en présence de 100 nM de VD ont été quantifiées par densitométrie et normalisées par rapport à la GAPDH (B). Les expressions protéiques basales mesurées dans les cellules traitées à l'EtOH ont été arbitrairement fixées à 1. ## p<0,01.

IV. Impact de la vitamine D sur la différenciation myofibroblastique

i. Les marqueurs de la différenciation

a. Effets sur les gènes pro-fibrosants

Puisque la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes est un paramètre essentiel de la fibrogenèse, nous nous sommes intéressés à l'expression des marqueurs myofibroblastiques induits par le TGF- β 1. Par RT-qPCR, nous avons quantifié l'expression des ARNm *ACTA2* qui codent pour un isoforme de l'actine, des ARNm *COL1A1*, *COL1A2*, *COL4A2* qui codent pour des isoformes du collagène, et des ARNm *FN1* qui code pour la fibronectine (Figure 37). Nous avons d'abord constaté qu'en condition non stimulée au TGF- β 1, la vitamine D n'a pas d'effet sur les marqueurs pro-fibrosants des fibroblastes FPI (Figure 37 A). Ensuite, nous avons observé que le TGF- β 1 augmente fortement l'expression de ces différents marqueurs, puis que la vitamine D diminue significativement l'expression de *ACTA2* à la dose de 100 nM, et tend à diminuer l'expression de *COL4A2* (Figure 37 B). Cependant, la vitamine D n'a pas montré d'effet inhibiteur de l'induction des autres marqueurs.

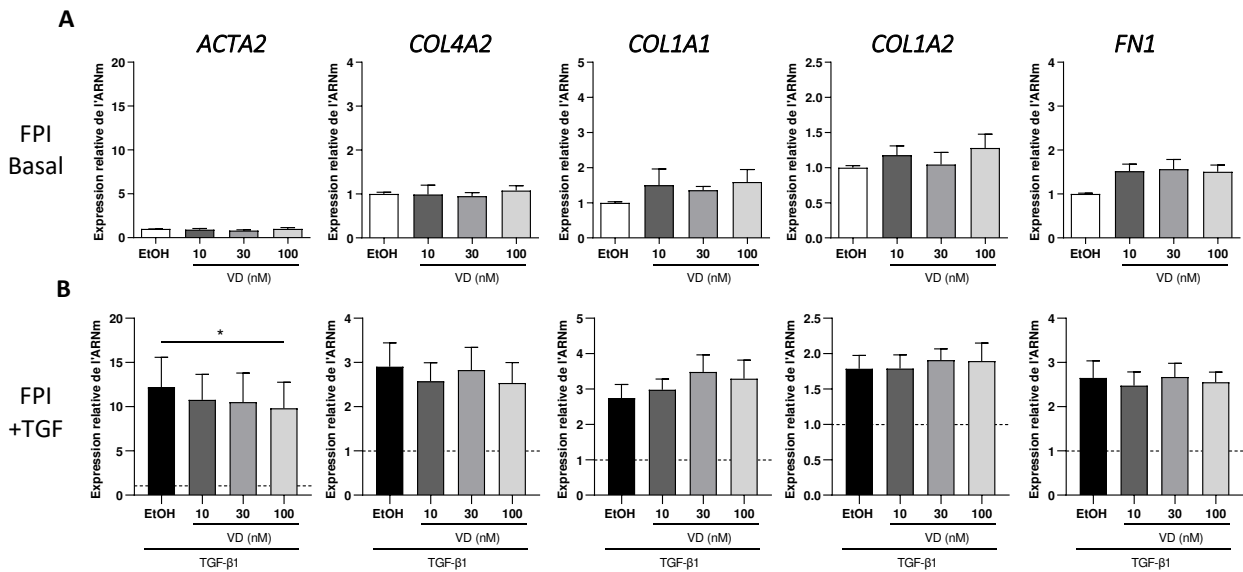


Figure 37 : Effets de la VD sur les niveaux d'ARNm de gènes pro-fibrosants chez les fibroblastes FPI. Les cellules ont été traitées avec le véhicule (EtOH) ou 3-100 nM de vitamine D (VD) en l'absence ou en présence de 1 ng/mL de TGF-β1 pendant 24 h. (A, B) Les doses-réponses sont réalisées sur 5 cultures de fibroblastes FPI. Les niveaux relatifs d'ARNm ACTA2, COL1A1, COL1A2, COL4A2 et FN1 ont été mesurés par RT-qPCR et normalisés par rapport à l'ARN 18S ribosomal. Les niveaux d'ARNm mesurés dans les cellules traitées à l'EtOH (lignes en pointillés) ont été arbitrairement fixés à 1. * $p < 0,05$.

Nous avons enfin confirmé sur un plus grand nombre de cultures (N = 10 FPI ; 7 contrôles) qu'une concentration de 100 nM de vitamine D inhibe significativement, bien que faiblement, l'expression des ARNm de ACTA2 et COL4A2 en présence de TGF-β1 chez les fibroblastes contrôles et FPI (Figure 38).

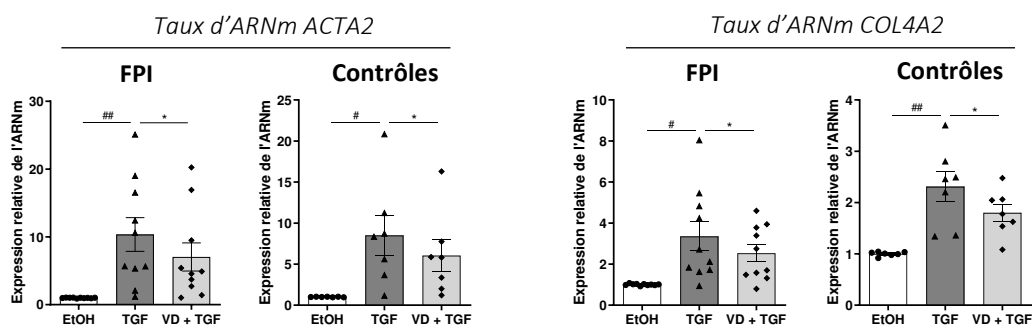


Figure 38 : La VD diminue les niveaux d'ARNm d'ACTA2 et de COL4A2 dans les fibroblastes FPI et contrôles. L'effet de 100 nM vitamine D (VD) a été étudié sur 10 cultures de fibroblastes FPI et 7 cultures de fibroblastes contrôles exposées à 1 ng/mL de TGF-β1 (TGF). Les niveaux relatifs d'ARNm ACTA2, COL1A1, COL1A2, COL4A2 et FN1 ont été mesurés par RT-qPCR et normalisés par rapport à l'ARN 18S ribosomal. Les niveaux d'ARNm mesurés dans les cellules traitées à l'EtOH ont été arbitrairement fixés à 1. *, # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression protéique de ces mêmes marqueurs pro-fibrosants par western blot : α -SMA qui est codé par *ACTA2*, la fibronectine codée par *FN1* et le collagène I codé par *COL1A1* (bande supérieur) et *COL1A2* (bande du dessous) (Figure 39). En condition non stimulée par le TGF- β 1, la vitamine D n'a pas eu d'effet sur l'expression de ces marqueurs (Figure 39 A-B). En condition stimulée par le TGF- β 1, nous avons observé que l'expression des trois marqueurs est augmentée, et que la vitamine D à 100 nM inhibe significativement et très légèrement l'expression de α -SMA dans les cultures FPI (Figure 39 C-D).

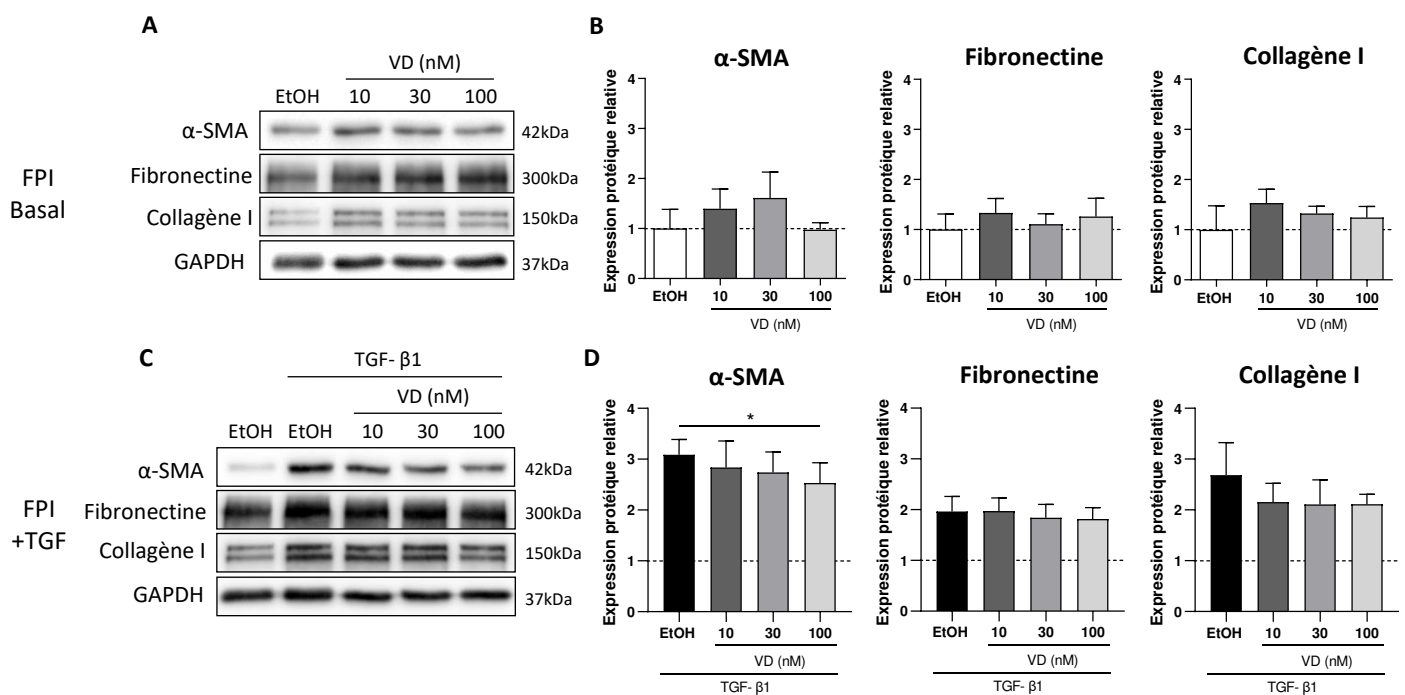


Figure 39 : Effets de la VD sur l'expression protéique de gènes pro-fibrosants chez les fibroblastes FPI. Les cellules ont été traitées avec le véhicule (EtOH) ou 3-100 nM de vitamine D (VD) en l'absence ou en présence de 1 ng/mL de TGF- β 1 pendant 24 h. Les western blots ont été réalisés sur 5 cultures de fibroblastes FPI pour évaluer l'expression protéique d' α -SMA, de fibronectine et de collagène (A, C) puis ont été quantifiés par densitométrie et normalisés à la GAPDH (B, D). Les niveaux d'expressions protéiques des cellules traitées à l'EtOH (lignes en pointillés) ont été arbitrairement fixés à 1. * $p < 0,05$.

Nous avons enfin confirmé sur un plus grand nombre de cultures (N = 10 FPI ; 7 contrôles) qu'une concentration de 100 nM de vitamine D diminue significativement l'expression de α -SMA dans les fibroblastes de patients FPI et contrôles en présence de TGF- β 1 (Figure 40).

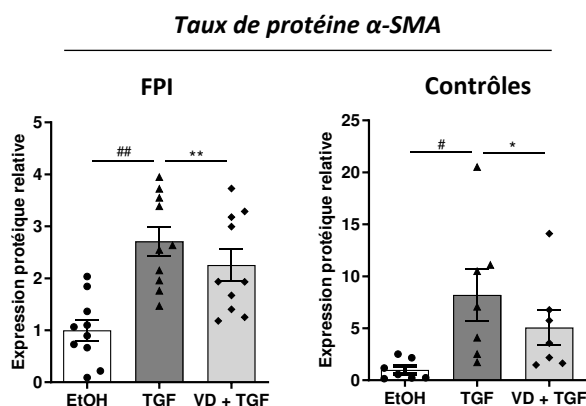


Figure 40: La VD diminue l'expression protéique d' α -SMA dans les fibroblastes FPI. L'effet de 100 nM de Vitamine D (VD) est quantifié sur 10 cultures de fibroblastes FPI ou 7 cultures de fibroblastes contrôles exposées à 1 ng/mL de TGF- β 1 (TGF) pendant 24 h. L'expression protéique d' α -SMA a été quantifiée par densitométrie et normalisée à la GAPDH. Les niveaux d'expressions protéiques des cellules traitées à l'EtOH ont été arbitrairement fixés à 1. *,# p<0,05 ; **,## p<0,01.

b. Effets sur la voie de signalisation du TGF- β 1

Afin d'expliquer les effets de la vitamine D sur la différenciation des myofibroblastes, nous nous sommes intéressés à la voie de signalisation canonique du TGF- β 1 en quantifiant par western blot la phosphorylation de ses effecteurs principaux SMAD2 et SMAD3. Nous avons d'abord confirmé que le TGF- β 1 induit fortement la phosphorylation des protéines SMAD2 et SMAD3 (Figure 41). La vitamine D tend à diminuer les niveaux de p-SMAD2, mais elle n'a pas d'effet sur ceux de p-SMAD3.

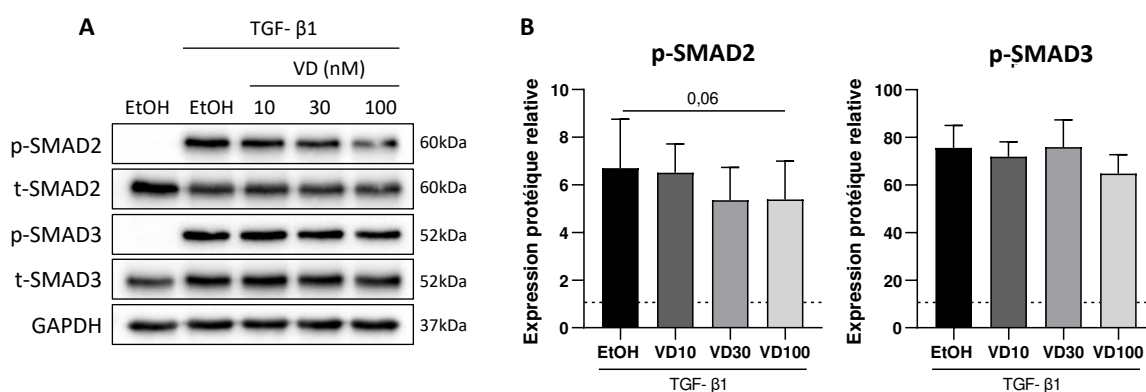


Figure 41 : Effets de la VD sur la voie de signalisation du TGF- β 1 dans les fibroblastes FPI. Les cellules ont été traitées avec le véhicule (EtOH) ou 3-100 nM de vitamine D (VD) en absence ou en présence de 1 ng/mL de TGF- β 1 pendant 24 h. Les expériences ont été réalisées sur 5 cultures de fibroblastes FPI. L'expression protéique de p-SMAD2 et p-SMAD3 a été quantifiée par densitométrie et normalisée à la GAPDH (B). Les niveaux d'expressions protéiques des cellules traitées à l'EtOH (lignes en pointillés) ont été arbitrairement fixés à 1.

Nous avons ensuite confirmé sur un plus grand nombre de cultures (N = 10 FPI ; 6 contrôles) que la vitamine D à 100 nM diminue très faiblement mais significativement la phosphorylation de SMAD2 chez les fibroblastes de patients FPI (11 % d'inhibition) et tend à diminuer celle des fibroblastes contrôles (19 % d'inhibition) (Figure 42).

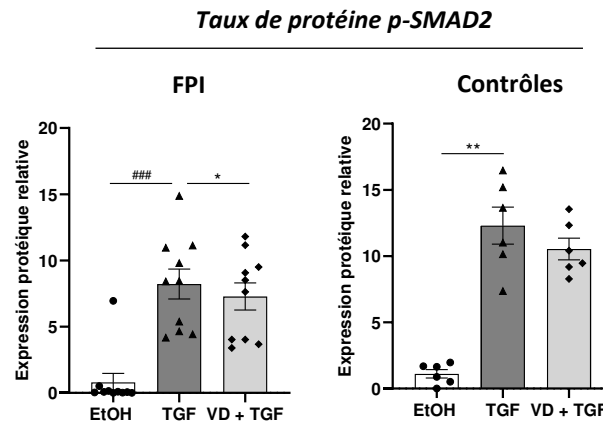


Figure 42: La VD diminue la phosphorylation de SMAD2 dans les fibroblastes FPI et contrôles. L'effet de 100 nM de vitamine D (VD) est quantifié sur 10 cultures de fibroblastes FPI ou 6 cultures de fibroblastes contrôles exposées à 1 ng/mL de TGF- β 1 (TGF) pendant 24 h. L'expression protéique de p-SMAD2 a été quantifiée par densitométrie et normalisée à la GAPDH. Les niveaux d'expressions protéiques des cellules traitées à l'EtOH ont été arbitrairement fixés à 1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ### $p < 0,001$.

ii. Effets sur l'activité contractile

L'activité contractile des fibroblastes contribue aux altérations structurelles des poumons au cours de la FPI, nous avons donc étudié ce paramètre par la technique de contraction de matrice de collagène (Figure 43). Nous avons observé dans un premier temps que la vitamine D seule n'a pas d'effet sur l'activité contractile des fibroblastes FPI. Dans un second temps, nous avons observé que le TGF- β 1 induit une forte contraction de la matrice de collagène. Enfin, la vitamine D tend à diminuer cette contraction mais de manière non significative.

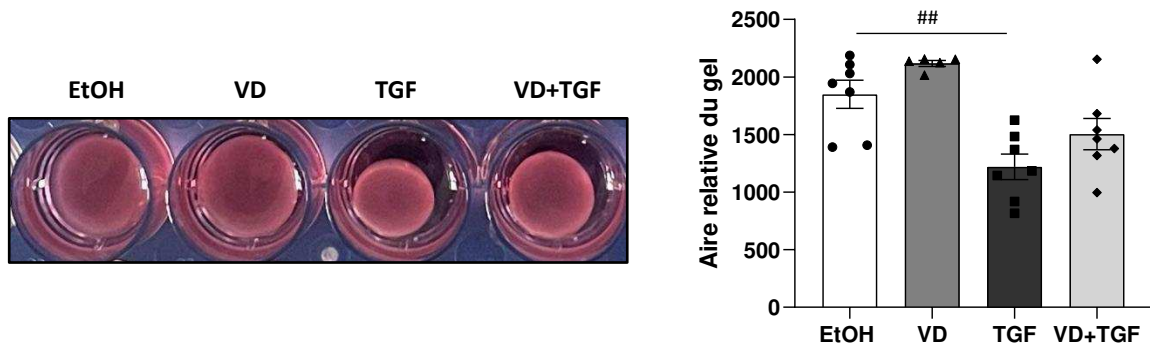


Figure 43 : La VD n'a pas d'effet significatif sur l'activité contractile des fibroblastes FPI. Les cellules ont été mises en culture dans une matrice de collagène avec le véhicule (EtOH) ou 100 nM de vitamine D (VD) en l'absence ou en présence de 1 ng/mL de TGF- β 1 (TGF) pendant 48 h. Le gel a ensuite été décollé et son aire relative a été quantifiée après 4 h de contraction. ## p<0,01.

V. Impact de la vitamine D sur le métabolisme des fibroblastes

i. Effets sur la respiration mitochondriale

Pour étudier les effets de la vitamine D sur le métabolisme des fibroblastes, nous avons d'abord utilisé le protocole Seahorse® « cell mito stress test » qui permet de quantifier différents paramètres de la chaîne respiratoire mitochondriale (Figure 44 A). Ainsi, nous avons observé que le TGF- β 1 augmente la respiration basale et la production d'ATP des fibroblastes FPI, et que la vitamine D tend à inhiber cet effet (Figure 44 B). La fuite de protons, la respiration maximale, la respiration mitochondriale et la capacité de réserve n'ont pas été impactés significativement par le TGF- β 1 et la vitamine D (Figure 44 B).

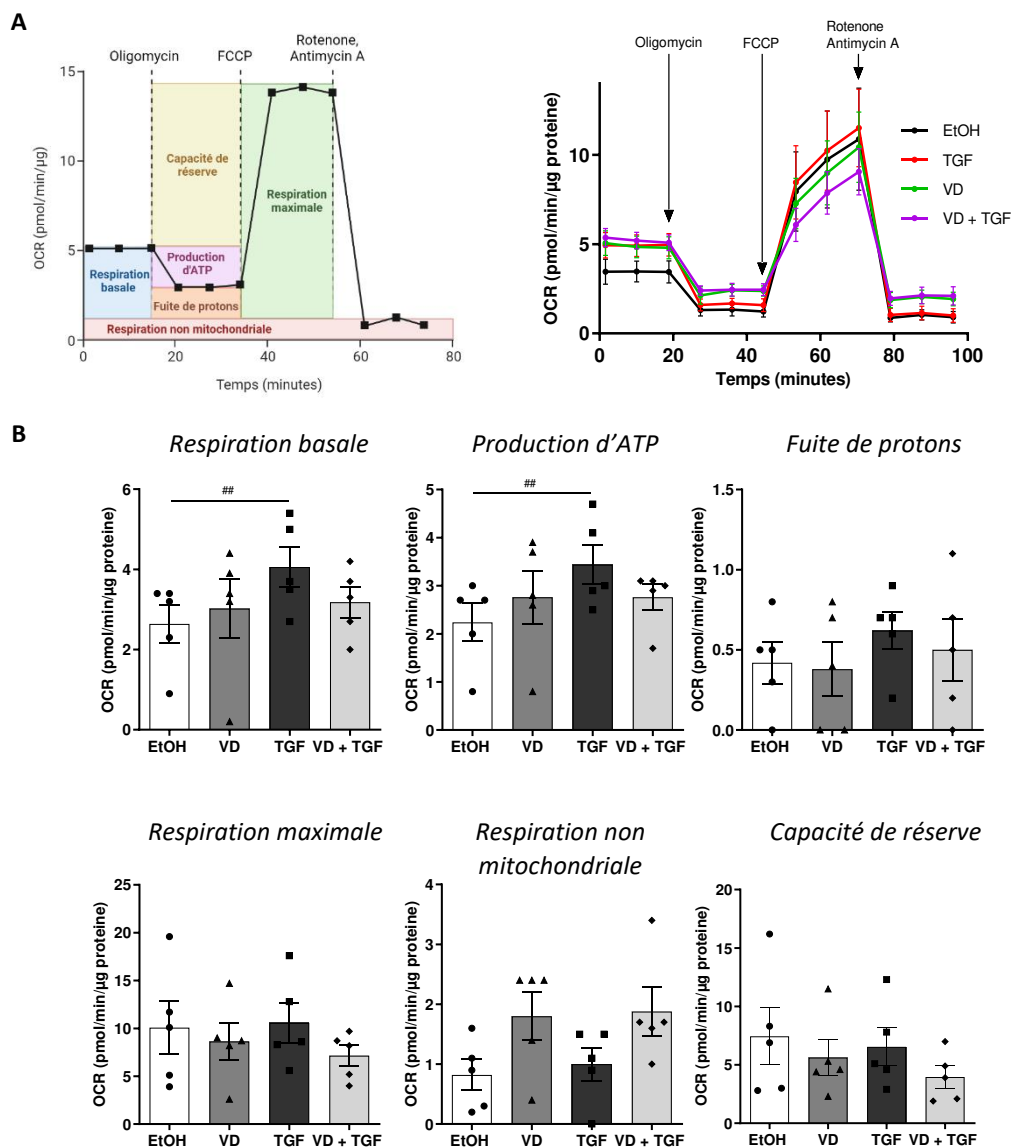


Figure 44 : La VD n'a pas d'effet sur les paramètres de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les fibroblastes FPI ont été traités avec le véhicule (EtOH) ou 100 nM de vitamine D (VD), en absence ou en présence de TGF-β1 (TGF), pendant 24 h avant l'analyse du métabolisme cellulaire par la technologie Seahorse®. (A) Graphique représentatif du taux de consommation d'oxygène (OCR) par les fibroblastes FPI à l'aide du kit Seahorse® XF Cell Mito Stress. (B) Les paramètres de la chaîne respiratoire liés à l'OCR ont été quantifiés après injection d'oligomycine, de FCCP, de roténone et d'antimycine A dans le système. ## p<0,01.

Le kit « cell mito stress test » permet également de mesurer l'évolution du pH extracellulaire. Ainsi, en parallèle des paramètres de la chaîne respiratoire, nous avons pu observer que le TGF-β1 augmente significativement l'acidification basale des fibroblastes FPI et que la vitamine D bloque cet effet (Figure 45 A). Le dressage d'une carte métabolique comparant la respiration basale (OCR) avec l'acidification basale des fibroblastes (ECAR) a

permis de confirmer que le TGF- β 1 entraîne un changement de phénotype métabolique vers un état énergétique/glycolytique, tandis que la vitamine D tend à maintenir les fibroblastes dans un état métabolique quiescent/aérobie (Figure 45 B).

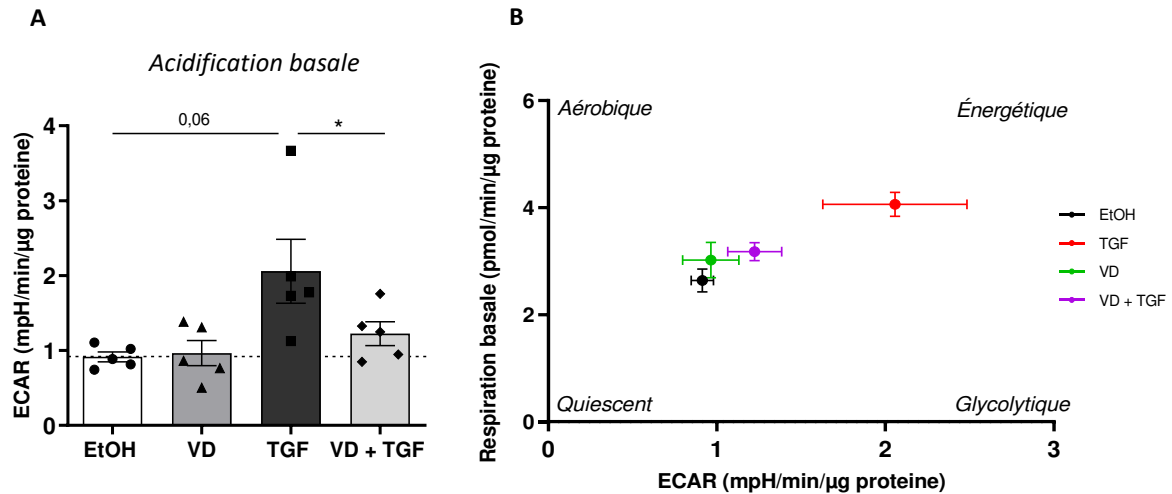


Figure 45: La VD diminue l'acidification basale et l'altération métabolique induites par le TGF- β 1 chez les fibroblastes FPI. Les cellules ont été traitées avec le véhicule (EtOH) ou 100 nM de vitamine D (VD), en absence ou en présence de TGF- β 1 (TGF), pendant 24 h avant l'analyse du métabolisme cellulaire par la technologie Seahorse®. (A) L'acidification extracellulaire basale a été déterminée en mesurant le taux d'acidification extracellulaire (ECAR). (B) Le phénotype métabolique est déterminé par la mesure simultanée des valeurs OCR et ECAR est illustré. #,* $p < 0,05$.

ii. Effets sur la respiration glycolytique

Pour préciser l'effet de la vitamine D sur l'acidification induite par le TGF- β 1, nous avons utilisé un second protocole Seahorse® « glycolytic stress test » qui permet de quantifier les paramètres de la glycolyse (Figure 46 A). Le TGF- β 1 augmente significativement la glycolyse des fibroblastes FPI et leur capacité glycolytique, et accroît de manière non significative leur réserve glycolytique (Figure 46 B). La vitamine D seule n'a pas montré d'effet sur ces paramètres, mais elle diminue l'induction de la glycolyse par le TGF- β 1 ($p = 0,0506$), rétablie au niveau basal la capacité glycolytique, et diminue la réserve glycolytique en dessous de sa valeur basale.

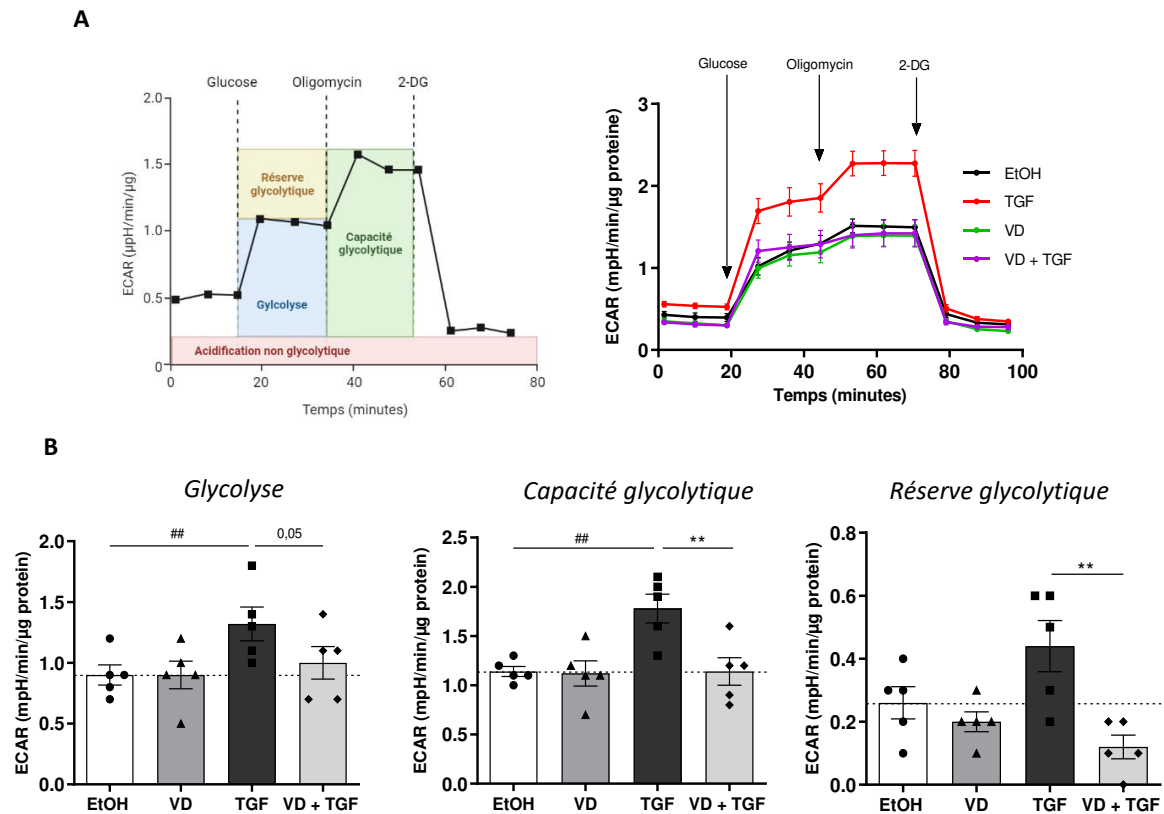


Figure 46 : La VD inhibe la glycolyse induite par le TGF- β 1 chez les fibroblastes FPI. Cinq cultures de fibroblastes FPI ont été traitées avec le véhicule (EtOH) ou 100 nM de vitamine D (VD), en absence ou en présence de 5 ng/mL de TGF- β 1 (TGF) pendant 24 h, avant l'analyse de la glycolyse par la technologie Seahorse®. (A) Graphique représentatif du taux d'acidification extracellulaire (ECAR) des milieux de culture des fibroblastes FPI à l'aide du kit Seahorse® XF Glycolysis Stress Test. (B) Les paramètres du métabolisme glycolytique ont été déterminés après injection de glucose, d'oligomycine et de 2-DG dans le système. **, ## $p < 0,01$.

Nous avons pu observer des effets similaires mais non significatifs de la vitamine D sur les paramètres glycolytiques des fibroblastes contrôles (Figure 47). Le TGF- β 1 semble également avoir un effet moins important sur l'induction des différents paramètres de la glycolyse des fibroblastes contrôles en comparaison aux fibroblastes FPI.

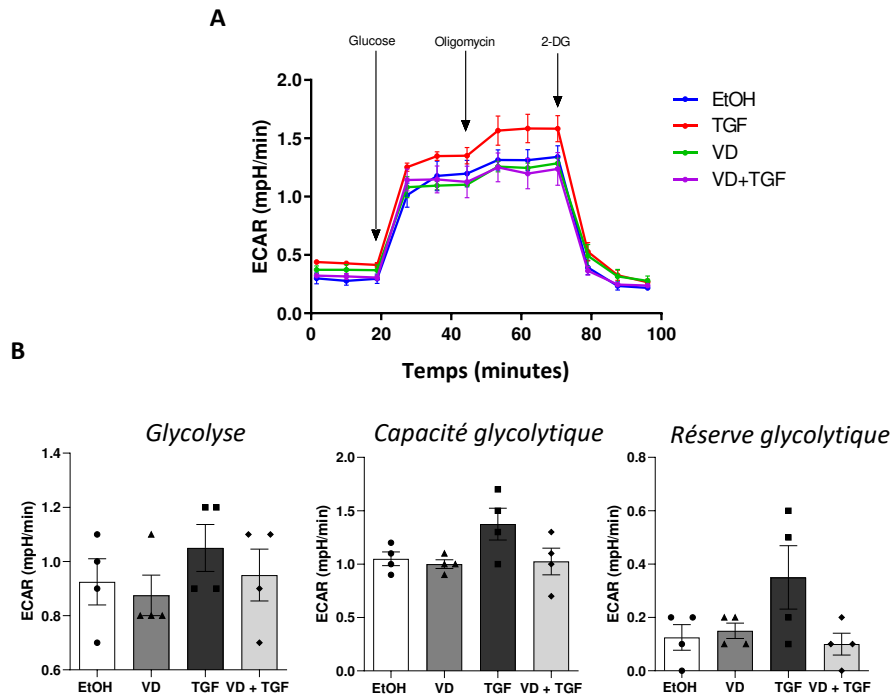


Figure 47: La VD tend à inhiber la glycolyse induite par le TGF- β 1 chez les fibroblastes contrôles. Les cellules ont été traitées avec le véhicule (EtOH) ou 100 nM de vitamine D (VD), en absence ou en présence de 5 ng/mL de TGF- β 1 (TGF) pendant 24 h, avant l'analyse de la glycolyse par la technologie Seahorse®. (A) Graphique représentatif du taux d'acidification extracellulaire (ECAR) des milieux de culture des fibroblastes FPI à l'aide du kit Seahorse® XF Glycolysis Stress Test. (B) Les paramètres du métabolisme glycolytique a été déterminé après injection de glucose, d'oligomycine et de 2-DG dans le système.

Enfin, nous avons mis en évidence que les effets de la vitamine D sur le métabolisme glycolytique est dépendent de son récepteur VDR (Figure 48). En effet, nous avons observé que la vitamine D n'inhibe plus la glycolyse induite par le TGF- β 1 chez les fibroblastes FPI transfectés par un siRNA VDR.

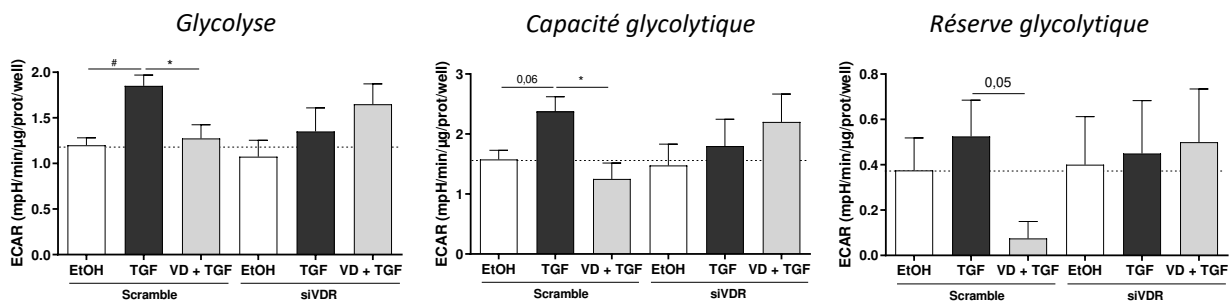


Figure 48: La VD inhibe la glycolyse de façon VDR-dépendante chez les fibroblastes FPI. Les cellules ont été transfectées avec un siRNA contrôle (scramble) ou un siRNA VDR (siVDR) pendant 24 h, puis traitées avec de l'EtOH ou 100 nM de vitamine D (VD), en absence ou en présence de 5 ng/mL de TGF- β 1 (TGF) pendant 24 h, avant l'analyse du métabolisme glycolytique. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes. *, #, $p < 0,05$.

a. Effets sur l'expression des enzymes de la glycolyse

Après avoir étudié l'impact de la vitamine D sur le phénotype métabolique des fibroblastes, nous nous sommes intéressés à l'expression des enzymes impliquées dans la chaîne glycolytique. Par RT-qPCR, nous avons observé que le TGF- β 1 induit l'expression de l'ARNm de *LDHA* qui code pour l'enzyme de synthèse des lactates, de *SLC2A3* qui code pour un transporteur membranaire du glucose, et de *PDK1* qui code pour une enzyme permettant la conversion du pyruvate en acétyl-CoA (Figure 49). Nous avons ensuite observé que la vitamine D seule diminue l'expression de ces trois marqueurs, et qu'elle diminue également leur expression induite par le TGF- β 1. La vitamine D et le TGF- β 1 n'ont pas montré d'effet sur *HK2*, *PFKB3* et *SIRT1* qui sont d'autres enzymes glycolytiques.

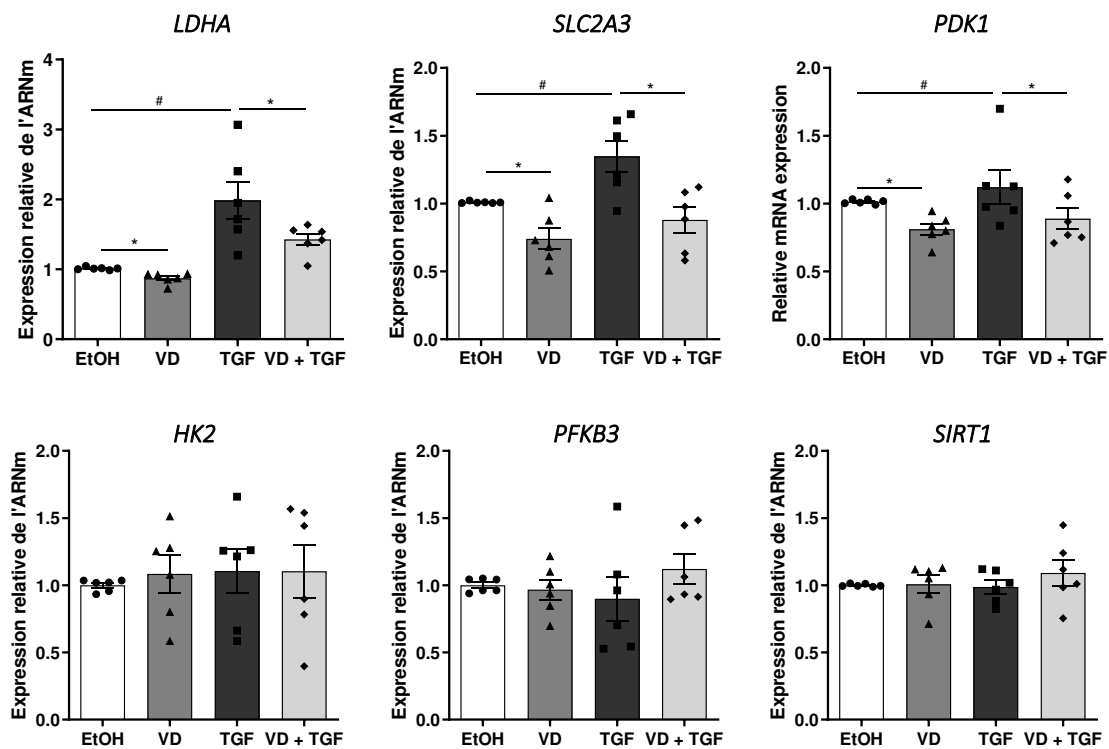


Figure 49: La VD diminue l'expression de l'ARNm de *LDHA*, *SLC2A3* et *PDK1*. Les cellules ont été traitées avec le véhicule (EtOH) ou 100 nM de vitamine D (VD) en l'absence ou en présence de 1 ng/mL de TGF- β 1 pendant 24 h. Les niveaux relatifs d'ARNm *LDHA*, *SLC2A3*, *PDK1*, *HK2*, *PFKB3* et *SIRT1* ont été mesurés par RT-qPCR et normalisés par rapport à l'ARN 18S ribosomal. *, # $p < 0,05$.

b. Effets sur la sécrétion de lactates et l'activité LDH

Puisque les enzymes de la chaîne glycolytique sont responsables de la production et de la sécrétion de lactates, nous nous sommes intéressés à sa concentration extracellulaire. Nous avons observé que le TGF- β 1 augmente fortement la concentration de lactates extracellulaires et que la vitamine D diminue cette concentration basale ou induite par le TGF- β 1 (Figure 50 A). La production de lactate étant contrôlée par la lactate déshydrogénase (LDH), nous nous sommes donc ensuite intéressés à l'activité de cette enzyme. Nous avons observé que l'activité de la LDH est augmentée d'un facteur 2 en présence de TGF- β 1 (Figure 50 B). La vitamine D seule n'a pas diminué l'activité basale de la LDH, mais elle a significativement réduit l'induction de son activité par le TGF- β 1. Les effets de la vitamine D sur la sécrétion de lactate et sur l'activité LDH sont très similaires et correspondent à une inhibition d'environ 20 % de l'effet inducteur du TGF- β 1.

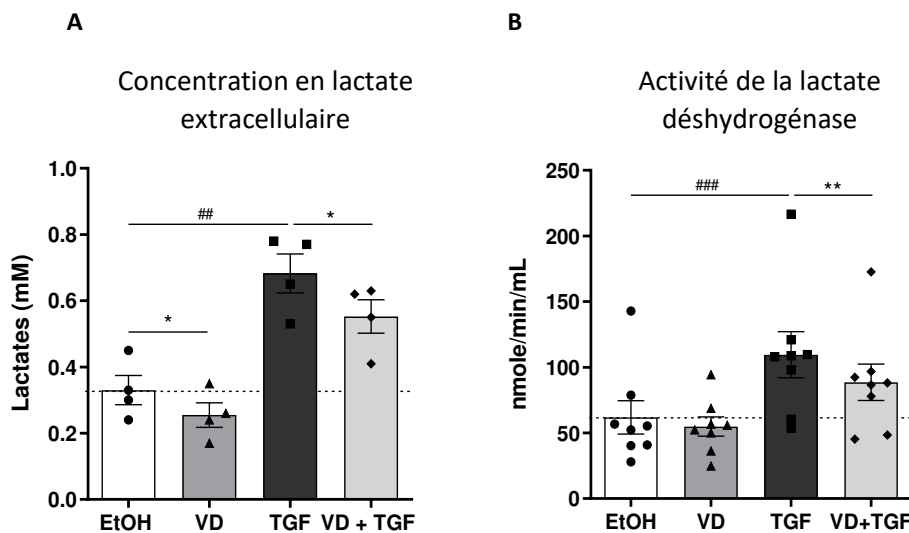


Figure 50: La VD inhibe la production de lactate et l'activité de la LDH. Les cellules ont été traitées avec le véhicule (EtOH) ou 100 nM de vitamine D (VD) en absence ou en présence de 5 ng/mL TGF- β 1 (TGF) pendant 24 h. Les concentrations extracellulaires de lactate (A) et l'activité LDH (B) ont été mesurées comme décrit dans la section matériels et méthodes. *,# p < 0,05 ; **,## p < 0,01 ; ### p < 0,001.

VI. Statut vitaminique des patients FPI

Nous avons dosé la concentration de vitamine D dans le sérum des patients atteints de FPI pour comparer leur statut vitaminique avec une population globale de patients dosés en routine au CHU de Rennes. Cette population globale non FPI utilisée comme référence de comparaison est normo-calcémique (concentration moyenne de calcium sérique de $2,32 \text{ mM} \pm 0,15$) et a été sélectionnée pour présenter la même moyenne et écart-type d'âge que le groupe FPI, avec une absence d'insuffisance rénale chronique (débit de filtration glomérulaire supérieur à 90 ml/min) (Figure 51). Nous avons observé que la population globale a une concentration moyenne de $23,94 \text{ ng/mL}$ (équivalent à $59,85 \text{ nM}$) et que les patients FPI ont une concentration moyenne de $20,25 \text{ ng/mL}$ (équivalent à $50,62 \text{ nM}$). Cette valeur est proche de la population globale bien que statistiquement plus basse et au niveau du seuil d'insuffisance fixé à 20 ng/mL (équivalent à 50 nM).

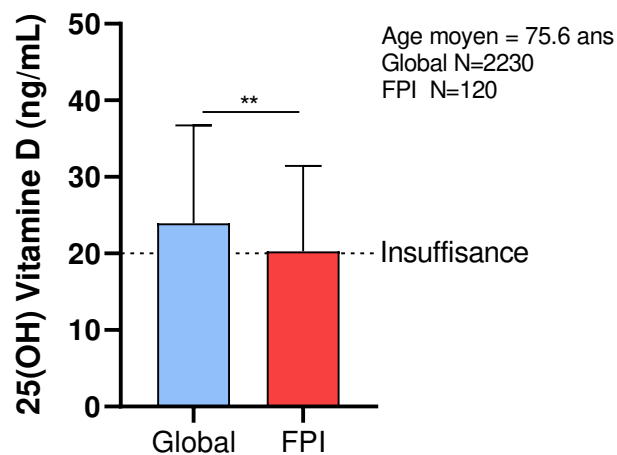


Figure 51: Les patients FPI sont carencés en 25(OH) Vitamine D. La concentration en 25(OH) Vitamine D a été quantifiée dans le sérum des patients FPI au diagnostic et dans une population globale du même âge moyen. ** $p < 0,01$.

VII. Effets de la vitamine D sur d'autres PID fibrosantes

D'autres PID fibrosantes ont été étudiées afin de savoir si la vitamine D a également des effets anti-fibrosants sur les fibroblastes isolés de patients développant ces maladies : La pneumopathies d'hypersensibilité (PHS) et la fibro-élastose pleuro-parenchymateuses (FEPP). La PHS est une PID fibrosante de cause connue, le plus souvent professionnelle. Elle résulte le plus souvent d'une exposition répétée à des substances organiques telles que les poussières

végétales (fermier) ou les plumes (éleveur d'oiseaux), et elle déclenche une réaction immuno-allergique. La FEPP est une autre PID fibrosante idiopathique mais qui présente des lésions fibrotiques localisées dans les lobes supérieurs, contrairement à la FPI qui prédomine dans les lobes inférieurs. Des fibroblastes issus de biopsie diagnostic de 6 PHS et de 3 FEPP (dont 2 cultures ont été obtenues en collaboration avec l'équipe du Pr Bruno Crestani – INSERM UMR 1152) ont été utilisés pour étudier les effets de la vitamine D sur leur prolifération et leur différenciation.

i. Prolifération

Nous avons observé que la vitamine D a un effet inhibiteur dose-dépendant sur les fibroblastes isolés de PHS et de FEPP qui est similaire à celui observés chez les fibroblastes de patients FPI (Figure 52). En effet, la vitamine D à 100 nM inhibe de 50 % la prolifération basale des deux types de fibroblastes, et bloque complètement l'effet inducteur du PDGF-BB sur la prolifération, avec une dose-réponse qui commence dès 3 nM.

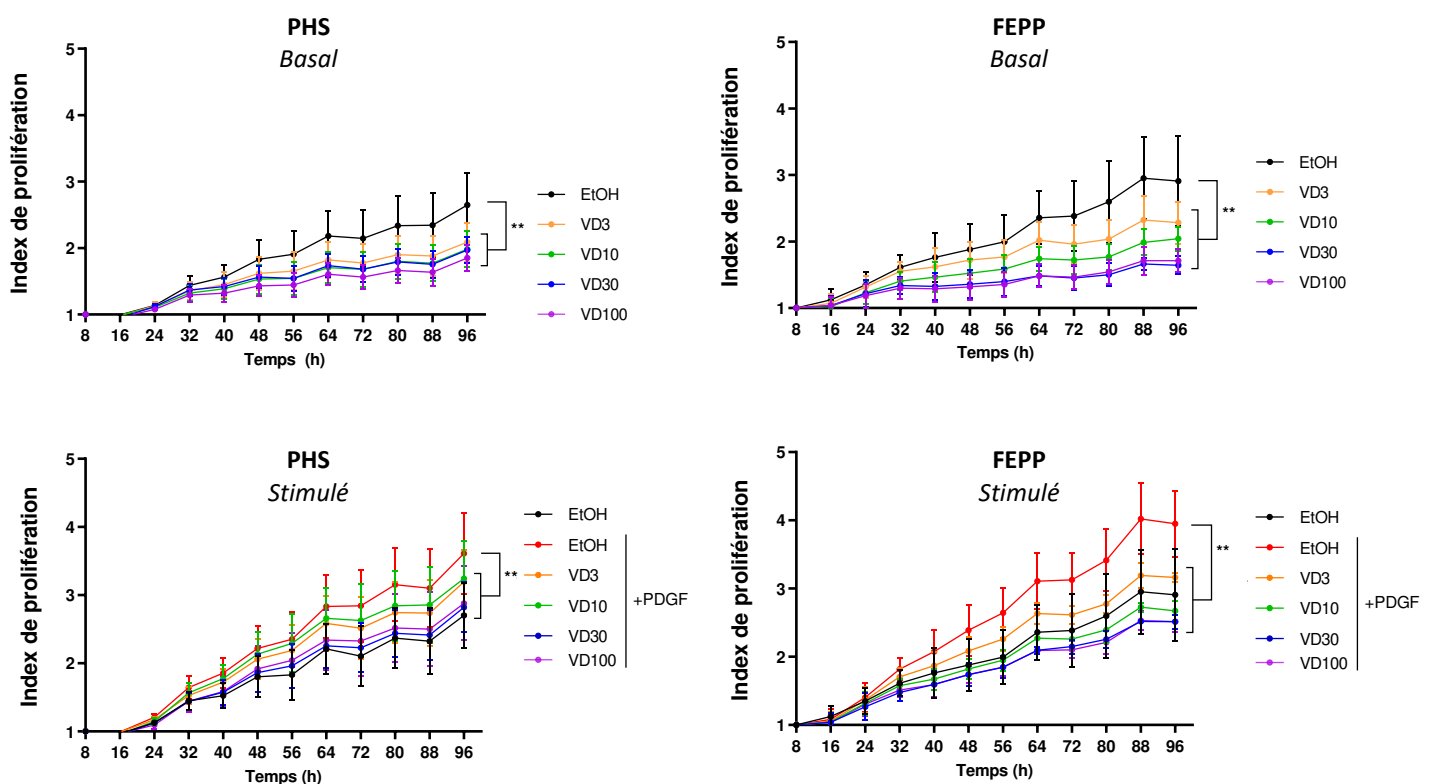


Figure 52: La VD inhibe la prolifération des fibroblastes de patients PHS (N = 6) et de FEPP (N = 3). Les fibroblastes PHS et FEPP ont été traités avec le véhicule (EtOH) ou 3-100 nM de vitamine D (VD) pendant 96 h en absence ou en présence de 50 ng/ml de PDGF-BB. La prolifération a été quantifiée toutes les 8 h à l'aide du microscope à fluorescence Incucyte®. L'indice de prolifération a été calculé en fixant arbitrairement la première acquisition du nombre de cellules à 1. Les différences significatives ont été déterminées par ANOVA suivi d'un test Dunnett de comparaisons multiples. ** p<0,01.

ii. Différenciation

L'effet du TGF- β 1 n'ayant jamais été rapporté sur les fibroblastes isolés de PHS ou de FEPP, nous avons d'abord constaté que ces cellules répondent de la même façon que les fibroblastes FPI à un traitement au TGF- β 1, avec une forte augmentation de l'expression des gènes pro-fibrosants (Figure 53, 54). En RT-qPCR, nous avons observé que la vitamine D diminue l'induction de *ACTA2* induite par le TGF- β 1 chez les fibroblastes PHS, avec une tendance similaire mais non significative pour les fibroblastes FEPP. Comme pour les fibroblastes FPI, nous n'avons pas observé d'effets de la vitamine D sur l'induction des ARNm des autres marqueurs de la fibrose (Figure 53).

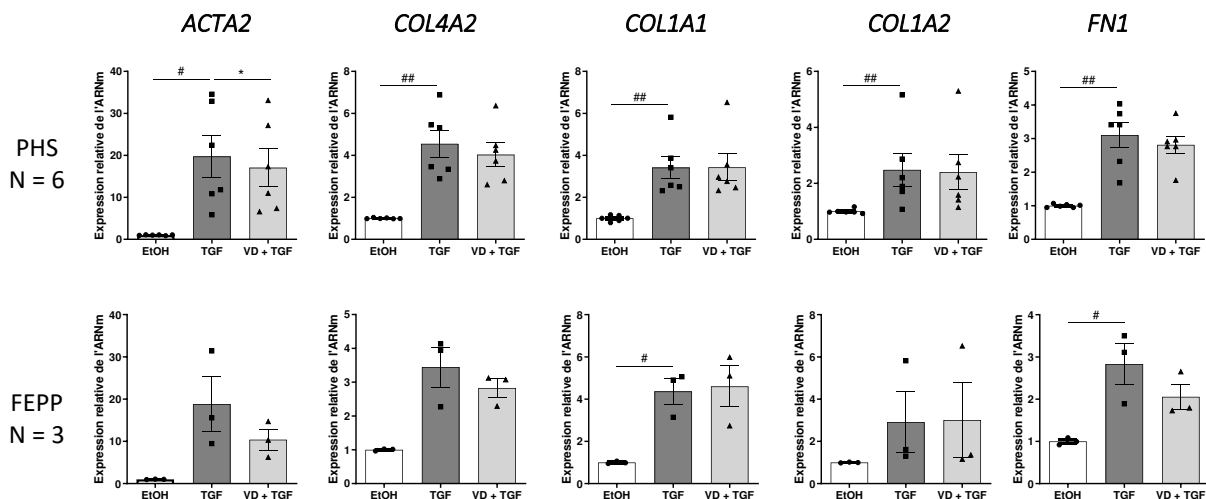


Figure 53 : La VD diminue les niveaux d'ARNm d'*ACTA2* chez les fibroblastes PHS et FEPP. Les cellules ont été traitées avec le véhicule (EtOH) ou 100 nM de vitamine D (VD) en l'absence ou en présence de 1 ng/mL de TGF- β 1 pendant 24 h. Les niveaux relatifs d'ARNm *ACTA2*, *COL1A1*, *COL1A2*, *COL4A2* et *FN1* ont été mesurés par RT-qPCR et normalisés par rapport à l'ARN 18S ribosomal. Les niveaux d'ARNm mesurés dans les cellules traitées à l'EtOH ont été arbitrairement fixés à 1. *, # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$.

Cependant, par western blot, nous n'avons pas observé d'effets de la vitamine D sur l'expression protéique de α -SMA ni sur les autres marqueurs pro-fibrosants en présence de TGF- β 1 (Figure 54). L'activation des protéines SMAD2 et SMAD3 par le TGF- β 1 n'est pas non plus impactée par la vitamine D (Figure 55). Il semble donc qu'au niveau de la différenciation induite par le TGF- β 1, les effets de la vitamine D soient plus importants chez les fibroblastes isolés de patients FPI que sur les fibroblastes isolés de FEPP et de PHS.

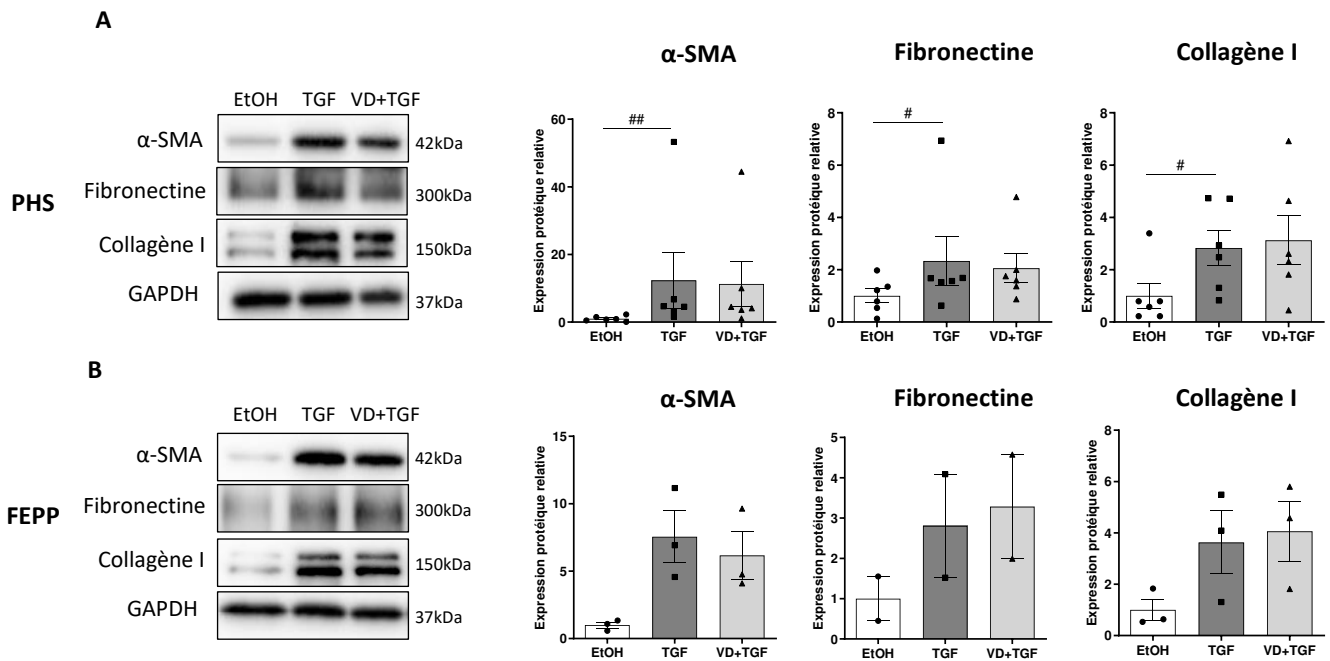


Figure 54 : La VD n'a pas d'effet sur l'expression protéique d' α -SMA dans les fibroblastes PHS et FEPP. Les cellules ont été traitées avec le véhicule (EtOH) 100 nM de vitamine D (VD) en l'absence ou en présence de 1 ng/mL de TGF- β 1 pendant 24 h. L'expression protéique d' α -SMA, de fibronectine et de collagène a été quantifiée par densitométrie et normalisée à la GAPDH. Les niveaux d'expressions protéiques des cellules traitées à l'EtOH ont été arbitrairement fixés à 1. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$.

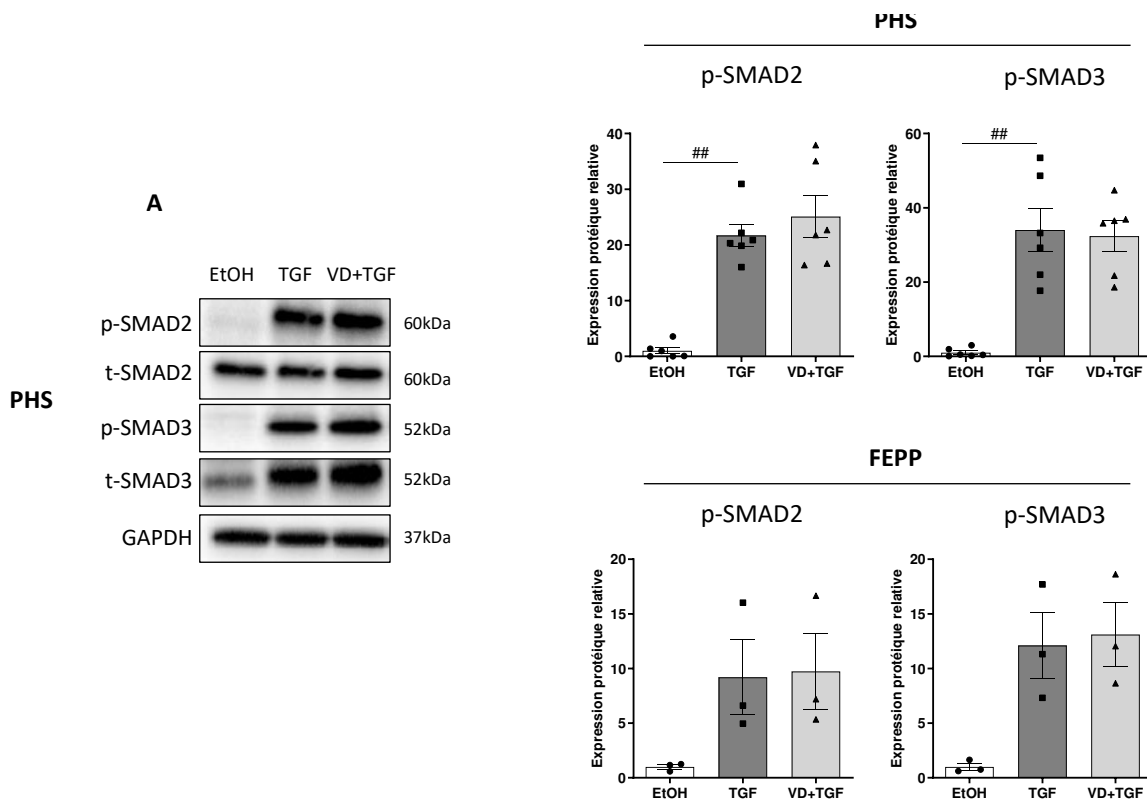


Figure 55 : La VD n'a pas d'effet sur la phosphorylation de SMAD chez les fibroblastes PHS et FEPP. Les cellules ont été traitées avec le véhicule (EtOH) ou 100 nM de vitamine D (VD) en l'absence ou en présence de 1 ng/mL de TGF- β 1 pendant 30 min. L'expression protéique de p-SMAD2 et p-SMAD3 a été quantifiée par densitométrie et normalisée à la GAPDH. Les niveaux d'expressions protéiques des cellules traitées à l'EtOH ont été arbitrairement fixés à 1. ## $p < 0,01$.

PARTIE IV : DISCUSSION ET CONCLUSION

Au cours de ce travail de thèse, nous avons étudié l'impact du métabolite actif de la vitamine D, la 1,25-dihydroxyvitamine D₃, sur la physiologie *in vitro* des fibroblastes pulmonaires humains isolés de patients atteints de FPI ou contrôles. Les fibroblastes jouent un rôle clé dans le développement de la FPI en étant les principaux responsables du remodelage tissulaire et de la rigidification des poumons. Nous avons démontré pour la première fois que la vitamine D inhibe la prolifération cellulaire et dans une moindre mesure la différenciation de fibroblastes isolés de patients atteints de FPI, de FEPP et de PHS. Nous avons également mis en évidence un effet protecteur de la vitamine D sur l'altération métabolique des fibroblastes isolés de patients FPI, qui est un paramètre récemment identifié comme participant au développement de la maladie.

L'activité hormonale de la vitamine D passe par l'activation de son récepteur, le VDR, dont l'expression varie fortement selon les organes et les différents types cellulaires (Wang et al., 2012). Ainsi, nous avons d'abord confirmé que le VDR est exprimé dans les fibroblastes pulmonaires de patients FPI et dans les fibroblastes pulmonaires contrôles. Nous avons constaté que les fibroblastes FPI et contrôles expriment de manière similaire le VDR, ce qui suggère que la signalisation liée au VDR n'est pas altérée dans les fibroblastes pulmonaires de patients atteints de FPI. Ce résultat semble contradictoire avec une étude récente montrant que l'expression du VDR est négativement corrélée avec le développement de la fibrose hépatique chez les patients souffrant d'une infection chronique par le virus de l'hépatite B (K. Yang et al., 2022). Une autre étude a également montré que l'expression du VDR est diminuée dans les fibroblastes de peau de patients atteints de sclérodémie systémique ainsi que chez la souris exposée à la bléomycine (Zerr et al., 2015). Nous avons ensuite vérifié que le VDR est fonctionnel dans les fibroblastes pulmonaires. Il est bien connu que la cible génétique principale du VDR est le CYP24A1, une enzyme permettant l'oxydation et l'élimination de la vitamine D (Jones et al., 2012). L'induction de l'expression de ce gène est à l'origine d'un mécanisme de rétrocontrôle négatif de la concentration cytoplasmique en vitamine D. Dans notre étude, l'inhibition du VDR montre que son expression est nécessaire à l'induction du CYP24A1 en présence de vitamine D, ce qui suggère que le VDR est bien actif dans les fibroblastes pulmonaires humains.

Dans un second temps, nous avons montré que des doses croissantes de vitamine D inhibent fortement la prolifération basale et stimulée par le PDGF-BB. La prolifération des

fibroblastes est une fonction clé responsable de leur accumulation dans le parenchyme pulmonaire, et le PDGF-BB est l'une des chimiokines surexprimées dans les poumons des patients FPI qui stimule la prolifération au niveau des foyers fibroblastiques (King et al., 2011). De plus, il a été montré que l'inhibition pharmacologique du PDGFR supprime l'induction de la fibrose pulmonaire dans différents modèles murins, ce qui appuie le rôle du PDGF-BB dans le développement de la FPI (Aono et al., 2005; Kishi et al., 2018). Nos résultats montrent que la vitamine D à 100 nM inhibe de plus de 50 % la prolifération basale des fibroblastes FPI et contrôle, et bloque complètement l'effet du PDGF-BB en condition stimulée. Nous avons observé un effet similaire de la vitamine D sur la prolifération des fibroblastes isolés de PHS et de FEPP. Ces données sont en accord avec la littérature qui rapporte que la vitamine D est capable d'inhiber la prolifération de la lignée fibroblastique NIH/3T3 ainsi que de fibroblastes pulmonaires normaux (Ramirez et al., 2010). Cette dernière étude a montré que la vitamine D (1 μ M) inhibe l'expression de PCNA (proliferating cell nuclear antigen), une protéine nucléaire qui stimule l'activité de l'ADN polymérase (Strzalka and Ziemienowicz, 2011). Cependant, nous n'avons pas observé de variation de l'expression de l'ARNm de cette protéine à notre concentration maximale d'intérêt qui est de 100 nM, soit dix fois plus faible que celle utilisée par les auteurs. Cet écart de concentrations pourrait expliquer la différence d'effets observés sur PCNA. L'effet inhibiteur de la vitamine D sur la prolifération induite par le PDGF-BB n'avait pas encore été décrit dans la littérature, et nos résultats indiquent que la vitamine D n'interfère pas avec la voie de signalisation du PDGF-BB, puisqu'elle n'a pas empêché l'activation de son récepteur PDGFR ni de ses effecteurs principaux ERK et AKT qui contribuent à la croissance des fibroblastes pulmonaires (Sun et al., 2016).

L'effet inhibiteur de la prolifération est associé à une altération du cycle cellulaire. En effet, la vitamine D augmente la quantité de fibroblastes FPI arrêtés en phase G0/G1 tout en diminuant l'expression de nombreuses cyclines et CDK contrôlant la progression du cycle cellulaire. La vitamine D a notamment réduit l'expression de la cycline D1, connue pour favoriser la transition de la phase G0/G1 vers la phase de synthèse de l'ADN. Cette suppression globale de l'expression des cyclines et CDK contribue probablement à l'effet antiprolifératif de la vitamine D puisque plusieurs études ont montré que l'hormone inhibe également la prolifération de lignées cellulaires cancéreuses (sein, ovaire, thyroïde, prostate, leucémie) en arrêtant souvent le cycle cellulaire dans la phase G0/G1 et en réduisant l'expression de

certaines cyclines (cyclines D et E) et CDK (CDK4 et CDK2) (Bhoora and Punchoo, 2020; Gesmundo et al., 2020; Scaglione-Sewell et al., 2000). Puisque les CDK nécessitent une phosphorylation activatrice pour être fonctionnelles et activer leurs cyclines respectives (Malumbres, 2014), il serait intéressant d'étudier l'état de phosphorylation de toutes les CDK régulées à la baisse par la vitamine D en présence de PDGF-BB. Cette donnée permettrait de savoir si ce sont seulement les CDK impliquées dans le passage de la phase G0/G1 à la phase S qui sont moins actives à la suite d'un traitement à la vitamine D.

Puisque la voie de signalisation du PDGF-BB n'est pas impactée par la vitamine D, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'elle inhibe la croissance cellulaire en réduisant directement l'expression des gènes du cycle cellulaire par un mécanisme dépendant du VDR. Cette hypothèse est appuyée par le fait que la délétion génétique de son récepteur bloque les effets de la vitamine D. Des recherches supplémentaires sont toutefois nécessaires pour déterminer si la vitamine D peut stimuler la liaison du VDR sur des éléments de réponses spécifiques contrôlant l'expression des cyclines/CDK. Pour ce faire, nous pourrions étudier la région promotrice des cyclines/CDK d'intérêt via l'utilisation de la technique du gène rapporteur (β -galactosidase, β -glucuronidase ou luciférase), en présence ou non de vitamine D. Outre la fixation du VDR à ses éléments de réponses, il a également été rapporté que la vitamine D est capable de stimuler la transcription de p27kip1, un inhibiteur de la cycline D1, alors que sa région promotrice ne possède pas d'élément de réponse au VDR (Inoue et al., 1999). Cette étude a montré que la vitamine D induit l'expression de p27kip1 en augmentant l'activité transcriptionnelle d'autres facteurs de transcription : Sp1 (specificity protein 1) et NF-Y (Nuclear transcription factor Y) qui eux possèdent bien des éléments de réponse sur la région promotrice de p27kip1. Une autre étude a montré par immunoprécipitation que le VDR actif interagit avec Sp1 pour permettre son activité et sa fixation sur la région promotrice de p27kip1 (Huang et al., 2004). Ainsi, la vitamine D pourrait contrôler l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire même s'ils ne possèdent pas d'éléments de réponse au VDR.

Nous avons ensuite étudié les effets de la vitamine D sur la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. Cette différenciation est induite par le TGF- β 1 et est essentielle au développement de la FPI puisque les myofibroblastes participent à la sécrétion de MEC (expression de collagène et de fibronectine) ainsi qu'à la rigidification pulmonaire (expression de α -SMA) (D'Urso and Kurniawan, 2020). Plusieurs études ont rapporté que la vitamine D est

capable d'inhiber cette différenciation dans des modèles murins de fibrose pulmonaire ainsi que sur des fibroblastes primaires humains (Lee et al., 2017; Ramirez et al., 2010; Zhu et al., 2021). De manière surprenante, nos résultats montrent que la vitamine D n'agit que très partiellement sur la différenciation induite par le TGF- β 1 chez les fibroblastes pulmonaires, qu'ils soient contrôles ou issus de patients atteints de FPI, de PHS ou de FEPP. En effet, la vitamine D à 100 nM diminue très faiblement l'expression de l'ARNm du collagène 4A2 ainsi que l'expression protéique et de l'ARNm de α -SMA dans les fibroblastes FPI, sans avoir d'effet sur les autres marqueurs de la différenciation tels que la fibronectine ou le collagène 1. Nous avons observé encore moins d'effet de la vitamine D sur la différenciation des fibroblastes pulmonaires isolés de patients atteints de FEPP ou de PHS, peut-être à cause d'un nombre trop faible d'expériences (N = 3 FEPP et N = 7 PHS). Ces observations sont inattendues car la vitamine D bloque l'expression des principaux gènes pro-fibrosants tels que *ACTA2*, *COL1A1*, *COL1A2* et *FN1* induits par le TGF- β 1 dans divers modèles murins et diverses lignées cellulaires (Lee et al., 2017; Meredith et al., 2015; Tzilas et al., 2019; Zerr et al., 2015; Zhu et al., 2021). Ces résultats discordants sont probablement dus à l'incapacité de la vitamine D à inhiber la signalisation TGF- β 1/SMAD dans les fibroblastes pulmonaires humains. De manière générale, pour stimuler la différenciation des fibroblastes, le TGF- β 1 active les facteurs de transcription SMAD2 et SMAD3. La translocation nucléaire de ces protéines SMAD puis leur liaison à leurs éléments de réponse stimule l'expression des gènes pro-fibrosants dont le collagène, l'actine et la fibronectine font partis (Schiller et al., 2004). Or, il a été rapporté que le VDR activé par la vitamine D peut interagir physiquement avec les protéines SMAD2/3 et ainsi bloquer leur liaison aux régions promotrices de divers gènes dans les fibroblastes stimulés par le TGF- β 1 (Xu et al., 2020; Zerr et al., 2015). Au regard de l'effet très faible de la vitamine D observé sur la différenciation des fibroblastes pulmonaires humains, nous n'avons pas cherché à savoir si l'hormone était capable de bloquer la translocation nucléaire ou la liaison de SMAD2/3 activés sur leurs éléments de réponse. Cependant, nos résultats montrent que la vitamine D a un effet très limité sur la phosphorylation des deux protéines SMAD dans les fibroblastes FPI et contrôles, avec une légère diminution de l'activation de la protéine SMAD2. Nous n'avons pas observé d'effet de la vitamine D sur cette voie dans les fibroblastes isolés de PHS ou de FEPP. Il est donc peu probable que la vitamine D induise la liaison du VDR aux protéines SMAD, et ce résultat pourrait expliquer pourquoi la vitamine D n'a pas pu empêcher activement la différenciation des myofibroblastes. Nous pouvons tout de même émettre l'hypothèse que des

concentrations supérieures à 100 nM de vitamine D pourraient bloquer la signalisation du TGF- β 1 dans notre modèle. Néanmoins, il est important de noter que des concentrations plasmatiques de l'ordre du μ M de vitamine D ne seraient pas atteignables chez l'homme, même en cas de supplémentation, puisque les concentrations physiologiques de 25(OH)-vitamine D s'étendent classiquement entre 50 et 100 nM (Ceglia et al., 2011).

Malgré le fait que la vitamine D ait peu d'effet direct sur la différenciation des fibroblastes pulmonaires, nous avons démontré que l'hormone module fortement l'altération glycolytique induite par le TGF- β 1. La littérature rapporte qu'un micro-environnement cellulaire acide causé par la glycolyse est capable de libérer le TGF- β latent stocké dans la MEC (Annes et al., 2003; Lyons et al., 1988; Wipff et al., 2007). Nos résultats montrent que la vitamine D bloque l'induction de la glycolyse aérobie dans les fibroblastes FPI et contrôles, et ce probablement par le biais d'une signalisation dépendante du VDR. Chez les patients FPI, la stimulation de la glycolyse aérobie a été identifiée dans plusieurs types de cellules pulmonaires comprenant les cellules épithéliales alvéolaires, les macrophages et les fibroblastes (Zank et al., 2018). Cette reprogrammation métabolique est de plus en plus décrite comme un mécanisme essentiel favorisant le développement de la FPI (Bueno et al., 2020). Une étude récente a d'ailleurs proposé un nouvel outil pronostic des patients FPI basé sur l'analyse de l'expression de certains gènes associés à la glycolyse (Li et al., 2023). De plus, *in vitro*, les inhibiteurs de la 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase, qui empêchent la reprogrammation métabolique induite par le TGF- β 1, réduisent les effets profibrotiques du TGF- β 1 (Chen et al., 2021; Xie et al., 2015). L'inhibition *in vivo* de la glycolyse atténue également la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (Chen et al., 2021; Xie et al., 2015) et l'induction de la glycolyse semble favoriser la différenciation des myofibroblastes en stimulant l'expression de α -SMA (Xie et al., 2015). Nos résultats concordent avec ce mécanisme, bien que nous ayons constaté que la vitamine D ne diminue que légèrement l'expression de α -SMA dans les fibroblastes stimulés par le TGF- β 1. D'un autre côté, la glycolyse conduit à la production d'acide lactique via la lactate déshydrogénase qui réduit le pyruvate en lactates. Plusieurs études ont rapporté que la concentration de lactate est élevée dans le parenchyme pulmonaire ainsi que dans les lavages broncho-alvéolaires des patients atteints de FPI (Kottmann et al., 2012; Worlitzsch et al., 2013). La sécrétion d'acide lactique favorise une diminution du pH extracellulaire avec pour conséquence une augmentation de l'activation du TGF- β latent

(Kottmann et al., 2012). De manière intéressante, nos résultats démontrent que la vitamine D réduit l'expression de la LDH, l'activité de la LDH et la production d'acide lactique en plus d'inhiber l'expression d'autres enzymes de la glycolyse. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la vitamine D pourrait limiter la formation de TGF- β actif en réduisant l'acidification extracellulaire due à la sécrétion d'acide lactique. Des expériences supplémentaires sont toutefois nécessaires pour déterminer si la vitamine D peut réduire l'acidification du microenvironnement pulmonaire et limiter la boucle d'auto-activation profibrotique liée à la glycolyse chez les patients atteints de FPI.

D'un point de vue clinique, nous avons montré que la population de patients FPI suivie au CHU de Rennes est proche de l'insuffisance en 25-OH Vitamine D avec une concentration sérique moyenne de 20,25 ng/mL. Cette valeur est cohérente avec les données de la cohorte Grecque de 93 patients FPI qui présentait un taux sérique moyen de 18,76 ng/mL (Tzilas et al., 2019). Cette faible concentration est certainement liée à l'âge des patients mais pourrait indirectement participer au développement de la FPI en limitant ses effets protecteurs que nous avons démontré. De plus, la littérature rapporte qu'une déficience en vitamine D aggrave la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris (Li et al., 2019). Cette même étude n'a pas montré d'effet basal d'une déficience en vitamine D sur les poumons des souris. Cependant, une autre équipe a rapporté qu'une déficience alimentaire chronique en vitamine D chez des souris saines est suffisante pour induire une fibrose pulmonaire chez les individus F1 de leur descendance. Cette fibrose s'accompagne d'une surexpression pulmonaire de TGF- β 1 et de α -SMA (Shi et al., 2017). Ensemble, ces données suggèrent que la carence en vitamine D et l'état alimentaire des patients atteints de FPI pourraient être pris en compte dans leur suivi médical.

Ce travail étant focalisé uniquement sur le phénotype des fibroblastes pulmonaires humains, il serait intéressant d'étudier les effets de la vitamine D sur la fonction des autres acteurs cellulaires impliqués dans le développement de la FPI comme les CEAll et les cellules immunitaires. Il a d'ailleurs déjà été montré que la vitamine D diminue *in vitro* la TEM induite par le TGF- β 1 dans la lignée de cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B (Fischer and Agrawal, 2014). De plus, dans des cellules de cancer du sein (lignée MCF-7), il a été rapporté qu'un analogue de la vitamine D diminue l'expression du facteur de transcription Snail impliqué dans la TEM (Chiang et al., 2014) qui est également impliqué dans la TEM des CEAll traitées au TGF-

β 1 (Qian et al., 2020). La vitamine D ou ses analogues inhibent aussi l'expression des facteurs de transcription ZEB1 et TWIST1 impliqués dans la TEM des cellules cancéreuses (Chiang et al., 2014; Upadhyay et al., 2013), et ces deux facteurs de transcriptions joueraient un rôle dans la fibrose pulmonaire (Chilosi et al., 2017; Pozharskaya et al., 2009; Valenzi et al., 2023). Il serait donc intéressant de d'étudier les effets protecteurs de la vitamine D sur la TEM des CEAll provenant de patients atteints de FPI. L'effet anti-inflammatoire de la vitamine D sur les cellules immunitaires est bien connu et, dans le contexte de la FPI, ses effets sur l'immunité pourraient être étudiés directement sur les cellules issues du lavage broncho-alvéolaire des patients, puisque ces derniers contiennent des macrophages et lymphocytes alvéolaires du micro-environnement fibrotique pulmonaire.

Enfin, dans une perspective de supplémentation des patients FPI en parallèle de la prise en charge thérapeutique conventionnelle, il serait intéressant de savoir si la vitamine D peut avoir des effets additionnels ou agir en synergie avec le nintedanib et la pirfénidone *in vitro* sur notre modèle cellulaire mais aussi *in vivo*. Cette étude pourrait être menée sur un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, via l'étude histologique de la structure pulmonaire et l'étude de l'expression des marqueurs de la fibrose. L'effet de la vitamine D sur les paramètres respiratoires et la survie des patients atteints de FPI pourrait aussi être testé cliniquement. Pour cela, il serait intéressant de mettre en place un protocole de supplémentation en vitamine D versus placebo qui pourrait débuter en même temps que la prise en charge des patients par le nintedanib ou la pirfénidone. Aussi, le contrôle des taux de vitamine D dans le sérum des patients suivis devra être régulier pour ne pas induire de bais expérimentaux liés à une auto-supplémentation.

En conclusion, mes travaux de thèse ont permis de démontrer que la vitamine D est capable de prévenir certains paramètres pro-fibrosants de fibroblastes pulmonaires humains ainsi que leur reprogrammation métabolique. Compte tenu de ces résultats et de la capacité de la vitamine D à prévenir la fibrose pulmonaire *in vivo* dans des modèles expérimentaux, il pourrait être intéressant de déterminer si une supplémentation en vitamine D peut contribuer à limiter le déclin des fonctions respiratoires chez les patients atteints de FPI déjà pris en charge au plan thérapeutique.

ARTICLES

The Journal of Nutritional Biochemistry

Antifibrotic effects of vitamin D3 on human lung fibroblasts derived from patients with idiopathic pulmonary fibrosis

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JNB-D-23-00760
Article Type:	Research Paper
Keywords:	Vitamin D, idiopathic pulmonary fibrosis, pulmonary fibroblasts, proliferation, differentiation, metabolism
Corresponding Author:	Laurent Vernhet University of Rennes FRANCE
First Author:	Tom Voisin
Order of Authors:	Tom Voisin Audrey Joannes Claudie Morzadec Dominique Lagadic-Gossmann Cécile Le Naoures Bertrand Richard De Latour Simon Rouze Stéphane Jouneau Laurent Vernhet
Abstract:	<p>Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive and fatal interstitial lung disease. Up to now, no treatment can stop the progression of IPF. Vitamin D3 (VD) reduces experimental lung fibrosis in murine models and depletion of vitamin D3 might be associated with the reduced survival of patients with IPF. In this context, we determined if VD can prevent the pro-fibrotic functions of human lung fibroblasts (HLFs) isolated from patients with IPF. IPF and control HLFs were derived from surgical lung biopsies collected from patients with IPF or with primary lung cancer, respectively. VD (3-100 nM) markedly reduced the basal and PDGF-induced proliferation of HLFs. VD also altered cell cycle by increasing the percentage of IPF HLFs arrested in the G0/G1 phase, and by downregulating the expression of various cell cycle regulatory proteins. In addition, VD barely prevented the TGF-β1-induced differentiation in HLFs. At 100 nM, VD slightly reduced the expression of the pro-fibrotic marker α-smooth muscle actin, and had no effect on fibronectin and collagen-1 expression. In contrast, 100 nM VD strongly inhibited the aerobic glycolytic metabolism induced by TGF- β1. Finally, VD reduced both the secretion of lactate, the levels of lactate deshydrogenase mRNA and the activity of intracellular LDH in IPF HLFs. Our study shows that low VD concentrations reduce pro-fibrotic functions of HLFs. These findings suggest that it might be interesting to assess the potential clinical benefits of vitamin D supplementation in patients with IPF, especially on lung function decline.</p>
Suggested Reviewers:	Margherita Cantorna mxc69@psu.edu Editor who worked on vitamin D Patrizia Riso patrizia.riso@unimi.it Editor who worked on vitamin D Carolyn Slupsky cslupsky@ucdavis.edu Editor who worked on vitamin D Michael B. Zemel

	michaelzemel@kinexum.com Editor who worked on vitamin D
	Ling Zhao lzhao7@utk.edu Editor who worked on vitamin D

Research Institute for Environmental and Occupational Health (IRSET) – INSERM-UMR_S 1085,
Univ Rennes, F-35000 Rennes, France

Pr L. Vernhet, PharmD, PhD
laurent.vernhet@univ-rennes.fr

Rennes, July 7, 2023

Editor-in-Chief
The Journal of Nutritional Biochemistry

Dear Editor,

Please find enclosed the manuscript entitled “Antifibrotic effects of vitamin D3 on human lung fibroblasts derived from patients with idiopathic fibrosis” by Voisin et al, for consideration by *The Journal of Nutritional Biochemistry* as a research paper.

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic and irreversible lung disease characterized by a progressive decline of pulmonary functions. The current therapeutic approach slows down but does not stop the progression of the disease. Recently, Vitamin D (VD) has been demonstrated to reduce the development of lung fibrosis in murine models and VD deficiency has been associated with the decline of lung functions and acute exacerbations in patients with IPF. In this manuscript, we demonstrated for the first time that, *in vitro*, VD counteracts fundamental fibrosing functions of primary human lung fibroblasts (HLFs) derived from patients with IPF. At nanomolar concentrations, VD blocked the PDGF-BB-induced proliferation and partially diminishes the TGF- β 1-induced differentiation. Moreover, VD strongly inhibited the glycolytic switch induced by TGF- β 1. Recent studies suggest that glycolytic reprogramming of fibroblasts can participate to the progression of IPF and targeting this pathway may be effective in treating fibrotic disorders.

Altogether, our findings demonstrate that low VD concentrations reduced, *in vitro*, pro-fibrotic functions of HLFs, and suggest that the VD supplementation in patients with IPF may be studied in the future to determine its therapeutic benefit for the management of human lung fibrosis.

This paper has been approved by all authors and is not being considered elsewhere.

Sincerely,

Laurent Vernhet

- Vitamin D suppresses the proliferation of primary IPF lung fibroblasts
- Vitamin D suppress the expression of various cyclins and CDK in primary IPF lung fibroblasts
- Vitamin D blocks the glycolytic switch of primary IPF lung fibroblasts

Antifibrotic effects of vitamin D3 on human lung fibroblasts derived from patients with idiopathic pulmonary fibrosis

Tom Voisin¹, Audrey Joannes¹, Claudie Morzadec¹, Dominique Lagadic-Gossmann¹, Cécile Le Naoures², Bertrand Richard De Latour³, Simon Rouze³, Stéphane Jouneau^{1,4} and Laurent Vernhet¹

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

²Department of pathology and cytology, Rennes University Hospital, France;

³Department of Thoracic, cardiac and vascular surgery, Rennes University Hospital, France;

⁴Department of Respiratory Diseases, Competence Center for Rare Pulmonary Diseases, Rennes University Hospital, France

Corresponding author: Laurent Vernhet (laurent.vernhet@univ-rennes.fr). Univ Rennes, CHU Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR_S 1085, France

List of abbreviations: IPF, Idiopathic pulmonary fibrosis; VD, 1,25-dihydroxyvitamin D3; VDR, vitamin D receptor; HLFs, human lung fibroblasts; PDGF, platelet-derived growth factor; TGF- β , transforming growth factor- β ; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; EtOH, ethanol; α -SMA, α -smooth muscle actin; OCR, oxygen consumption rate; ECAR, the extracellular acidification rate; FCCP, carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone; LDH, lactate deshydrogenase.

Abstract

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive and fatal interstitial lung disease. Up to now, no treatment can stop the progression of IPF. Vitamin D3 (VD) reduces experimental lung fibrosis in murine models and depletion of vitamin D3 might be associated with the reduced survival of patients with IPF. In this context, we determined if VD can prevent the pro-fibrotic functions of human lung fibroblasts (HLFs) isolated from patients with IPF. IPF and control HLFs were derived from surgical lung biopsies collected from patients with IPF or with primary lung cancer, respectively. VD (3-100 nM) markedly reduced the basal and PDGF-induced proliferation of HLFs. VD also altered cell cycle by increasing the percentage of IPF HLFs arrested in the G0/G1 phase, and by downregulating the expression of various cell cycle regulatory proteins. In addition, VD barely prevented the TGF- β 1-induced differentiation in HLFs. At 100 nM, VD slightly reduced the expression of the pro-fibrotic marker α -smooth muscle actin, and had no effect on fibronectin and collagen-1 expression. In contrast, 100 nM VD strongly inhibited the aerobic glycolytic metabolism induced by TGF- β 1. Finally, VD reduced both the secretion of lactate, the levels of lactate dehydrogenase mRNA and the activity of intracellular LDH in IPF HLFs. Our study shows that low VD concentrations reduce pro-fibrotic functions of HLFs. These findings suggest that it might be interesting to assess the potential clinical benefits of vitamin D supplementation in patients with IPF, especially on lung function decline.

Keywords: Idiopathic pulmonary fibrosis, vitamin D, pulmonary fibroblasts, proliferation, differentiation, metabolism

1. Introduction

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic and irreversible interstitial lung disease with an average life expectancy of 3-5 years after diagnosis [1]. An aberrant process of chronic healing, that stiffens the lungs and definitively reduces the airflow exchanges at pulmonary alveoli, defines IPF. The migration and proliferation of lung fibroblasts and then their differentiation into myofibroblasts constitute the central pathophysiological mechanisms that control the development of this disease [2]. Profibrotic factors like platelet-derived growth factor (PDGF) and transforming growth factor (TGF)- β , that are produced by epithelial and immune cells, orchestrate this process [3,4]. PDGF induces the migration and proliferation of fibroblasts [5] while TGF triggers the differentiation and the metabolic shift to aerobic glycolysis in myofibroblasts [6]. This glycolytic reprogramming contributes to the development of pulmonary fibrosis notably by increasing the secretion of lactic acid, a potent activator of latent TGF- β [6,7].

Nowadays, nintedanib and pirfenidone are the only drugs approved for treating IPF [8]. These antifibrotic drugs slow down but do not stop the progression of the disease [9,10]. Vitamin D3 is a fat-soluble pro-hormone that is metabolized by the kidneys and liver to produce 1,25-dihydroxyvitamin D3 (VD), its active metabolite [11]. VD is well-known to regulate mineralization and calcium homeostasis in bones and muscles by activating the vitamin D receptor (VDR), a ligand-dependent transcription factor [11]. In addition, VD could interfere with the fibrotic process in various organs. It decreases *in vitro* the differentiation of human dermal, corneal, cardiac and nasal polyp-derived fibroblasts induced by TGF- β [12–15]. It also limits the proliferation of primary murine lung fibroblasts [16]. In murine and rat models, VD attenuates renal fibrosis and bleomycin-induced lung fibrosis notably by decreasing the extracellular matrix production and deposition [17–19]. Conversely, vitamin D deficiency promotes lung fibrosis and especially exacerbates bleomycin-induced pulmonary fibrosis

[14,20]. Finally, recent clinical studies have shown that many patients with IPF have low serum vitamin D concentrations and that vitamin D deficiency may constitute a negative prognostic factor in IPF [20–22].

Altogether, these results suggest that vitamin D can interfere with the development of pulmonary fibrosis in humans. However, the ability of VD to inhibit the profibrotic functions of human lung fibroblasts (HLFs) still remains unknown. In this context, the present study was thus designed to determine whether VD could prevent the proliferation, migration and differentiation of HLFs isolated from patients with IPF.

2. Materials and Methods

2.1. Isolation of HLFs

HLFs derived from surgical lung biopsies isolated from patients with IPF (median age 68 years; range 51-77 years) [23]. IPF was diagnosed according to the 2022 ATS/ERS/JRS/ALAT criteria, including histopathological features of usual interstitial pneumonia [24]. Control HLFs derived from lung samples isolated from patients with cancer undergoing lobectomy or pneumonectomy, away from the tumor (median age 64.5 years; range 59-74 years). The absence of tumor tissue in control samples was verified histologically. Cell morphology was checked by phase contrast microscopy. This study was approved by the local ethics committee (Ethics Committee CHU Rennes, n° 16123). Written informed consent was obtained from all subjects. All experiments were performed following relevant guidelines and regulations.

2.2. Cell culture and treatments

IPF and control HLFs were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco™, Life Technologies, Courtaboeuf, France) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Eurobio scientific, Evry, France), L-glutamine, antibiotic-antimycotic solution (Gibco™, Life Technologies), and used at passages 5 and 6. Cells were cultured in the absence or presence of VD (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). VD was first dissolved in ethanol (EtOH) to constitute a stock solution. EtOH was used as vehicle in each experiment. To study mRNA and protein expression, HLFs were seeded in 6-well plates for 24 h and then starved in FCS-free DMEM for 16 h. To induce the differentiation of myofibroblasts, serum-starved HLFs were first cultured in the absence or presence of 3-100 nM VD for 1 h and then stimulated with TGF-β1 (1 ng/ml, Preprotech, Neuilly-sur-Seine, France) for 24 h. The HLFs used for cell growth and cell cycle studies were serum-starved for 16 h, cultured in DMEM containing 1 % FCS with 3-100 nM VD for 1 h, and stimulated with PDGF-BB (50 ng/ml) (R&D Systems, Bio-Techne, Lille, France) for a further 96 h.

2.3. Proliferation

Incucyte® live-cell analysis system (Essen BioScience, Sartorius, USA) was used to determine cell proliferation in a stable culture environment (37°C and 5% CO₂). The fluorescent dye NRR® (Nuclight Rapid Red Dye® diluted at 1/1000) specifically marked the nucleus of living HLFs. The number of HLFs was determined using the Incucyte® analysis software by creating a specific counting mask that identified and delimited the nuclei at each acquisition. The acquisition was performed every 8 hours for 96 hours using Incucyte® microscope, objective X4. Each point was performed in triplicate. The proliferation index was calculated relatively to the number of cells measured at 8 h and arbitrarily set at 1.

2.4. Cell cycle analysis

To analyse the cell cycle distribution, HLFs were fixed in ice-cold 70 % (v/v) ethanol for 30 min at 4°C and then collected by centrifugation (900g/5 min). The cell pellets were washed, suspended in PBS (pH 7.4) containing propidium iodide (50 µg/mL) and DNase-free RNase A (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France), and incubated at 4°C for 1 h. DNA content was quantified by flow cytometry using a LRSFortessa™X20 flow cytometer (BD Biosciences, Paris, France). Data were analysed with the flow cytometry data analysis software FlowLogic (Miltenyi Biotech, Paris, France) using the Watson improved method.

2.5. Genetic invalidation by siRNA transfection

HLFs were transfected in optiMEM medium (Gibco, Waltham, USA) for 6 h with 25 nM VDR siRNA (J-003448-07-0005, ONTARGETplus siRNA Human VDR (7421) 5 nmol; Dharmacon, Horizon discovery) or 25 nM non-targeting control siRNA (ONTARGETplus Non-targeting Pool, 5 nmol; Dharmacon, Horizon discovery). Then, cells were washed and cultured in antibiotic-free DMEM 1X Glutamax for 18 h before the study of cell proliferation and metabolism. siRNA efficacy was verified by western-blotting.

2.6. Western blot analysis

To analyse protein expression, cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Sigma-Aldrich) and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) in ice-cold RIPA buffer were used to lyse HLFs. Proteins separation was performed by electrophoresis on polyacrylamide gels containing 10 % Tris-glycine SDS and transferred to nitrocellulose membranes, as previously described [25]. Free binding sites were blocked by incubation in 5 % milk or bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) for 2 h at room temperature. The appropriate primary human antibody (Ab) was then added to the membranes overnight at 4°C. The primary Abs were anti- α SMA (clone 1A4, Sigma-Aldrich), anti-collagen I (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL), anti-fibronectin (Abcam), anti-GAPDH (mab90009-P, Covalab, Bron, France) Abs. Anti-phospho SMAD2 (3104), anti-SMAD2 (12584), anti-phospho SMAD3 (9520), anti-SMAD3 (9523), anti-phospho PDGF receptor (PDGFR) (3161), anti-PDGFR (3169), anti-CDK2 (2546), anti-CDK4 (12790), anti-CDK1 (9112S) and anti-Cyclin D1 (55506) Abs were from Cell Signaling Technology (Massachusetts, USA). Anti-Cyclin E (sc-56311), anti-Cyclin A (sc-751) and anti-Cyclin B1 (sc-245) Abs were from Santa Cruz Biotechnology, USA. A gel imaging system (Chemi doc, BIO-RAD Laboratories, Marnes-La-Coquette, France) equipped with a CCD camera was used to acquire digital images. Western blots were quantified using the Image Lab™ software (BIO-RAD) by densitometry and normalized to GAPDH. The relative protein expression in stimulated cells was determined by arbitrarily setting at 1 the protein expression measured in untreated cells cultured in the presence of vehicle (EtOH).

2.7. RNA isolation and RT-PCR assays

The extraction kit from Macherey Nagel (Hoerd, France) was used to extract total RNAs according to the manufacturer's instructions. NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Saint-Herblain, France) was used to quantify RNA concentrations by spectrofluorimetry. mRNAs

were reverse transcribed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Quantitative PCR (polymerase chain reaction) was performed using the SYBR Green methodology on a CFX384 Real-Time PCR System (Bio-Rad Laboratories) in duplicates. All the primers were provided by Sigma-Aldrich (KiCqStart™ SYBR® Green Primers, St. Quentin Fallavier, France). The specificity of gene amplification was checked at the end of PCR using the comparative cycle threshold method (CFX Manager Software). The mean Cq values were used to normalize the target mRNA concentrations to those of the 18S ribosomal protein by the $2(-\Delta\Delta Cq)$ method. The mRNA levels were defined relatively to those measured in untreated cells and arbitrarily set at 1.

2.8. Mitochondrial respiration and glycolytic function

A Seahorse XFe24® Analyzer (Agilent Technologies) was used to determine the basal mitochondrial respiration and the basal glycolysis by directly measuring the oxygen consumption rate (OCR) and the extracellular acidification rate (ECAR) in IPF and control HLFs, respectively. Parameters of the mitochondrial respiration were determined using the Seahorse XF Cell Mito Stress kit, in both basal condition and after the injection of mitochondrial respiration inhibitors in the system. These inhibitors were oligomycin (inhibitor of ATP synthase), carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP, uncoupling agent that collapses the proton gradient and disrupts the mitochondrial membrane potential), antimycin A (complex III inhibitor) and rotenone (complex I inhibitor). The glycolytic function was determined using a Seahorse® XF Glycolysis Stress Test kit that assesses the basal extracellular acidification rate (ECAR) in the absence of glucose in culture media. The main parameters of the glycolytic flux, i.e glycolysis, glycolytic capacity and glycolytic reserve, were then determined after the injection of glucose, oligomycin (shifted the energy production to glycolysis) and 2-deoxy-glucose (an inhibitor of glycolysis through competitive binding to glucose hexokinase), respectively.

2.9. Lactate secretion

The secretion of lactate in culture supernatant was quantified on the Roche Cobas 8000 c502 analyser (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland). Lactate concentrations were determined using a spectrophotometric enzymatic-based method catalysed by a lactate oxidase-peroxydase reaction that produced a chromogen quinone-imine product at 552 nm. The intensity of the color formed was proportional to the lactate concentration present in the sample.

2.10. Lactate deshydrogenase activity

The activity of lactate deshydrogenase (LDH) present in cell lysate was measured using the LDH IFCC assay from Sigma-Aldrich (MAK066) in duplicates. LDH catalysed the conversion of lactate to pyruvate in the presence of NAD that is reduced to NADH during this process. The rate of NADH formation, directly proportional to the catalytic LDH activity, was determined by measuring the increase in absorbance at 340 nm.

2.11. Statistical analysis

All results are presented as means \pm standard errors of mean (SEM) of the indicated numbers of independent biological experiments. Each biological experiment was performed with different cell cultures deriving from different donors. Statistical analyses were performed with Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Significant differences were determined by the Student's *t*-test when two groups were compared, or by a repeated ANOVA followed by the Dunnett's Multiple comparison *t*-test to study the effects of increasing VD concentrations. #, * $p < 0.05$; ##, ** $p < 0.01$; ###, *** $p < 0.001$. #: *versus* PDGF-BB or TGF- β 1, *: *versus* VD.

3. Results

3.1.VDR was expressed and active in HLFs.

We first determined if VDR expression could be detected in control and IPF HLF. The Figure 1A shows that the VDR protein expression was present in all HLF culture tested. The mean VDR expressions were not significantly different in IPF and control HLFs (Fig. 1B). To verify the activity of VDR, we quantified mRNA levels of the CYP24A1 gene that is highly activated in response to the binding of VD to VDR. As expected, CYP24A1 mRNA levels were strongly induced in HLFs exposed to VD (Fig. 1C). This expression was almost totally inhibited when VDR protein expression was deleted by genetic invalidation. This result thus confirms that VDR was active in HLFs.

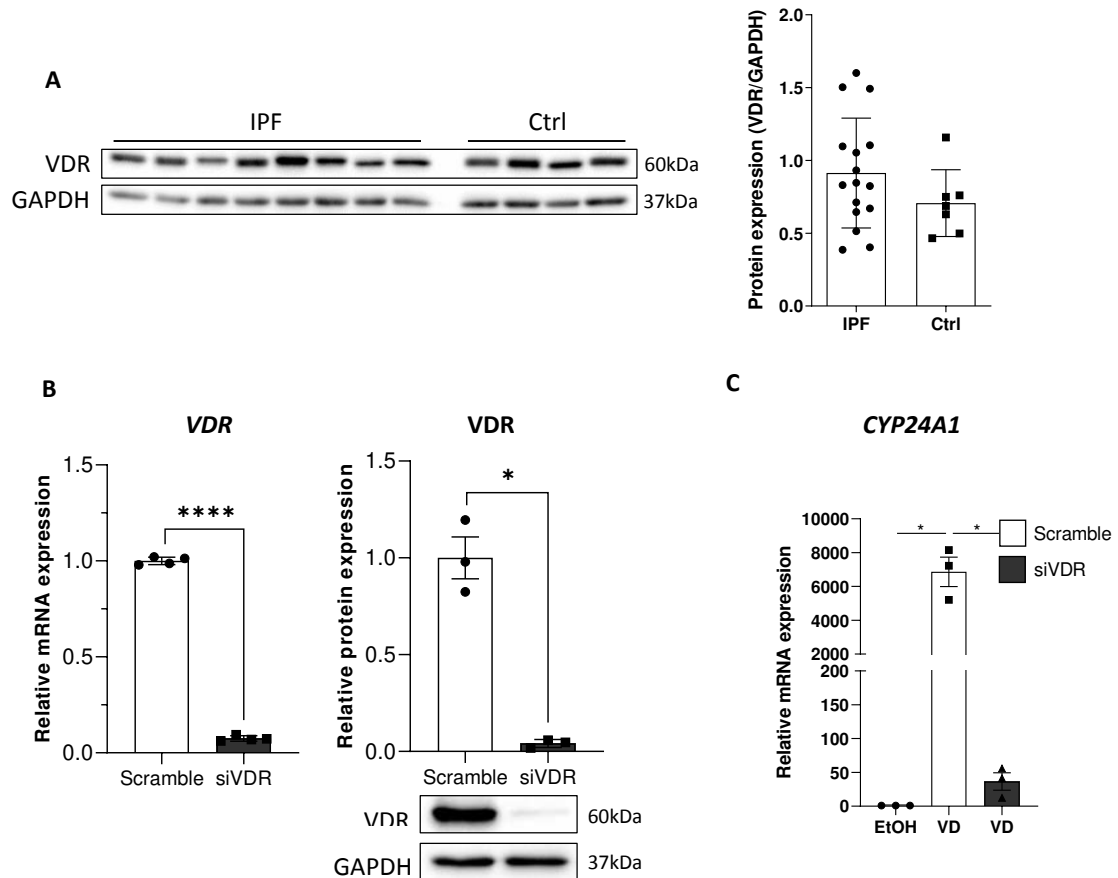


Figure 1. Vitamin D Receptor (VDR) was expressed and active in human HLFs. (A) Representative Western blot analysis of VDR expression in IPF and control (Ctrl) HLFs. Protein expression was quantified by densitometry and normalized to GAPDH protein expression. (B, C) IPF HLFs were transfected with control siRNA (scramble) or VDR-siRNA (siVDR) for 24 h (B), and then treated with vehicle (EtOH) or 100 nM VD for 24 h (C). Relative VDR mRNA (B) and CYP24A1 mRNA (C) levels were measured by quantitative RT-PCR and normalized to ribosomal 18S RNA. The mRNA levels measured in HLFs transfected with scramble (B) and treated with EtOH (C) were arbitrarily set at 1. VDR protein expressions in HLFs transfected with scramble or SiVDR were analysed by Western blot (B). Results are expressed as means \pm SEM of 3-16 independent experiments. Significant differences were determined by unpaired (A) or paired (B, C) t-tests.

3.2.VD inhibited basal and PDGF-BB-induced proliferation of HLFs.

Fibroblast proliferation is a major event contributing to the accumulation of fibroblastic foci in the pulmonary tissues of patients with IPF [26]. We thus determined if VD could prevent cell proliferation. IPF and control HLFs were cultured with VD, in the absence or presence of PDGF-BB for 96 h to determine its effects on basal and stimulated cell growth, respectively. VD significantly inhibited, in a concentration-dependent manner, the basal proliferation of both IPF and control HLFs (Fig. 2A). The inhibition was higher when cells were exposed to 100 nM VD. As expected, PDGF-BB significantly increased the proliferation of control and IPF HLFs (Fig. 2B). VD inhibited the PDGF-BB-induced proliferation with a dose-response similar to that reducing the basal proliferation. Finally, we assessed if VDR mediated the VD effects on cell proliferation. Figure 2C indicated that genetic invalidation of VDR expression blocked the ability of VD to reduce basal and PDGF-BB-induced proliferation of HLFs. Thus, VD likely prevented cell growth through a molecular VDR-dependent mechanism. PDGF-BB stimulates cell proliferation by its binding to the PDGFR and the subsequent activation of various signalling pathways involving the kinases ERK and AKT. Figure S1 shows that PDGF-BB strongly increased the phosphorylation of the PDGFR, ERK and AKT. However, VD could not prevent the activation of such a signalling.

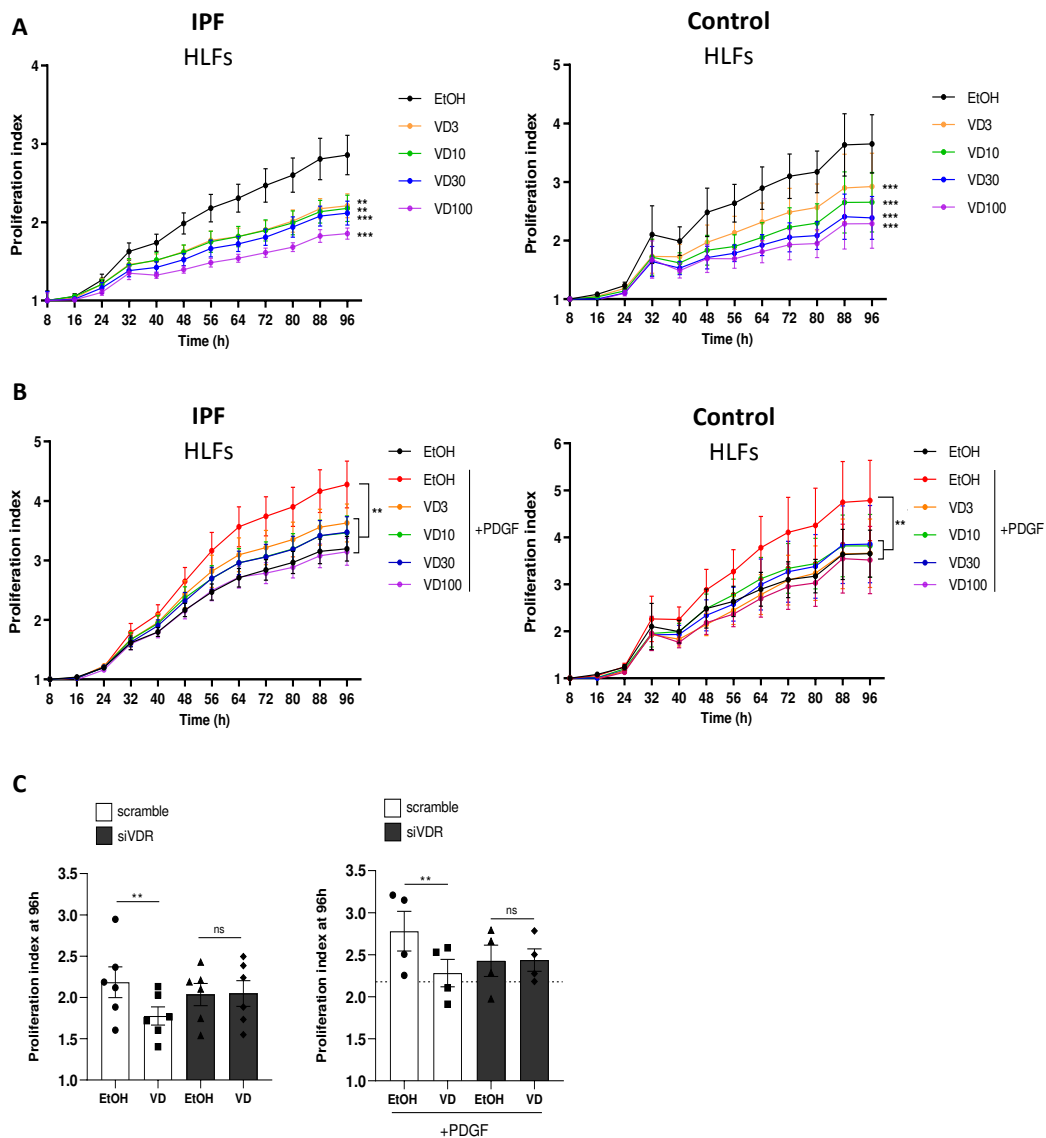


Figure 2. VD reduced the proliferation of HLFs in a VDR-dependent manner. (A, B) IPF and control HLFs were treated with vehicle (EtOH) or 3-100 nM VD in absence (A) or presence of 50 ng/mL PDGF-BB (B) for 96 h. (C) IPF HLFs were transfected with control siRNA (scramble) or VDR-siRNA (siVDR) for 24 h, and then treated with EtOH or 100 nM VD in the absence or presence of 50 ng/mL PDGF-BB for 96 h. The proliferation was determined by Incucyte® quantification of fluorescent stained cells with acquisition every 8 h. The proliferation index was calculated by arbitrarily setting the first cell number acquisition at 1. In the right panel (C), the dashed line represents the basal proliferation index for cells treated with EtOH in the absence of PDGF-BB. Results are expressed as means \pm SEM of 8 (A) and 6 (B,C) independent experiments. Significant differences were determined by a repeated ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons t-test (A, B) or by a paired t-test (C).

3.3.VD altered the cell cycle of IPF HLFs and inhibited the expression cyclin/cdk partners.

We then investigated the effects of VD on the cell cycle of basal and PDGF-BB-stimulated IPF HLFs. As shown in Figure 3A and 3B, a 48 h-treatment with 100 nM VD significantly increased the percentage of non-stimulated IPF HLFs arrested in G0/G1, while it numerically decreased the percentage of cells in the S and G2/M phases. Cell stimulation with PDGF-BB significantly decreased the percentage of cells in the G0/G1 phase and increased those of cells detected in the S and G2/M phases. As observed for basal IPF HLFs, VD specifically enhanced the percentage of PDGF-BB-activated cells arrested in the G0/G1 phase.

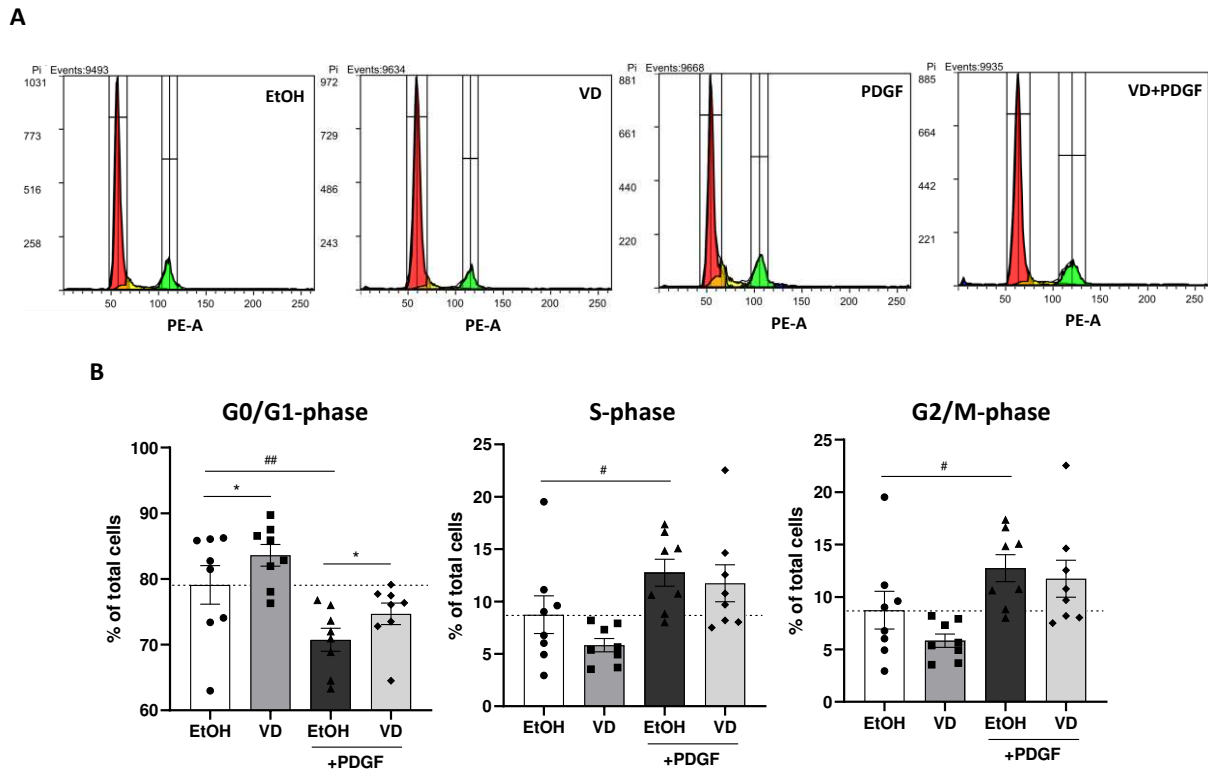


Figure 3. VD altered the cell cycle distribution in IPF HLFs. Cells were treated with vehicle (EtOH) or 100 nM VD for 1 h, and then left untreated or stimulated with 50 ng/mL PDGF-BB for 48 h. Cells were washed, fixed and stained with propidium iodide to analyse the cell cycle by flow cytometry. (A) Representative graphs saved during flow cytometry analysis. (B) Data for each cell cycle phase were expressed as percentages of total IPF HLFs. Results are expressed as means \pm SEM of 8 independent experiments. Significant differences were determined by paired t-tests.

To further specify the mechanism controlling the inhibition of cell proliferation, we next determined if VD could alter the expression of cell cycle regulatory proteins. Figure 4 shows that 100 nM VD significantly decreased the basal expression of cyclin D1 and cyclin A. In addition, it reduced the expression of cyclins A, B1, D1 and E induced by PDGF-BB in IPF HLFs. It also limited expression of the cyclin partners Cdk1, Cdk2 and Cdk4 in these activated cells (Figure 4B).

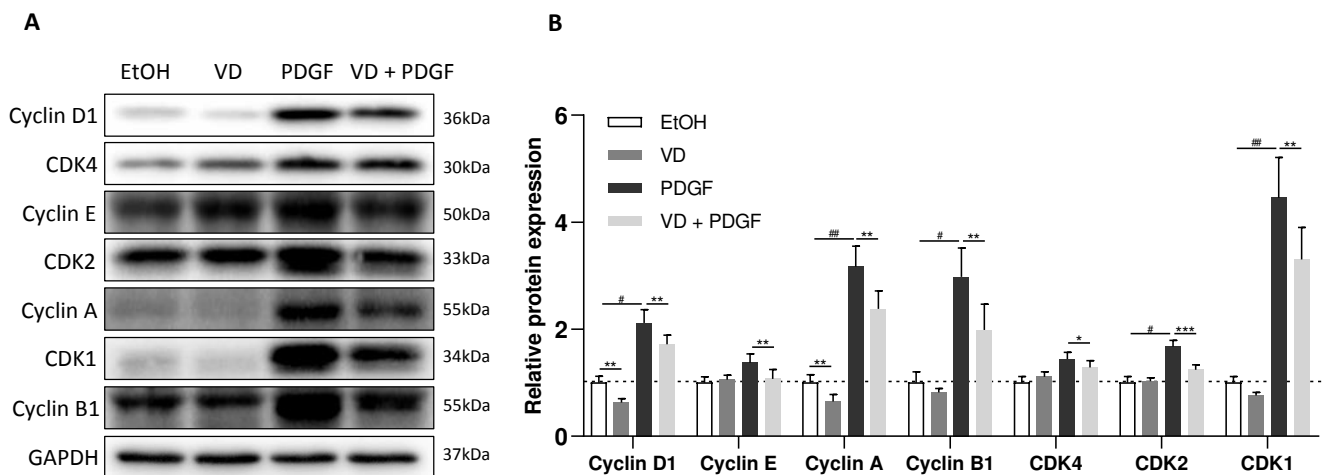


Figure 4. VD altered the protein expression of cyclins and cyclin-dependent kinases in IPF HLFs. Cells were treated with vehicle (EtOH) or 100 nM VD in the absence or presence of 50 ng/mL PDGF-BB for 48 h. (A) Representative Western blot showing the expression of cell cycle-related proteins in IPF HLFs. (B) Protein expression was quantified by densitometry and normalized to GAPDH. Basal protein expressions measured in cells treated with EtOH (dashed lines) were arbitrarily set at 1. Results are expressed as means \pm SEM of 8 independent experiments. Significant differences were determined by paired t-tests.

3.4. VD did not prevent the migration of HLFs induced by PDGF-BB.

Besides proliferation, the migration of HLFs also promotes the formation of pulmonary fibroblastic loci. As expected, PDGF-BB increased the migration of IPF HLFs stimulated for 24 h (Figure S2). However, co-treatment with 100 nM VD did not prevent this cell migration.

3.5.VD slightly reduced the TGF- β 1-induced differentiation of HLFs.

TGF- β plays a key role in the development of pulmonary fibrosis by inducing the differentiation of fibroblasts into myofibroblasts. These cells express major pro-fibrotic genes controlling the synthesis of contractile actin microfilaments containing α -SMA and the production of ECM such as fibronectin and collagen 1 [27]. In this next set of our experiments, we thus determined if VD could prevent the differentiation of pulmonary myofibroblasts by altering the mRNA and protein expression of various pro-fibrotic genes. Figures 5A-B show that VD did not modify the basal mRNA expression in IPF HLFs whatever the gene tested. In contrast, 100 nM VD slightly but significantly reduced the *ACTA2* mRNA level and the α -SMA protein expression in cells stimulated with TGF- β 1 for 24 h (Figures 5C-D). Similarly, 100 nM VD also slightly reduced the expression of the *ACTA2* gene at mRNA and protein levels in control HLFs (Figure S3). We next determined if VD could limit the *ACTA2* gene expression by interfering with the phosphorylation of SMAD2 and SMAD3, which mediate most TGF- β 1 effects. Figure 5E and S3C indicates that 100 nM VD did not significantly reduce the phosphorylation of SMAD2 and SMAD3 in IPF and control HLFs, respectively.

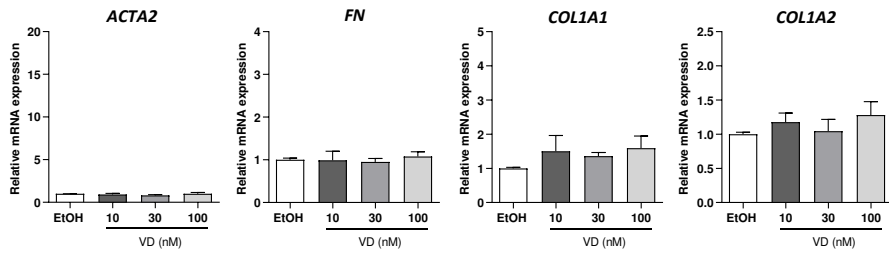
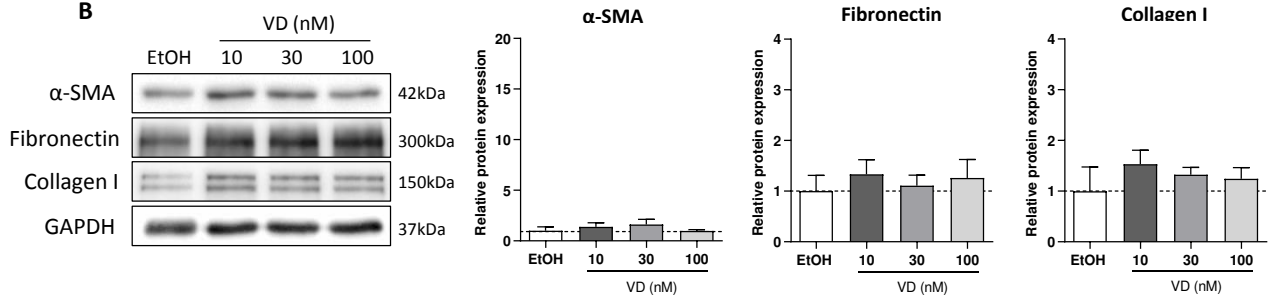
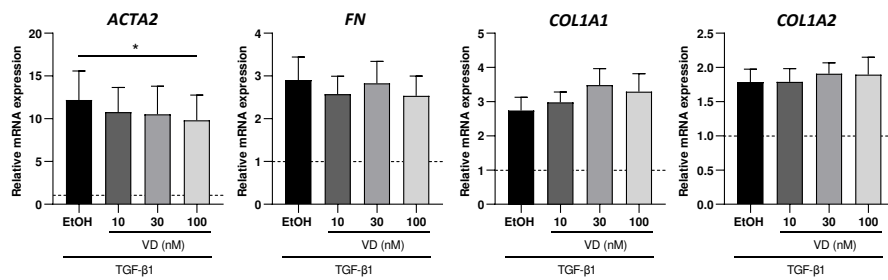
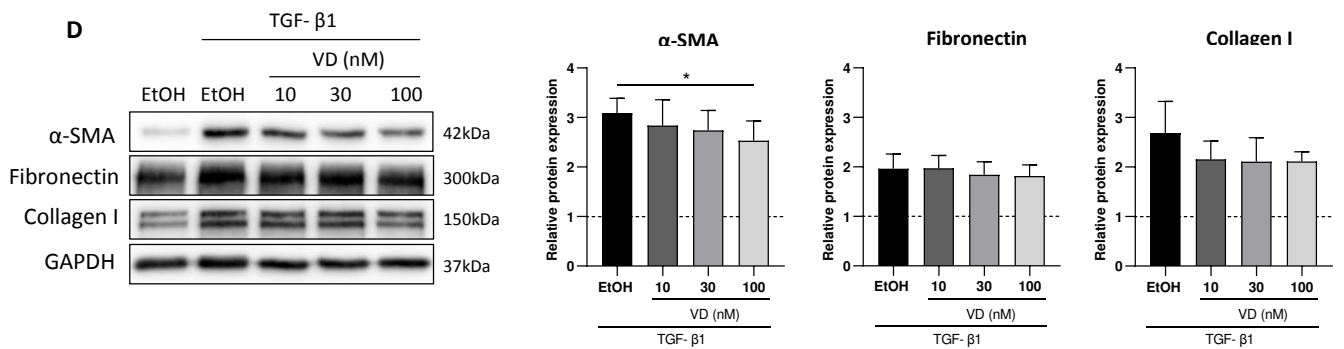
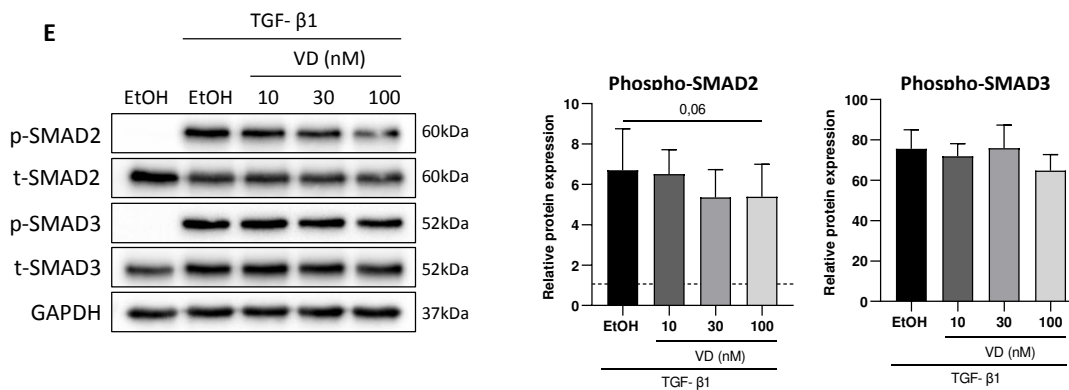
A**B****C****D****E**

Figure 5. VD reduced ACTA2 mRNA levels and α -SMA protein expression in IPF HLFs.

Cells were treated with vehicle (EtOH) or 100 nM VD in the absence (A, B) or presence (C-E) of 1 ng/mL TGF- β 1 for 24 h. (A, C) Relative *ACTA2*, *COL1A1*, *COL1A2* and *FNI* mRNA levels were measured by quantitative RT-PCR and normalized to ribosomal 18S RNA. The mRNA levels measured in cells treated with EtOH were arbitrarily set at 1. (B, D, E) Representative Western blot showing the expression of α -SMA, Fibronectin, collagen I and phospho-SMAD2/3 in IPF HLFs (left panels). Protein expressions were quantified by densitometry and normalized to GAPDH (bar plots). Basal protein expressions measured in cells treated with EtOH (dashed lines) were arbitrarily set at 1. Results are expressed as means \pm SEM of 4-6 independent experiments. Significant differences were determined by a repeated ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison t-tests.

3.6. VD inhibited the TGF- β 1-induced glycolytic metabolism in IPF HLFs.

Recently, glycolytic reprogramming has been associated with the differentiation of myofibroblast and has emerged as a targetable pathway in IPF [28]. To examine the ability of VD to prevent this stimulation of the glycolytic metabolism in HLFs, we evaluated its effects on mitochondrial and glycolysis-related respiration using a Seahorse extracellular flux analyser. TGF- β 1 increased mitochondrial respiration assessed by OCR consumption (Figure 6A). Particularly, the Figure 6B shows that TGF- β 1 significantly enhanced the basal mitochondrial respiration, thereby emphasizing an increased oxidative phosphorylation capacity, and OCR-related ATP production. VD reduced, although not significantly, these effects. In addition, TGF- β 1 increased the basal acidification rate (ECAR) and VD blocked this induction (Figure 6C). The metabolic profile (Figure 6D) indicates that TGF- β 1 promoted an energetic phenotype in HLFs that was in part prevented by VD.

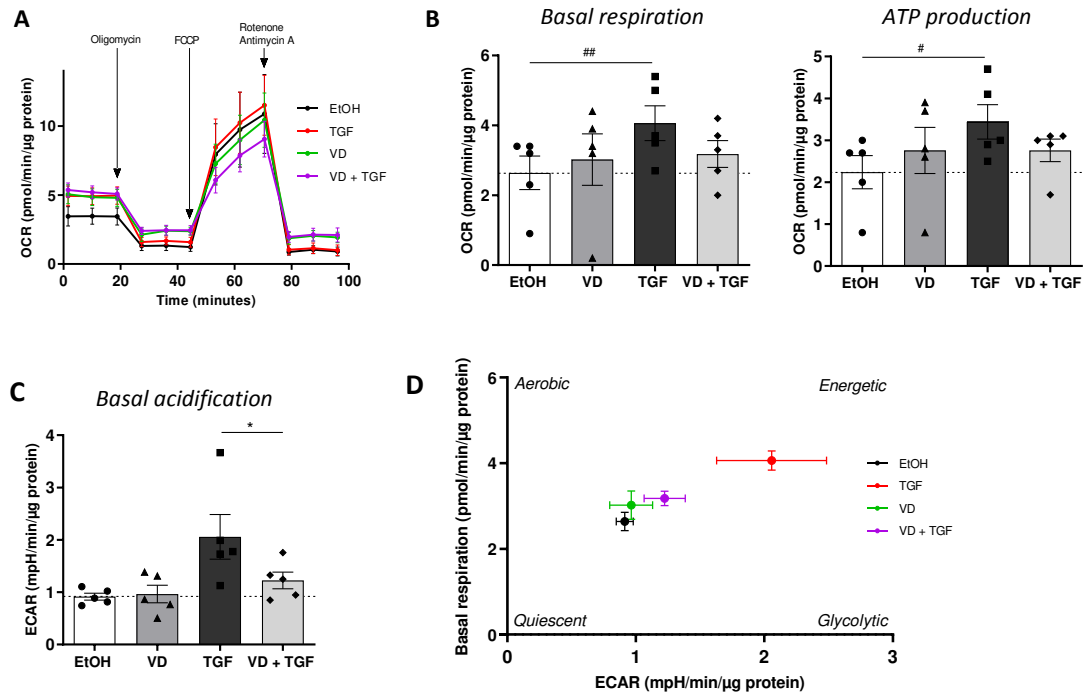


Figure 6. VD prevented the basal extracellular acidification induced by TGF- β 1 in IPF HLFs. Cells were treated with vehicle (EtOH) or 100 nVD, in the absence or presence of TGF- β 1 (TGF), for 24 h before analyzing of the cell metabolism by Seahorse technology. (A) Representative graph of oxygen consumption rate (OCR) by IPF HLFs using a Seahorse® XF Cell Mito Stress kit. (B) mitochondrial basal respiration and OCR-related ATP production were quantified after injection of oligomycin, FCCP, rotenone and antimycin A in the system. (C) The basal extracellular acidification was determined by measuring the extracellular acidification rate (ECAR). (D) The cell energy phenotype profile determined by the simultaneous measurement of OCR and ECAR values is shown. Results are expressed as means \pm SEM of 5 independent experiments. Significant differences were determined by paired t-tests.

We next specified the impact of VD on the glycolytic metabolism using the Seahorse XF Glycolysis Stress. Figure 7A shows that TGF- β 1 increased ECAR in the absence and presence of glucose. TGF- β 1 significantly stimulated glycolysis, glycolytic capacity and glycolytic reserve (Figure 7B). 100 nM VD did not affect the basal aerobic glycolysis of HLFs but totally inhibited the glycolytic shift induced by TGF- β 1 (Figure 7B). Genetic invalidation of VDR

expression blocked the inhibitory effects of VD on the glycolytic function in HLFs stimulated with TGF- β 1 (Figure 7C). TGF- β 1 also enhanced, although not significantly, the glycolytic functions in control HLFs (Figure S4). As observed with IPF HLFs, VD seems to reduce the basal glycolysis, glycolytic capacity and glycolytic reserve in control HLFs.

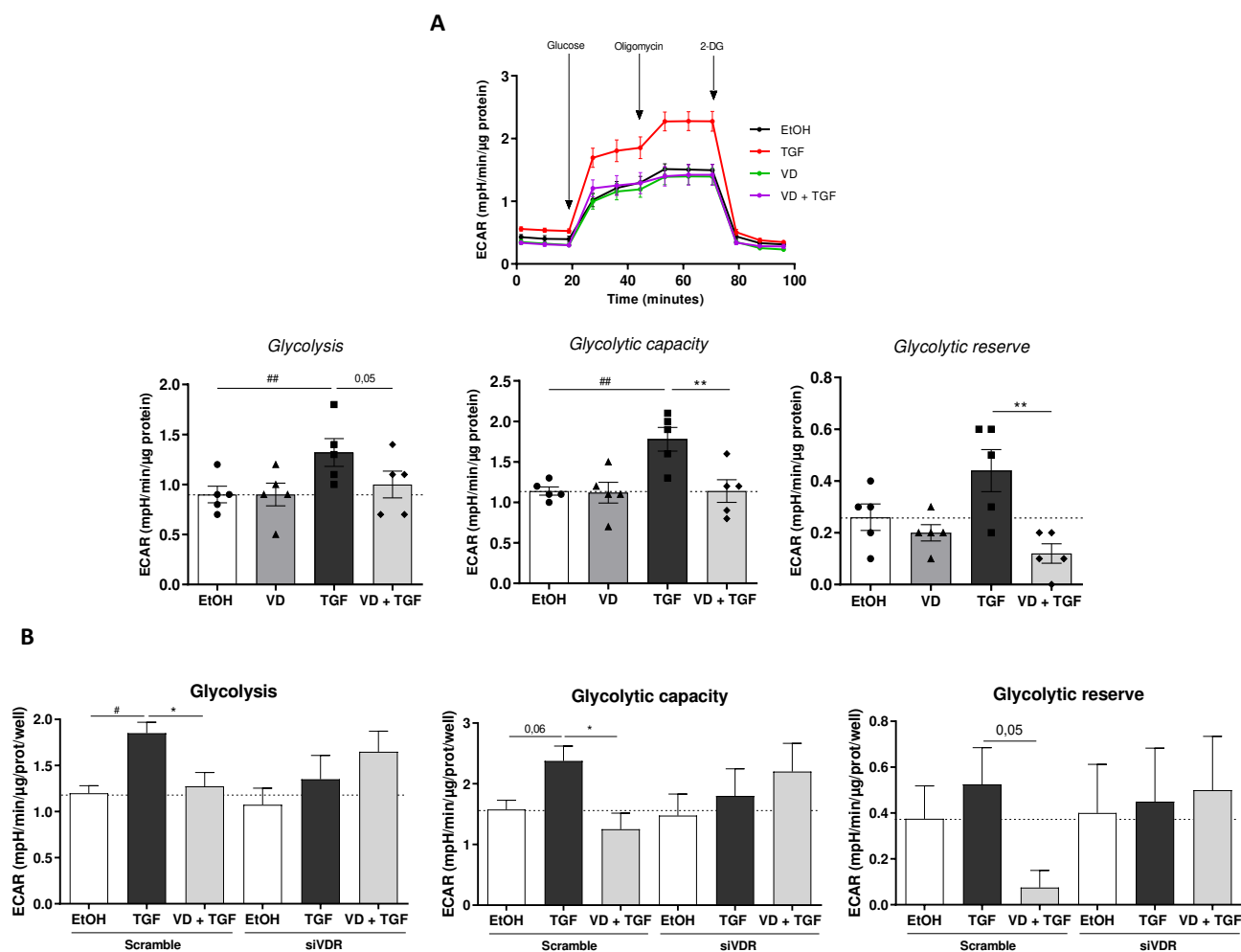


Figure 7. VD inhibited the glycolysis induced by TGF- β 1 in IPF HLFs. Cells were treated with vehicle (EtOH) or 100 nM VD, in the absence or presence of 5 ng/mL TGF- β 1 (TGF) for 24 h, before analysis of glycolysis by Seahorse technology. (A) Representative graph of extracellular acidification rate (ECAR) from IPF HLF culture media using a Seahorse® XF Glycolysis Stress Test kit. (B) The glycolytic metabolism was determined after injection of glucose, oligomycin and 2-DG in the system. (C) Cells were transfected with control siRNA (scramble) or VDR-siRNA (siVDR) for 24 h, and then treated with EtOH or 100 nM VD, in the absence or presence of TGF- β 1 for 24 h, before the analysis of the glycolytic metabolism. Results are expressed as means \pm SEM of 5 independent experiments. Significant differences were determined by paired t-tests.

The secretion of lactate, produced by the reduction of pyruvate, contributes to the increase of ECAR when the glycolytic function is stimulated. Figure 8A indicates that TGF- β 1 significantly increased the concentration of lactate in cell culture media. In addition, it induced the expression of the LDHA gene (Figure 8B) and stimulated the LDH activity in IPF HLFs (Figure 8C). 100 nM VD significantly reduced the secretion of lactate from IPF HFLs. It also limited the induction of both LDHA mRNA level and LDH activity in HLFs stimulated with TGF- β 1.

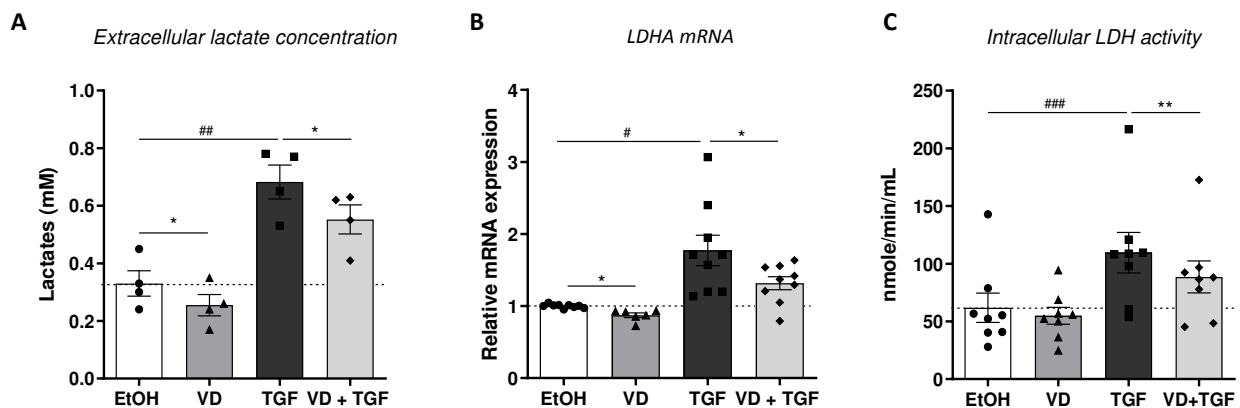


Figure 8. VD reduced lactate secretion, LDHA mRNA levels and intracellular LDH activity in IPF HLFs. Cells were treated with vehicle (EtOH) or 100 nM VD in the absence or presence of 5 ng/mL TGF- β 1 (TGF) for 24 h. Extracellular lactate concentrations (A) and LDH activity (C) were measured as described in the materials and methods section. (B) LDHA mRNA levels were measured by quantitative RT-PCR and normalized to ribosomal 18S RNA. The mRNA levels measured in cells treated with EtOH (dashed line) were arbitrarily set at 1. Results are expressed as means \pm SEM of 4 (A) or 8 (B, C) independent experiments. Significant differences were determined by paired t-tests.

4. Discussion

Our study demonstrates for the first time that VD inhibited major profibrotic processes in primary HLFs isolated from IPF and control lung parenchyma, likely through a VDR-dependent signalling.

We first reported that VDR was functional in HLFs as its genetic deletion totally blocked the induction of CYP24A1 mRNA levels in cells exposed to VD. CYP24A1 is one of the main target genes of VD that controls its oxidation and subsequent elimination [29]. In addition, we found that IPF and control HLFs similarly expressed VDR, which thus suggests that the VDR signalling may not be altered in pulmonary fibroblasts isolated from patients with IPF. This result contrasts with a recent report showing that VDR expression was negatively correlated with the development of liver fibrosis in patients suffering from chronic hepatitis B virus infection [30].

We next showed that increasing doses of VD significantly inhibited the basal and PDGF-BB-stimulated proliferation. PDGF-BB, that is frequently overexpressed in lung parenchyma of IPF patients, enhances the proliferation of lung fibroblasts and promotes their accumulation in pathologic foci [26]. Pharmacological inhibition of PDGFR reduced the induction of lung fibrosis in different mice models thereby strengthening a role for PDGF in the development of IPF [31,32]. These negative effects of VD on HLF proliferation were associated with a significant alteration of the cell cycle. Indeed, VD increased the percentage of HLFs arrested in G0/G1 and limited the expression of various cyclins and CDK controlling the cell cycle progression. Particularly, VD reduced the expression of cyclin D1, known to promote the G0/G1 transition. These mechanisms likely contribute to the antiproliferative of VD since previous reports showed that the hormone also inhibited the proliferation of various cell lines by arresting the cell cycle in the G0/G1 phase and by reducing cyclin and cdk expressions [33–35]. Our results further indicate that VD could not prevent the PDGF-induced proliferation of

HLFs by inhibiting the canonical PDGFR signalling since it did not prevent the activation of ERK, which markedly contributes to the growth of lung fibroblasts [36]. In contrast, we can hypothesize that VD inhibited cell growth by directly reducing cell cycle gene expression through a VDR-dependent mechanism, since the genetic deletion of its receptor blocked its effects. Additional investigations are however required to determine whether VD could stimulate the binding of VDR to specific responsive elements in genes controlling the expression of cyclin/CDK proteins.

In addition, our results demonstrated that VD slightly reduced the differentiation of HLFs into myofibroblasts. These cells play a major role in the development of lung fibrosis by the production of α -SMA-containing contractile filaments and extracellular matrix, which contributes to lung stiffness [26]. VD significantly, although slightly, prevented the increase in ACTA2 mRNA and α -SMA protein levels in both control and IPF HLFs. In addition, it had no effect on the expression of collagen 1 and fibronectin induced by TGF- β 1. These latter results were unexpected since VD blocked the expression of major pro-fibrosis genes like ACTA2, COL1A1, COL1A2, and FN1 induced by TGF- β 1 in various murine models and diverse cell lines [12–15,19,20]. These discordant results are likely due to the inability of VD to inhibit the TGF- β 1/SMAD signalling in HLFs. To stimulate fibroblast differentiation, TGF- β 1 activates the transcription factors SMAD2/3, their translocation into nuclei and their subsequent binding to the specific DNA-binding elements present on several profibrotic genes such as ACTA2 and COL1A1 [37]. VD-bound VDR can physically interact with phosphorylated SMAD2/3 and block their binding on various gene promoters in TGF- β 1-stimulated fibroblasts [13,38]. VD can also inhibit the phosphorylation of SMAD2/3 induced by TGF- β 1 [39]. We did not investigate if VD could block the binding of activated SMAD2/3 on their cognate responsive element in HLFs. However, we show that the hormone had very limited effects on the phosphorylation of the two SMAD proteins in HLFs. VD was thus unlikely to inhibit the

binding of VDR on SMAD proteins. This result might explain why VD could not actively prevent the differentiation of myofibroblasts induced by TGF- β 1. It may be hypothesized that concentrations of VD higher than 100 nM may be required to block the TGF- β 1 signalling in these cells. Nevertheless, it should be noted that μ M concentrations of vitamin D, and this metabolite, are hardly reached in humans supplemented with the hormone [40].

Finally, our results demonstrate that VD prevented the induction of aerobic glycolysis in myofibroblasts likely *via* VDR-dependent signalling. The stimulation of aerobic glycolysis has been identified in several pulmonary cells of patients with IPF, including alveolar epithelial cells, macrophages and fibroblasts [41]. This metabolic reprogramming is increasingly described as an essential mechanism promoting the development of IPF [41]. Indeed, *in vitro*, inhibitors of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase, that prevent the metabolic reprogramming induced by TGF- β 1 in HLFs, reduce the profibrotic effects of TGF- β 1 [6,42]. *In vivo* inhibition of glycolysis also attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis [6,42]. Aerobic glycolysis appears to promote the differentiation of myofibroblasts first by stimulating α -SMA expression [6]. Our results are concordant with this mechanism although we found that VD almost totally blocked the increase in aerobic glycolysis while it only slightly decreased the expression of α -SMA in TGF- β 1-stimulated HLFs. In addition, glycolysis leads to the ultimate production of lactic acid by the LDH-dependent reduction of pyruvic acid. Different studies have reported that lactic acid concentrations could be elevated in lung parenchyma and bronchoalveolar lavages in patients with IPF [7,43]. The secretion of lactic acid, notably through specific transporters, favours a decrease in the extracellular pH, with secondary increases in the activation of latent TGF- β [7]. Interestingly, our findings demonstrate that VD significantly reduced LDH expression, LDH activity and lactic acid production. It may thus be hypothesized that VD could limit the formation of active TGF- β by preventing extracellular acidification due to the secretion of lactic acid. Additional experiments are however required to

determine if VD may reduce the acidification in the lung microenvironment and block the loop of profibrotic response linked to glycolysis in patients with IPF.

In conclusion, the present study indicates that, *in vitro*, VD could prevent major profibrotic parameters in HLFs, including the metabolic reprogramming. Taking into account these results, and the ability of VD to prevent lung fibrosis *in vivo* in experimental models, it may be interesting in future to determine if a supplementation with vitamin D could contribute to limit the decline in lung function in patients with IPF.

Supplementary figures

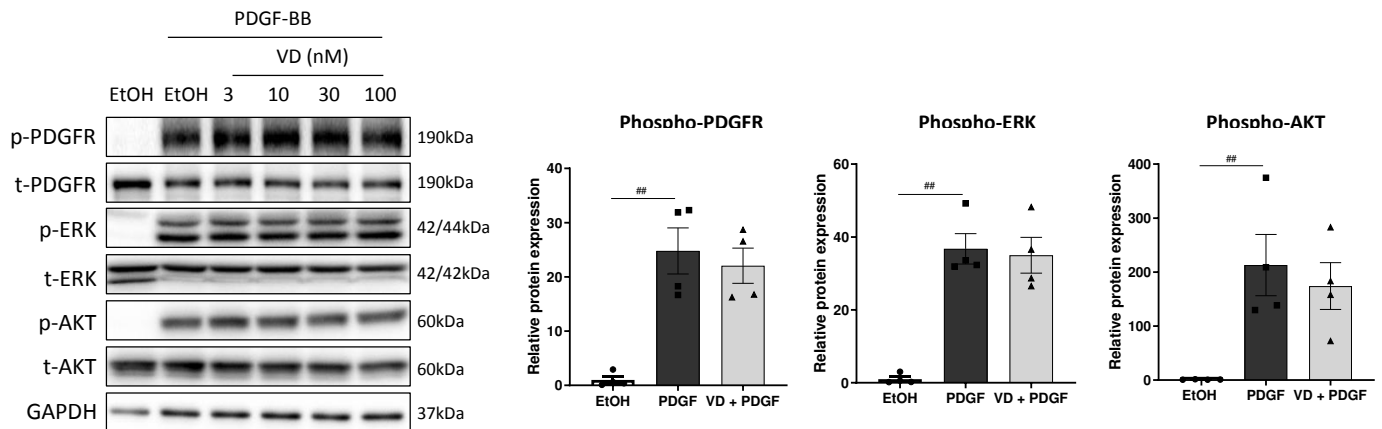


Figure S1. Vitamin D (VD) did not alter the PDGF-BB canonical pathway in IPF HLFs. Cells were treated with vehicle (EtOH) or 3-100 nM VD for 1 h, and then left quiescent or stimulated with 25 ng/mL PDGF-BB for 10 min. A representative Western blot showing the phosphorylation of PDGFR, ERK and AKT in IPF HLFs is shown in the left panel. Protein expressions in cells treated in the absence or presence of 100 nM VD were quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The basal protein expressions measured in cells treated EtOH were arbitrarily set at 1. Results are expressed with means \pm SEM of 4 independent experiments. Significant differences were determined by paired t-test.

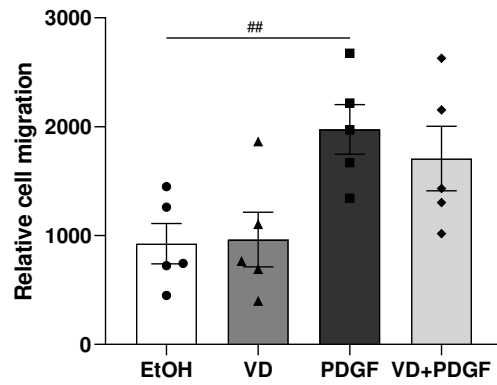


Figure S2. VD did not alter the migration of IPF HLFs induced by PDGF-BB. HLFs were treated with vehicle (EtOH) or 100 nM VD for 24 h in the absence or presence of 25 ng/ml PDGF-BB used as a chemoattractant to induce cell migration. Results are expressed as means \pm SEM of 5 independent experiments. Significant differences were determined paired t-tests.

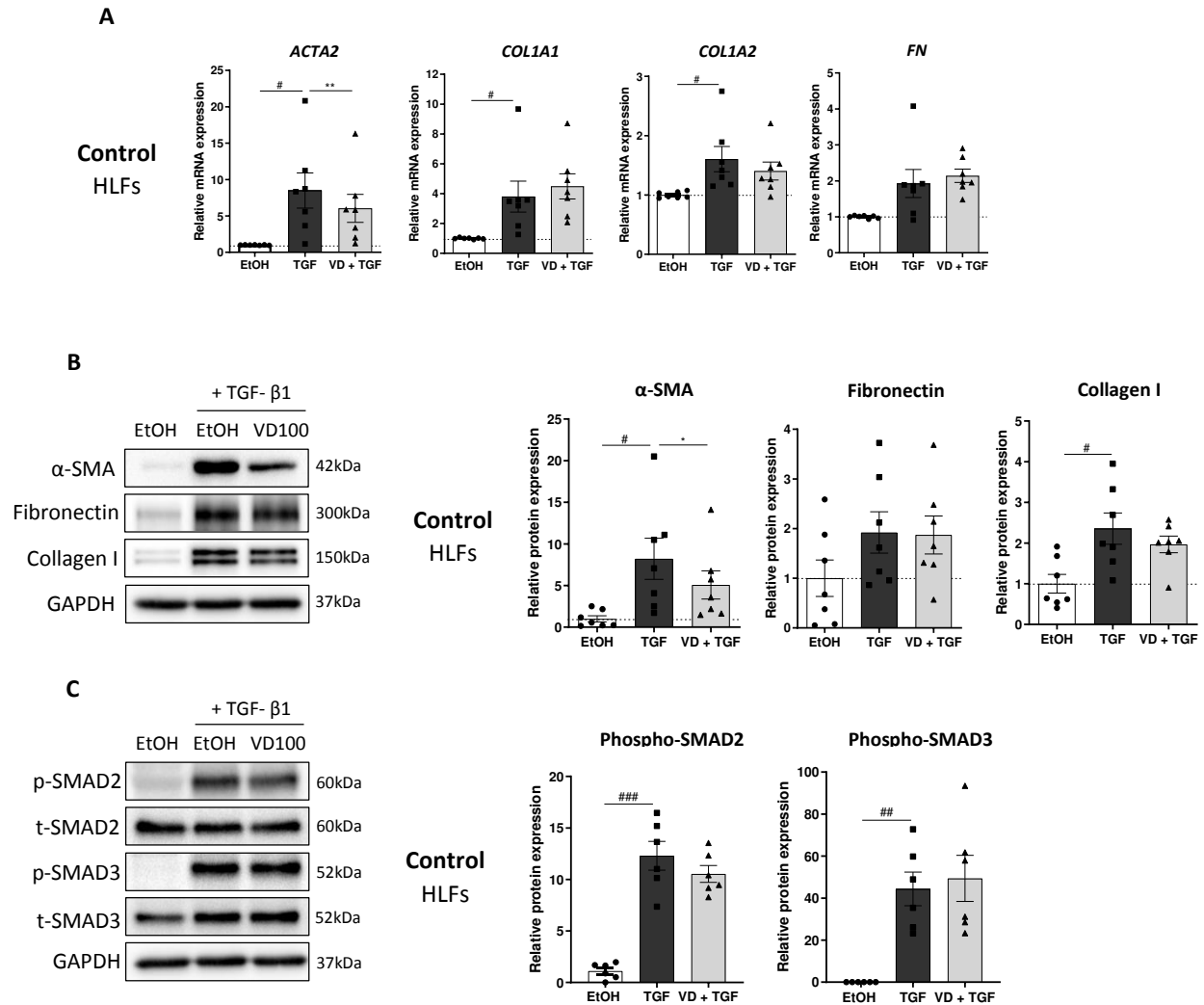


Figure S3. VD reduced the *ACTA2* mRNA and the α -SMA levels induced by TGF- β 1 in control HLFs. Cells were treated with vehicle (EtOH) or 100 nM VD for 1 h and then stimulated with 1 ng/mL TGF- β 1 for 24 h (A, B) or for 10 min (C). (A) Relative *ACTA2*, *COL1A1*, *COL1A2* and *FN1* mRNA levels were measured by quantitative RT-PCR and normalized to ribosomal 18S RNA. The mRNA levels measured in cells treated with EtOH were arbitrarily set at 1. (B, C) Representative Western blot showing the expression of α -SMA, Fibronectin, collagen I (B) and phospho-SMAD2/3 (C) in control HLFs (left panels). Protein expressions were quantified by densitometry and normalized to GAPDH (bar plots). Basal protein expressions measured in cells treated with EtOH (dashed lines) were arbitrarily set at 1. Results are expressed as means \pm SEM of 6 independent experiments. Significant differences were determined by paired t-tests.

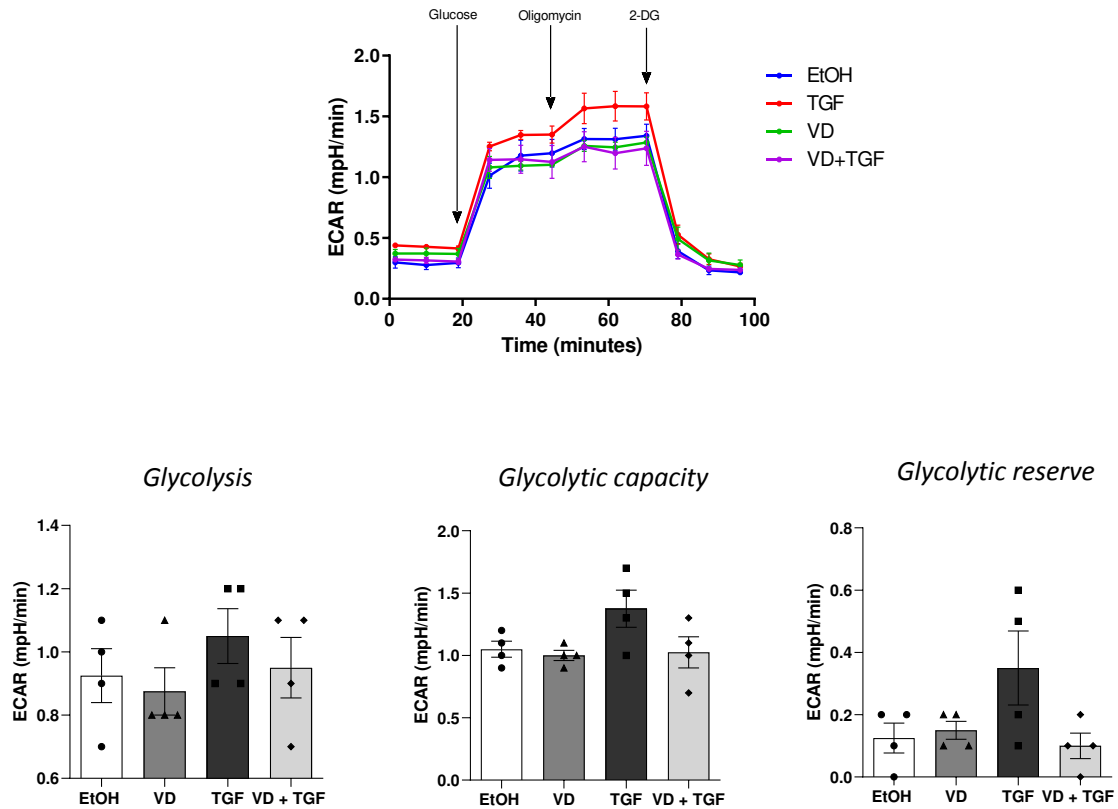


Figure S4. VD numerically reduced the glycolysis induced by TGF- β 1 in control HLFs. Cells were treated with vehicle (EtOH) or 100 nM VD, in the absence or presence of 5 ng/mL TGF- β 1 (TGF) for 24 h, before analysis of glycolysis by Seahorse technology. (A) Representative graph of extracellular acidification rate (ECAR) from control HLF using a Seahorse® XF Glycolysis Stress Test kit. (B) The glycolytic metabolism was determined after injection of glucose, oligomycin and 2-DG in the system. Results are expressed as means \pm SEM of 4 independent experiments. Significant differences were determined by paired t-tests.

Acknowledgments

We thank the Rennes Biosit platform for the flow cytometry analysis. We thank Isabelle Gallais for her technical advices on the Seahorse technology and Charles Lefevre for the quantification of lactate concentrations in culture media.

Funding

This work was supported by The Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Université de Rennes and Boehringer Ingelheim Pharma GmbH.

Authors' contributions

AJ, TV, SJ, LV conceived and designed the study. AJ, CM, TV performed the experiments. TV, AJ, SJ, LV interpreted the data and wrote the manuscript. CLN, BDLT, SR provided lung biopsy. DLG revised and edited the manuscript. Boehringer Ingelheim Pharma GmbH had no role in the design, analysis or interpretation of the results in this study but it was given the opportunity to review the manuscript for medical and scientific accuracy. All authors read and approved the final manuscript.

Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files]

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the local ethics committee (Ethics Committee CHU Rennes, n° 16123). Written informed consent was obtained from all subjects. All experiments were performed following relevant guidelines and regulations.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

SJ has received fees, funding or reimbursement for national and international conferences, boards, expert or opinion groups, research projects over the past 5 years from Actelion, AIRB, Astra Zeneca, Bellorophon Therapeutics, Biogen, BMS, Boehringer Ingelheim, Chiesi, Fibrogen, Galecto Biotech, Genzyme, Gilead, GSK, LVL, Mundipharma, Novartis, Olam Pharm, Pfizer, Pliant Therapeutics, Roche, Sanofi, Savara-Serendex. AJ and LV report grants from Boehringer Ingelheim. The other authors declare that they have no competing interests. All authors declare no conflict of interest and have consented for publication.

References

1. Martinez FJ, Collard HR, Pardo A, Raghu G, Richeldi L, Selman M, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat Rev Dis Primer*. 2017;3:17074.
2. Sgalla G, Iovene B, Calvello M, Ori M, Varone F, Richeldi L. Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and management. *Respir Res*. 2018;19:32.
3. Ye Z, Hu Y. TGF- β 1: Gentlemanly orchestrator in idiopathic pulmonary fibrosis (Review). *Int J Mol Med*. 2021;48:132.
4. Trojanowska M. Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis. *Rheumatology*. 2008;47:v2–4.
5. Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15:255–73.
6. Xie N, Tan Z, Banerjee S, Cui H, Ge J, Liu R-M, et al. Glycolytic Reprogramming in Myofibroblast Differentiation and Lung Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192:1462–74.
7. 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- β . *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186:740–51.
8. Cottin V, Bonniaud P, Cadranel J, Crestani B, Jouneau S, Marchand-Adam S, et al. Recommandations pratiques pour le diagnostic et la prise en charge de la fibrose pulmonaire idiopathique – Actualisation 2021. Version courte. *Rev Mal Respir*. 2022;39:275–312.
9. Lancaster L, Crestani B, Hernandez P, Inoue Y, Wachtlin D, Loaiza L, et al. Safety and survival data in patients with idiopathic pulmonary fibrosis treated with nintedanib: pooled data from six clinical trials. *BMJ Open Respir Res*. 2019;6:e000397.

10. Zurkova M, Kriegova E, Kolek V, Lostakova V, Sterclova M, Bartos V, et al. Effect of pirfenidone on lung function decline and survival: 5-yr experience from a real-life IPF cohort from the Czech EMPIRE registry. *Respir Res.* 2019;20:16.
11. Bikle DD. Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications. *Chem Biol.* 2014;21:319–29.
12. Meredith A, Boroomand S, Carthy J, Luo Z, McManus B. 1,25 Dihydroxyvitamin D3 Inhibits TGF β 1-Mediated Primary Human Cardiac Myofibroblast Activation. *PLOS ONE.* 2015;10:e0128655.
13. Zerr P, Vollath S, Palumbo-Zerr K, Tomcik M, Huang J, Distler A, et al. Vitamin D receptor regulates TGF- β signalling in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2015;74:e20.
14. Lee S-A, Yang H-W, Um J-Y, Shin J-M, Park I-H, Lee H-M. Vitamin D attenuates myofibroblast differentiation and extracellular matrix accumulation in nasal polyp-derived fibroblasts through smad2/3 signaling pathway. *Sci Rep.* 2017;7:7299.
15. Watsky MA, Chen Z, Lu X. Effects of Vitamin D on Corneal Myofibroblast Differentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018;59:4357–4357.
16. Ramirez AM, Wongtrakool C, Welch T, Steinmeyer A, Zügel U, Roman J. Vitamin D inhibition of pro-fibrotic effects of transforming growth factor β 1 in lung fibroblasts and epithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;118:142–50.
17. Arfian N, Muflikhah K, Soeyono SK, Sari DCR, Tranggono U, Anggorowati N, et al. Vitamin D Attenuates Kidney Fibrosis via Reducing Fibroblast Expansion, Inflammation, and Epithelial Cell Apoptosis. *Kobe J Med Sci.* 2016;62:E38-44.
18. Wang F, Hu R, Zhang J, Pei T, He Z, Ju L, et al. High-dose vitamin D3 supplementation ameliorates renal fibrosis by vitamin D receptor activation and inhibiting TGF- β 1/Smad3 signaling pathway in 5/6 nephrectomized rats. *Eur J Pharmacol.* 2021;907:174271.

19. Zhu W, Ding Q, Wang L, Xu G, Diao Y, Qu S, et al. Vitamin D3 alleviates pulmonary fibrosis by regulating the MAPK pathway via targeting PSAT1 expression in vivo and in vitro. *Int Immunopharmacol*. 2021;101:108212.
20. Tzilas V, Bouros E, Barbayianni I, Karampitsakos T, Kourtidou S, Ntassiou M, et al. Vitamin D prevents experimental lung fibrosis and predicts survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulm Pharmacol Ther*. 2019;55:17–24.
21. Faverio P, Fumagalli A, Conti S, Madotto F, Bini F, Harari S, et al. Nutritional assessment in idiopathic pulmonary fibrosis: a prospective multicentre study. *ERJ Open Res* [Internet]. 2022 [cited 2023 Apr 26];8. Available from: <https://openres.ersjournals.com/content/8/1/00443-2021>
22. Yang L, Zhai Z, Zhang J. The Role of Serum 1,25-Dihydroxy Vitamin D3 and PCT in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Int J Gen Med*. 2022;15:8081–92.
23. Marchand-Adam S, Marchal J, Cohen M, Soler P, Gerard B, Castier Y, et al. Defect of Hepatocyte Growth Factor Secretion by Fibroblasts in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168:1156–61.
24. Raghu G, Remy-Jardin M, Richeldi L, Thomson CC, Inoue Y, Johkoh T, 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*. 2022;205:e18–47.
25. Joannes A, Morzadec C, Duclos M, Bellamri N, Gutierrez FL, Latour BR de, et al. Arsenic trioxide inhibits the functions on lung fibroblasts derived from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* [Internet]. 2019 [cited 2023 May 11];54. Available from: <https://univ-rennes.hal.science/hal-02470493>
26. King TE, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *The Lancet*. 2011;378:1949–61.

27. Budi EH, Schaub JR, Decaris M, Turner S, Derynck R. TGF- β as a driver of fibrosis: physiological roles and therapeutic opportunities. *J Pathol*. 2021;254:358–73.
28. Hamanaka RB, Mutlu GM. Metabolic requirements of pulmonary fibrosis: Role of fibroblast metabolism. *FEBS J*. 2021;febs.15693.
29. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev*. 2016;96:365–408.
30. Yang K, Pan Y, Zhang H, Jin L, Wang X. Hepatic vitamin D receptor expression is negatively associated with liver inflammation and fibrosis in patients with chronic HBV infection. *Clin Exp Med* [Internet]. 2022 [cited 2023 Feb 13]; Available from: <https://doi.org/10.1007/s10238-022-00919-9>
31. Aono Y, Nishioka Y, Inayama M, Ugai M, Kishi J, Uehara H, et al. Imatinib as a novel antifibrotic agent in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171:1279–85.
32. Kishi M, Aono Y, Sato S, Koyama K, Azuma M, Abe S, et al. Blockade of platelet-derived growth factor receptor- β , not receptor- α ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *PLOS ONE*. 2018;13:e0209786.
33. Scaglione-Sewell BA, Bissonnette M, Skarosi S, Abraham C, Brasitus TA. A Vitamin D3 Analog Induces a G1-Phase Arrest in CaCo-2 Cells by Inhibiting Cdk2 and Cdk6: Roles of Cyclin E, p21Waf1, and p27Kip1**This work was supported by National Institutes of Health Grants DK-39573, CA-36745 (to T.A.B. and M.B.) and P30DK42086 (to T.A.B., Digestive Disease Research Core Center). *Endocrinology*. 2000;141:3931–9.
34. Bhoora S, Punchoo R. Policing Cancer: Vitamin D Arrests the Cell Cycle. *Int J Mol Sci*. 2020;21:9296.

35. Gesmundo I, Silvagno F, Banfi D, Monica V, Fanciulli A, Gamba G, et al. Calcitriol Inhibits Viability and Proliferation in Human Malignant Pleural Mesothelioma Cells. *Front Endocrinol.* 2020;11:559586.
36. Sun Q, Liu L, Mandal J, Molino A, Stolz D, Tamm M, et al. PDGF-BB induces PRMT1 expression through ERK1/2 dependent STAT1 activation and regulates remodeling in primary human lung fibroblasts. *Cell Signal.* 2016;28:307–15.
37. Schiller M, Javelaud D, Mauviel A. TGF- β -induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J Dermatol Sci.* 2004;35:83–92.
38. Shany S, Sigal-Batikoff I, Lamprecht S. Vitamin D and Myofibroblasts in Fibrosis and Cancer: At Cross-purposes with TGF- β /SMAD Signaling. *Anticancer Res.* 2016;36:6225–34.
39. Xu S, Zhang Z-H, Fu L, Song J, Xie D-D, Yu D-X, et al. Calcitriol inhibits migration and invasion of renal cell carcinoma cells by suppressing Smad2/3-, STAT3- and β -catenin-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Sci.* 2020;111:59–71.
40. Ceglia L, Chiu GR, Harris SS, Araujo AB. Serum 25-hydroxyvitamin D concentration and physical function in adult men. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2011;74:370–6.
41. Bueno M, Calyeca J, Rojas M, Mora AL. Mitochondria dysfunction and metabolic reprogramming as drivers of idiopathic pulmonary fibrosis. *Redox Biol.* 2020;33:101509.
42. Chen W, Zhang J, Zhong W, Liu Y, Lu Y, Zeng Z, et al. Anlotinib Inhibits PFKFB3-Driven Glycolysis in Myofibroblasts to Reverse Pulmonary Fibrosis. *Front Pharmacol.* 2021;12:744826.
43. Worlitzsch D, Meyer KC, Döring G. Lactate Levels in Airways of Patients with Cystic Fibrosis and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;188:111–111.



Click here to access/download
Supplementary Material
Uncropped Blots.pdf



Titre : Anti-fibrotic effects of nintedanib on lung fibroblasts derived from patients with Progressive Fibrosing Interstitial Lung Diseases (PF-ILDs).

Contexte : Le nintedanib a récemment été autorisé pour le traitement des PID qui manifestent un phénotype de fibrose progressive autre que la FPI (Flaherty et al., 2019; Raghu et al., 2022). Bien que l'effet anti-fibrosant du nintedanib ait été validé *in vitro* sur le phénotype de fibroblastes pulmonaires humains isolés de patients atteints de FPI, il n'a jamais été validé sur des fibroblastes isolés de patients présentant d'autres PID fibrosantes progressives.

Objectif : Pour mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires qui déterminent l'efficacité clinique du nintedanib sur des PID fibrosantes progressives non-IPF, des fibroblastes isolés de pneumopathie d'hypersensibilité (N=7), de sarcoïdose (N=5) ou de FEPP (N=4) ont été traités avec du nintedanib (10 nM – 1 µM) puis stimulés avec du PDGF-BB (25-50 ng/mL) ou du TGF-β1 (1 ng/ml) pendant 24 à 72h pour évaluer leur différenciation, leur migration et leur prolifération.

Résultats principaux : À des concentrations nanomolaires, le nintedanib réduit les niveaux de phosphorylation du récepteur du PDGF et de ERK1/2 pour ainsi diminuer la migration et la prolifération de tous les types de fibroblastes. Le nintedanib atténue également la différenciation myofibroblastique mais seulement à la concentration maximale de 1 µM, en diminuant la phosphorylation de SMAD2/3 et l'expression du collagène, de la fibronectine et de α-SMA induite par le TGF-β1 chez tous les types de fibroblastes.

Conclusion : Cet article démontre que le nintedanib contrecarre les fonctions fibrosantes fondamentales de fibroblastes de PID fibrosantes progressives non-FPI, ce qui contribue probablement aux bénéfices cliniques que ce médicament apporte chez les patients présentant ces pathologies.

Pulmonary Pharmacology & Therapeutics

Anti-fibrotic effects of nintedanib on lung fibroblasts derived from patients with Progressive Fibrosing Interstitial Lung Diseases (PF-ILDs).

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	YPUPT-D-23-00158
Article Type:	Full length article
Keywords:	PPF; primary human lung fibroblasts; nintedanib; proliferation; migration; differentiation
Corresponding Author:	AUDREY JOANNES, Ph.D IRSET Rennes, Bretagne FRANCE
First Author:	AUDREY JOANNES, Ph.D
Order of Authors:	AUDREY JOANNES, Ph.D Tom Voisin Claudie Morzadec Alice Letellier Francisco Llamas Gutierrez Dan Cristian Chiforeanu Cécile Le Naoures Stéphanie Guillot Bertrand Richard De Latour Simon Rouze Madeleine Jaillet Bruno Crestani Lutz Wollin Stéphane Jouneau Laurent Vernhet
Abstract:	<p>The tyrosine kinase inhibitor nintedanib has been recently approved for the treatment of Interstitial Lung Diseases (ILDs) that manifest a progressive fibrosis phenotype other than Idiopathic pulmonary Fibrosis (IPF).</p> <p>Nintedanib reduces the development of lung fibrosis in various animal models resembling features of PF-ILD and in vitro, it inhibits the fibrosing phenotype of human lung fibroblasts (HLFs) isolated from patients with IPF. To get insight on the cellular and molecular mechanisms that drive the clinical efficiency of nintedanib in patients with non-IPF PF-ILD, we investigated its effects on the fibrosing functions of HLFs derived from patients with PF-hypersensitivity pneumonitis (PF-HP, n=7), PF-sarcoidosis (n=5) and pleuroparenchymal fibroelastosis (PPFE, n=4).</p> <p>HLFs were treated with nintedanib (10 nM-1 μM) and then stimulated with PDGF-BB (25-50 ng/ml) or TGF-β1 (1 ng/ml) for 24 to 72 hours to assess proliferation and migration or differentiation.</p> <p>At nanomolar concentrations, nintedanib reduced the levels of PDGF receptor and ERK1/2 phosphorylation, the proliferation and the migration of PF-HP, PF-sarcoidosis and PPFE HLFs stimulated with PDGF-BB. Moreover, nintedanib also attenuates the myofibroblastic differentiation driven by TGF-β1 but only when it is used at 1 μM. The drug reduced the phosphorylation of SMAD2/3 and decreased the induction of collagen, fibronectin and α-smooth muscle actin expression induced by TGF-β1.</p> <p>In conclusion, our results demonstrate that nintedanib counteracts fundamental fibrosing functions of lung fibroblasts derived from patients with PF-HP, PF-sarcoidosis and PPFE, at concentrations previously reported to inhibit control and IPF HLFs. Such</p>

	effects may contribute to its clinical benefit in patients suffering from these irreversible ILDs.
Suggested Reviewers:	Olivier Burgy olivier.burgy@inserm.fr
	plantier Laurent laurent.plantier@univ-tours.fr



Dr. Estelle Cormet-Boyaka
Editor-in-chief
Pulmonary Pharmacology & Therapeutics

Joannes Audrey, PhD
Research Institute for Environmental and Occupational Health (IRSET) – INSERM-UMR_S 1085, Univ Rennes, F-35000 Rennes, France
audrey.joannes@univ-rennes1.fr

Rennes, 5th July 2023

Dear editor,

We wish to submit the research article entitled “**Anti-fibrotic effects of nintedanib on lung fibroblasts derived from patients with Progressive Fibrosing Interstitial Lung Diseases (PF-ILDs)**” for consideration by Pulmonary Pharmacology & Therapeutics.

The tyrosine kinase inhibitor nintedanib has been used for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) for several years. More recently, based on the results of clinical studies, this drug has also been approved for the treatment of other Interstitial Lung Diseases (ILDs) that manifest a progressive fibrosis phenotype (PF-ILDs). The molecular basis of the clinical effects of nintedanib on patients with non-IPF PF-ILD remain however to be studied.

In this research article, we demonstrated that nintedanib counteracts fundamental fibrosing functions of primary human lung fibroblasts (HLFs) derived from patients with PF-hypersensitivity pneumonitis, PF-sarcoidosis and pleuroparenchymal fibroelastosis. At nanomolar concentrations, nintedanib blocked PDGF-BB-signaling pathways and prevented PGGF-BB-induced proliferation and migration. Nintedanib also diminished TGF- β 1-induced fibroblast to myofibroblasts transition. Altogether, our findings support that nintedanib may slow down the decline in the lung function in most patients with PF-ILDs, at least in part by inhibiting the profibrosing properties of HLFs.

We confirm that all authors have approved the manuscript for submission. This work is original and has not been published elsewhere. The manuscript is not currently under consideration for publication elsewhere.

Thank you for your consideration of this manuscript.

Sincerely,

Audrey Joannes

1 **Anti-fibrotic effects of nintedanib on lung fibroblasts derived from patients with**
2 **Progressive Fibrosing Interstitial Lung Diseases (PF-ILDs).**

3

4 Audrey Joannes¹, Tom Voisin¹, Claudie Morzadec¹, Alice Letellier¹, Francisco Llamas
5 Gutierrez², Dan Cristian Chiforeanu², Cécile Le Naoures², Stéphanie Guillot³, Bertrand Richard
6 De Latour⁴, Simon Rouze⁴, Madeleine Jaillet⁵, Bruno Crestani^{5,6}, Lutz Wollin⁷, Stéphane
7 Jouneau^{1,8*} and Laurent Vernhet^{1*}.

8

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

11 ²Department of pathology and cytology, Rennes University Hospital, 35033, Rennes, France;

12 ³Department of Respiratory Physiology, Rennes University Hospital, 35033, Rennes, France;

13 ⁴Department of Thoracic, cardiac and vascular surgery, Rennes University Hospital, 35033,
14 Rennes, France;

15 ⁵Faculté de Médecine Xavier Bichat, Université de Paris, Institut National de la Santé et de la
16 Recherche Médicale (INSERM), UMR1152, FHU APOLLO, Labex INFLAMEX, Paris,
17 France;

18 ⁶Department of Pulmonology, AP-HP, Hôpital Bichat, FHU APOLLO, Inserm 1152,
19 University of Paris, Paris, France

20 ⁷Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co, KG, Biberach an der Riss, Germany;

21 ⁸Department of Respiratory Diseases, Competence Center for Rare Pulmonary Disease, Rennes
22 University Hospital, 35033, Rennes, France

23 * Equally contributed

24

25 **Running title:** Anti-fibrotic effects of nintedanib on PPF fibroblasts

26 **Address correspondence to:** Audrey Joannes, Irset - Inserm UMR_S 1085, 2 avenue du
27 Professeur Léon Bernard, 35043 RENNES CEDEX, France, Email: audrey.joannes@univ-
28 rennes.fr

29 **Nonstandard abbreviations:** ILD: interstitial lung disease, PF-ILD: Progressive fibrosing-
30 ILD, IPF: idiopathic pulmonary fibrosis, HP: hypersensitivity pneumonitis, PPF:
31 pleuroparenchymal fibroelastosis, PBS: phosphate-buffered saline, HLFs: human lung
32 fibroblasts, TGF- β 1: transforming growth factor- β 1, PDGF-BB: platelet-derived growth factor
33 BB, COL1: collagen I, α -SMA: α -smooth muscle actin, SEM: standard error of the mean,
34 ANOVA: one-way analysis of variance.

35

36

Abstract

37 The tyrosine kinase inhibitor nintedanib has been recently approved for the treatment of
38 Interstitial Lung Diseases (ILDs) that manifest a progressive fibrosis phenotype other than
39 Idiopathic pulmonary Fibrosis (IPF).

40 Nintedanib reduces the development of lung fibrosis in various animal models resembling
41 features of PF-ILD and *in vitro*, it inhibits the fibrosing phenotype of human lung fibroblasts
42 (HLFs) isolated from patients with IPF. To get insight on the cellular and molecular
43 mechanisms that drive the clinical efficiency of nintedanib in patients with non-IPF PF-ILD,
44 we investigated its effects on the fibrosing functions of HLFs derived from patients with PF-
45 hypersensitivity pneumonitis (PF-HP, n=7), PF-sarcoidosis (n=5) and pleuroparenchymal
46 fibroelastosis (PPFE, n=4).

47 HLFs were treated with nintedanib (10 nM-1 μ M) and then stimulated with PDGF-BB (25-
48 50 ng/ml) or TGF- β 1 (1 ng/ml) for 24 to 72 hours to assess proliferation and migration or
49 differentiation.

50 At nanomolar concentrations, nintedanib reduced the levels of PDGF receptor and ERK1/2
51 phosphorylation, the proliferation and the migration of PF-HP, PF-sarcoidosis and PPFE HLFs
52 stimulated with PDGF-BB. Moreover, nintedanib also attenuates the myofibroblastic
53 differentiation driven by TGF- β 1 but only when it is used at 1 μ M. The drug reduced the
54 phosphorylation of SMAD2/3 and decreased the induction of collagen, fibronectin and α -
55 smooth muscle actin expression induced by TGF- β 1.

56 In conclusion, our results demonstrate that nintedanib counteracts fundamental fibrosing
57 functions of lung fibroblasts derived from patients with PF-HP, PF-sarcoidosis and PPFE, at
58 concentrations previously reported to inhibit control and IPF HLFs. Such effects may contribute
59 to its clinical benefit in patients suffering from these irreversible ILDs.

60

61

62 **Highlights:**

63 Nintedanib blocks PDGF-BB-induced signalling of PF-ILD HLFs.

64 Nintedanib inhibits PDGF-BB-induced proliferation of PF-ILD HLFs

65 Nintedanib prevents PDGF-BB-induced migration of PF-ILD HLFs

66 Nintedanib diminishes TGF- β 1-induced differentiation of PF-ILD HLFs

67 **Keywords (6):** PPF, primary human lung fibroblasts, nintedanib, proliferation, migration,
68 differentiation.

69

70

71 **1. Introduction**

72 Interstitial lung diseases (ILDs) are defined as a large and heterogeneous group of
73 parenchymal pulmonary disorders of various etiologies characterized by diffuse damages in the
74 lung parenchyma [1,2]. Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), the best described ILD, is a
75 progressive fibrosing ILD (PF-ILD) associated with a high rate of mortality. A proportion of
76 patients with non-IPF ILD can also develop a progressive fibrosing phenotype that leads to
77 decline in lung function, quality of life worsening and early mortality [3]. These ILDs notably
78 include idiopathic non-specific interstitial pneumonia (NSIP), unclassifiable idiopathic
79 interstitial pneumonia, connective-tissue disease ILDs, chronic sarcoidosis, fibrosing
80 hypersensitivity pneumonitis (HP), asbestosis, silicosis or pleuroparenchymal fibroelastosis
81 (PPFE). The estimated prevalence of non-IPF PF-ILD ranges from 6.9 (Europe) to 70.3 (United
82 States) per 100 000 persons and the estimated incidence from 2.1 (Europe) to 32.6 (United
83 States) per 100 000 persons per years [4]. It is estimated that around 30% of all ILDs will evolve
84 toward PF-ILD [5,6].

85 The development of pulmonary fibrosis in non-IPF ILD is probably the consequence of
86 chronic injuries to lung endothelial cells or epithelial alveolar cells associated with immune
87 stimulation or autoimmunity. The repeated damages to alveolar tissues lead to the migration
88 and proliferation of lung fibroblasts and their differentiation into myofibroblasts in fibroblastic
89 foci [2,7]. Pulmonary tissue then acquires a fibrosis phenotype, characterized by self-
90 progression and activation loops that contribute to the accumulation of extracellular matrix
91 (ECM) and end-stage lung remodeling.

92 Nintedanib is a tyrosine kinase inhibitor that has been used for several years in the treatment
93 of IPF. Recently, nintedanib has also been approved in EU, US and many other countries for
94 the treatment of patients that develop other PF-ILD [8,9]. The randomized, double-blind
95 placebo-controlled INBUILD[®] study, which assessed the efficacy and safety of nintedanib,

96 demonstrated that the drug slows the progression of several non-IPF PF-ILDs, established by
97 the annual rate of decline in forced vital capacity (FVC). Nintedanib likely reduces the
98 development of IPF by interfering with key functions of lung fibroblasts. Indeed, *in vitro*,
99 nintedanib inhibits the migration and proliferation of human lung fibroblasts (HLFs) isolated
100 from patients with IPF by competitively blocking the ATP-binding pocket in various tyrosine
101 kinase receptors including the platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), the fibroblast
102 growth factor receptor and the vascular endothelial growth factor receptor [10]. However,
103 besides IPF, the effects of nintedanib on the functions of lung fibroblasts isolated from patients
104 suffering from other PF-ILD remain largely unknown.

105 In order to demonstrate the pharmacological activity of nintedanib on non-IPF HLFs, we
106 investigated in the present study the *in vitro* drug effects on the pro-fibrosing functions of HLFs
107 isolated from ILD patients with PF-HP, PF-sarcoidosis and PPFE.

108

109 **2. Materials and Methods**

110 **2.1 Primary cultures of HLFs**

111 PF-HP (median age 58 year; range 46.23-66.91 years) (4 females, 3 males), PF-sarcoidosis
112 (median age 57 year; range 36.57-68.05 years) (2 females, 3 males), PPFE (median age 52.85
113 year; range 29.5-72.53 years) (3 females, 1 male) and IPF (median age 66.94 year; range 56.72-
114 76.06 years) lung samples were isolated from patients undergoing open lung biopsy using the
115 explant method [11]. PF-ILD patients were required to meet at least one of the following criteria
116 for progression of their ILD within 24 months, a relative decline in the FVC of at least 10% of
117 the predicted value, a relative decline FVC of 5% to less than 10% of the predicted value and
118 worsening of respiratory symptoms or an increased extent of fibrosis on high-resolution CT, or
119 worsening of respiratory symptoms and an increased extent of fibrosis [2,3]. IPF (2 females, 7
120 males) were diagnosed according to the ATS/ERS/JRS/ALAT criteria, including
121 histopathological features of usual interstitial pneumonia [12,13]. Control samples (median age
122 64.14 year; range 59.09-71.29 year, males) were from lung cancer patients undergoing
123 lobectomy or pneumonectomy, away from the tumor. The absence of tumor tissue in control
124 samples was verified histologically. This study was approved by the local ethics committee
125 (Ethics Committee CHU Rennes, n° 16.123). Written informed consent was obtained from all
126 subjects. Cell morphology was checked by phase contrast microscopy. All experiments were
127 performed in accordance with relevant guidelines and regulations.

128 **2.2 Cell culture and treatments**

129 HLFs derived from patients with PF-HP (n=7), PF-sarcoidosis (n=5) and PPFE (n=4) were
130 cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco™, Life Technologies,
131 Courtaboeuf, France) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Eurobio scientific, Evry,
132 France), antibiotic-antimycotic solution (Gibco™, Life Technologies) and L-glutamine used at
133 passages 5 and 6. Nintedanib was provided by Boehringer Ingelheim Pharma GmbH (Biberach,

134 Germany). To analyze mRNA and protein expressions, HLFs were seeded for 24 h in 6-well
135 plates, and then starved in FCS-free DMEM for 16 h. To study cell growth, HLFs were serum-
136 starved for 16 h, cultured in DMEM containing 1 % FCS and 0.01-0.3 μ M nintedanib (NTD)
137 for 3 h, and finally stimulated with PDGF-BB (50 ng/ml) (R&D Systems, Bio-Techne, Lille,
138 France) for a further 72 h. To analyze the TGF- β 1-induced myofibroblastic differentiation,
139 serum-starved HLFs were pretreated with nintedanib (0.01-1 μ M) for 3 h and then stimulated
140 with TGF- β 1 (1 ng/ml; Preprotech, Neuilly-sur-Seine, France) for 24 h.

141 **2.3 Proliferation**

142 After nintedanib and PDGF-BB treatments, cells were dissociated with trypsin, centrifuged
143 (1500g, 5 min) and resuspended in DMEM containing 10 % FCS. Proliferation was assessed
144 with the acridine orange/propidium iodide staining (Logos Biosystems, Villeneuve d'Ascq,
145 France) and an automated fluorescence cell counter (LunaTM, Logos Biosystems). The dye
146 causes viable nucleated cells to fluoresce green and nonviable nucleated cells to fluoresce red.
147 After cell counting, the relative cell proliferation was calculated by dividing the number of
148 viable cells exposed to nintedanib +/- PDGF-BB by the number of viable untreated cells
149 arbitrarily set at 1.

150 **2.4 Migration assay**

151 HLF migration was assessed in a modified Boyden chamber assay, using a ThinCert®
152 permeable support (6.5 mm, 8 μ m) (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) coated with
153 fibronectin (0.1 μ g/ml) (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). The medium in the
154 upper compartment (DMEM-0%FCS) contained 0.01-0.3 μ M nintedanib and the medium in the
155 lower compartment contained (DMEM-1%FCS) 25 ng/ml PDGF-BB. Cells were incubated for
156 16 h at 37°C, fixed in 70 % ethanol, and labelled with DAPI. Migration was assessed by
157 counting the number of cells on the lower surface of the filters. The relative cell migration was

158 defined by dividing the number of migrating cells stimulated with PDGF-BB by the number of
159 migrating cells left untreated and arbitrarily set at 1.

160 **2.5 Protein analysis**

161 HLFs were lysed in ice-cold RIPA buffer containing cComplete™ Protease Inhibitor Cocktail
162 (Roche, Sigma-Aldrich) and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Proteins were
163 separated by electrophoresis on 10 % Tris-glycine SDS polyacrylamide gels and transferred to
164 nitrocellulose membranes (pore size: 0.2 µm, Invitrogen). Free binding sites were blocked by
165 incubation in 5 % milk or bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier,
166 France) for 2 h at room temperature. Membranes were then incubated with the appropriate
167 primary human antibody (Ab) overnight at 4°C. The primary Abs were anti- α -smooth muscle
168 actin (α -SMA) (clone 1A4, Sigma-Aldrich), anti-collagen I (Southern Biotechnology
169 Associates, Birmingham, AL), anti-GAPDH (mab90009-P, Covalab, Bron, France). Anti-
170 phospho p44/42 MAPK (197G2), anti-p44/42 MAPK (9101), anti-phospho SMAD2 (3104),
171 anti-SMAD2 (D43B4), anti-phospho SMAD3 (C25A9), anti-SMAD3 (C67H9), anti-phospho
172 PDGF receptor (PDGFR) β (3161) and anti-PDGFR (28E1) Abs were from Cell Signaling
173 Technology (Massachusetts, USA). Digital images were acquired on a gel imaging system
174 (Chemi doc, BIO-RAD Laboratories, Marnes-La-Coquette, France) equipped with a CCD
175 camera. Western blots were quantified by densitometry using Image Lab™ software (BIO-
176 RAD) and normalized to GAPDH. The relative protein expression in HLFs was determined by
177 arbitrarily setting at 1 the protein expression measured in untreated cells.

178 **2.6 RNA isolation and RT-PCR assays**

179 Total RNAs were extracted using the mRNA extraction kit from Macherey Nagel (Hoerd,
180 France) according to the manufacturer's instructions. RNA concentrations were measured by
181 spectrofluorimetry using a NanoDrop 1000 (Thermo Fisher scientific, Saint-Herblain, France).

182 Then mRNA were reverse transcribed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription
183 kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Quantitative PCR (polymerase chain
184 reaction) was performed using the SYBR Green methodology on a CFX384 Real-Time PCR
185 System (Bio-Rad Laboratories) in duplicates. All the primers were provided by Sigma-Aldrich
186 (KiCqStart™ SYBR® Green Primers, St. Quentin Fallavier, France). The specificity of gene
187 amplification was checked at the end of PCR using the comparative cycle threshold method
188 (CFX Manager Software). The mean Cq values were used to normalize the target mRNA
189 concentrations to those of the 18S ribosomal protein by the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method. The mRNA levels
190 were expressed relatively to those measured in unstimulated HLFs, arbitrarily set at 1.

191 **2.7 Statistical analysis**

192 All results are presented as means \pm standard errors of mean (SEM) of the indicated numbers
193 of independent biological experiments performed with cell cultures deriving from different
194 patients. Statistical analyses were performed with Prism 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA).
195 Significant differences were determined by ANOVA followed by the Dunnett's Multiple
196 comparison *t*-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

197

198 **3. Results**

199 **3.1 Nintedanib blocked PDGF-BB-induced signaling of PF-HP, PF-sarcoidosis and**
200 **PPFE primary HLFs.**

201 PDGF-BB modulates cell functions, notably in lung fibroblasts, by stimulating the PDGFR
202 which, in turn, controls the activation of the ERK1/2 signaling pathway [14]. Our results show
203 that PDGF-BB increased the level of phosphorylation of the PDGFR and ERK1/2 in PF-HP
204 (Fig. 1A-B), PF-sarcoidosis (Fig. 1C-D), PPFE (Fig. 1E-F), IPF and control (Supplementary
205 Fig. 1) HLFs. To explore the effects of nintedanib on the PDGFR signaling pathway in PF-ILD
206 HLFs, cells were first treated for 3 h with 10 nM-300 nM nintedanib and then stimulated for 10
207 min with PDGF-BB. The drug decreased in a concentration-dependent manner the PDGF-BB-
208 induced phosphorylation of PDGFR and ERK in PF-HP (Fig. 1 A-B) and PF-sarcoidosis (Fig.
209 1 C-D) HLFs, as well as in IPF and control HLFs (Supplementary Fig. 1 A-D). Its effects were
210 significant from 10-30 nM and maximal at 300 nM. In PPFE HLFs, nintedanid also reduced
211 PDGFR and ERK phosphorylation but this effect was only significant at 300 nM.

212 **3.2 Nintedanib inhibited PDGF-BB-induced proliferation of PF-HP, PF-sarcoidosis**
213 **and PPFE HLFs.**

214 Fibroblast proliferation is an important step of self-sustaining fibrosis that likely promotes
215 the formation of pulmonary fibroblastic foci [15] in the lungs of patients suffering from IPF or
216 non-IPF PF-ILD [2,7]. We thus explored the potential of nintedanib to block cell proliferation
217 induced by PDGF-BB, a potent mitogenic cytokine. HLFs were incubated for 3 h with
218 nintedanib and then stimulated with PDGF-BB for the next 72 h. As expected, PDGF-BB
219 increased the proliferation of PF-ILD HLFs (Fig. 2 A, B, C), IPF and control HLFs
220 (Supplemental Fig. 1 E, G). Nintedanib significantly and dose-dependently reduced the PGDF-
221 BB-induced proliferation of PF-HP, PF-sarcoidosis and PPFE HLFs. At 100 nM, nintedanib
222 totally inhibited the proliferation of all PF-ILD HLFs.

223 **3.3 Nintedanib prevented PDGF-BB-induced migration of PF-HP, PF-sarcoidosis and**
224 **PPFE HLFs.**

225 The migratory cell dynamic is another important function involved in the formation of
226 fibroblastic foci and self-sustaining fibrosis [15,16]. Besides proliferation, PDGF-BB also
227 promotes cell migration through its chemoattractant properties. Figure 3 shows that PDGF-BB
228 significantly increased the migration of the different PF-ILD HLFs. Nintedanib significantly
229 decreased, in a concentration-dependent manner, the migration of PF-HP, PF-sarcoidosis and
230 PPFE stimulated with PDGF-BB. Significant inhibition started at 30 nM and reduction close to
231 baseline was reached at 300 nM. Similarly, the drug strongly reduced the migration of IPF and
232 control HLFs cultured with PDGF-BB (Supplemental Fig. 1 F, H).

233 **3.4 Nintedanib diminished TGF- β 1-induced fibroblast to myofibroblast transition of**
234 **PF-HP, PF-sarcoidosis and PPFE HLFs.**

235 The canonical TGF- β signaling pathway, mediated by the signal transducers and
236 transcriptional modulators SMAD2 and SMAD3, drives the production of myogenic markers
237 linked to myofibroblast differentiation. This signaling pathway controls fibrogenesis by
238 regulating the production of ECM and the development of contractile actin stress fibers. In
239 order to study the effects of nintedanib on the fibroblast to myofibroblast transition, PF-HP, PF-
240 sarcoidosis and PPFE HLFs were treated with the drug for 3 h and then stimulated with TGF-
241 β 1 for the next 24 hours. Figure 4 shows that TGF- β 1 induced the phosphorylation of SMAD2
242 and SMAD3 proteins in all three PF-ILD HLFs (Fig. 4). The cytokine also strongly increased
243 the production of the myofibroblastic markers fibronectin, collagen-1 (COL1) and α -smooth-
244 muscle actin (α -SMA), at both mRNA (Fig. 5) and protein levels (Fig. 6). In these conditions,
245 nintedanib weakly reduced the phosphorylation of SMAD 2/3 in PF-ILD HLFs. Its effects were
246 only significant when nintedanib was used at its highest concentration (1 μ M) (Fig. 4).
247 Similarly, nintedanib poorly limited the expression of the different myofibroblastic markers, at

248 both mRNA and protein levels in non-IPF HLFs (Figures 5 and 6), as well as in IPF and control
249 HLFs (Supplementary Fig. 2). Nintedanib significantly reduced the *FIBRONECTIN*, *COL1A1*
250 and *ACTA2* mRNA levels in PF-HP and PPFE HLFs, mainly at its highest concentration (1
251 μM), and it only prevented the *FIBRONECTIN* gene expression in PF-sarcoidosis HLFs. In
252 addition, 1 μM nintedanib prevented the expression of fibronectin, COL1 and α -SMA in PF-
253 HP HLFs (Fig. 6). At this concentration, the drug also significantly reduced α -SMA protein
254 levels in PF-sarcoidosis and PPFE HLFs. However, nintedanib had no significant effect on
255 COL1 levels in these two cell types. As expected, high drug concentrations significantly
256 prevented protein expression of the three myofibroblastic markers in IPF and control HLFs
257 (Supplemental Fig. 2 C-D and G-H).

258

259 **4. Discussion**

260 Our study demonstrates for the first time that the tyrosine kinase inhibitor nintedanib, used
261 *in vitro* at pharmacologically relevant concentrations, reduced the proliferation, migration and
262 differentiation of primary HLFs derived from progressive fibrosing (PF)-HP, PF-sarcoidosis
263 and PPFE HLFs.

264 Several reports have previously shown that nintedanib could modulate different signalling
265 pathways and pro-fibrotic functions in HLFs isolated from patients with IPF [17–19] or with
266 systemic sclerosis-associated ILD (SSc-ILD) [20]. The present results show that nintedanib also
267 exerts potent *in vitro* antifibrotic effects on HLFs deriving from patients with three other ILDs
268 that could be associated with a progressive fibrosing phenotype, i.e fibrosing HP, sarcoidosis
269 and PPFE. As described in IPF HLFs, nintedanib strongly inhibited the PDGFR-dependent
270 signaling pathways in the three types of HLFs [19]. Our results suggest that low drug
271 concentrations (30-100 nM) significantly and similarly prevented the proliferation and
272 migration of PF-HP, PF-sarcoidosis and PPFE HLF stimulated with PDGF-BB. Moreover,

273 these concentrations are equivalent to those inhibiting the proliferation and migration of IPF-
274 HLFs [19] and SSc-ILD HLFs [20]. Consequently, nintedanib seems to be equally active to
275 block PDGF effects in IPF and non-IPF HLFs.

276 In addition, we demonstrated that nintedanib partially blocked the switch of fibroblasts to
277 myofibroblasts induced by TGF- β 1 in PF-HP, PF-sarcoidosis and PPFE HLFs. During this step,
278 HLFs gain the expression of contractile and ECM proteins. Specifically, the production of α -
279 SMA allows the contraction of myofibroblasts and contributes to the matrix stiffening [21].
280 Nintedanib significantly reduced the TGF- β 1-induced expression of α -SMA in the three PF-
281 ILD HLFs, but its effects were more potent in PF-HP HLF. In addition, we show that nintedanib
282 specifically reduced COL1 expression in PF-HP HLFs. The production and secretion of
283 collagen is another critical event conferring the stiffness of fibrotic lung tissues. In viable
284 precision-cut lung slices from bleomycin-treated rats and IPF patients, nintedanib modulates
285 type III collagen turnover [22]. In IPF HLFs, nintedanib also inhibited COL1 fibril formation
286 and altered the appearance of collagen fibril bundles [23]. As reported for IPF [17,18] and SSc-
287 ILD HLFs [20], our results clearly show that the concentrations of nintedanib required to block
288 the myofibroblast differentiation are higher than those preventing proliferation and migration
289 of HLFs. Indeed, COL1 and α -SMA expressions were only significantly reduced in HLFs
290 treated with 1 μ M nintedanib. The reasons why different ranges of concentrations of nintedanib
291 are necessary to prevent the proliferation and migration of HLFs on the one hand and the
292 differentiation of HLFs on the other hand remain still unclear since the half maximal inhibitory
293 concentrations of nintedanib for the PDGFR and TGF- β 1 receptor tyrosine kinases are very
294 similar [24,25].

295 It was recently discussed that the fibrotic process controlling the development of non-IPF
296 PF-ILD may be similar to those involved in the progression of IPF [2,7,26,27]. Different recent
297 reports are in agreement with this hypothesis. In fibrotic HP, a single-cell transcriptional

298 analysis had identified a subpopulation of fibroblasts with a high expression of *ACTA2* or
299 *COL1A1* [28]. In fibrotic lung tissues of patients with sarcoidosis, gene and protein expressions
300 in fibroblastic foci were quite similar to those detected in patients with IPF [29]. PPFE, a very
301 rare subtype of interstitial pneumonia [30] is also characterized by the development of an elastic
302 fibre-rich fibrosis in pulmonary parenchyma. The fact that nintedanib similarly inhibited major
303 fibroblastic functions in IPF and other PF-ILD HLFs also supports a common mechanism of
304 fibrogenesis in these heterogeneous fibrotic ILDs. Finally, our results suggest that nintedanib
305 may prevent the decline in lung function in most PF-ILDs, including PPFE, by inhibiting the
306 main functions of HLFs [31].

307 **5. Conclusion**

308 In conclusion, we found that nintedanib, used at pharmacologically relevant concentrations,
309 counteracts *in vitro* key fibrotic functions of lung fibroblasts isolated from patients with PF-
310 HP, PF-sarcoidosis and PPFE. These cellular and molecular effects are likely to contribute to
311 its clinical benefit in patients suffering from these irreversible ILDs.

312

313

314

315 **6. Authorship contributions**

316 *Conceptualization:* AJ, LV, SJ conceived and designed the study.

317 *Performed data analysis:* AJ, CM, TV performed the experiments. AJ analyzed and interpreted
318 the data.

319 *Resources:* FLG, DCC, CLN, BDLT, SR provided lung biopsy. SG and AL provide clinical
320 data. MJ and BC provided HLFs.

321 *Writing - review & editing:* AJ, LV, SJ and LW.

322 All authors read and approved the final manuscript.

323

324

325 **7. References**

- 326 [1] M. Kolb, M. Vašáková, The natural history of progressive fibrosing interstitial lung
327 diseases, *Respir. Res.* 20 (2019) 57. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1022-1>.
- 328 [2] M. Wijsenbeek, V. Cottin, Spectrum of Fibrotic Lung Diseases, *N. Engl. J. Med.* 383
329 (2020) 958–968. <https://doi.org/10.1056/NEJMra2005230>.
- 330 [3] V. Cottin, N.A. Hirani, D.L. Hotchkin, A.M. Nambiar, T. Ogura, M. Otaola, D. Skowasch,
331 J.S. Park, H.K. Poonyagariyagorn, W. Wuyts, A.U. Wells, Presentation, diagnosis and
332 clinical course of the spectrum of progressive-fibrosing interstitial lung diseases, *Eur.*
333 *Respir. Rev. Off. J. Eur. Respir. Soc.* 27 (2018). [https://doi.org/10.1183/16000617.0076-](https://doi.org/10.1183/16000617.0076-2018)
334 2018.
- 335 [4] V. Cottin, R. Teague, L. Nicholson, S. Langham, M. Baldwin, The Burden of Progressive-
336 Fibrosing Interstitial Lung Diseases, *Front. Med.* 9 (2022) 799912.
337 <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.799912>.
- 338 [5] V. Cottin, C. Valenzuela, Progressive pulmonary fibrosis: all roads lead to Rome (but not
339 all at the same speed), *Eur. Respir. J.* 60 (2022). [https://doi.org/10.1183/13993003.01449-](https://doi.org/10.1183/13993003.01449-2022)
340 2022.
- 341 [6] A. Olson, N. Hartmann, P. Patnaik, L. Wallace, R. Schlenker-Herceg, M. Nasser, L.
342 Richeldi, A.-M. Hoffmann-Vold, V. Cottin, Estimation of the Prevalence of Progressive
343 Fibrosing Interstitial Lung Diseases: Systematic Literature Review and Data from a
344 Physician Survey, *Adv. Ther.* 38 (2021) 854–867. [https://doi.org/10.1007/s12325-020-](https://doi.org/10.1007/s12325-020-01578-6)
345 01578-6.
- 346 [7] M. Selman, A. Pardo, When things go wrong: Exploring possible mechanisms driving the
347 progressive fibrosis phenotype in interstitial lung diseases, *Eur. Respir. J.* (2021).
348 <https://doi.org/10.1183/13993003.04507-2020>.
- 349 [8] K.R. Flaherty, A.U. Wells, V. Cottin, A. Devaraj, S.L.F. Walsh, Y. Inoue, L. Richeldi, M.
350 Kolb, K. Tetzlaff, S. Stowasser, C. Coeck, E. Clerisme-Beaty, B. Rosenstock, M.
351 Quaresma, T. Haeufel, R.-G. Goeldner, R. Schlenker-Herceg, K.K. Brown, INBUILD
352 Trial Investigators, Nintedanib in Progressive Fibrosing Interstitial Lung Diseases, *N.*
353 *Engl. J. Med.* 381 (2019) 1718–1727. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1908681>.
- 354 [9] A.U. Wells, K.R. Flaherty, K.K. Brown, Y. Inoue, A. Devaraj, L. Richeldi, T. Moua, B.
355 Crestani, W.A. Wuyts, S. Stowasser, M. Quaresma, R.-G. Goeldner, R. Schlenker-Herceg,
356 M. Kolb, INBUILD trial investigators, Nintedanib in patients with progressive fibrosing
357 interstitial lung diseases-subgroup analyses by interstitial lung disease diagnosis in the
358 INBUILD trial: a randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group trial,
359 *Lancet Respir. Med.* 8 (2020) 453–460. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30036-9](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30036-9).
- 360 [10] L. Wollin, E. Wex, A. Pautsch, G. Schnapp, K.E. Hostettler, S. Stowasser, M. Kolb, Mode
361 of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis, *Eur. Respir. J.*
362 45 (2015) 1434–1445. <https://doi.org/10.1183/09031936.00174914>.
- 363 [11] S. Marchand-Adam, J. Marchal, M. Cohen, P. Soler, B. Gerard, Y. Castier, G. Lesèche,
364 D. Valeyre, H. Mal, M. Aubier, M. Dehoux, B. Crestani, Defect of hepatocyte growth
365 factor secretion by fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis, *Am. J. Respir. Crit. Care*
366 *Med.* 168 (2003) 1156–1161. <https://doi.org/10.1164/rccm.200212-1514OC>.
- 367 [12] G. Raghu, M. Remy-Jardin, L. Richeldi, C.C. Thomson, Y. Inoue, T. Johkoh, M. Kreuter,
368 D.A. Lynch, T.M. Maher, F.J. Martinez, M. Molina-Molina, J.L. Myers, A.G. Nicholson,
369 C.J. Ryerson, M.E. Streck, L.K. Troy, M. Wijsenbeek, M.J. Mammen, T. Hossain, B.D.
370 Bissell, D.D. Herman, S.M. Hon, F. Kheir, Y.H. Khor, M. Macrea, K.M. Antoniou, D.
371 Bourros, I. Buendia-Roldan, F. Caro, B. Crestani, L. Ho, J. Morisset, A.L. Olson, A.
372 Podolanczuk, V. Poletti, M. Selman, T. Ewing, S. Jones, S.L. Knight, M. Ghazipura, K.C.
373 Wilson, Idiopathic Pulmonary Fibrosis (an Update) and Progressive Pulmonary Fibrosis

- 374 in Adults: An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline, *Am. J. Respir.*
375 *Crit. Care Med.* 205 (2022) e18–e47. <https://doi.org/10.1164/rccm.202202-0399ST>.
- 376 [13] G. Raghu, M. Remy-Jardin, J.L. Myers, L. Richeldi, C.J. Ryerson, D.J. Lederer, J. Behr,
377 V. Cottin, S.K. Danoff, F. Morell, K.R. Flaherty, A. Wells, F.J. Martinez, A. Azuma, T.J.
378 Bice, D. Bouros, K.K. Brown, H.R. Collard, A. Duggal, L. Galvin, Y. Inoue, R.G. Jenkins,
379 T. Johkoh, E.A. Kazerooni, M. Kitaichi, S.L. Knight, G. Mansour, A.G. Nicholson, S.N.J.
380 Pipavath, I. Buendía-Roldán, M. Selman, W.D. Travis, S. Walsh, K.C. Wilson, American
381 Thoracic Society, European Respiratory Society, Japanese Respiratory Society, and Latin
382 American Thoracic Society, Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official
383 ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 198
384 (2018) e44–e68. <https://doi.org/10.1164/rccm.201807-1255ST>.
- 385 [14] M. Hetzel, M. Bachem, D. Anders, G. Trischler, M. Faehling, Different Effects of Growth
386 Factors on Proliferation and Matrix Production of Normal and Fibrotic Human Lung
387 Fibroblasts, *Lung.* 183 (2005) 225–237. <https://doi.org/10.1007/s00408-004-2534-z>.
- 388 [15] T.E. King, A. Pardo, M. Selman, Idiopathic pulmonary fibrosis, *Lancet Lond. Engl.* 378
389 (2011) 1949–1961. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60052-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60052-4).
- 390 [16] M. Chilosi, A. Zamò, C. Doglioni, D. Reghellin, M. Lestani, L. Montagna, S. Pedron,
391 M.G. Ennas, A. Cancellieri, B. Murer, V. Poletti, Migratory marker expression in
392 fibroblast foci of idiopathic pulmonary fibrosis, *Respir. Res.* 7 (2006) 95.
393 <https://doi.org/10.1186/1465-9921-7-95>.
- 394 [17] K.E. Hostettler, J. Zhong, E. Papakonstantinou, G. Karakiulakis, M. Tamm, P. Seidel, Q.
395 Sun, J. Mandal, D. Lardinois, C. Lambers, M. Roth, Anti-fibrotic effects of nintedanib in
396 lung fibroblasts derived from patients with idiopathic pulmonary fibrosis, *Respir. Res.* 15
397 (2014) 157. <https://doi.org/10.1186/s12931-014-0157-3>.
- 398 [18] S. Rangarajan, A. Kurundkar, D. Kurundkar, K. Bernard, Y.Y. Sanders, Q. Ding, V.B.
399 Antony, J. Zhang, J. Zmijewski, V.J. Thannickal, Novel Mechanisms for the Antifibrotic
400 Action of Nintedanib, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 54 (2016) 51–59.
401 <https://doi.org/10.1165/rcmb.2014-0445OC>.
- 402 [19] L. Wollin, I. Maillet, V. Quesniaux, A. Holweg, B. Ryffel, Antifibrotic and anti-
403 inflammatory activity of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib in experimental models
404 of lung fibrosis, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 349 (2014) 209–220.
405 <https://doi.org/10.1124/jpet.113.208223>.
- 406 [20] I. Atanelishvili, T. Akter, A. Noguchi, O. Vuyiv, L. Wollin, R.M. Silver, G.S.
407 Bogatkevich, Antifibrotic efficacy of nintedanib in a cellular model of systemic sclerosis-
408 associated interstitial lung disease, *Clin. Exp. Rheumatol.* 37 Suppl 119 (2019) 115–124.
- 409 [21] S. Asano, S. Ito, K. Takahashi, K. Furuya, M. Kondo, M. Sokabe, Y. Hasegawa, Matrix
410 stiffness regulates migration of human lung fibroblasts, *Physiol. Rep.* 5 (2017) e13281.
411 <https://doi.org/10.14814/phy2.13281>.
- 412 [22] C. Hesse, V. Beneke, S. Konzok, C. Diefenbach, J.M. Bülow Sand, S.R. Rønnow, M.A.
413 Karsdal, D. Jonigk, K. Sewald, A. Braun, D.J. Leeming, L. Wollin, Nintedanib modulates
414 type III collagen turnover in viable precision-cut lung slices from bleomycin-treated rats
415 and patients with pulmonary fibrosis, *Respir. Res.* 23 (2022) 201.
416 <https://doi.org/10.1186/s12931-022-02116-4>.
- 417 [23] L. Knüppel, Y. Ishikawa, M. Aichler, K. Heinzelmann, R. Hatz, J. Behr, A. Walch, H.P.
418 Bächinger, O. Eickelberg, C.A. Staab-Weijnitz, A Novel Antifibrotic Mechanism of
419 Nintedanib and Pirfenidone. Inhibition of Collagen Fibril Assembly, *Am. J. Respir. Cell*
420 *Mol. Biol.* 57 (2017) 77–90. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0217OC>.
- 421 [24] F. Hilberg, G.J. Roth, M. Krssak, S. Kautschitsch, W. Sommergruber, U. Tontsch-Grunt,
422 P. Garin-Chesa, G. Bader, A. Zoepfel, J. Quant, A. Heckel, W.J. Rettig, BIBF 1120: triple

- 423 angiokinase inhibitor with sustained receptor blockade and good antitumor efficacy,
424 *Cancer Res.* 68 (2008) 4774–4782. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6307>.
- 425 [25] F. Hilberg, U. Tontsch-Grunt, A. Baum, A.T. Le, R.C. Doebele, S. Lieb, D. Gianni, T.
426 Voss, P. Garin-Chesa, C. Haslinger, N. Kraut, Triple Angiokinase Inhibitor Nintedanib
427 Directly Inhibits Tumor Cell Growth and Induces Tumor Shrinkage via Blocking
428 Oncogenic Receptor Tyrosine Kinases, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 364 (2018) 494–503.
429 <https://doi.org/10.1124/jpet.117.244129>.
- 430 [26] K.K. Brown, F.J. Martinez, S.L.F. Walsh, V.J. Thannickal, A. Prasse, R. Schlenker-
431 Herceg, R.-G. Goeldner, E. Clerisme-Beaty, K. Tetzlaff, V. Cottin, A.U. Wells, The
432 natural history of progressive fibrosing interstitial lung diseases, *Eur. Respir. J.* 55 (2020).
433 <https://doi.org/10.1183/13993003.00085-2020>.
- 434 [27] V. Cottin, L. Wollin, A. Fischer, M. Quaresma, S. Stowasser, S. Harari, Fibrosing
435 interstitial lung diseases: knowns and unknowns, *Eur. Respir. Rev. Off. J. Eur. Respir.*
436 *Soc.* 28 (2019). <https://doi.org/10.1183/16000617.0100-2018>.
- 437 [28] J. Wang, L. Zhang, L. Luo, P. He, A. Xiong, M. Jiang, Y. Liu, S. Liu, Q. Ran, D. Wu, Y.
438 Xiong, X. He, G. Li, Characterizing cellular heterogeneity in fibrotic hypersensitivity
439 pneumonitis by single-cell transcriptional analysis, *Cell Death Discov.* 8 (2022) 38.
440 <https://doi.org/10.1038/s41420-022-00831-x>.
- 441 [29] J.C. Kamp, L. Neubert, H. Stark, J.B. Hinrichs, C. Boekhoff, A.D. Seidel, F. Ius, A.
442 Haverich, J. Gottlieb, T. Welte, P. Braubach, F. Laenger, M.M. Hoeper, M.P. Kuehnel,
443 D.D. Jonigk, Comparative Analysis of Gene Expression in Fibroblastic Foci in Patients
444 with Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Pulmonary Sarcoidosis, *Cells.* 11 (2022) 664.
445 <https://doi.org/10.3390/cells11040664>.
- 446 [30] V. Cottin, S. Si-Mohamed, R. Diesler, P. Bonniaud, C. Valenzuela, Pleuroparenchymal
447 fibroelastosis, *Curr. Opin. Pulm. Med.* 28 (2022) 432–440.
448 <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000907>.
- 449 [31] M. Nasser, S. Si-Mohamed, S. Turquier, J. Traclet, K. Ahmad, F. Philit, P. Bonniaud, L.
450 Chalabreysse, F. Thivolet-Béjui, V. Cottin, Nintedanib in idiopathic and secondary
451 pleuroparenchymal fibroelastosis, *Orphanet J. Rare Dis.* 16 (2021) 419.
452 <https://doi.org/10.1186/s13023-021-02043-5>.

453

454

455 **8. Funding**

456 This work was supported by The Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
457 (INSERM), the Université de Rennes (Univ Rennes) and Boehringer Ingelheim (BI). BI had no
458 role in the design, analysis or interpretation of the results in this study. BI was given the
459 opportunity to review the manuscript for medical and scientific accuracy as it relates to BI
460 substances, as well as intellectual property considerations.

461 **9. Competing interests**

462 SJ has received fees, funding or reimbursement for national and international conferences,
463 boards, expert or opinion groups, research projects over the past 5 years from Actelion, AIRB,
464 Astra Zeneca, Bellorophon Therapeutics, Biogen, BMS, Boehringer Ingelheim, Chiesi,
465 Fibrogen, Galecto Biotech, Genzyme, Gilead, GSK, LVL, Mundipharma, Novartis, Olam
466 Pharm, Pfizer, Pliant Therapeutics, Roche, Sanofi, Savara. AJ and LV report grants from
467 Boehringer Ingelheim. LW is an employee of Boehringer Ingelheim. The other authors declare
468 that they have no competing interests.

469

470

471 **10. Figure Legends**

472 **Figure 1. Nintedanib blocked the PDGFR signalling pathway in PF-HP, PF-sarcoidosis**
473 **and PPFE HLFs.**

474 PF-HP (n=7), PF-sarcoidosis (n=5) and PPFE (n=4) HLFs were treated with 0.01-0.3 μ M
475 nintedanib for 3 h and then stimulated with 25 ng/ml PDGF-BB for 10 min. **A,C,E.**
476 Representative Western blots showing the phosphorylation of PDGF receptor and ERK. **B, D,**
477 **F.** Proteins were quantified by densitometry and then normalized to GAPDH. The fold change
478 in the levels of phosphorylated proteins found in stimulated cells was compared to the levels of
479 phosphorylated proteins measured in untreated cells, arbitrarily set at 1. Results are expressed
480 as means \pm SEM of 4-7 independent experiments. Significant differences were determined by
481 ANOVA followed by the Dunnett's multiple comparison *t*-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ***
482 $p < 0.001$). NTD: nintedanib

483 **Figure 2. Nintedanib blocked the proliferation of PF-HP, PF-sarcoidosis and PPFE HLFs**
484 **stimulated with PDGF-BB.**

485 PF-HP (n=7) (**A**), PF- sarcoidosis (n=5) (**B**) and PPFE (n=4) (**C**) HLFs were treated with
486 0.01-0.3 μ M nintedanib for 3 h and then stimulated with 50 ng/ml PDGF-BB for 72 h. Cell
487 proliferation was determined by the fluorescent acridine orange/propidium iodide staining and
488 automated fluorescence cell counting. The relative cell proliferation was calculated by dividing
489 the number of viable cells treated with nintedanib +/- PDGF-BB by the number of viable
490 untreated cells, which was arbitrarily set at 1. All results are expressed as means \pm SEM of 4-7
491 independent experiments. Significant differences were determined by ANOVA followed by the
492 Dunnett's multiple comparison *t*-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). NTD: nintedanib

493

494 **Figure 3. Nintedanib decreased the PDGF-BB-induced migration of PF HP, sarcoidosis**
495 **and PPFE HLFs.**

496 PF-HP (n=7) (A), PF-sarcoidosis (n=5) (B) and PPFE (n=4) (C) HLFs were treated with 0.01-
497 0.3 μ M nintedanib for 24 h along with 25 ng/ml PDGF-BB, used as a chemoattractant to induce
498 cell migration. The relative cell migration was calculated by dividing the number of migrating
499 cells treated with nintedanib +/- PDGF-BB by the number of untreated migrating cells,
500 arbitrarily set at 1. Values are expressed as means \pm SEM of 4-7 independent experiments.
501 Significant differences were determined by ANOVA followed by the Dunnett's multiple
502 comparison *t*-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

503 **Figure 4. Nintedanib attenuated the phosphorylation of SMAD2/3 induced by TGF- β 1 in**
504 **PF-HP, PF-sarcoidosis and PPFE HLFs.**

505 PF-HP (n=7), PF-sarcoidosis (n=5) and PPFE (n=4) HLFs were treated with 0.01-1 μ M
506 nintedanib for 3 h and then stimulated with 1 ng/ml TGF- β 1 for 30 min. A, C, E. Representative
507 Western blots showing the phosphorylation of SMAD2 and SMAD3. B, D, F. Proteins were
508 quantified by densitometry and then normalized to the GAPDH. The fold change in the levels
509 of phosphorylated proteins found in stimulated cells was determined by arbitrarily setting at 1
510 the levels of phosphorylated proteins measured in untreated cells. Results are expressed as
511 means \pm SEM of 4-7 independent experiments. Significant differences were determined by
512 ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison *t*-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$).

513 NTD: nintedanib

514 **Figure 5. Nintedanib decreased the mRNA levels of myofibroblastic markers in PF-HP,**
515 **PF-sarcoidosis and PPFE HLFs stimulated with TGF- β 1.**

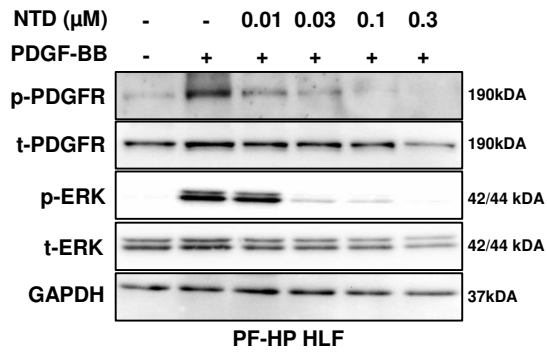
516 PF-HP (n=7), PF-sarcoidosis (n=5) and PPFE (n=4) HLFs were treated with 0.01-1 μ M
517 nintedanib for 3 h and then stimulated with 1 ng/ml TGF- β 1 for 24 h. A, B, C. Relative
518 *FIBRONECTIN*, *COL1A1* and *ACTA2* mRNA levels were measured by quantitative RT-PCR
519 and normalized to endogenous ribosomal *18S* mRNA levels. Data are expressed relatively to
520 the mRNA levels founds in unstimulated HLFs, arbitrarily set at 1. Results are expressed as

521 means \pm SEM of 4-7 independent experiments. Significant differences were determined by
522 ANOVA followed by Dunnett's Multiple comparison *t*-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ***
523 $p < 0.001$). NTD: nintedanib

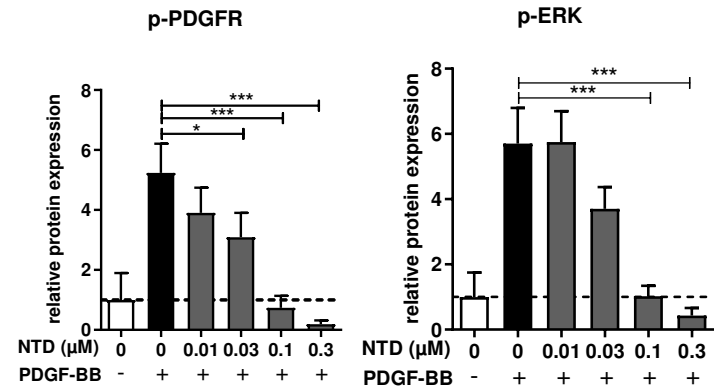
524 **Figure 6. Nintedanib decreased the TGF- β 1-induced differentiation of PF-HP, PF-**
525 **sarcoidosis and PPFE HLFs.**

526 PF-HP (n=7), PF-sarcoidosis (n=6) and PPFE (n=4) HLFs were treated with 0.01-1 μ M NTD
527 for 3 h and then stimulated with 1 ng/ml TGF- β 1 for 24 h. **A, C, E.** Representative Western
528 blots of Fibronectin (FN), collagen-1 (COL1) and α -SMA. **B, D, F.** Protein levels were
529 quantified by densitometry and normalized to the GAPDH levels. The fold change in protein
530 expression in stimulated cells was determined by arbitrarily setting at 1 the protein expression
531 measured in untreated cells. Results are expressed as means \pm SEM of 4-7 independent
532 experiments. Significant differences were determined by ANOVA followed by the Dunnett's
533 multiple comparison *t*-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). NTD: nintedanib

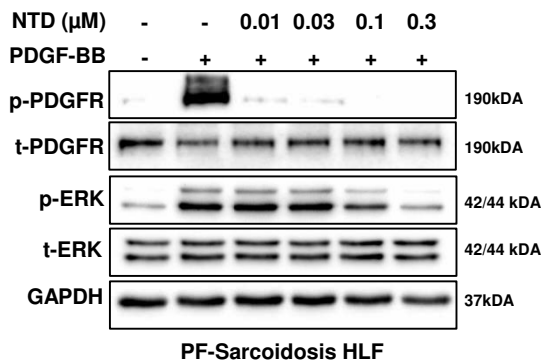
A



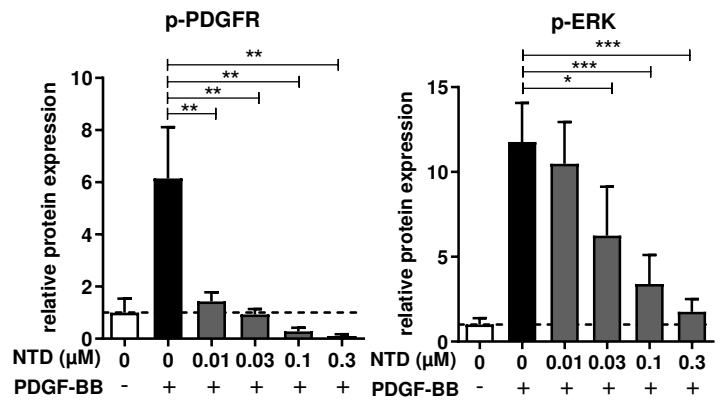
B



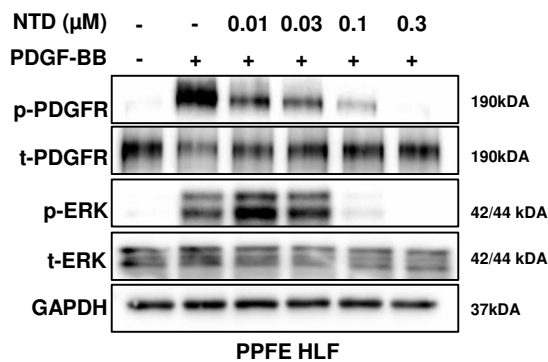
C



D



E



F

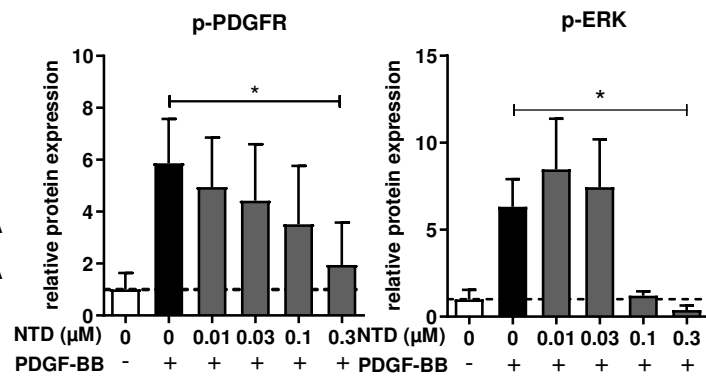


Figure 2

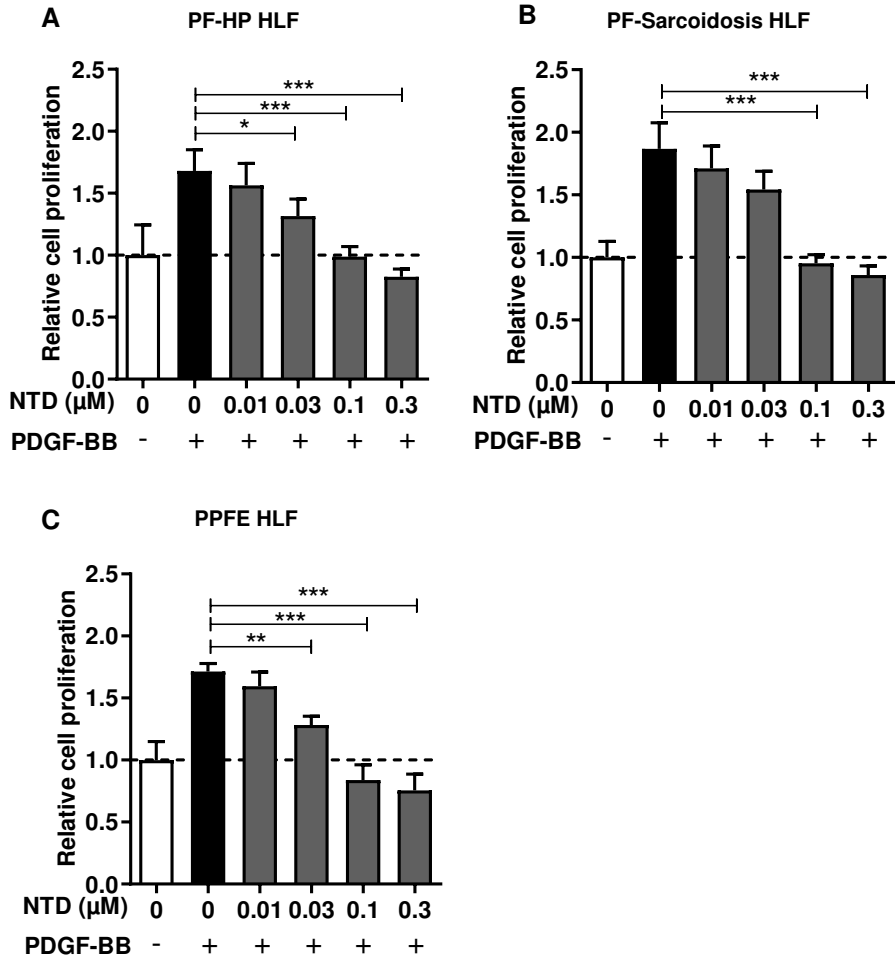


Figure 3

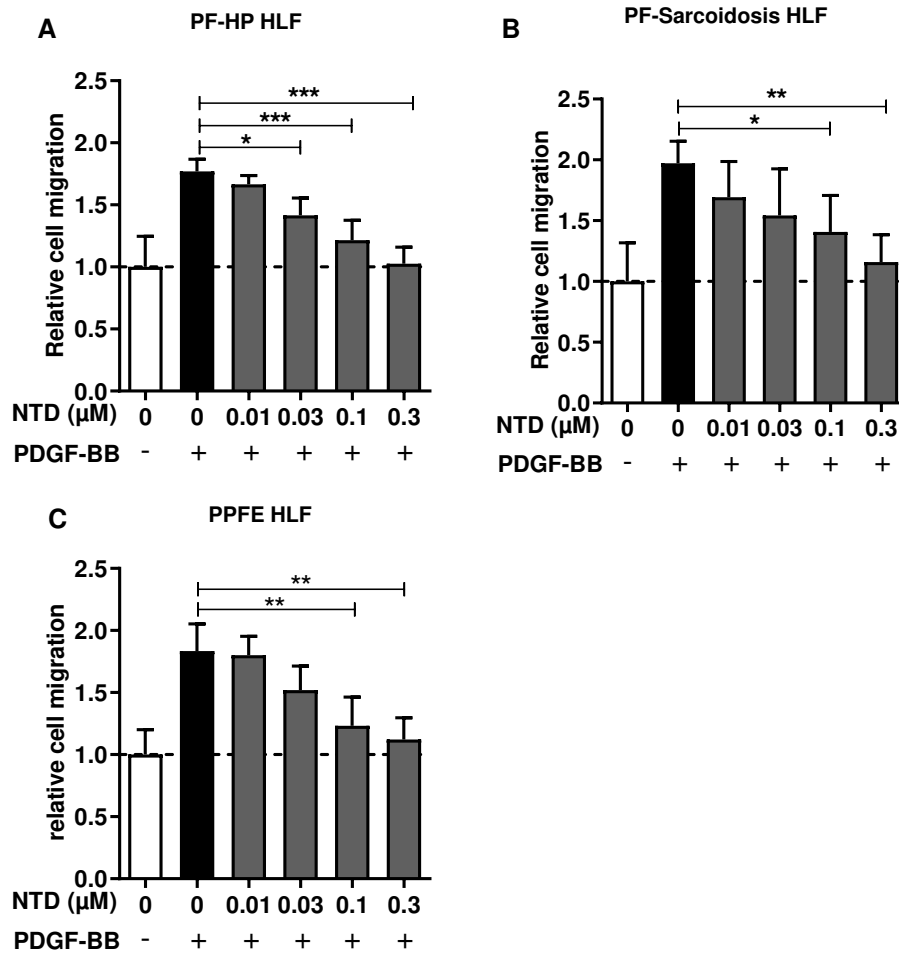


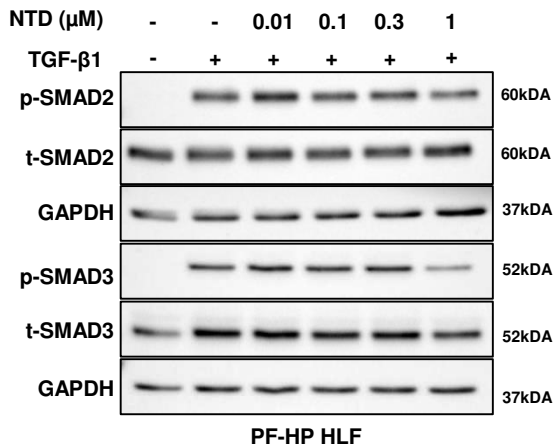
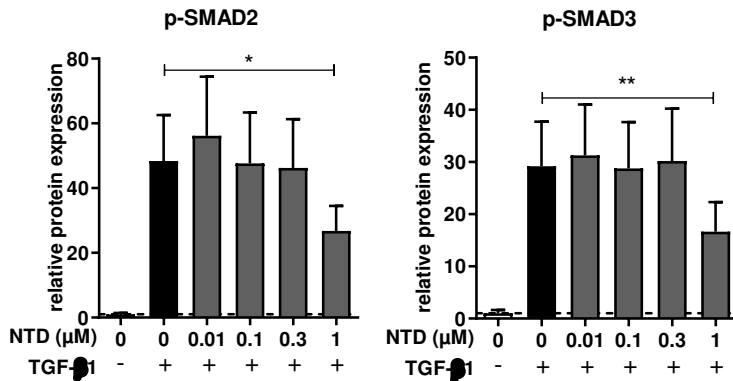
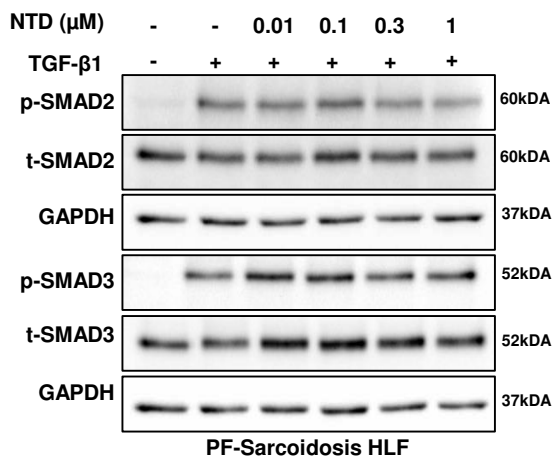
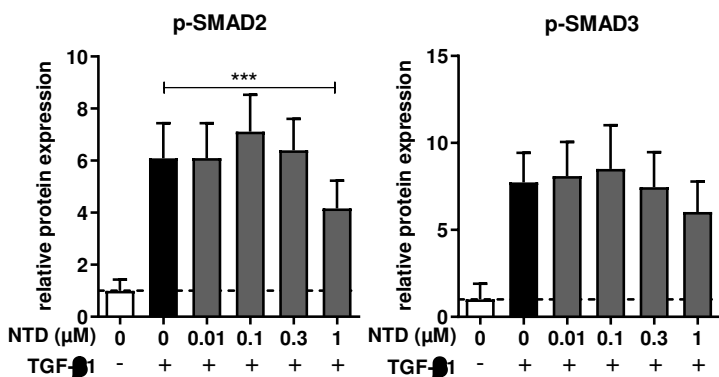
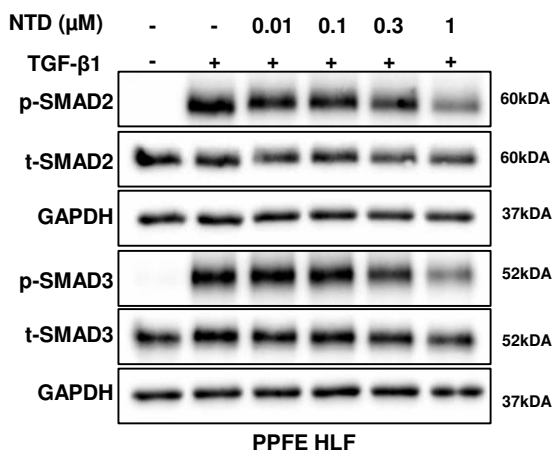
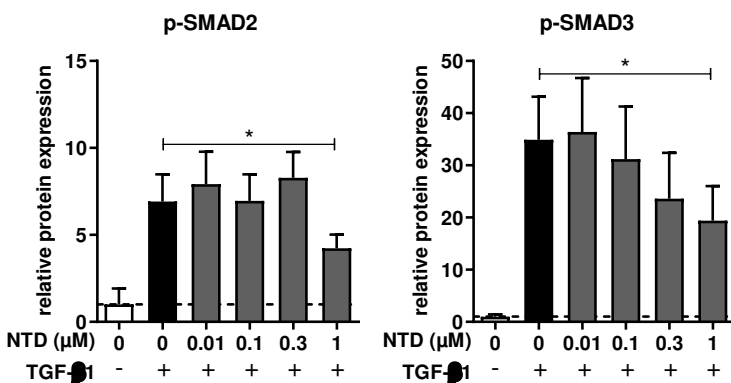
Figure 4**A****B****C****D****E****F**

Figure 5

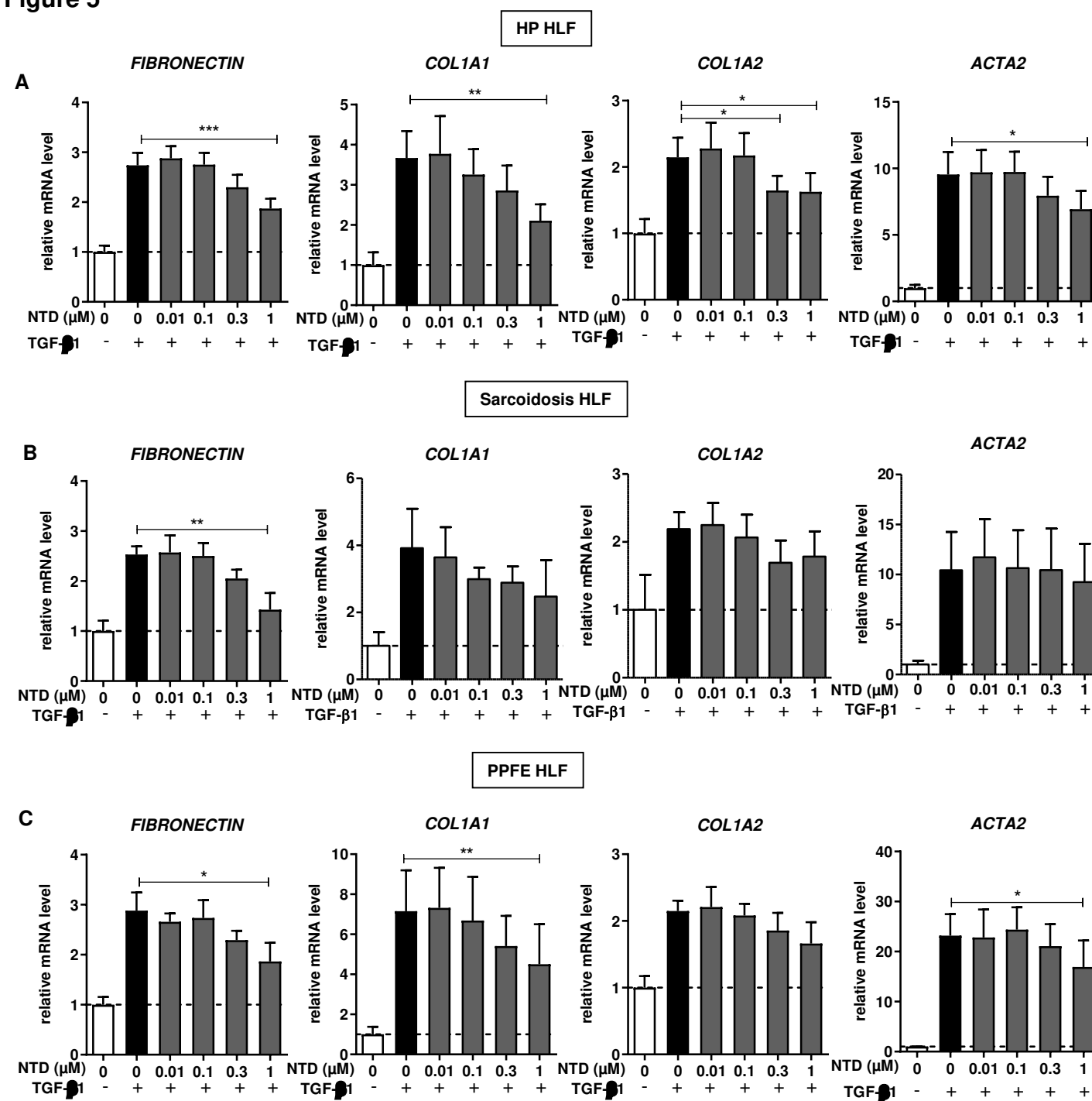
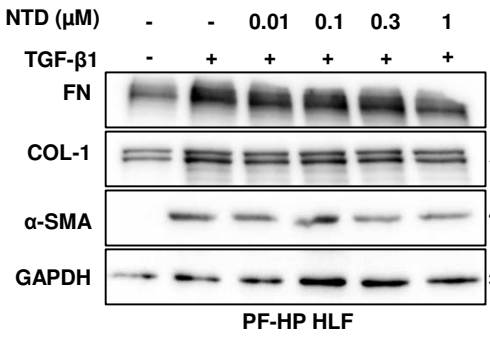
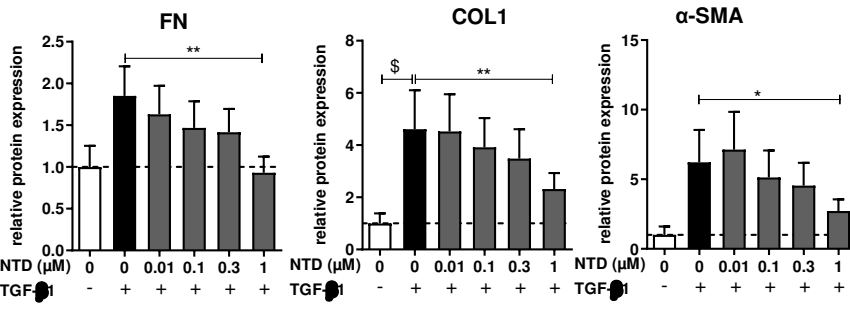


Figure 6

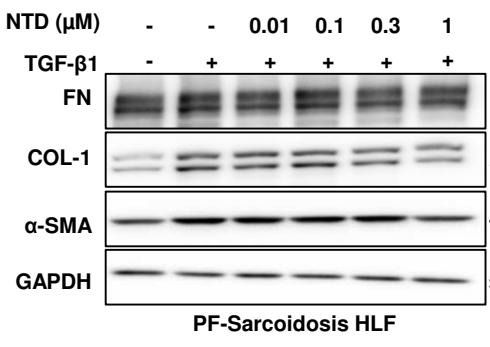
A



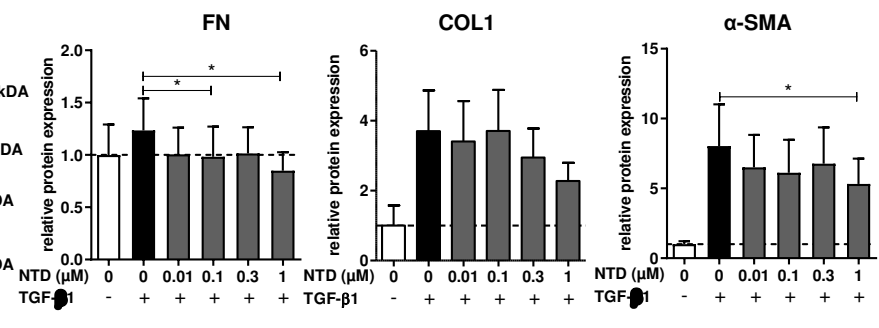
B



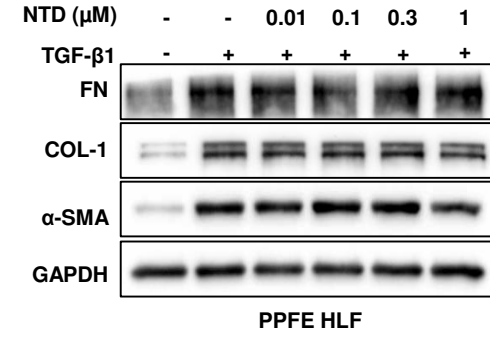
C



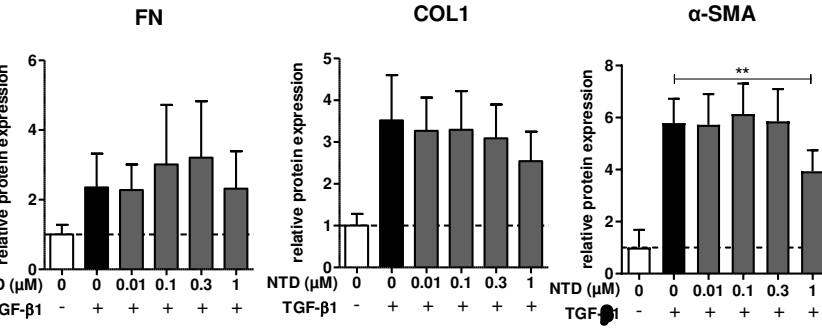
D



E



F

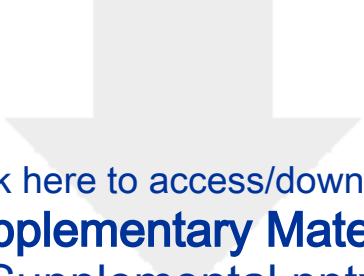


Declaration of interests

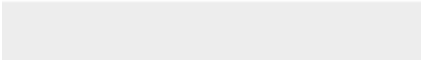

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

Laurent Vernhet reports financial support was provided by Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG Biberach.



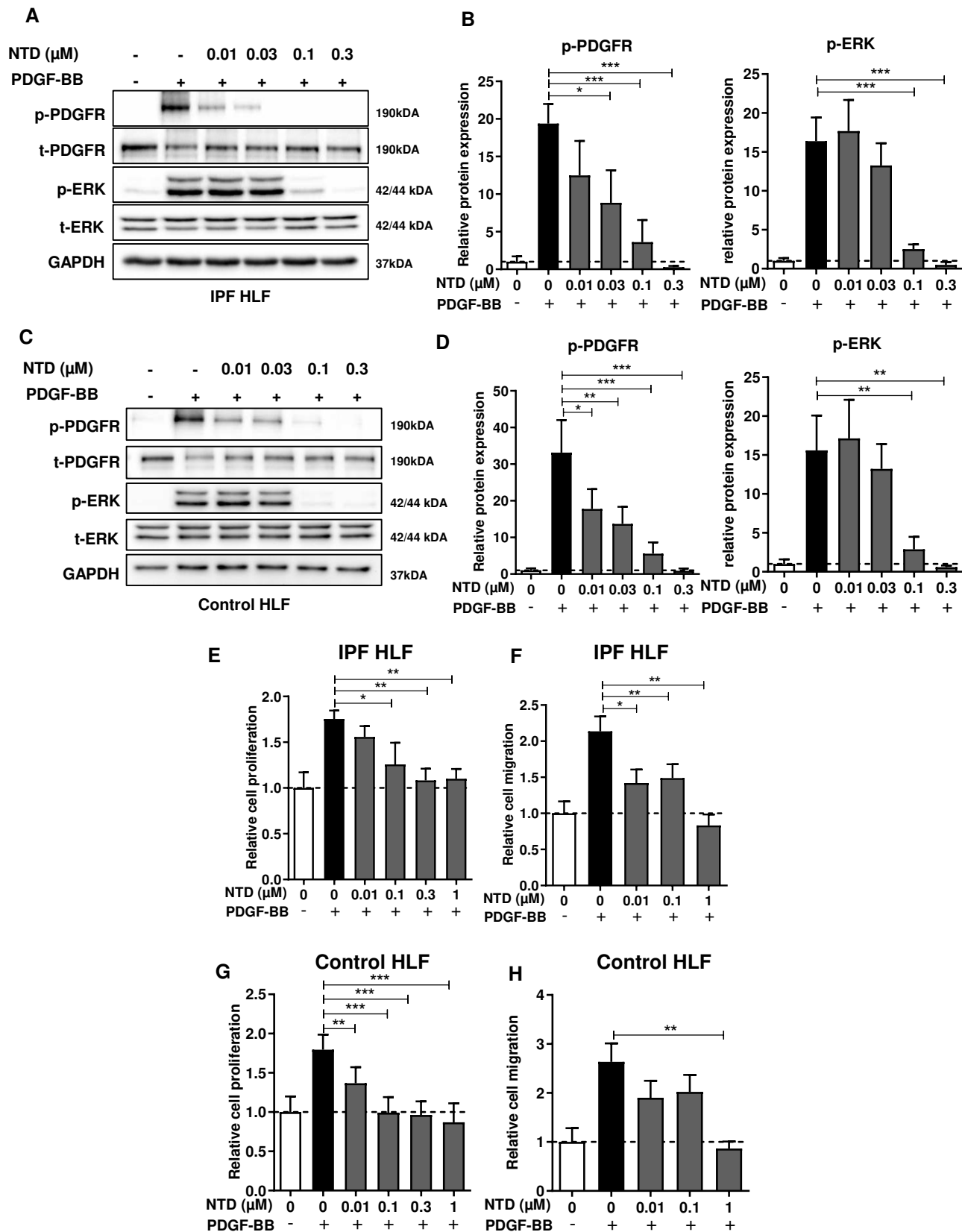
Click here to access/download
Supplementary Material
Supplemental.pptx



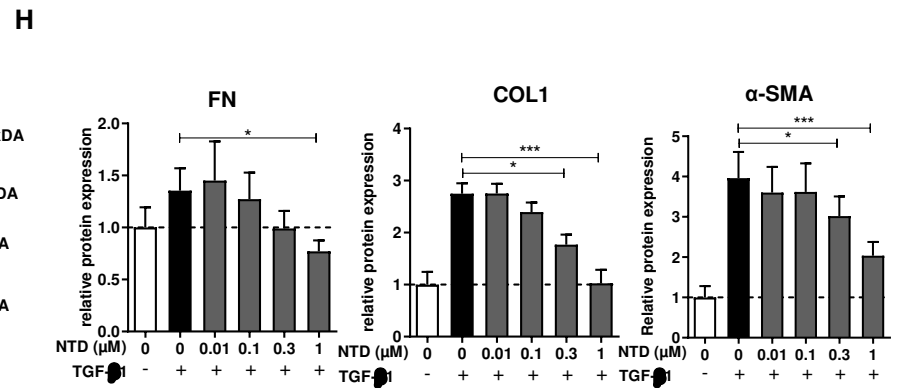
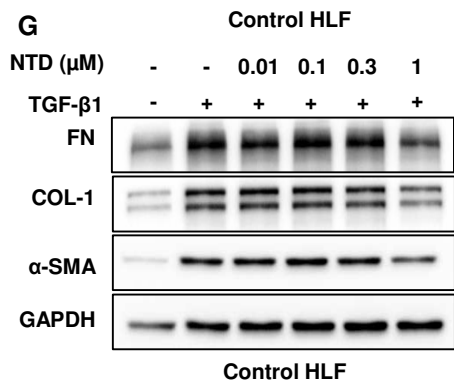
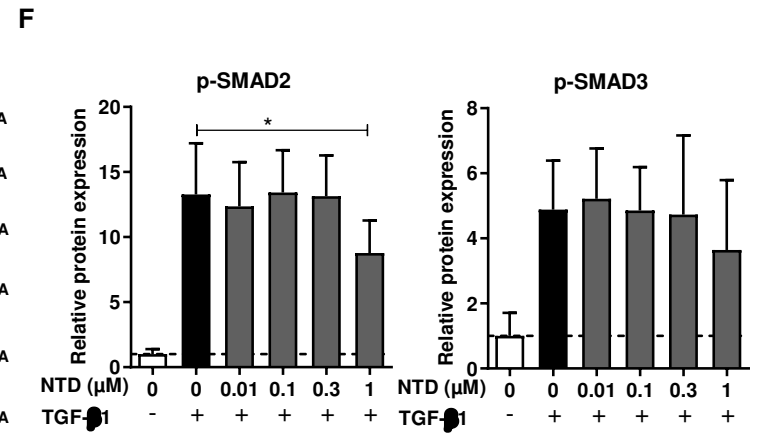
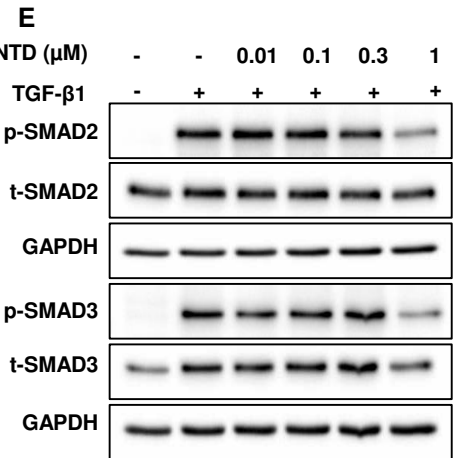
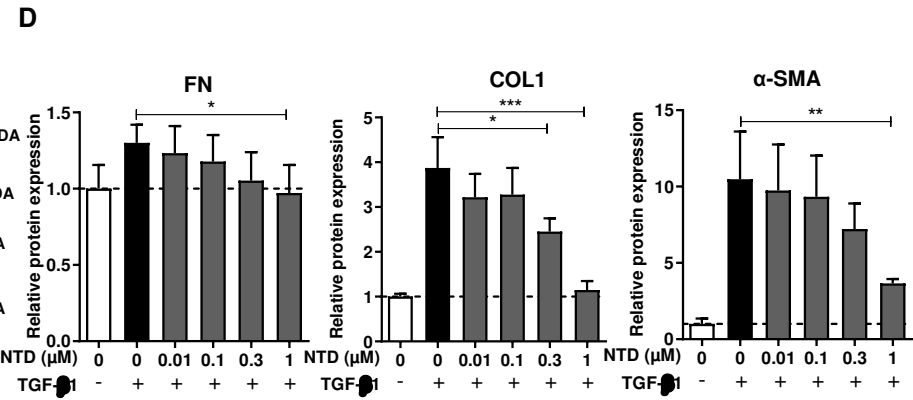
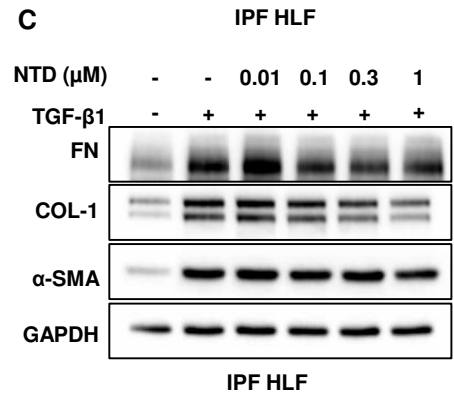
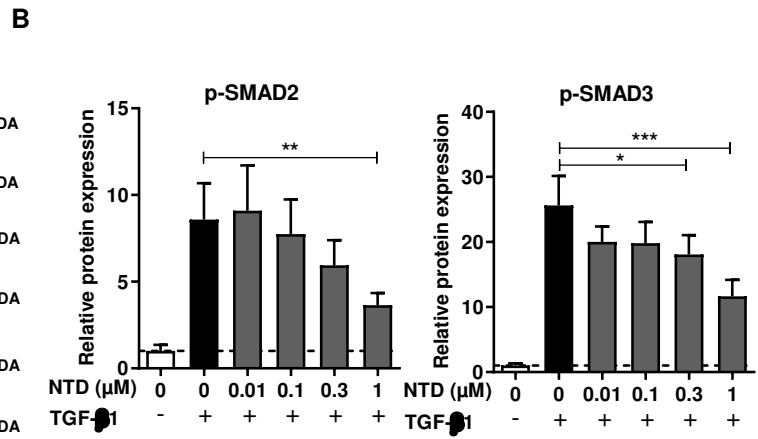
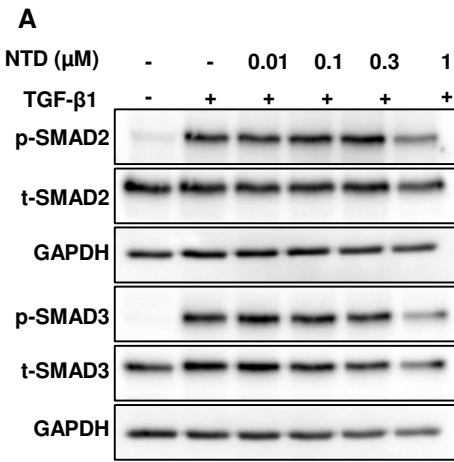


Click here to access/download
Supplementary Material
Supplemental Legends.docx

Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 1. Nintedanib inhibited the PDGFR signalling pathway, the proliferation and the migration of IPF and control HLFs stimulated with PDGF-BB.

A,C. Representative Western blots showing the phosphorylation of PDGFR and ERK in IPF (n=4) and control (n=4) HLFs treated with 0.01-0.3 μ M nintedanib for 3 h and then stimulated with 25 ng/ml PDGF-BB for 10 min. **B, D.** Protein levels were quantified by densitometry and then normalized to GAPDH levels. The fold change in the levels of phosphorylated proteins found in stimulated cells was compared to that measured in untreated cells, arbitrarily set at 1. **E,G.** For proliferation analysis, IPF (n=6) and control (n=6) HLFs were treated with 0.01-0.3 μ M nintedanib for 3 h and then stimulated with 50 ng/ml PDGF-BB for 72 h. The proliferation was determined by fluorescent acridine orange/propidium iodide staining and automated fluorescence cell counting. The relative cell proliferation was calculated by dividing the number of viable cells treated with nintedanib +/- PDGF-BB by the number of viable untreated cells, which was arbitrarily set at 1. **F, H.** The migration of IPF (n=9) and control (n=4) HLFs was analysed using a modified-Boyden chamber assay. Cells were treated with 0.01-1 μ M nintedanib for 24 h along with 25 ng/ml PDGF-BB used as a chemoattractant to induce cell migration. The relative cell migration was calculated by dividing the number of migrating cells treated with nintedanib +/- PDGF-BB by the number of untreated migrating cells, arbitrarily set at 1. Results are expressed as means \pm SEM of 4-9 independent experiments. Significant differences were determined by ANOVA followed by the Dunnett's multiple comparison t-test (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001). NTD: nintedanib

Supplemental Figure. 2. Nintedanib attenuated the phosphorylation of SMAD2/3 and the expression of myofibroblastic markers in IPF and control HLFs stimulated with TGF- β 1.

A, C, E, G. IPF (n=4) and control (n=4) HLFs were treated with 0.01-1 μ M nintedanib for 3 h and stimulated with 1 ng/ml TGF- β 1 for 30 min (**A, E**) or 24 h (**C, G**). Representative Western blots showing the phosphorylation of SMAD2 and SMAD3 (**A, E**), fibronectin (FN), collagen

I (COL1) and α -SMA (C, G). **B, D, F, H.** Protein levels were quantified by densitometry and normalized to the GAPDH levels. The fold change in protein expression in stimulated cells was determined relatively to the protein expression measured in untreated cells, arbitrarily set at 1. Results are expressed as means \pm SEM of 4 independent experiments. Significant differences were determined ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison t-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). NTD: nintedanib

RÉFÉRENCES

- Abdollahi, A., Li, M., Ping, G., Plathow, C., Domhan, S., Kiessling, F., Lee, L.B., McMahon, G., Gröne, H.-J., Lipson, K.E., Huber, P.E., 2005. Inhibition of platelet-derived growth factor signaling attenuates pulmonary fibrosis. *J. Exp. Med.* 201, 925–935. <https://doi.org/10.1084/jem.20041393>
- Adams, T.S., Schupp, J.C., Poli, S., Ayaub, E.A., Neumark, N., Ahangari, F., Chu, S.G., Raby, B.A., Deluiliis, G., Januszyk, M., Duan, Q., Arnett, H.A., Siddiqui, A., Washko, G.R., Homer, R., Yan, X., Rosas, I.O., Kaminski, N., 2020. Single-cell RNA-seq reveals ectopic and aberrant lung-resident cell populations in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sci. Adv.* 6, eaba1983. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba1983>
- Agha, E.E., Moiseenko, A., Kheirollahi, V., De Langhe, S., Crnkovic, S., Kwapiszewska, G., Kosanovic, D., Schwind, F., Schermuly, R.T., Henneke, I., MacKenzie, B., Quantius, J., Herold, S., Ntokou, A., Ahlbrecht, K., Morty, R.E., Günther, A., Seeger, W., Bellusci, S., 2017. Two-Way Conversion between Lipogenic and Myogenic Fibroblastic Phenotypes Marks the Progression and Resolution of Lung Fibrosis. *Cell Stem Cell* 20, 261-273.e3. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.10.004>
- Akamine, A., Raghu, G., Narayanan, A.S., 1992. Human Lung Fibroblast Subpopulations with Different C1q Binding and Functional Properties. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 6, 382–389. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb/6.4.382>
- Alfarouk, K.O., Verduzco, D., Rauch, C., Muddathir, A.K., Bashir, A.H.H., Elhassan, G.O., Ibrahim, M.E., Orozco, J.D.P., Cardone, R.A., Reshkin, S.J., Harguindey, S., 2014. Glycolysis, tumor metabolism, cancer growth and dissemination. A new pH-based etiopathogenic perspective and therapeutic approach to an old cancer question. *Oncoscience* 1, 777–802. <https://doi.org/10.18632/oncoscience.109>
- Alhamad, E.H., Shakoor, Z., Al-Kassimi, F.A., Almogren, A., Gad ElRab, M.O., Maharaj, S., Kolb, M., 2015. Rapid detection of circulating fibrocytes by flowcytometry in idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann. Thorac. Med.* 10, 279–283. <https://doi.org/10.4103/1817-1737.157294>
- Álvarez-Mercado, A.I., Mesa, M.D., Gil, Á., 2023. Vitamin D: Role in chronic and acute diseases. *Encycl. Hum. Nutr.* 535–544. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821848-8.00101-3>
- Andersson-Sjöland, A., de Alba, C.G., Nihlberg, K., Becerril, C., Ramírez, R., Pardo, A., Westergren-Thorsson, G., Selman, M., 2008. Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 2129–2140. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.02.012>
- Andrae, J., Gallini, R., Betsholtz, C., 2008. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 22, 1276–1312. <https://doi.org/10.1101/gad.1653708>
- Annes, J.P., Munger, J.S., Rifkin, D.B., 2003. Making sense of latent TGF β activation. *J. Cell Sci.* 116, 217–224. <https://doi.org/10.1242/jcs.00229>
- Aono, Y., Kishi, M., Yokota, Y., Azuma, M., Kinoshita, K., Takezaki, A., Sato, S., Kawano, H., Kishi, J., Goto, H., Uehara, H., Izumi, K., Nishioka, Y., 2014. Role of Platelet-Derived Growth Factor/Platelet-Derived Growth Factor Receptor Axis in the Trafficking of Circulating Fibrocytes in Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 51, 793–801. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0455OC>
- Aono, Y., Nishioka, Y., Inayama, M., Ugai, M., Kishi, J., Uehara, H., Izumi, K., Sone, S., 2005. Imatinib as a novel antifibrotic agent in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171, 1279–1285. <https://doi.org/10.1164/rccm.200404-531OC>
- Aoyagi-Ikeda, K., Maeno, T., Matsui, H., Ueno, M., Hara, K., Aoki, Y., Aoki, F., Shimizu, T., Doi, H., Kawai-Kowase, K., Iso, T., Suga, T., Arai, M., Kurabayashi, M., 2011. Notch induces myofibroblast differentiation of alveolar epithelial cells via transforming growth factor- β -Smad3

- pathway. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 45, 136–144. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2010-0140oc>
- Arai, T., Hirose, M., Kagawa, T., Hatsuda, K., Inoue, Y., 2022. Platelet-derived growth factor can predict survival and acute exacerbation in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Thorac. Dis.* 14. <https://doi.org/10.21037/jtd-21-1418>
- Aranow, C., 2011. Vitamin D and the Immune System. *J. Investig. Med. Off. Publ. Am. Fed. Clin. Res.* 59, 881–886. <https://doi.org/10.231/JIM.0b013e31821b8755>
- Arnsion, Y., Amital, H., Agmon-Levin, N., Alon, D., Sánchez-Castañón, M., López-Hoyos, M., Matucci-Cerinic, M., Szücs, G., Shapira, Y., Szekanecz, Z., Shoenfeld, Y., 2011. Serum 25-OH vitamin D concentrations are linked with various clinical aspects in patients with systemic sclerosis: A retrospective cohort study and review of the literature. *Autoimmun. Rev.* 10, 490–494. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.02.002>
- Artaza, J.N., Norris, K.C., 2009. Vitamin D reduces the expression of collagen and key profibrotic factors by inducing an antifibrotic phenotype in mesenchymal multipotent cells. *J. Endocrinol.* 200, 207–221. <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0241>
- B. Moore, B., Lawson, W.E., Oury, T.D., Sisson, T.H., Raghavendran, K., Hogaboam, C.M., 2013. Animal Models of Fibrotic Lung Disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 49, 167–179. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0094TR>
- Balestro, E., Cocconcelli, E., Tinè, M., Biondini, D., Faccioli, E., Saetta, M., Rea, F., 2019. Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Lung Transplantation: When it is Feasible. *Medicina (Mex.)* 55, 702. <https://doi.org/10.3390/medicina55100702>
- Bantsimba-Malanda, C., Marchal-Sommé, J., Goven, D., Freynet, O., Michel, L., Crestani, B., Soler, P., 2010. A role for dendritic cells in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 182, 385–395. <https://doi.org/10.1164/rccm.200907-1164OC>
- Barber, C.M., Fishwick, D., 2012. Importance of past occupational exposures in the rising incidence of idiopathic pulmonary fibrosis in the U.K. *Thorax* 67, 264; author reply 264-265. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2011-200836>
- Bargagli, E., Refini, R.M., d'Alessandro, M., Bergantini, L., Cameli, P., Vantaggiato, L., Bini, L., Landi, C., 2020. Metabolic Dysregulation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 5663. <https://doi.org/10.3390/ijms21165663>
- Barkauskas, C.E., Crouce, M.J., Rackley, C.R., Bowie, E.J., Keene, D.R., Stripp, B.R., Randell, S.H., Noble, P.W., Hogan, B.L.M., 2013. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *J. Clin. Invest.* 123, 3025–3036. <https://doi.org/10.1172/JCI68782>
- Bartels, L.E., Hvas, C.L., Agnholt, J., Dahlerup, J.F., Agger, R., 2010. Human dendritic cell antigen presentation and chemotaxis are inhibited by intrinsic 25-hydroxy vitamin D activation. *Int. Immunopharmacol.* 10, 922–928. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.05.003>
- Beisang, D.J., Smith, K., Yang, L., Benyumov, A., Gilbertsen, A., Herrera, J., Lock, E., Racila, E., Forster, C., Sandri, B.J., Henke, C.A., Bitterman, P.B., 2020. Single-cell RNA sequencing reveals that lung mesenchymal progenitor cells in IPF exhibit pathological features early in their differentiation trajectory. *Sci. Rep.* 10, 11162. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66630-5>
- BHALLA, ASHOK.K., AMENTO, E.P., CLEMENS, T.L., HOLICK, M.F., KRANE, S.M., 1983. SPECIFIC HIGH-AFFINITY RECEPTORS FOR 1,25-DIHYDROXYVITAMIN D3 IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS: PRESENCE IN MONOCYTES AND INDUCTION IN T LYMPHOCYTES FOLLOWING ACTIVATION. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 57, 1308–1310. <https://doi.org/10.1210/jcem-57-6-1308>
- Bhoora, S., Punchoo, R., 2020. Policing Cancer: Vitamin D Arrests the Cell Cycle. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 9296. <https://doi.org/10.3390/ijms21239296>
- Birjandi, S.Z., Palchevskiy, V., Xue, Y.Y., Nunez, S., Kern, R., Weigt, S.S., Lynch, J.P., Chatila, T.A., Belperio, J.A., 2016. CD4(+)CD25(hi)Foxp3(+) Cells Exacerbate Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Pathol.* 186, 2008–2020. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.03.020>

- Black, P.N., Scragg, R., 2005. Relationship Between Serum 25-Hydroxyvitamin D and Pulmonary Function in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Chest* 128, 3792–3798. <https://doi.org/10.1378/chest.128.6.3792>
- Bocchino, M., Zanotta, S., Capitelli, L., Galati, D., 2021. Dendritic Cells Are the Intriguing Players in the Puzzle of Idiopathic Pulmonary Fibrosis Pathogenesis. *Front. Immunol.* 12, 664109. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.664109>
- Boilly, B., Vercoutter-Edouart, A.S., Hondemarck, H., Nurcombe, V., Le Bourhis, X., 2000. FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11, 295–302. [https://doi.org/10.1016/s1359-6101\(00\)00014-9](https://doi.org/10.1016/s1359-6101(00)00014-9)
- Bonniaud, P., Margetts, P.J., Kolb, M., Schroeder, J.A., Kapoun, A.M., Damm, D., Murphy, A., Chakravarty, S., Dugar, S., Higgins, L., Protter, A.A., Gauldie, J., 2005. Progressive transforming growth factor beta1-induced lung fibrosis is blocked by an orally active ALK5 kinase inhibitor. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171, 889–898. <https://doi.org/10.1164/rccm.200405-612OC>
- Borie, R., Quesnel, C., Phin, S., Debray, M.-P., Marchal-Somme, J., Tiev, K., Bonay, M., Fabre, A., Soler, P., Dehoux, M., Crestani, B., 2013. Detection of alveolar fibrocytes in idiopathic pulmonary fibrosis and systemic sclerosis. *PloS One* 8, e53736. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053736>
- Borzzone, G., Moreno, R., Urrea, R., Meneses, M., Oyarzún, M., Lisboa, C., 2001. Bleomycin-Induced Chronic Lung Damage Does Not Resemble Human Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163, 1648–1653. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.7.2006132>
- Boustani, K., Ghai, P., Invernizzi, R., Hewitt, R.J., Maher, T.M., Li, Q.-Z., Molyneaux, P.L., Harker, J.A., 2022. Autoantibodies are present in the bronchoalveolar lavage but not circulation in patients with fibrotic interstitial lung disease. *ERJ Open Res.* 8. <https://doi.org/10.1183/23120541.00481-2021>
- Braga, T.T., Agudelo, J.S.H., Camara, N.O.S., 2015. Macrophages During the Fibrotic Process: M2 as Friend and Foe. *Front. Immunol.* 6.
- Broekelmann, T.J., Limper, A.H., Colby, T.V., McDonald, J.A., 1991. Transforming growth factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 6642–6646.
- Brunnemer, E., Ehlers-Tenenbaum, S., Heussel, C.P., Warth, A., Herth, F., Kreuter, M., 2016. Real life experience with nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* 48. <https://doi.org/10.1183/13993003.congress-2016.PA2093>
- Bruyère, O., Malaise, O., Neuprez, A., Collette, J., Reginster, J. -Y., 2007. Prevalence of vitamin D inadequacy in European postmenopausal women. *Curr. Med. Res. Opin.* 23, 1939–1944. <https://doi.org/10.1185/030079907X219562>
- Bueno, M., Calyeca, J., Rojas, M., Mora, A.L., 2020. Mitochondria dysfunction and metabolic reprogramming as drivers of idiopathic pulmonary fibrosis. *Redox Biol.* 33, 101509. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101509>
- Burgy, O., Mailleux, A.A., 2023. ATAC-ing single nucleus in idiopathic pulmonary fibrosis: TWIST1 strives back for myofibroblasts. *Eur. Respir. J.* 62. <https://doi.org/10.1183/13993003.00881-2023>
- Burman, A., Tanjore, H., Blackwell, T.S., 2018. Endoplasmic reticulum stress in pulmonary fibrosis. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 68–69, 355–365. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.03.015>
- Calton, E.K., Keane, K.N., Raizel, R., Rowlands, J., Soares, M.J., Newsholme, P., 2017. Winter to summer change in vitamin D status reduces systemic inflammation and bioenergetic activity of human peripheral blood mononuclear cells. *Redox Biol.* 12, 814–820. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.009>
- Cameli, P., Carleo, A., Bergantini, L., Landi, C., Prasse, A., Bargagli, E., 2020. Oxidant/Antioxidant Disequilibrium in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Pathogenesis. *Inflammation* 43, 1–7. <https://doi.org/10.1007/s10753-019-01059-1>
- Cantorna, M.T., Snyder, L., Lin, Y.-D., Yang, L., 2015. Vitamin D and 1,25(OH)2D Regulation of T cells. *Nutrients* 7, 3011–3021. <https://doi.org/10.3390/nu7043011>

- Cao, H., Wang, C., Chen, X., Hou, J., Xiang, Z., Shen, Y., Han, X., 2018. Inhibition of Wnt/ β -catenin signaling suppresses myofibroblast differentiation of lung resident mesenchymal stem cells and pulmonary fibrosis. *Sci. Rep.* 8, 13644. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28968-9>
- Cederholm, T., Barazzoni, R., Austin, P., Ballmer, P., Biolo, G., Bischoff, S.C., Compher, C., Correia, I., Higashiguchi, T., Holst, M., Jensen, G.L., Malone, A., Muscaritoli, M., Nyulasi, I., Pirlich, M., Rothenberg, E., Schindler, K., Schneider, S.M., de van der Schueren, M. a. E., Sieber, C., Valentini, L., Yu, J.C., Van Gossum, A., Singer, P., 2017. ESPEN guidelines on definitions and terminology of clinical nutrition. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* 36, 49–64. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.09.004>
- Ceglia, L., Chiu, G.R., Harris, S.S., Araujo, A.B., 2011. Serum 25-hydroxyvitamin D concentration and physical function in adult men. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 74, 370–376. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2010.03926.x>
- Cerri, S., Monari, M., Guerrieri, A., Donatelli, P., Bassi, I., Garuti, M., Luppi, F., Betti, S., Bandelli, G., Carpano, M., Bacchi Reggiani, M.L., Tonelli, R., Clini, E., Nava, S., 2019. Real-life comparison of pirfenidone and nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: A 24-month assessment. *Respir. Med.* 159, 105803. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2019.105803>
- Chakraborty, A., Mastalerz, M., Ansari, M., Schiller, H.B., Staab-Weijnitz, C.A., 2022. Emerging Roles of Airway Epithelial Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Cells* 11, 1050. <https://doi.org/10.3390/cells11061050>
- Chakraborty, K., Chatterjee, S., Bhattacharyya, A., 2017. Modulation of CD11c+ lung dendritic cells in respect to TGF- β in experimental pulmonary fibrosis. *Cell Biol. Int.* 41, 991–1000. <https://doi.org/10.1002/cbin.10800>
- Chambard, J.-C., Lefloch, R., Pouysségur, J., Lenormand, P., 2007. ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res., Mitogen-Activated Protein Kinases: New Insights on Regulation, Function and Role in Human Disease* 1773, 1299–1310. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.11.010>
- Chang, C.-H., Qiu, J., O'Sullivan, D., Buck, M.D., Noguchi, T., Curtis, J.D., Chen, Q., Gindin, M., Gubin, M.M., van der Windt, G.J.W., Tonc, E., Schreiber, R.D., Pearce, E.J., Pearce, E.L., 2015. Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell* 162, 1229–1241. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.016>
- Chang, C.-J., Lin, C.-F., Lee, C.-H., Chuang, H.-C., Shih, F.-C., Wan, S.-W., Tai, C., Chen, C.-L., 2021. Overcoming interferon (IFN)- γ resistance ameliorates transforming growth factor (TGF)- β -mediated lung fibroblast-to-myofibroblast transition and bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Biochem. Pharmacol.* 183, 114356. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114356>
- Chang, J., Nie, H., Ge, X., Du, J., Liu, W., Li, X., Sun, Y., Wei, X., Xun, Z., Li, Y.C., 2021. Vitamin D suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis by targeting the local renin–angiotensin system in the lung. *Sci. Rep.* 11, 16525. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96152-7>
- Chen, W., Zhang, J., Zhong, W., Liu, Y., Lu, Y., Zeng, Z., Huang, H., Wan, X., Meng, X., Zou, F., Cai, S., Dong, H., 2021. Anlotinib Inhibits PFKFB3-Driven Glycolysis in Myofibroblasts to Reverse Pulmonary Fibrosis. *Front. Pharmacol.* 12, 744826. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.744826>
- Cheresh, P., Kim, S.-J., Tulasiram, S., Kamp, D.W., 2013. Oxidative stress and pulmonary fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis., Fibrosis: Translation of basic research to human disease* 1832, 1028–1040. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.11.021>
- Chi, J.-Y., Hsiao, Y.-W., Liang, H.-Y., Huang, T.-H., Chen, F.-W., Chen, C.-Y., Ko, C.-Y., Cheng, C.-C., Wang, J.-M., 2022. Blockade of the pentraxin 3/CD44 interaction attenuates lung injury-induced fibrosis. *Clin. Transl. Med.* 12, e1099. <https://doi.org/10.1002/ctm2.1099>
- Chiang, K.-C., Chen, S.-C., Yeh, C.-N., Pang, J.-H.S., Shen, S.-C., Hsu, J.-T., Liu, Y.-Y., Chen, L.-W., Kuo, S.-F., Takano, M., Kittaka, A., Sun, C.-C., Juang, H.-H., Chen, T.C., 2014. MART-10, a less calcemic vitamin D analog, is more potent than 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in inhibiting the metastatic potential of MCF-7 breast cancer cells in vitro. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 139, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.10.005>

- Chilosi, M., Calì, A., Rossi, A., Gilioli, E., Pedica, F., Montagna, L., Pedron, S., Confalonieri, M., Doglioni, C., Ziesche, R., Grubinger, M., Mikulits, W., Poletti, V., 2017. Epithelial to mesenchymal transition-related proteins ZEB1, β -catenin, and β -tubulin-III in idiopathic pulmonary fibrosis. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 30, 26–38. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.147>
- Chilosi, M., Poletti, V., Zamò, A., Lestani, M., Montagna, L., Piccoli, P., Pedron, S., Bertaso, M., Scarpa, A., Murer, B., Cancellieri, A., Maestro, R., Semenzato, G., Doglioni, C., 2003. Aberrant Wnt/ β -Catenin Pathway Activation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Pathol.* 162, 1495–1502. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64282-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64282-4)
- Christensen, P.J., Goodman, R.E., Pastoriza, L., Moore, B., Toews, G.B., 1999. Induction of Lung Fibrosis in the Mouse by Intratracheal Instillation of Fluorescein Isothiocyanate Is Not T-Cell-Dependent. *Am. J. Pathol.* 155, 1773–1779.
- Chun, R.F., Peercy, B.E., Orwoll, E.S., Nielson, C.M., Adams, J.S., Hewison, M., 2014. Vitamin D and DBP: the free hormone hypothesis revisited. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 144 Pt A, 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.09.012>
- Chung, J., Huda, M.N., Shin, Y., Han, S., Akter, S., Kang, I., Ha, J., Choe, W., Choi, T.G., Kim, S.S., 2021. Correlation between Oxidative Stress and Transforming Growth Factor-Beta in Cancers. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 13181. <https://doi.org/10.3390/ijms222413181>
- Cilli, A., Hanta, I., Uzer, F., Coskun, F., Sevinc, C., Deniz, P.P., Parlak, M., Altunok, E., Tertemiz, K.C., Ursavas, A., 2022. Characteristics and outcomes of COVID-19 patients with IPF: A multi-center retrospective study. *Respir. Med. Res.* 81, 100900. <https://doi.org/10.1016/j.resmer.2022.100900>
- Collard, H.R., Richeldi, L., Kim, D.S., Taniguchi, H., Tschöepe, I., Luisetti, M., Roman, J., Tino, G., Schlenker-Herceg, R., Hallmann, C., Bois, R.M. du, 2017. Acute exacerbations in the INPULSIS trials of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* 49. <https://doi.org/10.1183/13993003.01339-2016>
- Constans, J., Hazout, S., Garruto, R.M., Gajdusek, D.C., Spees, E.K., 1985. Population distribution of the human vitamin D binding protein: anthropological considerations. *Am. J. Phys. Anthropol.* 68, 107–122. <https://doi.org/10.1002/ajpa.1330680110>
- Conte, E., Gili, E., Fagone, E., Fruciano, M., Iemmolo, M., Vancheri, C., 2014. Effect of pirfenidone on proliferation, TGF- β -induced myofibroblast differentiation and fibrogenic activity of primary human lung fibroblasts. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* 58, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.02.014>
- Cottin, V., 2019. Treatment of progressive fibrosing interstitial lung diseases: a milestone in the management of interstitial lung diseases. *Eur. Respir. Rev.* 28, 190109. <https://doi.org/10.1183/16000617.0109-2019>
- Cottin, V., Bonniaud, P., Cadranel, J., Crestani, B., Jouneau, S., Marchand-Adam, S., Nunes, H., Wémeau-Stervinou, L., Bergot, E., Blanchard, E., Borie, R., Bourdin, A., Chenivresse, C., Clément, A., Gomez, E., Gondouin, A., Hirschi, S., Lebagry, F., Marquette, C.-H., Montani, D., Prévot, G., Quetant, S., Reynaud-Gaubert, M., Salaun, M., Sanchez, O., Trumbic, B., Berkani, K., Brillet, P.-Y., Campana, M., Chalabreysse, L., Chatté, G., Debieuvre, D., Ferretti, G., Fourrier, J.-M., Just, N., Kambouchner, M., Legrand, B., Le Guillou, F., Lhuillier, J.-P., Mehdaoui, A., Naccache, J.-M., Paganon, C., Rémy-Jardin, M., Si-Mohamed, S., Terrioux, P., 2022. Recommandations pratiques pour le diagnostic et la prise en charge de la fibrose pulmonaire idiopathique – Actualisation 2021. Version courte. *Rev. Mal. Respir.* 39, 275–312. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2022.01.005>
- Craig, V.J., Zhang, L., Hagood, J.S., Owen, C.A., 2015. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 53, 585–600. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0020TR>
- Cuerpo, S., Moisés, J., Hernández-González, F., Benegas, M., Ramirez, J., Sánchez, M., Agustí, À., Sellares, J., 2019. Acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis: Does clinical

- stratification or steroid treatment matter? *Chron. Respir. Dis.* 16, 1479973119869334. <https://doi.org/10.1177/1479973119869334>
- Cully, M., 2020. Targeted PI3K inhibitors reduce lung fibrosis in mice. *Nat. Rev. Drug Discov.* 19, 838–838. <https://doi.org/10.1038/d41573-020-00190-1>
- Cyprian, F., Lefkou, E., Varoudi, K., Girardi, G., 2019. Immunomodulatory Effects of Vitamin D in Pregnancy and Beyond. *Front. Immunol.* 10.
- Dallas, S.L., Rosser, J.L., Mundy, G.R., Bonewald, L.F., 2002. Proteolysis of Latent Transforming Growth Factor- β (TGF- β)-binding Protein-1 by Osteoclasts: A CELLULAR MECHANISM FOR RELEASE OF TGF- β FROM BONE MATRIX*. *J. Biol. Chem.* 277, 21352–21360. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111663200>
- Dardenne, O., Prud'homme, J., Arabian, A., Glorieux, F.H., St-Arnaud, R., 2001. Targeted inactivation of the 25-hydroxyvitamin D(3)-1(α)-hydroxylase gene (CYP27B1) creates an animal model of pseudovitamin D-deficiency rickets. *Endocrinology* 142, 3135–3141. <https://doi.org/10.1210/endo.142.7.8281>
- Degryse, A.L., Tanjore, H., Xu, X.C., Polosukhin, V.V., Jones, B.R., McMahon, F.B., Gleaves, L.A., Blackwell, T.S., Lawson, W.E., 2010. Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 299, L442–L452. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00026.2010>
- DeMaio, L., Buckley, S.T., Krishnaveni, M.S., Flodby, P., Dubourd, M., Banfalvi, A., Xing, Y., Ehrhardt, C., Minoo, P., Zhou, B., Crandall, E.D., Borok, Z., 2012. Ligand-independent transforming growth factor- β type I receptor signaling mediates type I collagen-induced epithelial-mesenchymal transition. *J. Pathol.* 226, 633–644. <https://doi.org/10.1002/path.3016>
- Deng, X., Jin, K., Li, Y., Gu, W., Liu, M., Zhou, L., 2015. Platelet-Derived Growth Factor and Transforming Growth Factor β 1 Regulate ARDS-Associated Lung Fibrosis Through Distinct Signaling Pathways. *Cell. Physiol. Biochem.* 36, 937–946. <https://doi.org/10.1159/000430268>
- Desai, T.J., Brownfield, D.G., Krasnow, M.A., 2014. Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer. *Nature* 507, 190–194. <https://doi.org/10.1038/nature12930>
- Ding, N., Yu, R.T., Subramaniam, N., Sherman, M.H., Wilson, C., Rao, R., Leblanc, M., Coulter, S., He, M., Scott, C., Lau, S.L., Atkins, A.R., Barish, G.D., Gunton, J.E., Liddle, C., Downes, M., Evans, R.M., 2013. A Vitamin D Receptor/SMAD Genomic Circuit Gates Hepatic Fibrotic Response. *Cell* 153, 601–613. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.028>
- Distler, O., Highland, K.B., Gahlemann, M., Azuma, A., Fischer, A., Mayes, M.D., Raghu, G., Sauter, W., Girard, M., Alves, M., Clerisme-Beaty, E., Stowasser, S., Tetzlaff, K., Kuwana, M., Maher, T.M., 2019. Nintedanib for Systemic Sclerosis–Associated Interstitial Lung Disease. *N. Engl. J. Med.* 380, 2518–2528. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1903076>
- Dixon, P., Ghosh, T., Mondal, K., Konar, A., Chauhan, A., Hazra, S., 2018. Controlled delivery of pirfenidone through vitamin E-loaded contact lens ameliorates corneal inflammation. *Drug Deliv. Transl. Res.* 8, 1114–1126. <https://doi.org/10.1007/s13346-018-0541-5>
- Dominguez, L.J., Farruggia, M., Veronese, N., Barbagallo, M., 2021. Vitamin D Sources, Metabolism, and Deficiency: Available Compounds and Guidelines for Its Treatment. *Metabolites* 11, 255. <https://doi.org/10.3390/metabo11040255>
- Drakopanagiotakis, F., Wujak, L., Wygrecka, M., Markart, P., 2018. Biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 68–69, 404–421. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.01.023>
- du Bois, R.M., 2012. An earlier and more confident diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. Rev.* 21, 141–146. <https://doi.org/10.1183/09059180.00000812>
- Duchemann, B., Annesi-Maesano, I., Naurois, C.J. de, Sanyal, S., Brillet, P.-Y., Brauner, M., Kambouchner, M., Huynh, S., Naccache, J.M., Borie, R., Piquet, J., Mekinian, A., Virally, J., Uzunhan, Y., Cadranet, J., Crestani, B., Fain, O., Lhote, F., Dhote, R., Saidenberg-Kermanac'h, N., Rosental, P.-A., Valeyre, D., Nunes, H., 2017. Prevalence and incidence of interstitial lung

- diseases in a multi-ethnic county of Greater Paris. *Eur. Respir. J.* 50. <https://doi.org/10.1183/13993003.02419-2016>
- D'Urso, M., Kurniawan, N.A., 2020. Mechanical and Physical Regulation of Fibroblast–Myofibroblast Transition: From Cellular Mechanoreponse to Tissue Pathology. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8.
- Ebina, M., Shimizukawa, M., Shibata, N., Kimura, Y., Suzuki, T., Endo, M., Sasano, H., Kondo, T., Nukiwa, T., 2004. Heterogeneous increase in CD34-positive alveolar capillaries in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 169, 1203–1208. <https://doi.org/10.1164/rccm.200308-1111OC>
- Efe, C., Kav, T., Aydin, C., Cengiz, M., Imga, N.N., Purnak, T., Smyk, D.S., Torgutalp, M., Turhan, T., Ozenirler, S., Ozaslan, E., Bogdanos, D.P., 2014. Low Serum Vitamin D Levels Are Associated with Severe Histological Features and Poor Response to Therapy in Patients with Autoimmune Hepatitis. *Dig. Dis. Sci.* 59, 3035–3042. <https://doi.org/10.1007/s10620-014-3267-3>
- Fakih, M.G., Trump, D.L., Muindi, J.R., Black, J.D., Bernardi, R.J., Creaven, P.J., Schwartz, J., Brattain, M.G., Hutson, A., French, R., Johnson, C.S., 2007. A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of intravenous calcitriol in combination with oral gefitinib in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 1216–1223. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1165>
- Fang, L., Li, Yiran, Wang, S., Li, Yuxi, Chang, H.-M., Yi, Y., Yan, Y., Thakur, A., Leung, P.C.K., Cheng, J.-C., Sun, Y.-P., 2020. TGF- β 1 induces VEGF expression in human granulosa-lutein cells: a potential mechanism for the pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome. *Exp. Mol. Med.* 52, 450–460. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0396-y>
- Faverio, P., Fumagalli, A., Conti, S., Madotto, F., Bini, F., Harari, S., Mondoni, M., Oggionni, T., Barisione, E., Ceruti, P., Papetti, M.C., Bodini, B.D., Caminati, A., Valentino, A., Centanni, S., Noè, D., Zoppa, M.D., Crotti, S., Grosso, M., Sukkar, S.G., Modena, D., Andreoli, M., Nicali, R., Suigo, G., Giacomini, F.D., Busnelli, S., Cattaneo, E., Mantovani, L.G., Cesana, G., Pesci, A., Luppi, F., 2022. Nutritional assessment in idiopathic pulmonary fibrosis: a prospective multicentre study. *ERJ Open Res.* 8. <https://doi.org/10.1183/23120541.00443-2021>
- Fischer, K.D., Agrawal, D.K., 2015. Erratum to: Vitamin D regulating TGF- β induced epithelial-mesenchymal transition. *Respir. Res.* 16, 139. <https://doi.org/10.1186/s12931-015-0301-8>
- Fischer, K.D., Agrawal, D.K., 2014. Vitamin D regulating TGF- β induced epithelial-mesenchymal transition. *Respir. Res.* 15, 146. <https://doi.org/10.1186/s12931-014-0146-6>
- Flaherty, K.R., Wells, A.U., Cottin, V., Devaraj, A., Walsh, S.L.F., Inoue, Y., Richeldi, L., Kolb, M., Tetzlaff, K., Stowasser, S., Coeck, C., Clerisme-Beaty, E., Rosenstock, B., Quaresma, M., Haeufel, T., Goeldner, R.-G., Schlenker-Herceg, R., Brown, K.K., 2019. Nintedanib in Progressive Fibrosing Interstitial Lung Diseases. *N. Engl. J. Med.* 381, 1718–1727. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1908681>
- Frangogiannis, N.G., 2020. Transforming growth factor- β in tissue fibrosis. *J. Exp. Med.* 217, e20190103. <https://doi.org/10.1084/jem.20190103>
- Funke, M., Geiser, T., 2015. Idiopathic pulmonary fibrosis: the turning point is now! *Swiss Med. Wkly.* 145, w14139. <https://doi.org/10.4414/smw.2015.14139>
- Gabbiani, G., 2003. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J. Pathol.* 200, 500–503. <https://doi.org/10.1002/path.1427>
- Galli, J.A., Pandya, A., Vega-Olivo, M., Dass, C., Zhao, H., Criner, G.J., 2017. Pirfenidone and nintedanib for pulmonary fibrosis in clinical practice: Tolerability and adverse drug reactions. *Respirology* 22, 1171–1178. <https://doi.org/10.1111/resp.13024>
- Garcia-Morales, L.J., Chen, N.-Y., Weng, T., Luo, F., Davies, J., Philip, K., Volcik, K.A., Melicoff, E., Amione-Guerra, J., Bunge, R.R., Bruckner, B.A., Loebe, M., Eltzhig, H.K., Pandit, L.M., Blackburn, M.R., Karmouty-Quintana, H., 2016. Altered Hypoxic-Adenosine Axis and Metabolism in Group III Pulmonary Hypertension. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 54, 574–583. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0145OC>
- Gerova, D.I., Galunska, B.T., Ivanova, I.I., Kotzev, I.A., Tchervenkov, T.G., Balev, S.P., Svinarov, D.A., 2014. Prevalence of vitamin D deficiency and insufficiency in Bulgarian patients with chronic

- Hepatitis C viral infection. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 74, 665–672. <https://doi.org/10.3109/00365513.2014.930710>
- Gesmundo, I., Silvagno, F., Banfi, D., Monica, V., Fanciulli, A., Gamba, G., Congiusta, N., Libener, R., Riganti, C., Ghigo, E., Granata, R., 2020. Calcitriol Inhibits Viability and Proliferation in Human Malignant Pleural Mesothelioma Cells. *Front. Endocrinol.* 11, 559586. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.559586>
- Glass, D.S., Grossfeld, D., Renna, H.A., Agarwala, P., Spiegler, P., DeLeon, J., Reiss, A.B., 2022. Idiopathic pulmonary fibrosis: Current and future treatment. *Clin. Respir. J.* 16, 84–96. <https://doi.org/10.1111/crj.13466>
- Goto, Y., Sakamoto, K., Fukihara, J., Suzuki, A., Omote, N., Ando, A., Shindo, Y., Hashimoto, N., 2022. COVID-19-Triggered Acute Exacerbation of IPF, an Underdiagnosed Clinical Entity With Two-Peaked Respiratory Failure: A Case Report and Literature Review. *Front. Med.* 9.
- Groseau, L., Bojinca, V., Gudu, T., Saulescu, I., Predeteanu, D., Balanescu, A., Berghea, F., Opris, D., Borangiu, A., Constantinescu, C., Negru, M., Ionescu, R., 2016. Low vitamin D status in systemic sclerosis and the impact on disease phenotype. *Eur. J. Rheumatol.* 3, 50–55. <https://doi.org/10.5152/eurjrheum.2015.0065>
- Guiot, J., Moermans, C., Henket, M., Corhay, J.-L., Louis, R., 2017. Blood Biomarkers in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Lung* 195, 273–280. <https://doi.org/10.1007/s00408-017-9993-5>
- Guler, S.A., 2021. Pneumopathies interstitielles fibrosantes progressives. 2021 211112 21, 179–183.
- Gupte, V.V., Ramasamy, S.K., Reddy, R., Lee, J., Weinreb, P.H., Violette, S.M., Guenther, A., Warburton, D., Driscoll, B., Minoo, P., Bellusci, S., 2009. Overexpression of fibroblast growth factor-10 during both inflammatory and fibrotic phases attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180, 424–436. <https://doi.org/10.1164/rccm.200811-1794OC>
- Gurujeyalakshmi, G., Hollinger, M.A., Giri, S.N., 1999. Pirfenidone inhibits PDGF isoforms in bleomycin hamster model of lung fibrosis at the translational level. *Am. J. Physiol.* 276, L311–318. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1999.276.2.L311>
- Habermann, A.C., Gutierrez, A.J., Bui, L.T., Yahn, S.L., Winters, N.I., Calvi, C.L., Peter, L., Chung, M.-I., Taylor, C.J., Jetter, C., Raju, L., Roberson, J., Ding, G., Wood, L., Sucre, J.M.S., Richmond, B.W., Serezani, A.P., McDonnell, W.J., Mallal, S.B., Bacchetta, M.J., Loyd, J.E., Shaver, C.M., Ware, L.B., Bremner, R., Walia, R., Blackwell, T.S., Banovich, N.E., Kropski, J.A., 2020. Single-cell RNA sequencing reveals profibrotic roles of distinct epithelial and mesenchymal lineages in pulmonary fibrosis. *Sci. Adv.* 6, eaba1972. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba1972>
- Hagler, M.A., Hadley, T.M., Zhang, H., Mehra, K., Roos, C.M., Schaff, H.V., Suri, R.M., Miller, J.D., 2013. TGF- β signalling and reactive oxygen species drive fibrosis and matrix remodelling in myxomatous mitral valves. *Cardiovasc. Res.* 99, 175–184. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt083>
- Hamburg-Shields, E., DiNuoscio, G.J., Mullin, N.K., Lafyatis, R., Atit, R.P., 2015. Sustained β -catenin activity in dermal fibroblasts promotes fibrosis by up-regulating expression of extracellular matrix protein-coding genes. *J. Pathol.* 235, 686–697. <https://doi.org/10.1002/path.4481>
- Han, M.K., Zhou, Y., Murray, S., Tayob, N., Noth, I., Lama, V.N., Moore, B.B., White, E.S., Flaherty, K.R., Huffnagle, G.B., Martinez, F.J., COMET Investigators, 2014. Lung microbiome and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis: an analysis of the COMET study. *Lancet Respir. Med.* 2, 548–556. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70069-4](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70069-4)
- Harari, S., Pesci, A., Albera, C., Poletti, V., Amici, C., Crespi, G., Campolo, B., Vancheri, C., Group, on behalf of the F. study, 2022. Nintedanib in IPF: Post hoc Analysis of the Italian FIBRONET Observational Study. *Respiration* 101, 577–584. <https://doi.org/10.1159/000521138>
- Haston, C.K., 2012. Mouse genetic approaches applied to the normal tissue radiation response. *Front. Oncol.* 2, 94. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00094>
- Hennig, A., Markwart, R., Esparza-Franco, M.A., Ladds, G., Rubio, I., 2015. Ras activation revisited: role of GEF and GAP systems. *Biol. Chem.* 396, 831–848. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0257>

- Hennion, N., Dessey, J.-L., Gottrand, F., Wémeau-Stervinou, L., Gouyer, V., 2022. La fibrose pulmonaire idiopathique. *médecine/sciences* 38, 579–584. <https://doi.org/10.1051/medsci/2022084>
- Herrera, J., Henke, C.A., Bitterman, P.B., n.d. Extracellular matrix as a driver of progressive fibrosis. *J. Clin. Invest.* 128, 45–53. <https://doi.org/10.1172/JCI93557>
- Heukels, P., van Hulst, J. a. C., van Nimwegen, M., Boorsma, C.E., Melgert, B.N., van den Toorn, L.M., Boomars, K. a. T., Wijzenbeek, M.S., Hoogsteden, H., von der Thüsen, J.H., Hendriks, R.W., Kool, M., van den Blink, B., 2018. Fibrocytes are increased in lung and peripheral blood of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir. Res.* 19, 90. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0798-8>
- Hewitson, T.D., Smith, E.R., 2021. A Metabolic Reprogramming of Glycolysis and Glutamine Metabolism Is a Requisite for Renal Fibrogenesis—Why and How? *Front. Physiol.* 12, 645857. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.645857>
- Hinz, B., Celetta, G., Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Chaponnier, C., 2001. Alpha-Smooth Muscle Actin Expression Upregulates Fibroblast Contractile Activity. *Mol. Biol. Cell* 12, 2730–2741.
- Ho, P.-C., Bihuniak, J.D., Macintyre, A.N., Staron, M., Liu, X., Amezcua, R., Tsui, Y.-C., Cui, G., Micevic, G., Perales, J.C., Kleinstein, S.H., Abel, E.D., Insogna, K.L., Feske, S., Locasale, J.W., Bosenberg, M.W., Rathmell, J.C., Kaech, S.M., 2015. Phosphoenolpyruvate Is a Metabolic Checkpoint of Anti-tumor T Cell Responses. *Cell* 162, 1217–1228. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.012>
- Hodge, S., Matthews, G., Mukaro, V., Ahern, J., Shivam, A., Hodge, G., Holmes, M., Jersmann, H., Reynolds, P.N., 2011. Cigarette Smoke-Induced Changes to Alveolar Macrophage Phenotype and Function Are Improved by Treatment with Procysteine. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 44, 673–681. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0459OC>
- Holick, M.F., 2007. Vitamin D Deficiency. *N. Engl. J. Med.* 357, 266–281. <https://doi.org/10.1056/NEJMra070553>
- Holick, M.F., 2006. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J. Clin. Invest.* 116, 2062–2072. <https://doi.org/10.1172/JCI29449>
- Holm Nielsen, S., Willumsen, N., Leeming, D.J., Daniels, S.J., Brix, S., Karsdal, M.A., Genovese, F., Nielsen, M.J., 2018. Serological Assessment of Activated Fibroblasts by alpha-Smooth Muscle Actin (α -SMA): A Noninvasive Biomarker of Activated Fibroblasts in Lung Disorders. *Transl. Oncol.* 12, 368–374. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.11.004>
- Homps-Legrand, M., Crestani, B., Mailleux, A.A., 2023. Origins of pathological myofibroblasts in lung fibrosis: insights from lineage tracing mouse models in the single-cell RNA sequencing era. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 324, L737–L746. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00229.2022>
- Hostettler, K.E., Zhong, J., Papakonstantinou, E., Karakioulakis, G., Tamm, M., Seidel, P., Sun, Q., Mandal, J., Lardinois, D., Lambers, C., Roth, M., 2014. Anti-fibrotic effects of nintedanib in lung fibroblasts derived from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir. Res.* 15, 157. <https://doi.org/10.1186/s12931-014-0157-3>
- Hou, J., Shi, J., Chen, L., Lv, Z., Chen, X., Cao, H., Xiang, Z., Han, X., 2018. M2 macrophages promote myofibroblast differentiation of LR-MSCs and are associated with pulmonary fibrogenesis. *Cell Commun. Signal.* 16, 89. <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0300-8>
- Hou, Z., Ye, Q., Qiu, M., Hao, Y., Han, J., Zeng, H., 2017. Increased activated regulatory T cells proportion correlate with the severity of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir. Res.* 18, 170. <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0653-3>
- Hoyne, G.F., Elliott, H., Mutsaers, S.E., Prêle, C.M., 2017. Idiopathic pulmonary fibrosis and a role for autoimmunity. *Immunol. Cell Biol.* 95, 577–583. <https://doi.org/10.1038/icb.2017.22>
- Hsu, H.-S., Liu, C.-C., Lin, J.-H., Hsu, T.-W., Hsu, J.-W., Su, K., Hung, S.-C., 2017. Involvement of ER stress, PI3K/AKT activation, and lung fibroblast proliferation in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Sci. Rep.* 7, 14272. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14612-5>

- Hu, B., Wu, Z., Bai, D., Liu, T., Ullenbruch, M.R., Phan, S.H., 2015. Mesenchymal Deficiency of Notch1 Attenuates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Pathol.* 185, 3066–3075. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.07.014>
- Hu, X., Xu, Q., Wan, H., Hu, Y., Xing, S., Yang, H., Gao, Y., He, Z., 2020. PI3K-Akt-mTOR/PFKFB3 pathway mediated lung fibroblast aerobic glycolysis and collagen synthesis in lipopolysaccharide-induced pulmonary fibrosis. *Lab. Invest.* 100, 801–811. <https://doi.org/10.1038/s41374-020-0404-9>
- Hu, X., Zou, M., Ni, L., Zhang, M., Zheng, W., Liu, B., Cheng, Z., 2022. Dec1 Deficiency Ameliorates Pulmonary Fibrosis Through the PI3K/AKT/GSK-3 β / β -Catenin Integrated Signaling Pathway. *Front. Pharmacol.* 13.
- Hu, Y., Fu, J., Liu, X., Xue, X., 2020. ERK1/2 Signaling Pathway Activated by EGF Promotes Proliferation, Transdifferentiation, and Migration of Cultured Primary Newborn Rat Lung Fibroblasts. *BioMed Res. Int.* 2020, 7176169. <https://doi.org/10.1155/2020/7176169>
- Huang, C.-Y., Weng, Y.-T., Li, P.-C., Hsieh, N.-T., Li, C.-I., Liu, H.-S., Lee, M.-F., 2021. Calcitriol Suppresses Warburg Effect and Cell Growth in Human Colorectal Cancer Cells. *Life* 11, 963. <https://doi.org/10.3390/life11090963>
- Huang, Y.-C., Chen, J.-Y., Hung, W.-C., 2004. Vitamin D3 receptor/Sp1 complex is required for the induction of p27Kip1 expression by vitamin D3. *Oncogene* 23, 4856–4861. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207621>
- Huaux, F., Liu, T., McGarry, B., Ullenbruch, M., Phan, S.H., 2003. Dual Roles of IL-4 in Lung Injury and Fibrosis. *J. Immunol.* 170, 2083–2092. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.4.2083>
- Hubbard, R., Venn, A., Lewis, S., Britton, J., 2000. Lung cancer and cryptogenic fibrosing alveolitis. A population-based cohort study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161, 5–8. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.1.9906062>
- Hung, C., Linn, G., Chow, Y.-H., Kobayashi, A., Mittelsteadt, K., Altemeier, W.A., Gharib, S.A., Schnapp, L.M., Duffield, J.S., 2013. Role of Lung Pericytes and Resident Fibroblasts in the Pathogenesis of Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 188, 820–830. <https://doi.org/10.1164/rccm.201212-2297OC>
- Huppmann, P., Sczepanski, B., Boensch, M., Winterkamp, S., Schönheit-Kenn, U., Neurohr, C., Behr, J., Kenn, K., 2013. Effects of inpatient pulmonary rehabilitation in patients with interstitial lung disease. *Eur. Respir. J.* 42, 444–453. <https://doi.org/10.1183/09031936.00081512>
- Hwang, B., Song, J.-H., Park, S.L., Kim, J.T., Kim, W.-J., Moon, S.-K., 2020. Carnosine Impedes PDGF-Stimulated Proliferation and Migration of Vascular Smooth Muscle Cells In Vitro and Sprout Outgrowth Ex Vivo. *Nutrients* 12, 2697. <https://doi.org/10.3390/nu12092697>
- Inoki, K., Haneda, M., Maeda, S., Koya, D., Kikkawa, R., 1999. TGF- β 1 stimulates glucose uptake by enhancing GLUT1 expression in mesangial cells. *Kidney Int.* 55, 1704–1712. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.00438.x>
- Inoue, T., Kamiyama, J., Sakai, T., 1999. Sp1 and NF- κ B synergistically mediate the effect of vitamin D(3) in the p27(Kip1) gene promoter that lacks vitamin D response elements. *J. Biol. Chem.* 274, 32309–32317. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.45.32309>
- Ito, I., Waku, T., Aoki, M., Abe, R., Nagai, Y., Watanabe, T., Nakajima, Y., Ohkido, I., Yokoyama, K., Miyachi, H., Shimizu, T., Murayama, A., Kishimoto, H., Nagasawa, K., Yanagisawa, J., 2013. A nonclassical vitamin D receptor pathway suppresses renal fibrosis. *J. Clin. Invest.* 123, 4579–4594. <https://doi.org/10.1172/JCI67804>
- Iyer, A.K.V., Ramesh, V., Castro, C.A., Kaushik, V., Kulkarni, Y.M., Wright, C.A., Venkatadri, R., Rojanasakul, Y., Azad, N., 2015. Nitric Oxide Mediates Bleomycin-induced Angiogenesis and Pulmonary Fibrosis via Regulation of VEGF. *J. Cell. Biochem.* 116, 2484–2493. <https://doi.org/10.1002/jcb.25192>
- JafariNezhad, A., YektaKooshali, M.H., 2018. Lung cancer in idiopathic pulmonary fibrosis: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE* 13, e0202360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202360>

- Jakubzick, C., Kunkel, S.L., Puri, R.K., Hogaboam, C.M., 2004. Therapeutic targeting of IL-4-and IL-13-responsive cells in pulmonary fibrosis. *Immunol. Res.* 30, 339–349. <https://doi.org/10.1385/IR:30:3:339>
- Janssens, W., Bouillon, R., Claes, B., Carremans, C., Lehouck, A., Buyschaert, I., Coolen, J., Mathieu, C., Decramer, M., Lambrechts, D., 2010. Vitamin D deficiency is highly prevalent in COPD and correlates with variants in the vitamin D-binding gene. *Thorax* 65, 215–220. <https://doi.org/10.1136/thx.2009.120659>
- Jee, A.S., Sahhar, J., Youssef, P., Bleasel, J., Adelstein, S., Nguyen, M., Corte, T.J., 2019. Review: Serum biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis and systemic sclerosis associated interstitial lung disease - frontiers and horizons. *Pharmacol. Ther.* 202, 40–52. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.05.014>
- Jia, M., Rosas, L., Kapetanaki, M.G., Tabib, T., Sebrat, J., Cruz, T., Bondonese, A., Mora, A.L., Lafyatis, R., Rojas, M., Benos, P.V., 2023. Early events marking lung fibroblast transition to profibrotic state in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir. Res.* 24, 116. <https://doi.org/10.1186/s12931-023-02419-0>
- Jin, H., Yoo, Y., Kim, Younghwa, Kim, Yeijin, Cho, J., Lee, Y.-S., 2020. Radiation-Induced Lung Fibrosis: Preclinical Animal Models and Therapeutic Strategies. *Cancers* 12, 1561. <https://doi.org/10.3390/cancers12061561>
- Joannes, A., Brayer, S., Besnard, V., Marchal-Sommé, J., Jaillet, M., Mordant, P., Mal, H., Borie, R., Crestani, B., Mailleux, A.A., 2016. FGF9 and FGF18 in idiopathic pulmonary fibrosis promote survival and migration and inhibit myofibroblast differentiation of human lung fibroblasts in vitro. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 310, L615-629. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00185.2015>
- Joannes, A., Morzadec, C., Duclos, M., Bellamri, N., Gutierrez, F.L., Latour, B.R. de, Wollin, S.-L., Jouneau, S., Vernhet, L., 2019. Arsenic trioxide inhibits the functions on lung fibroblasts derived from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* 54. <https://doi.org/10.1183/13993003.congress-2019.PA5373>
- Johannson, K.A., Pendharkar, S.R., Mathison, K., Fell, C.D., Guenette, J.A., Kalluri, M., Kolb, M., Ryerson, C.J., 2017. Supplemental Oxygen in Interstitial Lung Disease: An Art in Need of Science. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 14, 1373–1377. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201702-137OI>
- Jones, G., Prosser, D.E., Kaufmann, M., 2012. 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): its important role in the degradation of vitamin D. *Arch. Biochem. Biophys.* 523, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.11.003>
- Jones, K.S., Assar, S., Harnpanich, D., Bouillon, R., Lambrechts, D., Prentice, A., Schoenmakers, I., 2014. 25(OH)D2 Half-Life Is Shorter Than 25(OH)D3 Half-Life and Is Influenced by DBP Concentration and Genotype. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, 3373–3381. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-1714>
- Jouneau, S., Crestani, B., Thibault, R., Lederlin, M., Vernhet, L., Yang, M., Morgenthien, E., Kirchgaessler, K.-U., Cottin, V., 2022a. Post hoc Analysis of Clinical Outcomes in Placebo- and Pirfenidone-Treated Patients with IPF Stratified by BMI and Weight Loss. *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* 101, 142–154. <https://doi.org/10.1159/000518855>
- Jouneau, S., Kerjouan, M., Rousseau, C., Lederlin, M., Llamas-Gutierrez, F., De Latour, B., Guillot, S., Vernhet, L., Desrues, B., Thibault, R., 2019a. What are the best indicators to assess malnutrition in idiopathic pulmonary fibrosis patients? A cross-sectional study in a referral center. *Nutrition* 62, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.12.008>
- Jouneau, S., Rousseau, C., Lederlin, M., Kerjouan, M., Guy, T., Sohier, L., Salé, A., Guillot, S., Vernhet, L., Oger, E., Thibault, R., 2019b. Low fat-free mass and body mass index are associated with worse survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). p. PA1337. <https://doi.org/10.1183/13993003.congress-2019.PA1337>
- Jouneau, S., Rousseau, C., Lederlin, M., Lescoat, A., Kerjouan, M., Chauvin, P., Luque-Paz, D., Guillot, S., Oger, E., Vernhet, L., Thibault, R., 2022b. Malnutrition and decreased food intake at

- diagnosis are associated with hospitalization and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis patients. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* 41, 1335–1342. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2022.05.001>
- Justet, A., Ghanem, M., Boghanim, T., Hachem, M., Vasarmidi, E., Jaillet, M., Vadel, A., Joannes, A., Mordant, P., Bonniaud, P., Kolb, M., Ling, L., Cazes, A., Mal, H., Mailleux, A., Crestani, B., 2022. FGF19 Is Downregulated in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Inhibits Lung Fibrosis in Mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 67, 173–187. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2021-0246OC>
- Justet, A., Joannes, A., Besnard, V., Marchal-Sommé, J., Jaillet, M., Bonniaud, P., Sallenave, J.M., Solhonne, B., Castier, Y., Mordant, P., Mal, H., Cazes, A., Borie, R., Mailleux, A.A., Crestani, B., 2017. FGF9 prevents pleural fibrosis induced by intrapleural adenovirus injection in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 313, L781–L795. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00508.2016>
- Kamboh, M.I., Ferrell, R.E., 1986. Ethnic variation in vitamin D-binding protein (GC): a review of isoelectric focusing studies in human populations. *Hum. Genet.* 72, 281–293. <https://doi.org/10.1007/BF00290950>
- Kärkkäinen, M., Kettunen, H.-P., Nurmi, H., Selander, T., Purokivi, M., Kaarteenaho, R., 2017. Effect of smoking and comorbidities on survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir. Res.* 18, 160. <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0642-6>
- Kasai, H., Allen, J.T., Mason, R.M., Kamimura, T., Zhang, Z., 2005. TGF- β 1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir. Res.* 6, 56. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-6-56>
- Keane, M.P., Belperio, J.A., Burdick, M.D., Strieter, R.M., 2001. IL-12 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 281, L92-97. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2001.281.1.L92>
- Kendall, R.T., Feghali-Bostwick, C.A., 2014. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front. Pharmacol.* 5.
- Khalil, N., O'Connor, R.N., Flanders, K.C., Unruh, H., 1996. TGF-beta 1, but not TGF-beta 2 or TGF-beta 3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 14, 131–138. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.14.2.8630262>
- Khoo, A.-L., Koenen, H.J.P.M., Chai, L.Y.A., Sweep, F.C.G.J., Netea, M.G., Ven, A.J.A.M. van der, Joosten, I., 2012. Seasonal Variation in Vitamin D3 Levels Is Paralleled by Changes in the Peripheral Blood Human T Cell Compartment. *PLoS ONE* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029250>
- Kim, H.-S., Rotundo, L., Kothari, N., Kim, S.-H., Pyrsopoulos, N., 2017. Vitamin D Is Associated with Severity and Mortality of Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A US Population-based Study. *J. Clin. Transl. Hepatol.* 5, 185–192. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2017.00025>
- Kim, S.-J., Cheresch, P., Jablonski, R.P., Williams, D.B., Kamp, D.W., 2015. The Role of Mitochondrial DNA in Mediating Alveolar Epithelial Cell Apoptosis and Pulmonary Fibrosis. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 21486–21519. <https://doi.org/10.3390/ijms160921486>
- King, T.E., Albera, C., Bradford, W.Z., Costabel, U., Hormel, P., Lancaster, L., Noble, P.W., Sahn, S.A., Swartzberg, J., Thomeer, M., Valeyre, D., du Bois, R.M., INSPIRE Study Group, 2009. Effect of interferon gamma-1b on survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (INSPIRE): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* 374, 222–228. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60551-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60551-1)
- King, T.E., Bradford, W.Z., Castro-Bernardini, S., Fagan, E.A., Glaspole, I., Glassberg, M.K., Gorina, E., Hopkins, P.M., Kardatzke, D., Lancaster, L., Lederer, D.J., Nathan, S.D., Pereira, C.A., Sahn, S.A., Sussman, R., Swigris, J.J., Noble, P.W., 2014. A Phase 3 Trial of Pirfenidone in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 370, 2083–2092. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1402582>
- King, T.E., Pardo, A., Selman, M., 2011. Idiopathic pulmonary fibrosis. *The Lancet* 378, 1949–1961. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60052-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60052-4)

- Kishi, M., Aono, Y., Sato, S., Koyama, K., Azuma, M., Abe, S., Kawano, H., Kishi, J., Toyoda, Y., Okazaki, H., Ogawa, H., Uehara, H., Nishioka, Y., 2018. Blockade of platelet-derived growth factor receptor- β , not receptor- α ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *PLOS ONE* 13, e0209786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209786>
- Kitagawa, T., Masumi, A., Akamatsu, Y., 1991. Transforming growth factor-beta 1 stimulates glucose uptake and the expression of glucose transporter mRNA in quiescent Swiss mouse 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 266, 18066–18071. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)55237-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)55237-6)
- Kleaveland, K.R., Velikoff, M., Yang, J., Agarwal, M., Rippe, R.A., Moore, B.B., Kim, K.K., 2014. Fibrocytes Are Not an Essential Source of Type I Collagen During Lung Fibrosis. *J. Immunol. Baltim. Md* 195 193, 5229–5239. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400753>
- Kolb, M., Margetts, P.J., Anthony, D.C., Pitossi, F., Gauldie, J., 2001. Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* 107, 1529–1536. <https://doi.org/10.1172/JCI12568>
- Kolb, M., Richeldi, L., Behr, J., Maher, T.M., Tang, W., Stowasser, S., Hallmann, C., Bois, R.M. du, 2017. Nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and preserved lung volume. *Thorax* 72, 340–346. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2016-208710>
- Kottmann, R.M., Kulkarni, A.A., Smolnycki, K.A., Lyda, E., Dahanayake, T., Salibi, R., Honnons, S., Jones, C., Isern, N.G., Hu, J.Z., Nathan, S.D., Grant, G., Phipps, R.P., Sime, P.J., 2012. Lactic Acid Is Elevated in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Induces Myofibroblast Differentiation via pH-Dependent Activation of Transforming Growth Factor- β . *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 186, 740–751. <https://doi.org/10.1164/rccm.201201-0084OC>
- Kreuter, M., Lederer, D.J., Molina-Molina, M., Noth, I., Valenzuela, C., Frankenstein, L., Weycker, D., Atwood, M., Kirchgassler, K.-U., Cottin, V., 2019. Association of Angiotensin Modulators With the Course of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Chest* 156, 706–714. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2019.04.015>
- Kropski, J.A., Blackwell, T.S., Loyd, J.E., 2015. The genetic basis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* 45, 1717–1727. <https://doi.org/10.1183/09031936.00163814>
- Kropski, J.A., Young, L.R., Cogan, J.D., Mitchell, D.B., Lancaster, L.H., Worrell, J.A., Markin, C., Liu, N., Mason, W.R., Fingerlin, T.E., Schwartz, D.A., Lawson, W.E., Blackwell, T.S., Phillips, J.A., Loyd, J.E., 2017. Genetic Evaluation and Testing of Patients and Families with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 195, 1423–1428. <https://doi.org/10.1164/rccm.201609-1820PP>
- Lancaster, L., Crestani, B., Hernandez, P., Inoue, Y., Wachtlin, D., Loaiza, L., Quaresma, M., Stowasser, S., Richeldi, L., 2019. Safety and survival data in patients with idiopathic pulmonary fibrosis treated with nintedanib: pooled data from six clinical trials. *BMJ Open Respir. Res.* 6, e000397. <https://doi.org/10.1136/bmjresp-2018-000397>
- Lee, C.G., Homer, R.J., Zhu, Z., Lanone, S., Wang, X., Koteliansky, V., Shipley, J.M., Gotwals, P., Noble, P., Chen, Q., Senior, R.M., Elias, J.A., 2001. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J. Exp. Med.* 194, 809–821. <https://doi.org/10.1084/jem.194.6.809>
- Lee, S.-A., Yang, H.-W., Um, J.-Y., Shin, J.-M., Park, I.-H., Lee, H.-M., 2017. Vitamin D attenuates myofibroblast differentiation and extracellular matrix accumulation in nasal polyp-derived fibroblasts through smad2/3 signaling pathway. *Sci. Rep.* 7, 7299. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07561-6>
- Lee, Y.H., Mungunsukh, O., Tutino, R.L., Marquez, A.P., Day, R.M., 2010. Angiotensin-II-induced apoptosis requires regulation of nucleolin and Bcl-xL by SHP-2 in primary lung endothelial cells. *J. Cell Sci.* 123, 1634–1643. <https://doi.org/10.1242/jcs.063545>
- Lehouck, A., Mathieu, C., Carremans, C., Baeke, F., Verhaegen, J., Van Eldere, J., Decallonne, B., Bouillon, R., Decramer, M., Janssens, W., 2012. High Doses of Vitamin D to Reduce Exacerbations in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Ann. Intern. Med.* 156, 105–114. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-156-2-201201170-00004>

- Lei, L., Zhao, C., Qin, F., He, Z.-Y., Wang, X., Zhong, X.-N., 2016. Th17 cells and IL-17 promote the skin and lung inflammation and fibrosis process in a bleomycin-induced murine model of systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 34 Suppl 100, 14–22.
- Ley, B., Brown, K.K., Collard, H.R., 2014. Molecular biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 307, L681–L691. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00014.2014>
- Li, D., Liu, Y., Wang, B., 2020. Single versus bilateral lung transplantation in idiopathic pulmonary fibrosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 15, e0233732. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233732>
- Li, R., Bernau, K., Sandbo, N., Gu, J., Preissl, S., Sun, X., n.d. Pdgfra marks a cellular lineage with distinct contributions to myofibroblasts in lung maturation and injury response. *eLife* 7, e36865. <https://doi.org/10.7554/eLife.36865>
- Li, S.-R., Tan, Z.-X., Chen, Y.-H., Hu, B., Zhang, C., Wang, H., Zhao, H., Xu, D.-X., 2019. Vitamin D deficiency exacerbates bleomycin-induced pulmonary fibrosis partially through aggravating TGF- β /Smad2/3-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Respir. Res.* 20, 266. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1232-6>
- Li, X., Molina-Molina, M., Abdul-Hafez, A., Ramirez, J., Serrano-Mollar, A., Xaubet, A., Uhal, B.D., 2006. Extravascular sources of lung angiotensin peptide synthesis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 291, L887-895. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00432.2005>
- Li, X., Molina-Molina, M., Abdul-Hafez, A., Uhal, V., Xaubet, A., Uhal, B.D., 2008. Angiotensin converting enzyme-2 is protective but downregulated in human and experimental lung fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 295, L178–L185. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00009.2008>
- Li, X., Zhang, H., Soledad-Conrad, V., Zhuang, J., Uhal, B.D., 2003. Bleomycin-induced apoptosis of alveolar epithelial cells requires angiotensin synthesis de novo. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 284, L501–L507. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00273.2002>
- Li, Y., Deng, Y., He, J., 2023. A novel prognostic index based on the analysis of glycolysis-related genes in idiopathic pulmonary fibrosis. *Medicine (Baltimore)* 102, e33330. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000033330>
- Liberti, M.V., Locasale, J.W., 2016. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem. Sci.* 41, 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>
- Littorin, B., Blom, P., Schölin, A., Arnqvist, H.J., Blohmé, G., Bolinder, J., Ekbom-Schnell, A., Eriksson, J.W., Gudbjörnsdóttir, S., Nyström, L., Ostman, J., Sundkvist, G., 2006. Lower levels of plasma 25-hydroxyvitamin D among young adults at diagnosis of autoimmune type 1 diabetes compared with control subjects: results from the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS). *Diabetologia* 49, 2847–2852. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0426-x>
- Liu, H., Chen, Y.-G., 2022. The Interplay Between TGF- β Signaling and Cell Metabolism. *Front. Cell Dev. Biol.* 10.
- Liu, H., Drew, P., Gaugler, A.C., Cheng, Y., Visner, G.A., 2005. Pirfenidone Inhibits Lung Allograft Fibrosis through L-Arginine–Arginase Pathway. *Am. J. Transplant.* 5, 1256–1263. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.00876.x>
- Liu, L.C.Y., Voors, A.A., van Veldhuisen, D.J., van der Veer, E., Belonje, A.M., Szymanski, M.K., Silljé, H.H.W., van Gilst, W.H., Jaarsma, T., de Boer, R.A., 2011. Vitamin D status and outcomes in heart failure patients. *Eur. J. Heart Fail.* 13, 619–625. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hfr032>
- Liu, R.-M., Desai, L.P., 2015. Reciprocal regulation of TGF- β and reactive oxygen species: A perverse cycle for fibrosis. *Redox Biol.* 6, 565–577. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.09.009>
- Liu, Y.-M., Nepali, K., Liou, J.-P., 2017. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Current Status, Recent Progress, and Emerging Targets. *J. Med. Chem.* 60, 527–553. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00935>
- Lopez-de la Mora, D.A., Sanchez-Roque, C., Montoya-Buelna, M., Sanchez-Enriquez, S., Lucano-Landeros, S., Macias-Barragan, J., Armendariz-Borunda, J., 2015. Role and New Insights of

- Pirfenidone in Fibrotic Diseases. *Int. J. Med. Sci.* 12, 840–847. <https://doi.org/10.7150/ijms.11579>
- Lv, Q., Wang, J., Xu, C., Huang, X., Ruan, Z., Dai, Y., 2020. Pirfenidone alleviates pulmonary fibrosis in vitro and in vivo through regulating Wnt/GSK-3 β / β -catenin and TGF- β 1/Smad2/3 signaling pathways. *Mol. Med. Camb. Mass* 26, 49. <https://doi.org/10.1186/s10020-020-00173-3>
- Lyons, R.M., Keski-Oja, J., Moses, H.L., 1988. Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J. Cell Biol.* 106, 1659–1665. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.5.1659>
- Ma, D., Peng, L., 2019a. Vitamin D and pulmonary fibrosis: a review of molecular mechanisms. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 12, 3171–3178.
- Ma, D., Peng, L., 2019b. Vitamin D and pulmonary fibrosis: a review of molecular mechanisms. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 12, 3171–3178.
- Ma, Z., Zhao, C., Chen, Q., Yu, C., Zhang, H., Zhang, Z., Huang, W., Shen, Z., 2018. Antifibrotic effects of a novel pirfenidone derivative in vitro and in vivo. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 53, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2018.10.006>
- MacLaughlin, J.A., Anderson, R.R., Holick, M.F., 1982. Spectral Character of Sunlight Modulates Photosynthesis of Previtamin D₃ and Its Photoisomers in Human Skin. *Science* 216, 1001–1003. <https://doi.org/10.1126/science.6281884>
- Magro, C.M., Waldman, W.J., Knight, D.A., Allen, J.N., Nadasdy, T., Frambach, G.E., Ross, P., Marsh, C.B., 2006. Idiopathic Pulmonary Fibrosis Related to Endothelial Injury and Antiendothelial Cell Antibodies. *Hum. Immunol.* 67, 284–297. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2006.02.026>
- Maher, T.M., 2015. Aerobic Glycolysis and the Warburg Effect. An Unexplored Realm in the Search for Fibrosis Therapies? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 192, 1407–1409. <https://doi.org/10.1164/rccm.201508-1699ED>
- Maher, T.M., Oballa, E., Simpson, J.K., Porte, J., Habgood, A., Fahy, W.A., Flynn, A., Molyneaux, P.L., Braybrooke, R., Divyateja, H., Parfrey, H., Rassl, D., Russell, A.-M., Saini, G., Renzoni, E.A., Duggan, A.-M., Hubbard, R., Wells, A.U., Lukey, P.T., Marshall, R.P., Jenkins, R.G., 2017. An epithelial biomarker signature for idiopathic pulmonary fibrosis: an analysis from the multicentre PROFILE cohort study. *Lancet Respir. Med.* 5, 946–955. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(17\)30430-7](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(17)30430-7)
- Maik-Rachline, G., Hacohen-Lev-Ran, A., Seger, R., 2019. Nuclear ERK: Mechanism of Translocation, Substrates, and Role in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1194. <https://doi.org/10.3390/ijms20051194>
- Malumbres, M., 2020. 4 - Control of the Cell Cycle, in: Niederhuber, J.E., Armitage, J.O., Kastan, M.B., Doroshow, J.H., Tepper, J.E. (Eds.), *Abeloff's Clinical Oncology (Sixth Edition)*. Elsevier, Philadelphia, pp. 56-73.e5. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47674-4.00004-9>
- Malumbres, M., 2014. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* 15, 122. <https://doi.org/10.1186/gb4184>
- Marchal-Sommé, J., Uzunhan, Y., Marchand-Adam, S., Kambouchner, M., Valeyre, D., Crestani, B., Soler, P., 2007. Dendritic cells accumulate in human fibrotic interstitial lung disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 176, 1007–1014. <https://doi.org/10.1164/rccm.200609-1347OC>
- Marchal-Sommé, J., Uzunhan, Y., Marchand-Adam, S., Valeyre, D., Soumelis, V., Crestani, B., Soler, P., 2006. Cutting edge: nonproliferating mature immune cells form a novel type of organized lymphoid structure in idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 5735–5739. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.10.5735>
- Marchand-Adam, S., Marchal, J., Cohen, M., Soler, P., Gerard, B., Castier, Y., Lesèche, G., Valeyre, D., Mal, H., Aubier, M., Dehoux, M., Crestani, B., 2003. Defect of Hepatocyte Growth Factor Secretion by Fibroblasts in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168, 1156–1161. <https://doi.org/10.1164/rccm.200212-1514OC>
- Marijic, P., Schwarzkopf, L., Schwettmann, L., Ruhnke, T., Trudzinski, F., Kreuter, M., 2021. Pirfenidone vs. nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: a retrospective cohort study. *Respir. Res.* 22, 268. <https://doi.org/10.1186/s12931-021-01857-y>

- Martineau, A.R., James, W.Y., Hooper, R.L., Barnes, N.C., Jolliffe, D.A., Greiller, C.L., Islam, K., McLaughlin, D., Bhowmik, A., Timms, P.M., Rajakulasingam, R.K., Rowe, M., Venton, T.R., Choudhury, A.B., Simcock, D.E., Wilks, M., Degun, A., Sadique, Z., Monteiro, W.R., Corrigan, C.J., Hawrylowicz, C.M., Griffiths, C.J., 2015. Vitamin D3 supplementation in patients with chronic obstructive pulmonary disease (ViDiCO): a multicentre, double-blind, randomised controlled trial. *Lancet Respir. Med.* 3, 120–130. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70255-3](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70255-3)
- Martineau, C., Naja, R.P., Hussein, A., Hamade, B., Kaufmann, M., Akhouayri, O., Arabian, A., Jones, G., St-Arnaud, R., n.d. Optimal bone fracture repair requires 24R,25-dihydroxyvitamin D3 and its effector molecule FAM57B2. *J. Clin. Invest.* 128, 3546–3557. <https://doi.org/10.1172/JCI98093>
- Mathieu, C., Van Etten, E., Gysemans, C., Decallonne, B., Kato, S., Laureys, J., Depovere, J., Valckx, D., Verstuyf, A., Bouillon, R., 2001. In Vitro and In Vivo Analysis of the Immune System of Vitamin D Receptor Knockout Mice. *J. Bone Miner. Res.* 16, 2057–2065. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.11.2057>
- Mehrad, B., Burdick, M.D., Zisman, D.A., Keane, M.P., Belperio, J.A., Strieter, R.M., 2007. Circulating peripheral blood fibrocytes in human fibrotic interstitial lung disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353, 104–108. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.11.149>
- Mei, Q., Liu, Z., Zuo, H., Yang, Z., Qu, J., 2022. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: An Update on Pathogenesis. *Front. Pharmacol.* 12, 797292. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.797292>
- Mercer, P.F., Woodcock, H.V., Eley, J.D., Platé, M., Sulikowski, M.G., Durrenberger, P.F., Franklin, L., Nanthakumar, C.B., Man, Y., Genovese, F., McAnulty, R.J., Yang, S., Maher, T.M., Nicholson, A.G., Blanchard, A.D., Marshall, R.P., Lukey, P.T., Chambers, R.C., 2016. Exploration of a potent PI3 kinase/mTOR inhibitor as a novel anti-fibrotic agent in IPF. *Thorax* 71, 701–711. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-207429>
- Meredith, A., Boroomand, S., Carthy, J., Luo, Z., McManus, B., 2015. 1,25 Dihydroxyvitamin D3 Inhibits TGFβ1-Mediated Primary Human Cardiac Myofibroblast Activation. *PLOS ONE* 10, e0128655. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128655>
- Merlino, L.A., Curtis, J., Mikuls, T.R., Cerhan, J.R., Criswell, L.A., Saag, K.G., Iowa Women’s Health Study, 2004. Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women’s Health Study. *Arthritis Rheum.* 50, 72–77. <https://doi.org/10.1002/art.11434>
- Midwood, K.S., Williams, L.V., Schwarzbauer, J.E., 2004. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int. J. Biochem. Cell Biol., Modulatory Adhesion Molecules in Tissue Homeostasis* 36, 1031–1037. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.12.003>
- Miller, L.A., Barnett, N.L., Sheppard, D., Hyde, D.M., 2001. Expression of the beta6 integrin subunit is associated with sites of neutrophil influx in lung epithelium. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 49, 41–48. <https://doi.org/10.1177/002215540104900105>
- Minagawa, S., Araya, J., Numata, T., Nojiri, S., Hara, H., Yumino, Y., Kawaishi, M., Odaka, M., Morikawa, T., Nishimura, S.L., Nakayama, K., Kuwano, K., 2011. Accelerated epithelial cell senescence in IPF and the inhibitory role of SIRT6 in TGF-β-induced senescence of human bronchial epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 300, L391-401. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00097.2010>
- Moeller, A., Gilpin, S.E., Ask, K., Cox, G., Cook, D., Gauldie, J., Margetts, P.J., Farkas, L., Dobranowski, J., Boylan, C., O’Byrne, P.M., Strieter, R.M., Kolb, M., 2009. Circulating Fibrocytes Are an Indicator of Poor Prognosis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 179, 588–594. <https://doi.org/10.1164/rccm.200810-1534OC>
- Moffatt, K.A., Johannes, W.U., Hedlund, T.E., Miller, G.J., 2001. Growth inhibitory effects of 1α, 25-dihydroxyvitamin D(3) are mediated by increased levels of p21 in the prostatic carcinoma cell line ALVA-31. *Cancer Res.* 61, 7122–7129.
- Molina-Molina, M., Lario, S., Luburich, P., Ramírez, J., Carrión, M.T., Xaubet, A., 2006. [Quantifying plasma levels of transforming growth factor beta1 in idiopathic pulmonary fibrosis]. *Arch. Bronconeumol.* 42, 380–383. [https://doi.org/10.1016/s1579-2129\(06\)60550-8](https://doi.org/10.1016/s1579-2129(06)60550-8)

- Molyneaux, P.L., Cox, M.J., Willis-Owen, S.A.G., Mallia, P., Russell, K.E., Russell, A.-M., Murphy, E., Johnston, S.L., Schwartz, D.A., Wells, A.U., Cookson, W.O.C., Maher, T.M., Moffatt, M.F., 2014. The Role of Bacteria in the Pathogenesis and Progression of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 190, 906. <https://doi.org/10.1164/rccm.201403-0541OC>
- Moore, B.B., Hogaboam, C.M., 2008. Murine models of pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 294, L152–L160. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00313.2007>
- Munger, J.S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M.J., Dalton, S.L., Wu, J., Pittet, J.F., Kaminski, N., Garat, C., Matthay, M.A., Rifkin, D.B., Sheppard, D., 1999. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 96, 319–328. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80545-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80545-0)
- Munger, K.L., Levin, L.I., Hollis, B.W., Howard, N.S., Ascherio, A., 2006. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA* 296, 2832–2838. <https://doi.org/10.1001/jama.296.23.2832>
- Munson, J.C., Kreider, M., Chen, Z., Christie, J.D., Kimmel, S.E., 2010. Factors associated with the use of corticosteroids in the initial management of idiopathic pulmonary fibrosis. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* 19, 756–762. <https://doi.org/10.1002/pds.1959>
- Nakatsuka, Y., Handa, T., Kokosi, M., Tanizawa, K., Puglisi, S., Jacob, J., Sokai, A., Ikezoe, K., Kanatani, K.T., Kubo, T., Tomioka, H., Taguchi, Y., Nagai, S., Chin, K., Mishima, M., Wells, A.U., Hirai, T., 2018. The Clinical Significance of Body Weight Loss in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Patients. *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* 96, 338–347. <https://doi.org/10.1159/000490355>
- Naqvi, S.F., Lakhani, D.A., Sohail, A.H., Maurer, J., Sofka, S., Sarwari, A., Hadi, Y.B., 2021. Patients with idiopathic pulmonary fibrosis have poor clinical outcomes with COVID-19 disease: a propensity matched multicentre research network analysis. *BMJ Open Respir. Res.* 8, e000969. <https://doi.org/10.1136/bmjresp-2021-000969>
- Nathan, J., Shameera, R., Palanivel, G., 2022. Studying molecular signaling in major angiogenic diseases. *Mol. Cell. Biochem.* 477, 2433–2450. <https://doi.org/10.1007/s11010-022-04452-x>
- Nathan, S.D., Albera, C., Bradford, W.Z., Costabel, U., Glaspole, I., Glassberg, M.K., Kardatzke, D.R., Daigl, M., Kirchgassler, K.-U., Lancaster, L.H., Lederer, D.J., Pereira, C.A., Swigris, J.J., Valeyre, D., Noble, P.W., 2017. Effect of pirfenidone on mortality: pooled analyses and meta-analyses of clinical trials in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet Respir. Med.* 5, 33–41. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(16\)30326-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(16)30326-5)
- Nie, Y.-J., Wu, S.-H., Xuan, Y.-H., Yan, G., 2022. Role of IL-17 family cytokines in the progression of IPF from inflammation to fibrosis. *Mil. Med. Res.* 9, 21. <https://doi.org/10.1186/s40779-022-00382-3>
- Nishiyama, O., Yamazaki, R., Sano, H., Iwanaga, T., Higashimoto, Y., Kume, H., Tohda, Y., 2017. Fat-free mass index predicts survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirol. Carlton Vic* 22, 480–485. <https://doi.org/10.1111/resp.12941>
- Nosedá, M., Fu, Y., Niessen, K., Wong, F., Chang, L., McLean, G., Karsan, A., 2006. Smooth Muscle alpha-actin is a direct target of Notch/CSL. *Circ. Res.* 98, 1468–1470. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000229683.81357.26>
- Noth, I., Zhang, Y., Ma, S.-F., Flores, C., Barber, M., Huang, Y., Broderick, S.M., Wade, M.S., Hysi, P., Scuirba, J., Richards, T.J., Juan-Guardela, B.M., Vij, R., Han, M.K., Martinez, F.J., Kossen, K., Seiwert, S.D., Christie, J.D., Nicolae, D., Kaminski, N., Garcia, J.G.N., 2013. Genetic variants associated with idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility and mortality: a genome-wide association study. *Lancet Respir. Med.* 1, 309–317. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(13\)70045-6](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(13)70045-6)
- Nuovo, G.J., Hagood, J.S., Magro, C.M., Chin, N., Kapil, R., Davis, L., Marsh, C.B., Folcik, V.A., 2012. The distribution of immunomodulatory cells in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 25, 416–433. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.166>
- Nykjaer, A., Dragun, D., Walther, D., Vorum, H., Jacobsen, C., Herz, J., Melsen, F., Christensen, E.I., Willnow, T.E., 1999. An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the

- steroid 25-(OH) vitamin D3. *Cell* 96, 507–515. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80655-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80655-8)
- Oak, S.R., Murray, L., Herath, A., Sleeman, M., Anderson, I., Joshi, A.D., Coelho, A.L., Flaherty, K.R., Toews, G.B., Knight, D., Martinez, F.J., Hogaboam, C.M., 2011. A Micro RNA Processing Defect in Rapidly Progressing Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLOS ONE* 6, e21253. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021253>
- Oh, C.K., Murray, L.A., Molfino, N.A., 2012. Smoking and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Pulm. Med.* 2012, 808260. <https://doi.org/10.1155/2012/808260>
- Ohbayashi, M., Kubota, S., Kawase, A., Kohyama, N., Kobayashi, Y., Yamamoto, T., 2014. Involvement of epithelial-mesenchymal transition in methotrexate-induced pulmonary fibrosis. *J. Toxicol. Sci.* 39, 319–330. <https://doi.org/10.2131/jts.39.319>
- Oku, H., Nakazato, H., Horikawa, T., Tsuruta, Y., Suzuki, R., 2002. Pirfenidone suppresses tumor necrosis factor- α , enhances interleukin-10 and protects mice from endotoxic shock. *Eur. J. Pharmacol.* 446, 167–176. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(02\)01757-0](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(02)01757-0)
- Oku, H., Shimizu, T., Kawabata, T., Nagira, M., Hikita, I., Ueyama, A., Matsushima, S., Torii, M., Arimura, A., 2008. Antifibrotic action of pirfenidone and prednisolone: Different effects on pulmonary cytokines and growth factors in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis. *Eur. J. Pharmacol.* 590, 400–408. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.06.046>
- O’Leary, E.M., Tian, Y., Nigdelioglu, R., Witt, L.J., Cetin-Atalay, R., Meliton, A.Y., Woods, P.S., Kimmig, L.M., Sun, K.A., Gökalp, G.A., Mutlu, G.M., Hamanaka, R.B., 2020. TGF- β Promotes Metabolic Reprogramming in Lung Fibroblasts via mTORC1-dependent ATF4 Activation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 63, 601–612. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2020-0143OC>
- Pandit, K.V., Milosevic, J., Kaminski, N., 2011. MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis. *Transl. Res., MicroRNAs: A potential new frontier for medicine* 157, 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2011.01.012>
- Papiris, S.A., Manali, E.D., Kolilekas, L., Triantafyllidou, C., Tsangaris, I., Kagouridis, K., 2012. Steroids in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Acute Exacerbation: Defenders or Killers? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 185, 587–588. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.185.5.587>
- Pardo, A., Selman, M., 2016. Lung Fibroblasts, Aging, and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 13 Suppl 5, S417–S421. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201605-341AW>
- Park, J., Kim, D.S., Shim, T.S., Lim, C.-M., Koh, Y., Lee, S.D., Kim, W.S., Kim, W.D., Lee, J.S., Song, K.S., 2001. Lung cancer in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* 17, 1216–1219. <https://doi.org/10.1183/09031936.01.99055301>
- Park, Y., Ahn, C., Kim, T.-H., 2021. Occupational and environmental risk factors of idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review and meta-analyses. *Sci. Rep.* 11, 4318. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81591-z>
- Parker, M.W., Rossi, D., Peterson, M., Smith, K., Sikström, K., White, E.S., Connett, J.E., Henke, C.A., Larsson, O., Bitterman, P.B., 2014. Fibrotic extracellular matrix activates a profibrotic positive feedback loop. *J. Clin. Invest.* 124, 1622–1635. <https://doi.org/10.1172/JCI71386>
- Patrucco, F., Solidoro, P., Gavelli, F., Apostolo, D., Bellan, M., 2023. Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Post-COVID-19 Lung Fibrosis: Links and Risks. *Microorganisms* 11, 895. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040895>
- Pechkovsky, D.V., Prasse, A., Kollert, F., Engel, K.M.Y., Dentler, J., Luttmann, W., Friedrich, K., Müller-Quernheim, J., Zissel, G., 2010. Alternatively activated alveolar macrophages in pulmonary fibrosis—mediator production and intracellular signal transduction. *Clin. Immunol.* 137, 89–101. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2010.06.017>
- Peng, R., Sridhar, S., Tyagi, G., Phillips, J.E., Garrido, R., Harris, P., Burns, L., Renteria, L., Woods, J., Chen, L., Allard, J., Ravindran, P., Bitter, H., Liang, Z., Hogaboam, C.M., Kitson, C., Budd, D.C., Fine, J.S., Bauer, C.M., Stevenson, C.S., 2013. Bleomycin Induces Molecular Changes Directly Relevant to Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Model for “Active” Disease. *PLOS ONE* 8, e59348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059348>

- Phillips, R.J., Burdick, M.D., Hong, K., Lutz, M.A., Murray, L.A., Xue, Y.Y., Belperio, J.A., Keane, M.P., Strieter, R.M., 2004. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J. Clin. Invest.* 114, 438–446. <https://doi.org/10.1172/JCI20997>
- Pike, J.W., Meyer, M.B., 2012. Regulation of Mouse Cyp24a1 Expression via Promoter-Proximal and Downstream-Distal Enhancers Highlights New Concepts of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Action. *Arch. Biochem. Biophys.* 523, 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.12.003>
- Potter, J.J., Liu, X., Koteish, A., Mezey, E., 2013. 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its nuclear receptor repress human $\alpha 1(I)$ collagen expression and type I collagen formation. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* 33, 10.1111/liv.12122. <https://doi.org/10.1111/liv.12122>
- Pozharskaya, V., Torres-González, E., Rojas, M., Gal, A., Amin, M., Dollard, S., Roman, J., Stecenko, A.A., Mora, A.L., 2009. Twist: A Regulator of Epithelial-Mesenchymal Transition in Lung Fibrosis. *PLoS ONE* 4, e7559. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007559>
- Prud'homme, G.J., 2007. Pathobiology of transforming growth factor β in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations. *Lab. Invest.* 87, 1077–1091. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700669>
- Qian, W., Cai, X., Qian, Q., Zhang, W., Tian, L., 2020. Metastasis-associated protein 1 promotes epithelial-mesenchymal transition in idiopathic pulmonary fibrosis by up-regulating Snail expression. *J. Cell. Mol. Med.* 24, 5998–6007. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15062>
- Raghu, G., Chen, S.-Y., Yeh, W.-S., Maroni, B., Li, Q., Lee, Y.-C., Collard, H.R., 2014a. Idiopathic pulmonary fibrosis in US Medicare beneficiaries aged 65 years and older: incidence, prevalence, and survival, 2001-11. *Lancet Respir. Med.* 2, 566–572. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70101-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70101-8)
- Raghu, G., Collard, H.R., Egan, J.J., Martinez, F.J., Behr, J., Brown, K.K., Colby, T.V., Cordier, J.-F., Flaherty, K.R., Lasky, J.A., Lynch, D.A., Ryu, J.H., Swigris, J.J., Wells, A.U., Ancochea, J., Bouros, D., Carvalho, C., Costabel, U., Ebina, M., Hansell, D.M., Johkoh, T., Kim, D.S., King, T.E., Kondoh, Y., Myers, J., Müller, N.L., Nicholson, A.G., Richeldi, L., Selman, M., Dudden, R.F., Griss, B.S., Protzko, S.L., Schünemann, H.J., 2011. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Evidence-based Guidelines for Diagnosis and Management. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183, 788–824. <https://doi.org/10.1164/rccm.2009-040GL>
- Raghu, G., Collins, B.F., Xia, D., Schmidt, R., Abraham, J.L., 2014b. Pulmonary fibrosis associated with aluminum trihydrate (Corian) dust. *N. Engl. J. Med.* 370, 2154–2156. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1404786>
- Raghu, G., Nathan, S.D., Behr, J., Brown, K.K., Egan, J.J., Kawut, S.M., Flaherty, K.R., Martinez, F.J., Wells, A.U., Shao, L., Zhou, H., Henig, N., Szwarcberg, J., Gillies, H., Montgomery, A.B., O'Riordan, T.G., 2015. Pulmonary hypertension in idiopathic pulmonary fibrosis with mild-to-moderate restriction. *Eur. Respir. J.* 46, 1370–1377. <https://doi.org/10.1183/13993003.01537-2014>
- 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., Flaherty, K.R., Wells, A., Martinez, F.J., Azuma, A., Bice, T.J., Bouros, D., Brown, K.K., Collard, H.R., Duggal, A., Galvin, L., Inoue, Y., Jenkins, R.G., Johkoh, T., Kazerooni, E.A., Kitaichi, M., Knight, S.L., Mansour, G., Nicholson, A.G., Pipavath, S.N.J., Buendía-Roldán, I., Selman, M., Travis, W.D., Walsh, S.L.F., Wilson, K.C., 2018. Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 198, e44–e68. <https://doi.org/10.1164/rccm.201807-1255ST>
- Raghu, G., Remy-Jardin, M., Richeldi, L., Thomson, C.C., Inoue, Y., Johkoh, T., Kreuter, M., Lynch, D.A., Maher, T.M., Martinez, F.J., Molina-Molina, M., Myers, J.L., Nicholson, A.G., Ryerson, C.J., Streck, M.E., Troy, L.K., Wijsenbeek, M., Mammen, M.J., Hossain, T., Bissell, B.D., Herman, D.D., Hon, S.M., Kheir, F., Khor, Y.H., Macrea, M., Antoniou, K.M., Bouros, D., Buendia-Roldan, I., Caro, F., Crestani, B., Ho, L., Morisset, J., Olson, A.L., Podolanczuk, A., Poletti, V., Selman, M., Ewing, T., Jones, S., Knight, S.L., Ghazipura, M., Wilson, K.C., 2022. 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. <https://doi.org/10.1164/rccm.202202-0399ST>

- Raghu, G., Selman, M., 2015. Nintedanib and Pirfenidone. New Antifibrotic Treatments Indicated for Idiopathic Pulmonary Fibrosis Offer Hopes and Raises Questions. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 191, 252–254. <https://doi.org/10.1164/rccm.201411-2044ED>
- Rajagopal, K., Bryant, A.J., Sahay, S., Wareing, N., Zhou, Y., Pandit, L.M., Karmouty-Quintana, H., 2021. Idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension: Heracles meets the Hydra. *Br. J. Pharmacol.* 178, 172–186. <https://doi.org/10.1111/bph.15036>
- Ramagopalan, S.V., Heger, A., Berlanga, A.J., Maugeri, N.J., Lincoln, M.R., Burrell, A., Handunnetthi, L., Handel, A.E., Disanto, G., Orton, S.-M., Watson, C.T., Morahan, J.M., Giovannoni, G., Ponting, C.P., Ebers, G.C., Knight, J.C., 2010. A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: Associations with disease and evolution. *Genome Res.* 20, 1352–1360. <https://doi.org/10.1101/gr.107920.110>
- Ramirez, A.M., Wongtrakool, C., Welch, T., Steinmeyer, A., Zügel, U., Roman, J., 2010. Vitamin D inhibition of pro-fibrotic effects of transforming growth factor β 1 in lung fibroblasts and epithelial cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 118, 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2009.11.004>
- Rangarajan, S., Kurundkar, A., Kurundkar, D., Bernard, K., Sanders, Y.Y., Ding, Q., Antony, V.B., Zhang, J., Zmijewski, J., Thannickal, V.J., 2016. Novel Mechanisms for the Antifibrotic Action of Nintedanib. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 54, 51–59. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2014-0445OC>
- Reilkoff, R.A., Peng, H., Murray, L.A., Peng, X., Russell, T., Montgomery, R., Feghali-Bostwick, C., Shaw, A., Homer, R.J., Gulati, M., Mathur, A., Elias, J.A., Herzog, E.L., 2013. Semaphorin 7a+ regulatory T cells are associated with progressive idiopathic pulmonary fibrosis and are implicated in transforming growth factor- β 1-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 187, 180–188. <https://doi.org/10.1164/rccm.201206-1109OC>
- Rieg, A.D., Suleiman, S., Anker, C., Bünting, N.A., Verjans, E., Spillner, J., Kalverkamp, S., von Stillfried, S., Braunschweig, T., Uhlig, S., Martin, C., 2022. Platelet-derived growth factor (PDGF)-BB regulates the airway tone via activation of MAP2K, thromboxane, actin polymerisation and Ca²⁺-sensitisation. *Respir. Res.* 23, 189. <https://doi.org/10.1186/s12931-022-02101-x>
- Roberts, S.N., Howie, S.E., Wallace, W.A., Brown, D.M., Lamb, D., Ramage, E.A., Donaldson, K., 1995. A novel model for human interstitial lung disease: hapten-driven lung fibrosis in rodents. *J. Pathol.* 176, 309–318. <https://doi.org/10.1002/path.1711760313>
- Robertson, I.B., Horiguchi, M., Zilberberg, L., Dabovic, B., Hadjiolova, K., Rifkin, D.B., 2015. Latent TGF- β -binding proteins. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 47, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.05.005>
- Robertson, I.B., Rifkin, D.B., 2016. Regulation of the Bioavailability of TGF- β and TGF- β -Related Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8, a021907. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021907>
- Rock, J.R., Barkauskas, C.E., Cronic, M.J., Xue, Y., Harris, J.R., Liang, J., Noble, P.W., Hogan, B.L.M., 2011. Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, E1475. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117988108>
- Rolf, L., Muris, A., Hupperts, R., Damoiseaux, J., 2016. Illuminating vitamin D effects on B cells – the multiple sclerosis perspective. *Immunology* 147, 275–284. <https://doi.org/10.1111/imm.12572>
- Romagnani, S., 2000. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.* 85, 21. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)62426-X](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)62426-X)
- Rosas, L., Jia, M., Cruz, T., Kapetanaki, M., Tabib, T., Sembrat, J., Stacey, S., Reader, B., Peters, V., Riley, M., Kralovic, K., Lafyatis, R.A., Mora, A.L., Benos, P.V., Rojas, M., 2022. Selective Expression of MOXD1 in IPF Fibroblast Correlates with Cell Senescence, in: A60. PULMONARY FIBROSIS: ANIMAL AND CELL CULTURE MODELS. Presented at the American Thoracic Society 2022 International Conference, May 13-18, 2022 - San Francisco, CA, American Thoracic Society, pp.

- A1967–A1967. https://doi.org/10.1164/ajrccm-conference.2022.205.1_MeetingAbstracts.A1967
- Rostand, S.G., 1997. Ultraviolet light may contribute to geographic and racial blood pressure differences. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 30, 150–156. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.30.2.150>
- Ruaro, B., Salton, F., Braga, L., Wade, B., Confalonieri, P., Volpe, M.C., Baratella, E., Maiocchi, S., Confalonieri, M., 2021. The History and Mystery of Alveolar Epithelial Type II Cells: Focus on Their Physiologic and Pathologic Role in Lung. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 2566. <https://doi.org/10.3390/ijms22052566>
- Sakao, S., Tanabe, N., Tatsumi, K., 2019. Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction and the Diffusing Capacity in Pulmonary Hypertension Secondary to Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J. Am. Heart Assoc.* 8, e013310. <https://doi.org/10.1161/JAHA.119.013310>
- Sánchez, I., Dynlacht, B.D., 2005. New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16, 311–321. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2005.02.007>
- Santos, J.M., Khan, Z.S., Munir, M.T., Tarafdar, K., Rahman, S.M., Hussain, F., 2018. Vitamin D 3 decreases glycolysis and invasiveness, and increases cellular stiffness in breast cancer cells. *J. Nutr. Biochem.* 53, 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.10.013>
- Sava, P., Ramanathan, A., Dobronyi, A., Peng, X., Sun, H., Ledesma-Mendoza, A., Herzog, E.L., Gonzalez, A.L., n.d. Human pericytes adopt myofibroblast properties in the microenvironment of the IPF lung. *JCI Insight* 2, e96352. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.96352>
- Scaglione-Sewell, B.A., Bissonnette, M., Skarosi, S., Abraham, C., Brasitus, T.A., 2000. A Vitamin D3 Analog Induces a G1-Phase Arrest in CaCo-2 Cells by Inhibiting Cdk2 and Cdk6: Roles of Cyclin E, p21Waf1, and p27Kip1**This work was supported by National Institutes of Health Grants DK-39573, CA-36745 (to T.A.B. and M.B.) and P30DK42086 (to T.A.B., Digestive Disease Research Core Center). *Endocrinology* 141, 3931–3939. <https://doi.org/10.1210/endo.141.11.7782>
- Schiller, M., Javelaud, D., Mauviel, A., 2004. TGF- β -induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J. Dermatol. Sci.* 35, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2003.12.006>
- Schmierer, B., Hill, C.S., 2007. TGF β –SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 970–982. <https://doi.org/10.1038/nrm2297>
- Schols, A.M.W.J., Soeters, P.B., Dingemans, A.M.C., Mostert, R., Frantzen, P.J., Wouters, E.F.M., 1993. Prevalence and Characteristics of Nutritional Depletion in Patients with Stable COPD Eligible for Pulmonary Rehabilitation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 147, 1151–1156. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/147.5.1151>
- Schruf, E., Schroeder, V., Kuttruff, C.A., Weigle, S., Krell, M., Benz, M., Bretschneider, T., Holweg, A., Schuler, M., Frick, M., Nicklin, P., Garnett, J.P., Sobotta, M.C., 2019. Human lung fibroblast-to-myofibroblast transformation is not driven by an LDH5-dependent metabolic shift towards aerobic glycolysis. *Respir. Res.* 20, 87. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1058-2>
- Schupp, J.C., Binder, H., Jäger, B., Cillis, G., Zissel, G., Müller-Quernheim, J., Prasse, A., 2015. Macrophage Activation in Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLOS ONE* 10, e0116775. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116775>
- Selman, M., Pardo, A., 2020. The leading role of epithelial cells in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell. Signal.* 66, 109482. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109482>
- Shenderov, K., Collins, S.L., Powell, J.D., Horton, M.R., 2021. Immune dysregulation as a driver of idiopathic pulmonary fibrosis [WWW Document]. <https://doi.org/10.1172/JCI143226>
- Sheng, G., Chen, P., Wei, Y., Yue, H., Chu, J., Zhao, J., Wang, Y., Zhang, W., Zhang, H.-L., 2020. Viral Infection Increases the Risk of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Meta-analysis. *Chest* 157, 1175. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2019.10.032>
- Shi, H., Xu, J., Zhao, R., Wu, H., Gu, L., Chen, Y., 2016. FGF2 regulates proliferation, migration, and invasion of ECA109 cells through PI3K/Akt signalling pathway in vitro. *Cell Biol. Int.* 40, 524–533. <https://doi.org/10.1002/cbin.10588>

- Shi, L., Zhou, L., Han, M., Zhang, Yu, Zhang, Yang, Yuan, X.-X., Lu, H.-P., Wang, Y., Yang, X.-L., Liu, C., Wang, J., Liang, P., Liu, S.-A., Liu, X.-J., Cheng, J., Lin, S.-M., 2023. Calcitriol attenuates liver fibrosis through hepatitis C virus nonstructural protein 3-transactivated protein 1-mediated TGF β 1/Smad3 and NF- κ B signaling pathways. *World J. Gastroenterol.* 29, 2798–2817. <https://doi.org/10.3748/wjg.v29.i18.2798>
- Shi, Q., Liu, X., Bai, Y., Cui, C., Li, J., Li, Y., Hu, S., Wei, Y., 2011. In Vitro Effects of Pirfenidone on Cardiac Fibroblasts: Proliferation, Myofibroblast Differentiation, Migration and Cytokine Secretion. *PLOS ONE* 6, e28134. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028134>
- Shi, Y., Liu, T., Yao, L., Xing, Y., Zhao, X., Fu, J., Xue, X., 2017. Chronic vitamin D deficiency induces lung fibrosis through activation of the renin-angiotensin system. *Sci. Rep.* 7, 3312. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03474-6>
- Shimbori, C., Bellaye, P.-S., Xia, J., Gauldie, J., Ask, K., Ramos, C., Becerril, C., Pardo, A., Selman, M., Kolb, M., 2016. Fibroblast growth factor-1 attenuates TGF- β 1-induced lung fibrosis. *J. Pathol.* 240, 197–210. <https://doi.org/10.1002/path.4768>
- Shin, J.-S., 2019. Unexpected role of dendritic cells in pulmonary fibrosis. *Thorax* 74, 925–926. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2019-213510>
- Sime, P.J., Marr, R.A., Gauldie, D., Xing, Z., Hewlett, B.R., Graham, F.L., Gauldie, J., 1998. Transfer of tumor necrosis factor-alpha to rat lung induces severe pulmonary inflammation and patchy interstitial fibrogenesis with induction of transforming growth factor-beta1 and myofibroblasts. *Am. J. Pathol.* 153, 825–832. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)65624-6](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)65624-6)
- Sime, P.J., Xing, Z., Graham, F.L., Csaky, K.G., Gauldie, J., 1997. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J. Clin. Invest.* 100, 768–776.
- Simler, N.R., Brenchley, P.E., Horrocks, A.W., Greaves, S.M., Hasleton, P.S., Egan, J.J., 2004. Angiogenic cytokines in patients with idiopathic interstitial pneumonia. *Thorax* 59, 581–585. <https://doi.org/10.1136/thx.2003.009860>
- Sowa, Y., Kishida, T., Louis, F., Sawai, S., Seki, M., Numajiri, T., Takahashi, K., Mazda, O., 2021. Direct Conversion of Human Fibroblasts into Adipocytes Using a Novel Small Molecular Compound: Implications for Regenerative Therapy for Adipose Tissue Defects. *Cells* 10. <https://doi.org/10.3390/cells10030605>
- Spagnolo, P., Sverzellati, N., Rossi, G., Cavazza, A., Tzouveleki, A., Crestani, B., Vancheri, C., 2015. Idiopathic pulmonary fibrosis: an update. *Ann. Med.* 47, 15–27. <https://doi.org/10.3109/07853890.2014.982165>
- Spath, L., Ulivieri, A., Lavra, L., Fidanza, L., Carlesimo, M., Giubettini, M., Narcisi, A., Luciani, E., Bucci, B., Pisani, D., Sciacchitano, S., Bartolazzi, A., 2017. Antiproliferative Effects of 1 α -OH-vitD3 in Malignant Melanoma: Potential Therapeutic implications. *Sci. Rep.* 7, 40370. <https://doi.org/10.1038/srep40370>
- St-Arnaud, R., 2010. CYP24A1-deficient mice as a tool to uncover a biological activity for vitamin D metabolites hydroxylated at position 24. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 121, 254–256. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.02.002>
- St-Arnaud, R., Arabian, A., Travers, R., Barletta, F., Raval-Pandya, M., Chapin, K., Depovere, J., Mathieu, C., Christakos, S., Demay, M.B., Glorieux, F.H., 2000. Deficient mineralization of intramembranous bone in vitamin D-24-hydroxylase-ablated mice is due to elevated 1,25-dihydroxyvitamin D and not to the absence of 24,25-dihydroxyvitamin D. *Endocrinology* 141, 2658–2666. <https://doi.org/10.1210/endo.141.7.7579>
- Stolfi, C., Troncone, E., Marafini, I., Monteleone, G., 2021. Role of TGF-Beta and Smad7 in Gut Inflammation, Fibrosis and Cancer. *Biomolecules* 11, 17. <https://doi.org/10.3390/biom11010017>
- Strzalka, W., Ziemienowicz, A., 2011. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Ann. Bot.* 107, 1127–1140. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq243>

- Sueblinvong, V., Neujahr, D.C., Mills, S.T., Roser-Page, S., Ritzenthaler, J.D., Guidot, D., Rojas, M., Roman, J., 2012. Predisposition for disrepair in the aged lung. *Am. J. Med. Sci.* 344, 41–51. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e318234c132>
- Sugimoto, N., Suzukawa, M., Nagase, H., Koizumi, Y., Ro, S., Kobayashi, K., Yoshihara, H., Kojima, Y., Kamiyama-Hara, A., Hebisawa, A., Ohta, K., 2019. IL-9 Blockade Suppresses Silica-induced Lung Inflammation and Fibrosis in Mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 60, 232–243. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0287OC>
- Swaminathan, A.C., Hellkamp, A.S., Neely, M.L., Bender, S., Paoletti, L., White, E.S., Palmer, S.M., Whelan, T.P.M., Dilling, D.F., n.d. Disparities in Lung Transplant among Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis: An Analysis of the IPF-PRO Registry. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 19, 981–990. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.202105-589OC>
- Swonger, J.M., Liu, J.S., Ivey, M.J., Tallquist, M.D., 2016. Genetic tools for identifying and manipulating fibroblasts in the mouse. *Differentiation, Fibroblast Differentiation* 92, 66–83. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2016.05.009>
- Takagi, K., Yamakuchi, M., Hashiguchi, T., Inoue, H., Takagi, K., Yamakuchi, M., Hashiguchi, T., Inoue, H., 2019. The Role of miRNAs in Idiopathic Pulmonary Fibrosis, in: *Interstitial Lung Diseases*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82771>
- Tang, N., Zhao, Y., Feng, R., Liu, Y., Wang, S., Wei, W., Ding, Q., An, M. (Songzhu), Wen, J., Li, L., 2014. Lysophosphatidic acid accelerates lung fibrosis by inducing differentiation of mesenchymal stem cells into myofibroblasts. *J. Cell. Mol. Med.* 18, 156–169. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12178>
- Tarrés, M.T., Aschenbrenner, F., Maus, R., Stolper, J., Schuette, L., Knudsen, L., Rodriguez, E.L., Jonigk, D., Kühnel, M.P., DeLuca, D., Prasse, A., Welte, T., Gauldie, J., Kolb, M.R., Maus, U.A., 2019. The FMS-like tyrosine kinase-3 ligand/lung dendritic cell axis contributes to regulation of pulmonary fibrosis. *Thorax* 74, 947–957. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2018-212603>
- Tashiro, J., Rubio, G.A., Limper, A.H., Williams, K., Elliot, S.J., Ninou, I., Aidinis, V., Tzouvelekis, A., Glassberg, M.K., 2017. Exploring Animal Models That Resemble Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Front. Med.* 4, 118. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00118>
- Taskar, V.S., Coultas, D.B., 2006. Is idiopathic pulmonary fibrosis an environmental disease? *Proc. Am. Thorac. Soc.* 3, 293–298. <https://doi.org/10.1513/pats.200512-131TK>
- Todd, N.W., Scheraga, R.G., Galvin, J.R., Iacono, A.T., Britt, E.J., Luzina, I.G., Burke, A.P., Atamas, S.P., 2013. Lymphocyte aggregates persist and accumulate in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Inflamm. Res.* 6, 63–70. <https://doi.org/10.2147/JIR.S40673>
- Tsoumakidou, M., Karagiannis, K.P., Bouloukaki, I., Zakyntinos, S., Tzanakis, N., Siafakas, N.M., 2009. Increased bronchoalveolar lavage fluid CD1c expressing dendritic cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* 78, 446–452. <https://doi.org/10.1159/000226244>
- Tsukui, T., Ueha, S., Shichino, S., Inagaki, Y., Matsushima, K., 2015. Intratracheal Cell Transfer Demonstrates the Profibrotic Potential of Resident Fibroblasts in Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Pathol.* 185, 2939–2948. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.07.022>
- Tzilas, V., Bouros, E., Barbayianni, I., Karampitsakos, T., Kourtidou, S., Ntassiou, M., Ninou, I., Aidinis, V., Bouros, D., Tzouvelekis, A., 2019. Vitamin D prevents experimental lung fibrosis and predicts survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 55, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2019.01.003>
- Udomsinprasert, W., Jittikoon, J., 2019. Vitamin D and liver fibrosis: Molecular mechanisms and clinical studies. *Biomed. Pharmacother.* 109, 1351–1360. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.140>
- Uhal, B.D., Kim, J.K., Li, X., Molina-Molina, M., 2007. Angiotensin-TGF-beta 1 crosstalk in human idiopathic pulmonary fibrosis: autocrine mechanisms in myofibroblasts and macrophages. *Curr. Pharm. Des.* 13, 1247–1256. <https://doi.org/10.2174/138161207780618885>
- Uhal, B.D., Li, X., Piasecki, C.C., Molina-Molina, M., 2012. ANGIOTENSIN SIGNALLING IN PULMONARY FIBROSIS. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 465–468. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.11.019>

- Upadhyay, S.K., Verone, A., Shoemaker, S., Qin, M., Liu, S., Campbell, M., Hershberger, P.A., 2013. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)2D3) Signaling Capacity and the Epithelial-Mesenchymal Transition in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): Implications for Use of 1,25(OH)2D3 in NSCLC Treatment. *Cancers* 5, 1504–1521. <https://doi.org/10.3390/cancers5041504>
- Urushiyama, H., Terasaki, Y., Nagasaka, S., Terasaki, M., Kunugi, S., Nagase, T., Fukuda, Y., Shimizu, A., 2015. Role of α 1 and α 2 chains of type IV collagen in early fibrotic lesions of idiopathic interstitial pneumonias and migration of lung fibroblasts. *Lab. Invest.* 95, 872–885. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2015.66>
- Valenzi, E., Bahudhanapati, H., Tan, J., Tabib, T., Sullivan, D.I., Nouraie, M., Sembrat, J., Fan, L., Chen, K., Liu, S., Rojas, M., Lafargue, A., Felsher, D.W., Tran, P.T., Kass, D.J., Lafyatis, R., 2023. Single-Nucleus Chromatin Accessibility Identifies a Critical Role for TWIST1 in IPF Myofibroblast Activity. *Eur. Respir. J.* <https://doi.org/10.1183/13993003.00474-2022>
- van de Poppel, J., van Leeuwen, J.P.T.M., 2014. Vitamin D and gene networks in human osteoblasts. *Front. Physiol.* 5.
- Verlinden, L., Verstuyf, A., Convents, R., Marcelis, S., Van Camp, M., Bouillon, R., 1998. Action of 1,25(OH)2D3 on the cell cycle genes, cyclin D1, p21 and p27 in MCF-7 cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 142, 57–65. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(98\)00117-8](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(98)00117-8)
- Vermaelen, K., Pauwels, R., 2005. Pulmonary dendritic cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172, 530–551. <https://doi.org/10.1164/rccm.200410-138450>
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., Berneman, Z.N., 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 36, 131–149. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x>
- Vignali, D.A.A., Collison, L.W., Workman, C.J., 2008. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 523–532. <https://doi.org/10.1038/nri2343>
- Villanueva, J., Yung, Y., Walker, J.L., Assoian, R.K., 2007. ERK Activity and G1 Phase Progression: Identifying Dispensable Versus Essential Activities and Primary Versus Secondary Targets. *Mol. Biol. Cell* 18, 1457–1463. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06-10-0908>
- Vincenti, M.P., Brinckerhoff, C.E., 2007. Signal transduction and cell-type specific regulation of matrix metalloproteinase gene expression: Can MMPs be good for you? *J. Cell. Physiol.* 213, 355–364. <https://doi.org/10.1002/jcp.21208>
- Vuga, L.J., Ben-Yehudah, A., Kovkarova-Naumovski, E., Oriss, T., Gibson, K.F., Feghali-Bostwick, C., Kaminski, N., 2009. WNT5A is a regulator of fibroblast proliferation and resistance to apoptosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 41, 583–589. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0201OC>
- Wang, H., Chen, W., Li, D., Yin, X., Zhang, X., Olsen, N., Zheng, S.G., 2017. Vitamin D and Chronic Diseases. *Aging Dis.* 8, 346–353. <https://doi.org/10.14336/AD.2016.1021>
- Wang, J., Chen, L., Chen, B., Meliton, A., Liu, S.Q., Shi, Y., Liu, T., Deb, D.K., Solway, J., Li, Y.C., 2015. Chronic Activation of the Renin-Angiotensin System Induces Lung Fibrosis. *Sci. Rep.* 5, 15561. <https://doi.org/10.1038/srep15561>
- Wang, Jincheng, Hu, K., Cai, X., Yang, B., He, Q., Wang, Jiajia, Weng, Q., 2022. Targeting PI3K/AKT signaling for treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Acta Pharm. Sin. B* 12, 18–32. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.07.023>
- Wang, L., Yuan, T., Du, G., Zhao, Q., Ma, L., Zhu, J., 2014. The impact of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the expression of connective tissue growth factor and transforming growth factor- β 1 in the myocardium of rats with diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 104, 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2014.01.031>
- Wang, Q.M., Luo, X., Studzinski, G.P., 1997. Cyclin-dependent kinase 6 is the principal target of p27/Kip1 regulation of the G1-phase traverse in 1,25-dihydroxyvitamin D3-treated HL60 cells. *Cancer Res.* 57, 2851–2855.
- Wang, Y., Tang, Z., Huang, H., Li, Jiao, Wang, Z., Yu, Y., Zhang, C., Li, Juan, Dai, H., Wang, F., Cai, T., Tang, N., 2018. Pulmonary alveolar type I cell population consists of two distinct subtypes that differ in cell fate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 2407–2412. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719474115>

- Wang, Y., Zhu, J., DeLuca, H.F., 2012. Where is the vitamin D receptor? *Arch. Biochem. Biophys.*, The Many Faces of Vitamin D 523, 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.04.001>
- Wang, Y.-C., Chen, Q., Luo, J.-M., Nie, J., Meng, Q.-H., Shuai, W., Xie, H., Xia, J.-M., Wang, H., 2019. Notch1 promotes the pericyte-myofibroblast transition in idiopathic pulmonary fibrosis through the PDGFR/ROCK1 signal pathway. *Exp. Mol. Med.* 51, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0228-0>
- Webb, A.R., Kline, L., Holick, M.F., 1988. Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D3: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D3 synthesis in human skin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 67, 373–378. <https://doi.org/10.1210/jcem-67-2-373>
- Wijsman, P.C., van Smoorenburg, L.H., de Bruin, D.M., Annema, J.T., Kerstjens, H.A., Mets, O.M., van den Berge, M., Bonta, P.I., Burgess, J.K., 2021. Imaging the pulmonary extracellular matrix. *Curr. Opin. Physiol.* 22, 100444. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2021.05.007>
- Willis, B.C., Borok, Z., 2007. TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 293, L525-534. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00163.2007>
- Willis, B.C., Liebler, J.M., Luby-Phelps, K., Nicholson, A.G., Crandall, E.D., du Bois, R.M., Borok, Z., 2005. Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition in Alveolar Epithelial Cells by Transforming Growth Factor- β 1: Potential Role in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Pathol.* 166, 1321–1332. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62351-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62351-6)
- Winston, J., Dong, F., Pledger, W.J., 1996. Differential Modulation of G1 Cyclins and the Cdk Inhibitor p27kip1 by Platelet-derived Growth Factor and Plasma Factors in Density-arrested Fibroblasts (*). *J. Biol. Chem.* 271, 11253–11260. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.19.11253>
- Winston, J.T., Pledger, W.J., 1993. Growth factor regulation of cyclin D1 mRNA expression through protein synthesis-dependent and -independent mechanisms. *Mol. Biol. Cell* 4, 1133–1144. <https://doi.org/10.1091/mbc.4.11.1133>
- Wipff, P.-J., Rifkin, D.B., Meister, J.-J., Hinz, B., 2007. Myofibroblast contraction activates latent TGF- β 1 from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 179, 1311–1323. <https://doi.org/10.1083/jcb.200704042>
- Wollin, L., Maillet, I., Quesniaux, V., Holweg, A., Ryffel, B., 2014. Antifibrotic and Anti-inflammatory Activity of the Tyrosine Kinase Inhibitor Nintedanib in Experimental Models of Lung Fibrosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 349, 209–220. <https://doi.org/10.1124/jpet.113.208223>
- Wollin, L., Wex, E., Pautsch, A., Schnapp, G., Hostettler, K.E., Stowasser, S., Kolb, M., 2015. Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* 45, 1434–1445. <https://doi.org/10.1183/09031936.00174914>
- Worlitzsch, D., Meyer, K.C., Döring, G., 2013. Lactate Levels in Airways of Patients with Cystic Fibrosis and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 188, 111–111. <https://doi.org/10.1164/rccm.201211-2042LE>
- Wrana, J.L., Attisano, L., Cárcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X.-F., Massague, J., 1992. TGF β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 71, 1003–1014. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90395-S](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90395-S)
- Wu, L., Derynck, R., 2009. Essential role of TGF- β signaling in glucose-induced cell hypertrophy. *Dev. Cell* 17, 35. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.05.010>
- Wynn, T.A., 2004. Fibrotic disease and the TH1/TH2 paradigm. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 583–594. <https://doi.org/10.1038/nri1412>
- Xia, H., Bodempudi, V., Benyumov, A., Hergert, P., Tank, D., Herrera, J., Brazianus, J., Larsson, O., Parker, M., Rossi, D., Smith, K., Peterson, M., Limper, A., Jessurun, J., Connett, J., Ingbar, D., Phan, S., Bitterman, P.B., Henke, C.A., 2014. Identification of a Cell-of-Origin for Fibroblasts Comprising the Fibrotic Reticulum in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Pathol.* 184, 1369–1383. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.01.012>
- Xiao, L., 2012. TGF-beta 1 induced fibroblast proliferation is mediated by the FGF-2/ERK pathway. *Front. Biosci.* 17, 2667. <https://doi.org/10.2741/4077>

- Xie, N., Tan, Z., Banerjee, S., Cui, H., Ge, J., Liu, R.-M., Bernard, K., Thannickal, V.J., Liu, G., 2015. Glycolytic Reprogramming in Myofibroblast Differentiation and Lung Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 192, 1462–1474. <https://doi.org/10.1164/rccm.201504-0780OC>
- Xu, K., Moghal, N., Egan, S.E., 2012. Notch signaling in lung development and disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 727, 89–98. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0899-4_7
- Xu, S., Zhang, Z.-H., Fu, L., Song, J., Xie, D.-D., Yu, D.-X., Xu, D.-X., Sun, G.-P., 2020. Calcitriol inhibits migration and invasion of renal cell carcinoma cells by suppressing Smad2/3-, STAT3- and β -catenin-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Sci.* 111, 59–71. <https://doi.org/10.1111/cas.14237>
- Xu, Y., Hino, C., Baylink, D.J., Xiao, J., Reeves, M.E., Zhong, J.F., Mirshahidi, S., Cao, H., 2022. Vitamin D activates FBP1 to block the Warburg effect and modulate blast metabolism in acute myeloid leukemia. *Biomark. Res.* 10, 16. <https://doi.org/10.1186/s40364-022-00367-3>
- Yang, C.-Y., Leung, P.S.C., Adamopoulos, I.E., Gershwin, M.E., 2013. The Implication of Vitamin D and Autoimmunity: a Comprehensive Review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 45, 217–226. <https://doi.org/10.1007/s12016-013-8361-3>
- Yang, E.S., Burnstein, K.L., 2003. Vitamin D inhibits G1 to S progression in LNCaP prostate cancer cells through p27Kip1 stabilization and Cdk2 mislocalization to the cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 278, 46862–46868. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306340200>
- Yang, K., Pan, Y., Zhang, H., Jin, L., Wang, X., 2022. Hepatic vitamin D receptor expression is negatively associated with liver inflammation and fibrosis in patients with chronic HBV infection. *Clin. Exp. Med.* <https://doi.org/10.1007/s10238-022-00919-9>
- Yang, L., Zhai, Z., Zhang, J., 2022. The Role of Serum 1,25-Dihydroxy Vitamin D3 and PCT in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Int. J. Gen. Med.* 15, 8081–8092. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S386984>
- Yang, W., Pan, L., Cheng, Y., Wu, X., Tang, B., Zhu, H., Zhang, M., Zhang, Y., 2022. Nintedanib alleviates pulmonary fibrosis in vitro and in vivo by inhibiting the FAK/ERK/S100A4 signalling pathway. *Int. Immunopharmacol.* 113, 109409. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109409>
- Ye, Z., Hu, Y., 2021. TGF- β 1: Gentlemanly orchestrator in idiopathic pulmonary fibrosis (Review). *Int. J. Mol. Med.* 48, 132. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4965>
- Yeum, K.-J., Song, B.C., Joo, N.-S., 2016. Impact of Geographic Location on Vitamin D Status and Bone Mineral Density. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13, 184. <https://doi.org/10.3390/ijerph13020184>
- Ying, H.-Z., Chen, Q., Zhang, W.-Y., Zhang, H.-H., Ma, Y., Zhang, S.-Z., Fang, J., Yu, C.-H., 2017. PDGF signaling pathway in hepatic fibrosis pathogenesis and therapeutics (Review). *Mol. Med. Rep.* 16, 7879–7889. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7641>
- Yiyan, S., Yang, S., Li, D., Li, W., 2022. Vitamin D Affects the Warburg Effect and Stemness Maintenance of Non- Small-Cell Lung Cancer Cells by Regulating the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway. *Curr. Cancer Drug Targets* 22, 86–95. <https://doi.org/10.2174/1568009621666210729100300>
- Yoshizawa, T., Handa, Y., Uematsu, Y., Takeda, S., Sekine, K., Yoshihara, Y., Kawakami, T., Arioka, K., Sato, H., Uchiyama, Y., Masushige, S., Fukamizu, A., Matsumoto, T., Kato, S., 1997. Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nat. Genet.* 16, 391–396. <https://doi.org/10.1038/ng0897-391>
- Yu, R., Sun, J., Zheng, Z., Chen, J., Fan, R., Liang, X., Zhu, Y., Liu, Y., Shen, S., Hou, J., 2015. Association between vitamin D level and viral load or fibrosis stage in chronic hepatitis B patients from Southern China. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 30, 566–574. <https://doi.org/10.1111/jgh.12783>
- Zank, D.C., Bueno, M., Mora, A.L., Rojas, M., 2018. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Aging, Mitochondrial Dysfunction, and Cellular Bioenergetics. *Front. Med.* 5, 10. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00010>
- Zavadil, J., Cermak, L., Soto-Nieves, N., Böttinger, E.P., 2004. Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. *EMBO J.* 23, 1155–1165. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600069>
- Zepp, J.A., Zacharias, W.J., Frank, D.B., Cavanaugh, C.A., Zhou, S., Morley, M.P., Morrisey, E.E., 2017. Distinct mesenchymal lineages and niches promote epithelial self-renewal and

- myofibrogenesis in the lung. *Cell* 170, 1134-1148.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.034>
- Zerr, P., Vollath, S., Palumbo-Zerr, K., Tomcik, M., Huang, J., Distler, A., Beyer, C., Dees, C., Gela, K., Distler, O., Schett, G., Distler, J.H.W., 2015. Vitamin D receptor regulates TGF- β signalling in systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* 74, e20. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204378>
- Zhang, L., Wang, Y., Wu, G., Xiong, W., Gu, W., Wang, C.-Y., 2018. Macrophages: friend or foe in idiopathic pulmonary fibrosis? *Respir. Res.* 19, 170. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0864-2>
- Zhang, P., Shao, Y., Quan, F., Liu, L., Yang, J., 2021. FBP1 enhances the radiosensitivity by suppressing glycolysis via the FBXW7/mTOR axis in nasopharyngeal carcinoma cells. *Life Sci.* 283, 119840. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119840>
- Zhang, X.-L., Xing, R.-G., Chen, L., Liu, C.-R., Miao, Z.-G., 2016. 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. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5960>
- Zhou, C., Lu, F., Cao, K., Xu, D., Goltzman, D., Miao, D., 2008. Calcium-independent and 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -dependent regulation of the renin-angiotensin system in 1 α -hydroxylase knockout mice. *Kidney Int.* 74, 170–179. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.101>
- Zhou, Y., Liao, S., Zhang, Z., Wang, B., Wan, L., 2016. Astragalus injection attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via down-regulating Jagged1/Notch1 in lungs. *J. Pharm. Pharmacol.* 68, 389–396. <https://doi.org/10.1111/jphp.12518>
- Zhu, J.G., Ochalek, J.T., Kaufmann, M., Jones, G., DeLuca, H.F., 2013. CYP2R1 is a major, but not exclusive, contributor to 25-hydroxyvitamin D production in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 15650–15655. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315006110>
- Zhu, W., Ding, Q., Wang, L., Xu, G., Diao, Y., Qu, S., Chen, S., Shi, Y., 2021. Vitamin D $_3$ alleviates pulmonary fibrosis by regulating the MAPK pathway via targeting PSAT1 expression in vivo and in vitro. *Int. Immunopharmacol.* 101, 108212. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108212>

Titre : Étude *in vitro* des effets de la vitamine D sur le phénotype des fibroblastes pulmonaires humains dans un contexte de pneumopathie interstitielle diffuse.

Mots clés : Fibrose pulmonaire idiopathique, vitamine D, fibroblastes, prolifération, différenciation, métabolisme

Résumé : La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie pulmonaire chronique et irréversible caractérisée par un déclin progressif des fonctions respiratoires. L'approche thérapeutique actuelle mais n'arrête pas la progression de la maladie. Récemment, il a été démontré que la vitamine D (VD) réduit le développement de la fibrose pulmonaire dans des modèles murins et que la carence en VD peut être associée au déclin des fonctions respiratoires des patients atteints de FPI. Au cours de cette thèse, nous avons démontré pour la première fois qu'*in vitro*, la VD bloque des fonctions fondamentales des fibroblastes pulmonaires humains primaires dérivés de patients atteints de FPI. À des concentrations physiologiquement atteignables, la VD diminue la prolifération basale comme induite par le PDGF-BB. Bien que la VD n'ait impacté que partiellement la différenciation induite par le TGF- β 1, elle a fortement inhibé l'altération glycolytique induite par le TGF- β 1. Des études récentes suggèrent que la reprogrammation glycolytique des fibroblastes peut participer à la progression de la FPI et que cibler cette voie pourrait être efficace dans le traitement des maladies fibrotiques. Enfin, nous avons démontré que les effets protecteurs de la VD sont probablement médiés par l'activation de son récepteur nucléaire. Dans l'ensemble, nos résultats démontrent que de faibles concentrations de VD réduisent, *in vitro*, les fonctions pro-fibrotiques des fibroblastes pulmonaires humains, et suggèrent qu'une supplémentation des patients atteints de FPI en VD pourrait être étudiée à l'avenir pour confirmer ses avantages thérapeutiques dans la gestion de la fibrose pulmonaire chez l'homme.

Title : *In vitro* study of the effects of vitamin D on phenotype of human lung fibroblasts in diffuse interstitial lung disease.

Keywords : Idiopathic pulmonary fibrosis, Vitamin D, fibroblasts, proliferation, differentiation, metabolism

Abstract: Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic, irreversible lung disease characterized by a progressive decline in respiratory function. Current therapeutic approaches slow but do not halt disease progression. Recently, it has been shown that vitamin D (VD) reduces the development of pulmonary fibrosis in mouse models, and that VD deficiency may be associated with respiratory function decline in patients with IPF. In this thesis, we demonstrated for the first time that, *in vitro*, VD blocks fundamental fibrosing functions in primary human lung fibroblasts derived from IPF patients. At physiologically reachable concentrations, VD decreases basal and induced proliferation by PDGF-BB.

While VD only partially impacted TGF- β 1-induced differentiation, it strongly inhibited TGF- β 1-induced glycolytic alteration. Recent studies suggest that the glycolytic reprogramming of fibroblasts may be involved in the progression of IPF, and that targeting this pathway could be effective in the treatment of fibrotic diseases. We demonstrated that such protective effects of VD are probably mediated by the activation of its nuclear receptor. Overall, our results demonstrate that low concentrations of VD reduce, *in vitro*, the pro-fibrotic functions of human lung fibroblasts, and suggest that VD supplementation of IPF patients could be studied in the future to confirm its therapeutic benefits in the management of pulmonary fibrosis in humans.