



Thèse de doctorat  
de l'Université Sorbonne Paris Cité  
Préparée à l'Université de Paris

**Ecole doctorale** BIOSORBONNE PARIS CITE (ED562)

Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Physiologie et Physiopathologie

*Unité INSERM U1152-Physiopathologie et épidémiologie des maladies respiratoires*

*Equipe 3 Inflammation et Fibrogénèse pulmonaire*

# IMPLICATION DE FGF9 ET DE FGF19 DANS LA FIBROSE PULMONAIRE IDIOPATHIQUE

**Par Aurélien Justet**

Thèse de doctorat de Physiologie et Physiopathologie`

Dirigée par le Pr Bruno Crestani et le Dr Arnaud Mailleux

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 9 Mars 2020

Rapporteur : Pr Thomas Geiser, Universität Bern

Rapporteur : Pr Laurent Plantier, Université de Tours

Examinateur : Pr Carole Planès, Université Paris 13

Examinateur : Dr Myriam Bernaudin, Université de Normandie

Examinateur : Dr Legeai Mallet, Université de Paris

Directeur de thèse : Pr Bruno Crestani , Université de Paris

Co-directeurs de thèse :Dr Arnaud Mailleux, Université de Paris



## **Titre : Implication de FGF9 et de FGF19 dans la Fibrose Pulmonaire Idiopathique**

La Fibrose Pulmonaire Idiopathique (FPI) est une pathologie pulmonaire chronique, progressive, irréversible et mortelle pour laquelle les options thérapeutiques restent aujourd'hui limitées. Il existe une réactivation anormale des voies impliquées dans le développement pulmonaire dont la famille des Fibroblast growth factors (FGF). Celle-ci induit des communications anormales entre les cellules mésothéliales, les cellules épithéliales alvéolaires et les fibroblastes pulmonaires qui sont des acteurs clés de la fibrogénèse pulmonaire.

Ainsi, il a été observé une réexpression de FGF9 dans la plèvre de patients atteints de FPI dont l'action demeure inconnue. D'autres membres de cette famille n'ont jamais été étudiés. Le FGF19 est un FGF à action endocrine qui a montré des propriétés anti fibrosantes au niveau hépatique mais son action au niveau pulmonaire reste à évaluer.

Nos travaux montrent pour la première fois qu'il existe une dérégulation de l'expression de FGF9 et de FGF19 au cours de la FPI. *In vivo*, le FGF9 prévient le remodelage pleural induit par un adénovirus contrôle. *In vitro*, FGF9 prévient la différenciation myofibroblastique des cellules mésothéliales via le récepteur FGFR3. La surexpression de FGF19 prévient le développement de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine ou une surexpression de TGF $\beta$  *in vivo* chez la souris. *In vitro*, nous avons démontré que FGF19 prévenait la différenciation myofibroblastique en inhibant la phosphorylation de JNK et prévenait l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires en diminuant l'expression de la protéine pro apoptotique Bim.

L'ensemble de ces données suggèrent que FGF9 et FGF19 sont impliqués dans la physiopathologie de la FPI et pourraient constituer des cibles thérapeutiques innovantes

**Mots clefs: Fibrose Pulmonaire Idiopathique (FPI), Fibroblast Growth Factor 9 (FGF9), Fibroblast Growth Factor 19 (FGF19)**

## **Title: Implication of FGF9 and FGF19 in Idiopathic Pulmonary Fibrosis**

Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) is a chronic, progressive, irreversible and fatal pulmonary pathology for which the therapeutic options remain limited today. There is an abnormal reactivation of the pathways involved in lung development including the family of Fibroblast growth factors (FGF). This induces abnormal communications between the mesothelial cells, the alveolar epithelial cells and the pulmonary fibroblasts which are key players in pulmonary fibrogenesis.

Thus, a re-expression of FGF9 has been observed in the pleura of patients with IPF but its action remains unknown. Other members of this family have never been studied. FGF19 is an endocrine FGF, it has shown anti-fibrotic properties in the liver but its action in the lungs remains to be evaluated.

Our work shows for the first time that there is a deregulation of the expression of FGF9 and FGF19 during IPF. *In vivo*, FGF9 prevents pleural remodeling induced by a control adenovirus. *In vitro*, FGF9 prevents myofibroblastic differentiation of mesothelial cells via the receptor FGFR3. Overexpression of FGF19 prevents the development of bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis or overexpression of TGF. *In vitro*, we have demonstrated that FGF19 prevents myofibroblastic differentiation by inhibiting the JNK pathway and prevents apoptosis of alveolar epithelial cells by decreasing the expression of the pro apoptotic protein Bim.

Altogether, these data suggest that FGF9 and FGF19 are involved in the pathophysiology of IPF and could constitute innovative therapeutic targets

**Keywords: Idiopathic Pulmonary Fibrosis, Fibroblast Growth Factor 9 (FGF9), Fibroblast Growth Factor 19 (FGF19)**

« Soit A un succès dans la vie. Alors  $A = x + y + z$ , où  $x = \text{travailler}$ ,  $y = \text{s'amuser}$ ,  $z = \text{se taire}$ . »

Albert Einstein

Ce travail a bénéficié de financements provenant de la Fondation pour la Recherche Médicale (FDM41320) de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-BSV1-0011,) et du Groupe Pasteur Mutualité et du DHU Fire

## REMERCIEMENTS

---

J'adresse mes plus sincères remerciements aux membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Je suis honoré de les compter parmi mes juges. Je remercie ainsi les Professeurs Thomas Geiser et Laurent Plantier pour avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs, le Professeur Carole Planès, le Dr Myriam Bernaudin et le Docteur Legeai-Mallet pour avoir accepté d'apporter leur expertise sur mon sujet de thèse

J'exprime ma reconnaissance et ma profonde gratitude au Professeur Bruno Crestani pour avoir encadré mon travail de thèse de Sciences. Merci beaucoup pour avoir accepté de me guider et former, sur le plan médical et scientifique, au cours de cette dernière année d'internat, ces années de clinicat puis de doctorat. Merci pour vos conseils, votre patience et pour votre soutien.

Je remercie également très chaleureusement le Dr Arnaud Mailleux pour avoir accepté de co-encadrer mon Master 2 puis ma thèse de Sciences. Merci beaucoup pour m'avoir guidé au quotidien pour sa disponibilité son soutien. Merci pour sa patience dans mon apprentissage délicat du Western Blot et surtout qu'il se rassure, ce qui s'est passé à Nassau y restera.

Je remercie vivement Marina Pretolani pour m'avoir accepté en tant qu'étudiant en Master puis en tant que doctorant dans son unité.

Je remercie grandement Madeleine Jaillet, l'allégorie de la constance et de la bonne humeur pour sa patience, son empathie et sa gentillesse quotidienne. Ce travail n'aurait pu être mené à son terme sans son aide.

Je remercie également Joëlle Marchal Somme qui m'a appris les arcanes de l'expérimentation animale.

Je remercie Audrey Joannes pour son encadrement et la patience dont elle a dû faire preuve au cours de mon Master 2.

Je remercie également Aurélie Cazes et Claire Danel qui m'ont aidé et soutenu dans ce projet

De nombreuses personnes ont directement collaboré et participé à ce travail. A ce titre, je remercie particulièrement Mouna Hachem et Tiara Boghanim que j'ai eu le plaisir d'encadrer dans le cadre leur Master 2. Merci également à Aurélie Vadel et à Mada Ghanem qui reprend le flambeau.

Merci beaucoup à Camille Taillé, Raphael Borie, pour leur soutien et leur amitié pendant ces années parisiennes.

Merci à Valérie Besnard pour les conseils avisés prodigués en cours de Master 2.

Merci également à Corentine et à Aurore, pour son aide au quotidien en tant que gestionnaire du laboratoire.

Merci à Sandrine Olivré, Isabelle Renault et aux animaliers de l'animalerie de Bichat ; tout est pardonné.

Merci à Olivier Thibaudeau et à Laure Wingertsmann, pour leur efficacité et leur gentillesse.

Merci au Professeur Jean-Michel Sallenave, pour sa collaboration sur le projet FGF9 et ses conseils en lien avec ce projet et merci à Brigitte pour l'appui technique sur la partie « adénovirale » de ce projet.

Merci au professeur Philippe Bonniaud pour sa collaboration sur le projet FGF19.

Merci au Pr Emmanuel Bergot pour son soutien et pour m'avoir accordé le temps précieux nécessaire à la rédaction de ce manuscrit.

Enfin, les résultats obtenus dans ce travail de thèse ont largement bénéficié de l'aide de mes collègues et amis du Service de Pneumologie A, du Service de Chirurgie vasculaire et thoracique et du Département d'Anatomo-pathologie de l'Hôpital Xavier Bichat, que je remercie.

Merci également à toutes les personnes j'ai pu rencontrer au cours de mes années à Bichat et avec qui j'ai eu plaisir à échanger : merci notamment à Solène Brosseau, Vincent Bunel, Gaele Dauriat, Clairelyne Dupin Pierre Leguen Laure Tabèze, Pauline Pradère ; aux professeurs, Michel Aubier, Olivier Brugière, Hervé

Mal, Pierre Mordant, Gabriel Thabut. Merci également à toutes les personnes que j'ai eu la chance de rencontrer au laboratoire : Olivier Bardou, Céline Sallon, Maha Ladjemi, Julien Fernandes, Ignacio Garcia-Verdugo, Séverine Létuvé, Bérengère Villeret, Saadé Kheir, Fatima Hamidi, Dominique Courbon, David Soussan, Méline Homps-Legrand et Marine Husson.

Enfin et surtout, merci à Elise pour sa patience et son soutien.

La Fibrose Pulmonaire Idiopathique (FPI) est une pathologie pulmonaire progressive, irréversible et mortelle. Deux traitements médicaux sont aujourd'hui disponibles, qui permettent de ralentir la progression de la FPI sans la stopper. De fait, une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques menant à l'excès de fibroprolifération et au défaut de réparation représente un enjeu majeur pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans cette pathologie.

La FPI commence dans les zones sous pleurales avant de s'étendre vers le centre du poumon. Elle serait la conséquence d'agressions répétées de l'épithélium alvéolaire conduisant à la différenciation des fibroblastes pulmonaires et de cellules mésothéliales en myofibroblastes. Ces cellules sont responsables d'une accumulation de protéines de la matrice extra cellulaires et du remodelage de l'architecture pulmonaire.

Il existe au cours de ce processus une réactivation des voies impliquées dans le développement pulmonaire, et en particulier la famille des Fibroblast Growth Factor (FGF). Les membres de cette famille peuvent avoir une action paracrine ou endocrine. L'implication des FGF paracrines dans la modulation du phénotype des fibroblastes a été particulièrement étudiée au cours des dix dernières années. Plusieurs récepteurs de cette famille sont d'ailleurs des cibles du nintedanib, un des traitements validés dans la FPI. En revanche, peu de données existent concernant l'action des FGF paracrines sur le phénotype des cellules mésothéliales ou l'implication des FGFs endocrine dans la FPI.

L'objectif de ce travail est double. Dans une première partie nous avons déterminé l'effet du FGF9 sur le phénotype des cellules mésothéliales. Dans une deuxième partie étudié et caractérisé les effets d'un FGF endocrine, le FGF19, lors de la fibrogénèse pulmonaire.

# TABLE DES MATIERES

---

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>1</b>
<b>AVANT-PROPOS .....</b>	<b>4</b>
<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>5</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS .....</b>	<b>9</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX .....</b>	<b>10</b>
<b>TABLE DES ABBREVIATIONS .....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>15</b>
<b>1. La Fibrose Pulmonaire Idiopathique .....</b>	<b>18</b>
<b>1.1 Caractéristiques cliniques et présentation de la FPI .....</b>	<b>18</b>
1.1.1 Epidémiologie .....	18
1.1.2 Diagnostic de la FPI .....	18
1.1.3 Facteurs favorisant ou prédisposant .....	22
<b>1.2 Physiopathologie de la FPI .....</b>	<b>27</b>
1.2.1 Les modèles expérimentaux de fibrose pulmonaire .....	28
1.2.2 Les cellules impliquées dans la FPI .....	32
1.2.4. Fibroblastes et myofibroblastes dans la FPI .....	38
1.2.5 Le rôle de l'inflammation du microbiome respiratoire dans la FPI .....	43
1.2.5 La niche alvéolaire et son implication dans fibrogénese pulmonaire .....	45

<b>1.3 La réactivation des voies impliquées dans le développement pulmonaire au cours de la FPI .....</b>	<b>48</b>
1.3.1 Le développement pulmonaire humain et murin.....	48
1.3.2 Les voies de signalisations impliquées dans le développement pulmonaire et réactivées au cours de la FPI .....	50
<b><u>3. Les FGFs, le développement et la FPI. ....</u></b>	<b>57</b>
<b>3.1 La famille des FGFs .....</b>	<b>57</b>
3.1.1 Les FGFs .....	57
3.1.2 Les FGFRs.....	60
3.1.3 Les co récepteurs des FGFRs .....	61
3.1.4 Régulation de la voie de signalisation .....	62
<b>3.2 Rôle des FGF et FGFR dans le développement pulmonaire.....</b>	<b>63</b>
<b>3.3 Implication de l'axe FGF/FGFR dans la fibrogénèse pulmonaire.....</b>	<b>65</b>
3.3.1 Les FGF récepteurs .....	65
3.3.2 Les FGF .....	66
<b><u>4- Le Fibroblast Growth Factor 9.....</u></b>	<b>69</b>
<b>4.1 Implication de FGF9 dans le développement pulmonaire .....</b>	<b>69</b>
<b>4.3 Implication de FGF9 dans la FPI.....</b>	<b>72</b>
<b><u>5. Le Fibroblast Growth Factor 19.....</u></b>	<b>74</b>
<b>5.1. Découverte et rôle lors de l'embryogénèse .....</b>	<b>74</b>
<b>5.2 Rôle physiologique de FGF19.....</b>	<b>76</b>
5.2.1 FGF19 et la régulation du métabolisme des acides biliaires .....	76
5.2.2 FGF19 et la régulation de l'homéostasie énergétique .....	76
	6

5.2.3 FGF19 et le métabolisme glucidique .....	77
5.2.4 FGF19 et la prolifération cellulaire .....	77
<b>5.3. Implication de FGF19 en pathologie .....</b>	<b>78</b>
5.3.1 FGF19 et cancer .....	78
5.3.2 FGF19 et syndrome métabolique .....	79
5.3.3 Implication de FGF19 dans la fibrogénèse .....	80
<b><u>Résumé de la problématique et objectifs .....</u></b>	<b><u>81</u></b>
<b><u>RESULTATS .....</u></b>	<b><u>82</u></b>
<b>FGF9 prévient la fibrose pleurale induite par l'injection d'un adénovirus chez la souris</b> .....	<b>83</b>
CONTEXTE ET JUSTIFICATION DE LA RECHERCHE .....	83
RESUME DES PRINCIPAUX RESULTATS .....	84
MANUSCRIT DE L'ARTICLE.....	86
DISCUSSION DE L'ARTICLE.....	102
<b>FGF19 est diminué dans la FPI et inhibe la survenue de la fibrose pulmonaire chez la</b> <b>souris. ....</b>	<b>104</b>
CONTEXTE ET JUSTIFICATION DE LA RECHERCHE .....	104
MANUSCRIT DE L'ARTICE.....	106
RESUME DES PRINCIPAUX RESULTATS .....	156
DISCUSSION DE L'ARTICLE.....	158
<b><u>DISCUSSION GENERALE .....</u></b>	<b><u>160</u></b>
<b><u>Bibliographie .....</u></b>	<b><u>165</u></b>



# TABLE DES ILLUSTRATIONS

---

<b>FIGURE 1</b> : REPARATION NORMALE DU TISSU LESE SUITE A UNE LESION OU INITIATION D'UNE FIBROSE TISSULAIRE	16
<b>FIGURE 2</b> : SCANNER THORACIQUE NON INJECTE HAUTE RESOLUTION: PATTERN DE PNEUMOPATHIE INTERSTITIELLE COMMUNE	20
<b>FIGURE 3</b> : COUPES HISTOLOGIQUES D'UN POUMON DE PATIENT ATTEINT DE FPI	21
<b>FIGURE 4</b> : HISTOIRE NATURELLE DE LA FPI	25
<b>FIGURE 5</b> : PARADIGME ACTUEL DE LA PHYSIOPATHOLOGIE DE LA FPI	28
<b>FIGURE 6</b> : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ALVEOLE PULMONAIRE	32
<b>FIGURE 7</b> : IMMUNODETECTION DE CELLULES EPITHELIALES EXPRIMANT DES PROTEINES DE STRESS DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE, SUR DES COUPES SERIEES DE TISSU PULMONAIRE PROVENANT D'UN PATIENT FPI.	36
<b>FIGURE 8</b> : LA MATRICE MYOFIBROBLASTIQUE	39
<b>FIGURE 9</b> : INFILTRATION DE CELLULES INFLAMMATOIRES DANS LES ESPACES ALVEOLAIRES ET INTERSTITIELS	44
<b>FIGURE 10</b> : REPOSE DE LA NICHE ALVEOLAIRE A UNE AGRESSION TISSULAIRE.	47
<b>FIGURE 11</b> : FORMATION DU SYSTEME RESPIRATOIRE.	49
<b>FIGURE 12</b> : LES VOIES DE SIGNALISATION PRINCIPALES IMPLIQUEES DANS LE DEVELOPPEMENT PULMONAIRE DES MAMMIFERES.	51
<b>FIGURE 13</b> INTERACTION ENTRE L'EPITHELIUM ET LE MESENCHYME EN CONDITION PHYSIOLOGIQUE ET LORS DE LA FIBROSE PULMONAIRE IMPLIQUENT LA REACTION DES VOIES DU DEVELOPPEMENT PULMONAIRE :	56
<b>FIGURE 14</b> : LA FAMILLE DES FGFS,	59
<b>FIGURE 15</b> : LES SOURIS DEFICIENTES POUR FGF9, (FGF9 <sup>-/-</sup> ) DEVELOPPENT UNE HYPOPLASIE	71
<b>FIGURE 16</b> : EXPRESSION DE FGF9 DANS LE POUMON NORMAL ET FIBREUX	73
<b>FIGURE 17</b> : ACTION DE FGF19 AU NIVEAU HEPATIQUE	75

# TABLE DES TABLEAUX

---

<b>TABLEAU 1</b> : CLASSIFICATION ETIOLOGIQUE DES PID SELON L'AMERICAN THORACIC SOCIETY/EUROPEAN RESPIRATORY SOCIETY	16
<b>TABLEAU 2</b> : AFFINITE DES FGF POUR LEURS RECEPTEURS	60
<b>TABLEAU 3</b> : IMPLICATION DES FGF DANS LA FIBROGENESE PULMONAIRE	69

## TABLE DES ABBREVIATIONS

---

**$\alpha$ -SMA** : Protéine alpha actine du muscle lisse

### A

**Ad** : adénovirus

**AAV** : virus adéno-associé

**ACTA2** : Protéine alpha actine du muscle lisse

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADNc** : Acide désoxyribonucléique complémentaire

**ALK5** : Récepteur de type I au TGF $\beta$  ou TGF $\beta$  R1

**AMP** : Sous population de progéniteurs myofibroblastiques exprimant l'Axin 2

**APC** : Protéine régulatrice de la  $\beta$ -caténine

**ARN** : Acide ribodesoxynucléique

**ARNm** : Acide ribodesoxynucléique messenger

**AXIN 2** : Protéine Axine 2

**ATF-6** : facteur de transcription activateur 6

### B

**BMP** : Facteur de croissance « Bone morphogenic protéine »

**BCL2** : Protéine régulatrice de l'apoptose « B cells lymphoma »

### C

**c-Jun** : Facteur de transcription de la voie JNK

**CCL-2** (ou MCP-1) : chimiokine 2

**CCL-4** : Tétrachlorure de Carbone

**CCL-21** : chimiokine 21

**CD** : cluster de différenciation

**CHOP** : protéine homologue de C/EBP

**COL1 $\alpha$ 1** : Protéines du collagène I chaîne  $\alpha$ 1

**COX-1/2** (ou PTGS1/2) : cyclo-oxygénase-1/2

**CTGF** : facteur de croissance du tissu conjonctif

**CXCR** : Récepteur aux chimiokines

### D

**DIP** : pneumopathie interstitielle desquamative

### E

**EFR** : explorations fonctionnelles respiratoires

**EGF** : Facteur de croissance épidermique

**ENaC** : canal sodique épithélial

**EP2** : récepteur à la PGE2

**ERK** : kinase régulée par un signal extracellulaire 'extracellular signal regulated kinase'

**ET-1** : endothéline 1

**ETV** : Facteurs de transcription appartenant à la famille des E26

## F

**FGF** : facteur de croissance des fibroblastes  
**FGFR** : récepteur du facteur de croissance des fibroblastes  
**FITC** : isothiocyanate de fluorescéine  
**FLT3** : Récepteur de la protéine kinase de type Fms  
**FN1** : Fibronectine 1  
**FPF** : fibrose pulmonaire familiale  
**FPI** : fibrose pulmonaire idiopathique

## G

**GLI** : Famille de facteurs de transcription « Glioma associated oncogene »  
**GREM2** : Protéine Gremlin 2, antagoniste des BMPs  
**GSK3** : Protéine Glycogène Synthase 3

## H

**H2O2** : peroxyde d'hydrogène  
**HEK293** : lignée cellulaire 'human embryonic kidney cells 293'  
**HGF** : facteur de croissance hépatocytaire

## I

**IL** : interleukine  
**INF(- $\gamma$ )** : interféron(- $\gamma$ )

## J

**JNK** : c Jun N Terminal Kinases

## K

**kDa** : kilodaltons

## L

**LBA** : lavage broncho-alvéolaire  
**LCK**: Protéine Tyrosine Kinase LCK  
**LIP** : pneumopathie interstitielle lymphocytaire  
**LTBPs** : 'latent TGF-beta binding proteins'  
**LNA**: Locked Nucleic Acid  
**LYN**: Protein Kinase LYN

## M

**MAPK** : protéines kinases d'activation de la mitose  
**MCP-1** (ou CCL-2) : protéine chimioattractive monocytaire  
**MEC** : matrice extracellulaire  
**MMP** : métalloprotéinases matricielles  
**MST1/2** : Serine Threonine protéine kinase de la voie hippo  
**MUC5b** : Protéine de type mucine

## N

**NSIP** : pneumopathie interstitielle non-spécifique

## P

**PAI-1** : inhibiteur 1 de l'activateur du plasminogène

**PDGF** : facteur de croissance dérivé des plaquettes

**PDGFR** : récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes

**PG (E2/F2/H2/I2)** : prostaglandines (E2/ F2/H2/I2)

**PIC** : pneumopathie interstitielle commune

**PID** : pneumopathies interstitielles diffuses

**PKC** : protéine kinase C

**PLA2** : phospholipases A2

## R

**RB-ILD** : bronchiolite respiratoire avec pneumopathie interstitielle

**RE** : réticulum endoplasmique

**ROS** : espèces réactives de l'oxygène

**ROCK** : Protéine kinase associée à la protéine G Rho

**RTEL1** : Protéine hélicase régulatrice de l'élongation des télomères

## S

**SAPK** : protéines kinase activées par le stress

**SFTP** : protéines du surfactant

**SHH** : Voie de signalisation Sonic Hedgehog

**SMAD** : Famille de facteurs de transcription de la famille des SMAD

**SMO** : Protéine smoothed, ligand de la voie SHH

**SNP** : polymorphisme nucléotidique

**Sp1** : facteur de transcription 'specificity protein 1'

**SP-C** : protéine C du surfactant

**SRC** : Proto-oncogène à activité tyrosine kinase

**SFTP** : Protéines du surfactant

## T

**TACE** : enzyme de conversion du TNF- $\alpha$

**TEM** : Transition épithélio-mésenchymateuse

**TERT** : Protéine « Télomérase Reverse Transcriptase »

**TF** : facteur tissulaire

**TGF- $\beta$**  : Super famille des facteurs de croissance 'transforming growth factor- $\beta$ '

**TIMP** : inhibiteurs des MMPs

**TNF(- $\alpha$ )** : facteur de nécrose tumorale (- $\alpha$ )

**TTF-1** : Facteur de transcription thyroïdien aussi appelé NkX2.1

## U

**UTR** : Région non traduite

## **V**

**VEGFR** : récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

**VNTR** : 'variable nucleotide tandem repeats'

## **W**

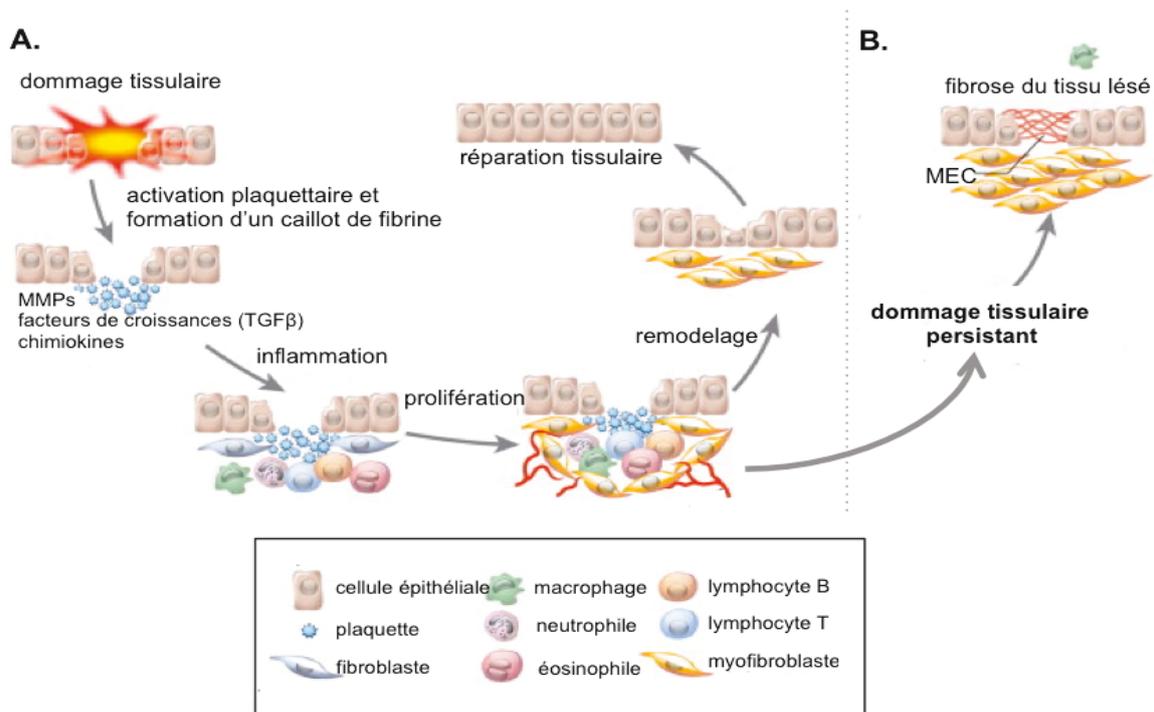
**Wnt** : Ligand « Wingless and int-1 »

**WT-1** : Facteur de transcription « Wilms Tumor proteine 1 »

# INTRODUCTION

---

La réparation tissulaire est un phénomène homéostatique finement régulé impliquant l'interaction de nombreux acteurs cellulaires qui peut aboutir à une réparation anarchique, une fibrose potentiellement progressive et irréversible (Figure1). Ce phénomène peut toucher de nombreux organes comme le foie, le cœur, la peau mais également le poumon. La fibrogénèse serait à l'origine d'environ 45% des décès dans le monde (1).



**Figure 1** : Réparation normale du tissu lésé suite à une lésion ou initiation d'une fibrose tissulaire

**A.** Dans le tissu sain, un dommage tissulaire et l'interruption de la barrière épithéliale et/ou endothéliale aboutissent à l'activation de la cascade de la coagulation pour permettre la coagulation et l'hémostase. Les plaquettes activées s'agrègent pour former un caillot initial et dégranulent leur contenu cellulaire, afin de stimuler localement l'activation des facteurs de la coagulation. Elles relarguent également des molécules de signalisation qui initient la phase inflammatoire de la réparation, en favorisant la vasodilatation, l'augmentation de la perméabilité des capillaires et le recrutement de cellules inflammatoires. La cascade anti-fibrinolytique mise en place permet la formation d'un caillot initial et la production d'une MEC provisoire. Les cellules épithéliales lésées, les macrophages et les polynucléaires neutrophiles recrutés sécrètent des cytokines, chimiokines et facteurs de croissance qui induisent le recrutement de fibroblastes. Les fibroblastes activés produisent et sécrètent des protéines matricielles. Enfin, les cellules épithéliales/endothéliales se divisent et migrent sur la MEC provisoire, afin de régénérer le tissu lésé. **B.** Quand le dommage tissulaire persiste, comme dans la FPI, des anomalies de réparation et une inflammation chronique participe à l'accumulation excessive de MEC, résultant en une lésion fibrotique permanente. Adapté de Pottier et al. (2). MEC, matrice extracellulaire ; MMPs, métalloprotéases matricielles ; TGF- $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$ .

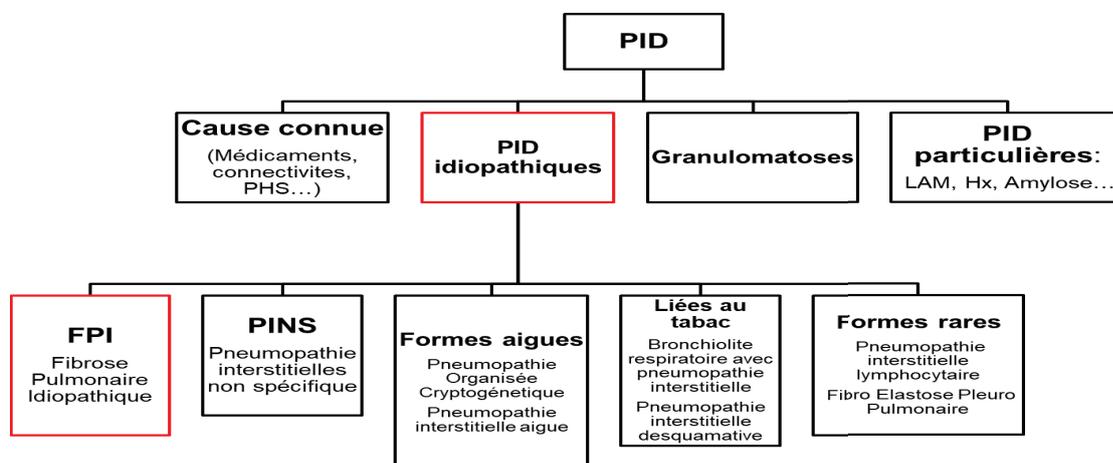
Au niveau pulmonaire, celle-ci se caractérise par une accumulation de protéines de la matrice extracellulaire dans l'interstitium pulmonaire composé des

cloisons inter alvéolaires, des septa inter lobulaires, du tissu péri-broncho vasculaire et sous pleural. Cette infiltration est à l'origine d'un remodelage de l'architecture pulmonaire associé à une destruction de l'espace alvéolaire et conduit à une insuffisance respiratoire chronique mortelle. La fibrose peut être présente d'emblée ou constituer l'évolution ultime des pneumopathies interstitielles diffuses (PID).

Ces pathologies sont classées en fonction de leur étiologie : exogène comme dans le cadre des pneumopathies d'hypersensibilité, des pneumopathies interstitielles médicamenteuses ou professionnelles. Dans d'autre cas, la PID peut être la manifestation d'une maladie systémique telle qu'une sclérodémie, une sarcoïdose ou d'une lymphangiomeiomyomatose. Enfin après un bilan exhaustif, elle peut être reconnue d'origine inconnue et être alors qualifiée d'idiopathique. Les PID idiopathiques regroupe un groupe hétérogène de pathologie, partageant des présentations et pronostics différents.

Dans ce travail, nous nous intéressons à la plus fréquente des PID idiopathiques, la Fibrose Pulmonaire Idiopathique (FPI).

**Tableau 1** : Classification étiologique des PID selon l'*American Thoracic Society/European Respiratory Society*, d'après (3)



PID, pneumopathie interstitielles diffuses ; FPI ; Fibrose Pulmonaire Idiopathique ; PINS, Pneumopathies interstitielle non spécifique ; DIP : Pneumopathie interstitielle desquamative ;

# 1. La Fibrose Pulmonaire Idiopathique

La FPI est une pathologie rare, progressive et mortelle (4), touchant préférentiellement les hommes de plus de 55 ans et conduit au décès dans les 3 à 5 ans au diagnostic pour 1 patient sur 2.

Malgré les avancées majeures réalisées au cours des dix dernières années dans la compréhension de cette pathologie, la transplantation pulmonaire demeure, à l'heure actuelle, le seul traitement curatif (5) mais qui reste associé à une forte morbi-mortalité (6). La recherche, l'identification et le développement de nouvelles options thérapeutiques est donc indispensable dans le domaine de la fibrogénèse pulmonaire.

## 1.1 Caractéristiques cliniques et présentation de la FPI

### 1.1.1 Epidémiologie

Bien qu'étant considérée comme une maladie rare, la FPI est la première cause de pneumopathie interstitielle idiopathique (7). Elle touche environ 5 millions de personnes dans le monde dont 80 000 à 110000 patients en Europe (8). En France la prévalence de la maladie est estimée à 11 pour 100000 et son incidence annuelle est de 2,76 pour 100000 (9), (10). Il est important de noter que sa fréquence augmente avec l'âge puisque son incidence serait de 400 pour 100000 patients chez les plus de 65 ans (11). Cette pathologie touche préférentiellement les hommes. Enfin, il existe un lien épidémiologique entre la FPI et le syndrome métabolique, très prévalent au cours de celle-ci. En effet, la prévalence du diabète de type 2 est doublée voire quadruplée dans cette population (12). Ces patients ont d'ailleurs 2 à 3 fois plus de risques de développer une pathologie cardiovasculaire (12), (13).

### 1.1.2 Diagnostic de la FPI

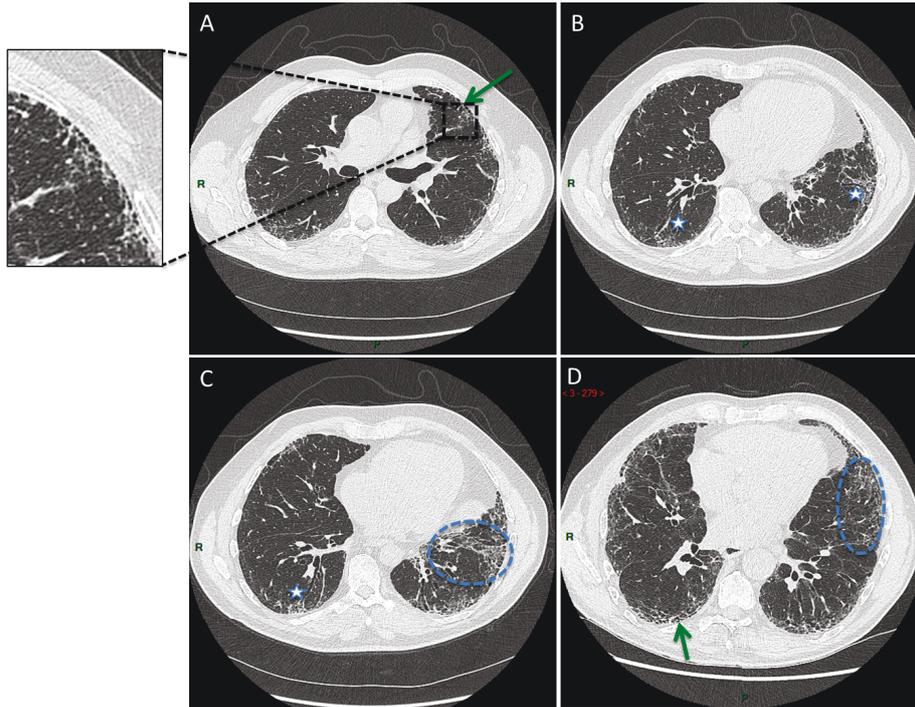
Le diagnostic de FPI repose sur la mise en évidence d'un pattern radiologique ou anatomopathologique de pneumopathie interstitielle commune (PIC) associé à la réalisation d'un bilan étiologique exhaustif sans cause pouvant expliquer la PID (14).

- **Clinique**

La FPI est une pathologie insidieuse et progressive caractérisée par un retard de 2 ans entre les premiers symptômes ressentis par le patient (toux sèche, dyspnée d'effort) et le diagnostic (15). Ce retard peut s'expliquer par l'absence de spécificité des symptômes et la pauvreté de l'examen clinique notamment au début de la maladie. Les principaux signes cliniques retrouvés sont des anomalies auscultatoires à type de crépitants fins et secs situés aux bases qui sont constantes (16). Un hippocratisme digital, peut être observé chez 50% des patients et n'est pas spécifique de cette pathologie (16).

- **Radiologie**

Le scanner thoracique, réalisé en inspiration profonde tient une place centrale dans le diagnostic de FPI. Les anomalies radiologiques rencontrées sont regroupées en un aspect de pneumopathie interstitielle commune (PIC). Les anomalies les plus fréquemment rencontrées dans ce contexte incluent des opacités en rayon de miel, des bronchectasies par traction, des réticulations et des zones de verre dépoli (Figure 2). Cependant, il existe une hétérogénéité dans la présentation radiologique de la maladie, et 30% environ des patients atteints de FPI se présentent avec un scanner d'aspect indéterminé (14).



**Figure 2** : Scanner thoracique non injecté haute résolution : Pattern de Pneumopathie interstitielle commune

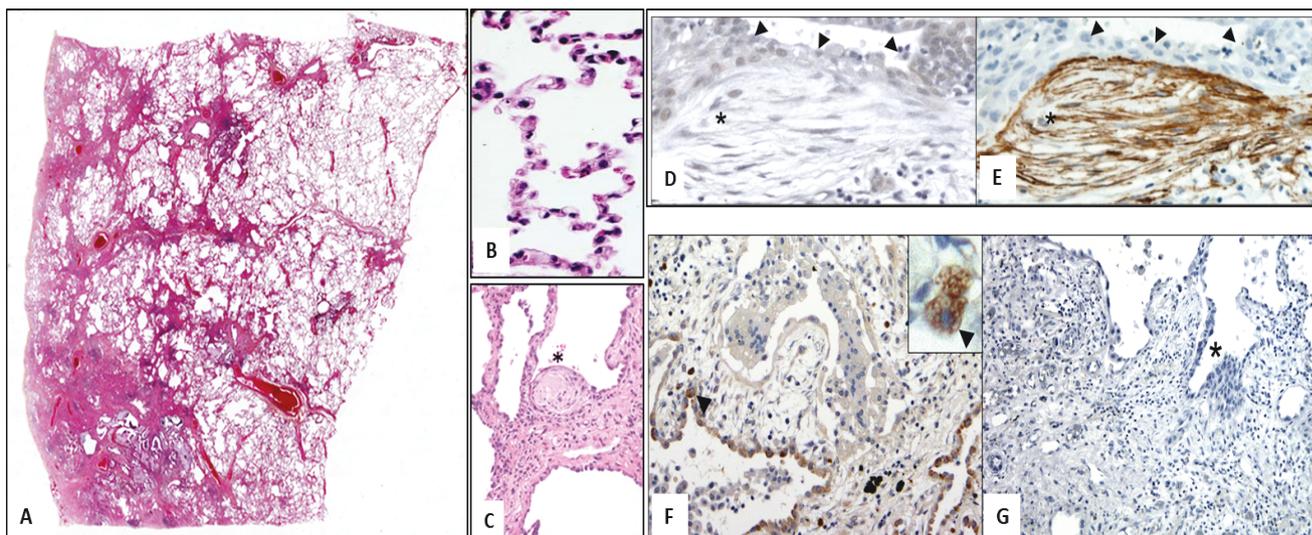
Les panels A, B, CD correspondent à différent niveaux de coupe. Les anomalies rencontrées sur ce scanner incluent des lésions de rayon de miel (flèche verte avec grossissement sur la zone d'intérêt, panel A), des bronchectasies de traction (Etoile blanche, panel B et C), des réticulations et enfin des zones de verre dépoli (zone entourée par rond bleu en pointillé, panel C et D). Données issues du service de Pneumologie A de l'hôpital Bichat.

- **Caractéristiques anatomopathologiques**

En cas d'incertitude diagnostique après interprétation du scanner, une biopsie pulmonaire chirurgicale peut être réalisée afin de confirmer le diagnostic (14)

Le pattern anatomopathologique de pneumopathie interstitielle commune (PIC) associe (Figure 3) :

1. Une destruction de l'architecture pulmonaire avec une fibrose dense avec présence de rayon de miel
2. Une distribution des lésions de fibrose prédominante dans les zones sous pleurales et para septales
3. L'alternance de zones de poumon sain et de fibrose définissant le front de progression de la maladie
4. La présence de foyers fibroblastiques
5. L'absence d'autre diagnostic possible



**Figure 3** : Coupes histologiques d'un poumon de patient atteint de FPI

**A.** Marquage éosine hématoxyline, de coupes pulmonaires atteints de FPI, illustrant l'alternance de zone saine (**B**) et pathologiques. A la jonction entre les deux existent des zones actives de fibrogénèse, les foyers fibroblastiques (**C, D**). **E.** Immunodétection d'un foyer fibroblastique par l'anti corps anti SMA, traduisant la différenciation des fibroblastes pulmonaires en myofibroblastes. **F** Immunodétection des cellules épithéliales alvéolaires de type II hypertrophiques par l'anti corps. **G.** Isotype contrôle de l'anti corps pro SPC, l'astérisque pointe des PII hypertrophiques. Données issues du laboratoire et du service d'anatomopathologie de l'hôpital Bichat Claude Bernard

FPI : Fibrose Pulmonaire Idiopathique, SP-C protéine C du surfactant

Outre l'apport diagnostique, l'étude des anomalies anatomo-pathologiques éclairent les mécanismes physiopathologiques de la FPI. Le motif de PIC associe un remodelage de l'architecture pulmonaire liée à une accumulation de protéines de la matrice extra cellulaire, une prolifération anormale des fibroblastes pulmonaires et des lésions de l'épithélium alvéolaire (17).

- **Le remodelage de l'architecture pulmonaire et les anomalies épithéliales**

A faible grossissement, une des caractéristiques de la FPI est l'alternance de tissus pulmonaire sain et fibreux. Il existe une augmentation du nombre de fibroblastes pulmonaires et des dépôts de protéines matricielles dans le secteur interstitiel. Bien que les anomalies mésenchymateuses soient au premier plan, l'épithélium alvéolaire est altéré dans la FPI (Figure 3) (18). En effet, il existe une diminution du nombre de pneumocytes de type I (PI) associé à une rupture de l'intégrité de leurs membranes basales. Les pneumocytes de type II (PII) sont quant

à eux fréquemment hyperplasiques, et présentent une morphologie de cellules épithéliales bronchiolaires dans le poumon distal (Figure 3). Cet aspect n'est pas spécifique de la FPI mais peut également être rencontré de façon transitoire dans un poumon en cours de réparation. A l'inverse, dans la FPI ces anomalies sont progressives et irréversibles aboutissant notamment à la disparition de l'espace alvéolaire suite à l'extension de la fibrose (19).

- **Les foyers fibroblastiques, lésions centrales de la fibrogénèse**

L'extension de la fibrose pulmonaire est médiée par des entités qui sont localisées au niveau de l'interface zone saine - zone pathologique, les foyers fibroblastiques (20). Ces derniers sont considérés comme des sites actifs de fibrogénèse (19). Ils sont composés d'un ensemble très dense de fibroblaste, de myofibroblastes et de tissus cicatriciels. En outre, ils sont fréquemment localisés à proximité d'un épithélium alvéolaire hypertrophique et ou apoptotique (Figure 3). Ces lésions récentes et actives jouxtent parfois des zones fibrotiques plus anciennes caractérisées par un parenchyme très fibreux formé d'espace kystique aérien rempli de mucus et délimité par un épithélium alvéolaire de morphologie anormale fréquemment bronchiolisé (21).

Le remodelage de l'architecture pulmonaire et la destruction des espaces alvéolaires sont la conséquence d'une accumulation anormale de protéines de la MEC comme la fibronectine mais également d'une distribution anormale des formes fibrillaires du collagène. Dans le tissu pulmonaire normal, le collagène I est préférentiellement localisé dans les septa inter-alvéolaires alors que le collagène de type III est principalement situé dans les espaces péri-bronchovasculaires. Dans le tissu pulmonaire fibreux, ils sont principalement situés dans l'espace inter-alvéolaire et participent à la destruction de l'espace alvéolaire.

### **1.1.3 Facteurs favorisant ou prédisposant**

- **Génétique**

L'apport de la génétique a grandement contribué à améliorer nos connaissances sur la physiopathologie de la FPI. En effet, 5 à 15 % des patients atteints de FPI présentent un ou plusieurs autres cas de fibrose pulmonaire dans leur

entourage familial (22). L'étude de ces formes familiales (FPF) a permis d'identifier des facteurs génétiques de susceptibilité à la fibrose pulmonaire.

La présence d'un polymorphisme fréquent (10% dans la population générale d'origine caucasienne, 35% dans les fibroses pulmonaires idiopathiques) portant sur le promoteur du gène codant pour la mucine MUC5B est le facteur génétique de susceptibilité le plus fréquent, retrouvé dans les formes familiales et sporadiques de FPI (23), (24). Les mécanismes liant ce polymorphisme à la physiopathologie de la FPI restent mal compris, d'autant plus que les patients porteurs de ce polymorphisme ont un meilleur pronostic que les patients non porteurs (25).

Dans les formes familiales de fibrose pulmonaire, on identifie dans 30% cas environ une mutation portant sur un gène pouvant expliquer la survenue de la maladie (26). Les gènes les plus fréquemment identifiés touchent les gènes codant pour le complexe télomérase (TERT, TERC, PARN, RTEL1, DKC1) qui contribuent à l'homéostasie des télomères, et ceux codant pour surfactant (SFTPA1, SFTPA2, SFTPC) qui contribuent à l'homéostasie épithéliale alvéolaire (27).

La découverte des mutations portant sur le complexe télomérase ont éclairé la physiopathologie de la maladie, en pointant le rôle crucial des altérations de l'épithélium alvéolaire et du vieillissement dans la fibrogénèse pulmonaire (28). Les télomères sont des complexes de ribonucléoprotéines présents aux extrémités des chromosomes. Leur longueur diminue à chaque réplication cellulaire et donc au cours de la vie (29). Le raccourcissement des télomères est un facteur de risque de développer la maladie (30) et est accéléré chez les patients porteurs d'une mutation (31). Les patients porteurs de mutation touchant le complexe télomérase développent une fibrose pulmonaire précoce et présentent un déclin accéléré de la fonction respiratoire en comparaison aux FPI sporadiques (32). Ces mutations sont fréquemment associées à des anomalies hépatiques, cutanées ou hématologiques (26). Leur présence peut constituer une contre-indication à la transplantation pulmonaire, en particulier si il existe une myélodysplasie associée (33), (34)

- **Environnement**

Bien que par définition idiopathique, plusieurs facteurs environnementaux ou occupationnels favorisant la survenue ou la progression de la maladie ont été identifiés. Le poumon étant à l'interface entre les milieux extérieur et intérieur, la

composition de l'air inspiré influence de façon majeure l'histoire naturelle des pathologies respiratoires et la FPI. Parmi eux le tabagisme est un des plus anciens identifiés et constitue un facteur de risque indépendant de développer la maladie. En effet, environ 75% des patients atteints de FPI sont ou ont été exposés au tabagisme (35).

L'exposition environnementale à des particules inhalées est une cause bien établie de fibrose pulmonaire, définissant les pneumoconioses (silicose, asbestose). Dans la FPI, l'exposition à des poussières de bois, de métaux ou de silice (35) ont également été identifiées comme facteurs favorisant la progression de la maladie.

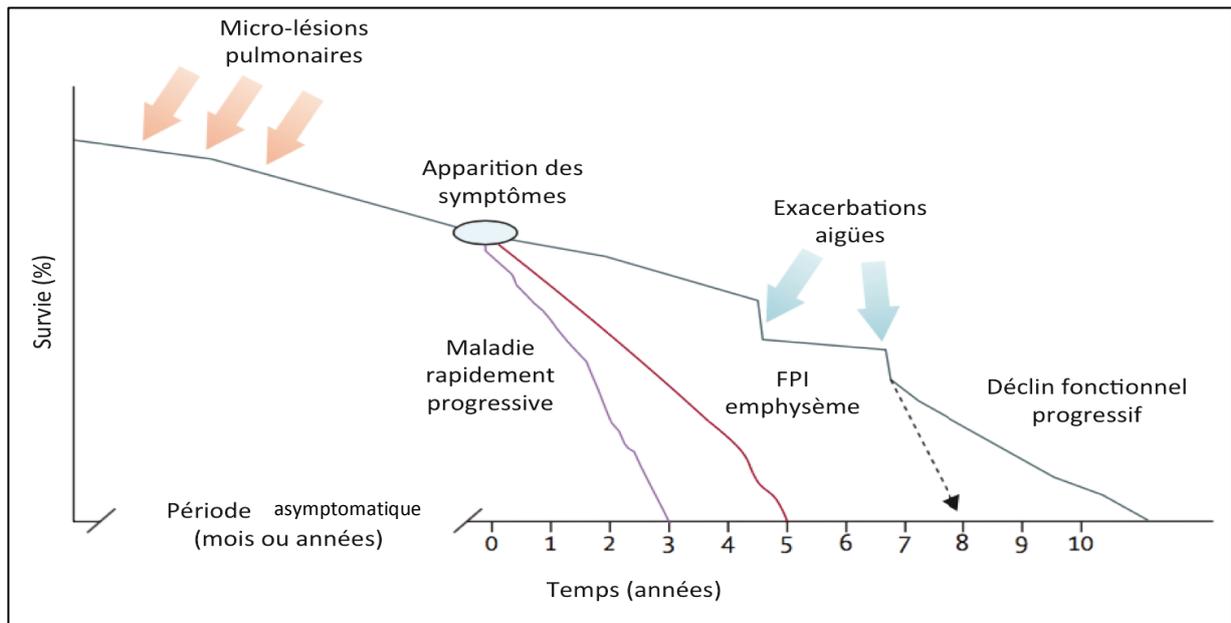
Une surexposition à la pollution atmosphérique pourrait également constituer un facteur de risque de développer la maladie (36). Cette donnée reste à confirmer. En revanche, la relation entre le niveau d'exposition et la progression de la maladie est maintenant bien établie. Des travaux récents ont identifié la pollution atmosphérique comme un facteur de risque de mortalité, associé au déclin de la fonction respiratoire. En effet, une augmentation de  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  d'exposition à l'ozone, observée au cours d'un pic de pollution atmosphérique, était associée à une augmentation significative du risque d'exacerbation (37). Des résultats similaires étaient retrouvés lors de l'exposition aux particules fines, notamment émises par les industries lourdes et le trafic automobile (37), (38),.

#### **1.1.4 Pronostic et prise en charge des patients atteints de FPI**

- **Histoire naturelle de la FPI**

La FPI est une pathologie grave irréversible et mortelle caractérisée par une médiane de survie comprise entre 2 et 5 ans en l'absence de traitement (39). Plusieurs éléments peuvent expliquer ce pronostic sombre, le retard diagnostique notamment des formes débutantes, la cinétique imprévisible d'évolution (40) de la maladie et enfin l'absence de traitement médical curatif (Figure 4).

L'évolution du déclin de la fonction respiratoire est très hétérogène d'un patient à un autre et peut varier chez un même individu. En effet, le déclin de la fonction respiratoire peut être marqué par une dégradation brutale correspondant à une poussée aiguë de la fibrose ou exacerbation (41). Cet événement grève fortement le pronostic à court terme.



**Figure 4 :** Histoire naturelle de la FPI

L'évolution clinique des patients est très hétérogène. La maladie présente initialement une plus ou moins longue phase asymptomatique, avant que le patient ne consulte suite à l'apparition de symptômes, le plus souvent une dyspnée et une toux. La plupart des patients sont des « progressseurs lents », qui voient un déclin très progressif de leurs capacités respiratoires. Environ 10 % des patients, les « progressseurs rapides », subissent des exacerbations aiguës, qui peuvent précéder ou initier la phase terminale de la maladie. Quelques patients voient un déclin fonctionnel progressif, puis une aggravation subite de leur état. Enfin, les patients tabagiques sévères peuvent développer une FPI doublée d'un emphysème, qui diminue la survie de ces patients. Adapté de King *et al.* (42). FPI, fibrose pulmonaire idiopathique.

- **Evaluation du pronostic**

Outre les exacerbations, l'altération de la fonction pulmonaire appréciée par la valeur de la capacité vitale forcée (CVF) et de la diffusion du monoxyde de carbone (DLCO) au moment du diagnostic, ou le déclin de la fonction pulmonaire au cours des 6 ou 12 mois après le diagnostic (43), (44) constituent actuellement les facteurs pronostiques les plus robustes. Ces éléments ont permis de construire le score GAP (Gender Age Physiology) basé sur l'âge, le sexe et la valeur de la CVF ou de la DLCO, le GAP score permettent de prédire la mortalité (45). La diminution de la distance parcourue au test de marche de 6 minutes, l'existence d'un emphysème d'une hypertension pulmonaire ou d'un cancer pulmonaire grèvent également le pronostic de la maladie (46). Paradoxalement, et malgré l'identification de facteurs de risques pronostiques, il n'est aujourd'hui pas possible d'évaluer l'activité de la maladie en temps réel ou de prédire le déclin mensuel de la fonction respiratoire

(40). Ce manque de visibilité impose donc une prise de contact précoce après le diagnostic avec un centre de transplantation pulmonaire (5).

- **Prise en charge thérapeutique**

En 2020, la transplantation pulmonaire reste le seul traitement curatif de la FPI. Ce projet doit être envisagé chez tout patient présentant une FPI modérée à sévère (35). Sur le plan médicamenteux, l'essai PANTHER testant les corticoïdes et les immunosuppresseurs contre placebo a démontré l'inefficacité de ces traitements qui restent indiqués en cas d'exacerbation de la maladie (47). Deux molécules sont aujourd'hui validées dans le traitement de la FPI, la pirfenidone et le nintedanib. Ces médicaments permettent de ralentir le déclin de la fonction respiratoire et d'améliorer la survie des patients.

La pirfenidone est une molécule aux propriétés anti fibrosantes, anti inflammatoires et anti oxydante. Bien que son mode d'action n'est pas encore été complètement élucidé, elle inhibe, *in vitro*, la différenciation myofibroblastique induite par le TGF $\beta$  notamment en inhibant la phosphorylation de Smad 3, de p38 et d'Akt (48). *In vivo*, l'administration de pirfenidone était associée à une diminution de la fibrose pulmonaire et de l'accumulation des dépôts de collagène et de myofibroblaste induits par la bléomycine (49). Dans le même modèle expérimental, un autre travail a révélé que la pirfenidone permettait de réduire l'accumulation de fibrocytes *via* la diminution de l'expression de CCL2 par les macrophages et les cellules épithéliales alvéolaires ou bronchiques (50). Les propriétés anti fibrosantes de la pirfenidone ont été démontrées *in vivo*; son administration permettait de diminuer le nombre d'espèces réactives de l'oxygène. Le mécanisme d'action a été étudié *in vitro*. La pirfenidone favorise l'expression de NRF2 par les fibroblastes pulmonaires après stimulation avec du TGF $\beta$ . NRF2 est un facteur de transcription impliqué dans la régulation de l'expression de protéines anti oxydantes (51). Enfin la pirfenidone aurait également des propriétés anti inflammatoires. L'administration de pirfenidone était associée à une diminution de la sécrétions de la cytokine inflammatoire IL-6 et une diminution du score d'inflammation dans un modèle de fibrose pulmonaire expérimentale murine (51).

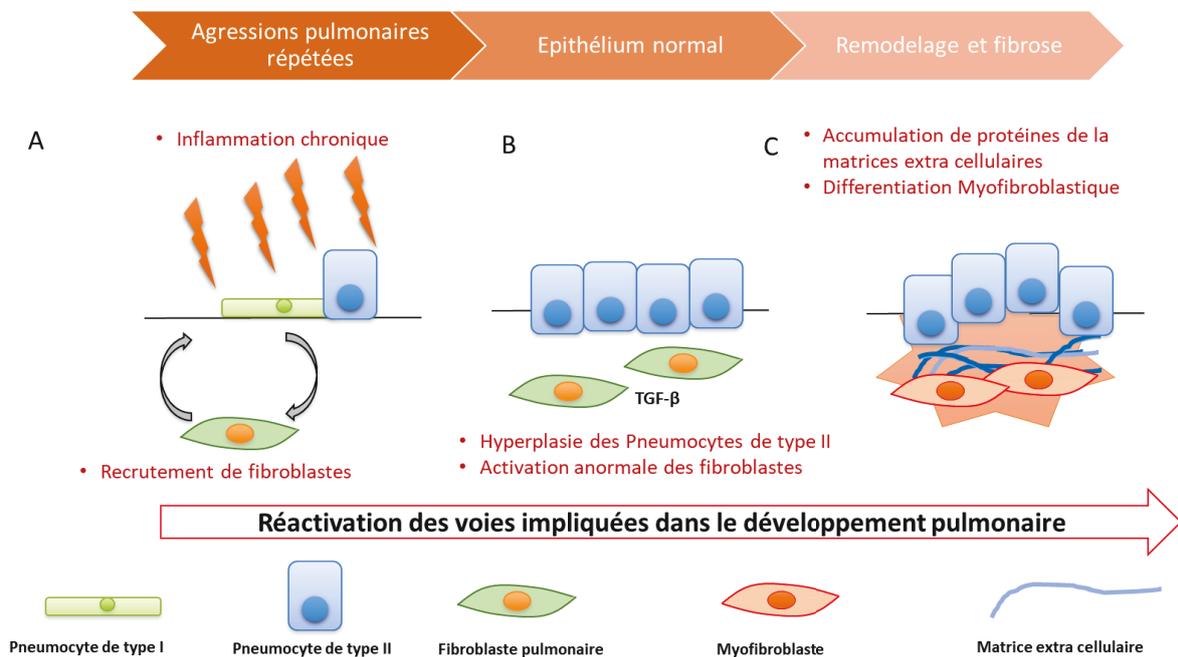
Le nintedanib est un inhibiteur de tyrosine kinase qui cible les récepteurs du *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), du *Vascular Endothelial Growth Factor*

(VEGF) et des FGF (FGFR1, FGFR2, FGFR3) (52) mais également des membres des protéines SRC telles que LCK, LYN et FLT-3 (53). Initialement utilisé en oncologie pour prévenir la néoangiogenèse tumorale, le nintedanib a fait preuve de propriétés anti fibrosantes, *in vitro*, notamment en inhibant la prolifération et la migration de fibroblastes pulmonaires mais également en diminuant la synthèse de protéine de la MEC par ces même cellules (53). *In vivo*, son administration permettait de diminuer les lésions de fibrose induite par l'administration intra trachéale de bléomycine ou de silice (54). Dans ces modèles expérimentaux, le nintedanib semblait également avoir un effet anti inflammatoire en diminuant l'influx pulmonaire de lymphocytes et de polynucléaires neutrophiles et l'expression de plusieurs cytokines pro inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$  et TIMP-1 (54).

## 1.2 Physiopathologie de la FPI

Alors que les premières descriptions de pathologie pulmonaire fibrosante datent des années 1800, ce n'est qu'en 1960 que Liebow et Carrington décrivent pour la première fois l'aspect de pneumopathie interstitielle commune en tant qu'entité anatomopathologique distincte (55). Le pendant clinique de cette entité était appelé alvéolite fibrosante cryptogénique (56). Cette appellation était basée sur l'analyse du LBA laissant suggérer qu'une inflammation chronique du compartiment alvéolaire était le moteur de la fibrogénèse pulmonaire. Au cours des années 80-90, les efforts se sont polarisés sur la recherche et le dosage de médiateurs sécrétés au niveau de l'épithélium alvéolaire et sur la prolifération et la différenciation des fibroblastes pulmonaires en myofibroblastes (57). L'observation du poumon fibreux a permis à la fois de démontrer l'influence mineure de l'inflammation dans le poumon de patient atteint de FPI et d'identifier le foyer fibroblastique comme élément central de la fibrogénèse pulmonaire (57). Celui-ci était préférentiellement situé à proximité d'un épithélium alvéolaire endommagé et à la frontière entre le tissu sain et pathologique. Les découvertes portant sur la génétique de la fibrose ont permis d'identifier les cellules alvéolaires et la sénescence comme des éléments majeurs de la fibrogénèse pulmonaire. Ces observations ont conduit au paradigme actuel. La FPI serait la conséquence d'agressions répétées d'un l'épithélium alvéolaire sénescents conduisant à une prolifération de myofibroblastes, responsables de

l'accumulation des protéines de la MEC. Il y aurait au cours de ce processus une réactivation des voies impliquées dans le développement pulmonaire (Figure 5).



**Figure 5 :** Paradigme actuel de la physiopathologie de la FPI

A. Une agression chronique de l'épithélium alvéolaire conduit à la modification phénotypique des pneumocytes de type II et au recrutement de fibroblastes pulmonaires. B Les pneumocytes de type II vont alors sécréter des cytokines pro fibrosantes comme le TGFβ. C Les fibroblastes pulmonaires vont alors se différencier en myofibroblastes, source de l'accumulation des protéines de la matrice extra cellulaire conduisant à la fibrose du parenchyme pulmonaire. Au cours de ces événements, il existe une réactivation anormale des voies impliquées dans le développement pulmonaire. Adapté de Froidure et *al.* (58)

### 1.2.1 Les modèles expérimentaux de fibrose pulmonaire

La compréhension des mécanismes impliqués dans la fibrogénèse pulmonaire est passée par l'élaboration de modèles expérimentaux animaux. Ces modèles ont permis de préciser les mécanismes physiopathologiques et les interactions cellulaires anormales impliquées dans la FPI. De nombreuses approches différentes ont été développées ces trente dernières années (59). Le modèle murin de fibrose pulmonaire induite par l'instillation intra-trachéale de bléomycine ou d'adénovirus recombinant surexprimant du TGFβ (AdTGFβ) sont les modèles animaux choisis dans le cadre de ce travail de thèse. Dans ces deux modèles, l'évaluation de la

fibrose expérimentale est établie à partir d'analyses qui combinent des mesures biochimiques du dépôt de matrice dans le poumon (test de Sircoll ou mesure de l'hydroxyproline, western-blots) avec des évaluations histologiques attestant de la variation.

- **Le modèle murin de fibrose induite par la bléomycine**

Le modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine est le modèle animal le plus fréquemment utilisé pour l'étude *in vivo* de la FPI (60). La bléomycine est une chimiothérapie efficace pour le traitement de nombreux types de cancers tels que les lymphomes ou les tumeurs de la peau (61). Cependant, son utilisation est restreinte, du fait du risque élevé de développer une PID fibrosante et mortelle (62). Cette toxicité est expliquée par la faible expression pulmonaire de la bléomycine hydrolase (63) qui conduit à l'absence de l'élimination de la bléomycine. L'activité antitumorale de ce glycopeptide est liée à l'induction de la mort des cellules cancéreuses par apoptose ou nécrose, suite à des lésions de l'ADN et la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (64).

L'injection intra trachéale de bléomycine est la voie d'administration privilégiée dans ce modèle, du fait de sa simplicité et de sa relative reproductivité. En effet, la fibrose induite est plus rapide et plus sévère que les autres voies d'administration et la bléomycine (60). Des doses uniques de bléomycine sont le plus souvent administrées, même si des doses répétées entraînent une fibrose plus durable (65). La souche de souris C57Bl/6 mâles est la plus fréquemment utilisée du fait de leur sensibilité à la bléomycine (59,66).

Il existe deux phases dans ce modèle, la phase inflammatoire et la phase fibrosante

La phase inflammatoire débute de J0 à J7 post instillation de bléomycine. Durant cette phase, il existe une augmentation de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et l'interféron (INF)- $\gamma$  accompagné d'un afflux important de macrophages et de cellules mononuclées.

La phase fibrosante débute à partir de J8 post instillation de de bléomycine. Elle est caractérisée par un afflux de macrophages et de lymphocytes, associé à une augmentation des marqueurs pro-fibrosants tels que TGF- $\beta$ 1, fibronectine et procollagène-1. Un pic de cette phase fibrosante est décrit au jour 14 (67). La troisième semaine se caractérise par un dépôt excessif de composants de la MEC,

constituant la fibrose pulmonaire en elle-même. A la quatrième semaine post-injection, il est observé une régression spontanée de ce modèle, et les poumons retrouvent un aspect proche de la normale environ six semaines après l'injection initiale de bléomycine (65).

Plusieurs divergences existent dans les lésions et anomalies rencontrées au cours de la FPI et dans ce modèle. Tout d'abord, il n'existe pas de foyers fibroblastique, élément pathognomonique de l'histopathologie de la FPI. Alors que la FPI débute dans les zones sous pleurale, ici la fibrose débute dans les zones peribronchiques (68). Enfin l'inflammation joue un rôle central dans ce modèle. L'administration précoce d'un traitement anti inflammatoire permet de prévenir l'apparition de la fibrose chez la souris mais ne prédit pas son efficacité sur la fibrose humaine (59).

Cependant, la bléomycine et ses composés de dégradation (ROS) peuvent entraîner différentes lésions similaires à ce qui est retrouvé chez les patients atteints de FPI : fibrose interstitielle avec épaississement de l'interstitium et hyperplasie du revêtement pneumocytaire, modification de la membrane basale, diminution de la fraction de cellules épithéliales, variation de la taille des capillaires (69) et fibrose pulmonaire hétérogène chez l'animal, d'intensité variable selon le fond génétique de la souris.

- **Le modèle de fibrose pulmonaire induit par un adénovirus recombiné surexprimant du TGF**

Le modèle de fibrose pulmonaire murin portant sur l'utilisation d'un adénovirus, non réplicatif et non intégratif est un modèle validé de fibrose pulmonaire expérimentale (59) , pour induire une surexpression transitoire (7 à 10 jours). L'instillation intra trachéale de l'adénovirus induit une surexpression de TGF $\beta$  porcin au niveau de l'épithélium bronchique et de l'épithélium alvéolaire (70) .

Dans ce modèle, il existe un remodelage de l'architecture pulmonaire, sans inflammation majeure, associée à une accumulation de myofibroblastes. De plus, des foyer fibroblastiques peuvent être retrouvés, contrairement au modèle expérimental basé sur l'administration intra trachéale de bléomycine (71). La fibrose débute de façon péri bronchique, touche l'ensemble du parenchyme pulmonaire à J21 et progresse vers la plèvre qui devient fibreuse, en général 28 jours après l'injection. Il n'y pas d'atteinte de la paroi thoracique ou de fibrose dans d'autres

organes dans ce modèle. Outre le TGF $\beta$ , l'utilisation d'un adénovirus recombiné peut être utilisé pour induire la surexpression d'autres protéines, dont certaines à visée anti fibrosante.

Dans de travail de thèse, nous avons utilisé des adénovirus recombinés comme deuxième modèle de fibrose pulmonaire (via la surexpression de TGF $\beta$ ) mais également afin d'induire la surexpression d'une protéine d'intérêt dans la cavité pleurale ou l'espace alvéolaire de souris C57Bl6. Nous avons utilisé un adénovirus recombinant classique et un Adeno Associated virus (AAV). Ces derniers ont été développé à des fins thérapeutiques, comme outil d'administration d'un gène d'intérêt chez l'homme.

- **Les Adeno Associated Virus**

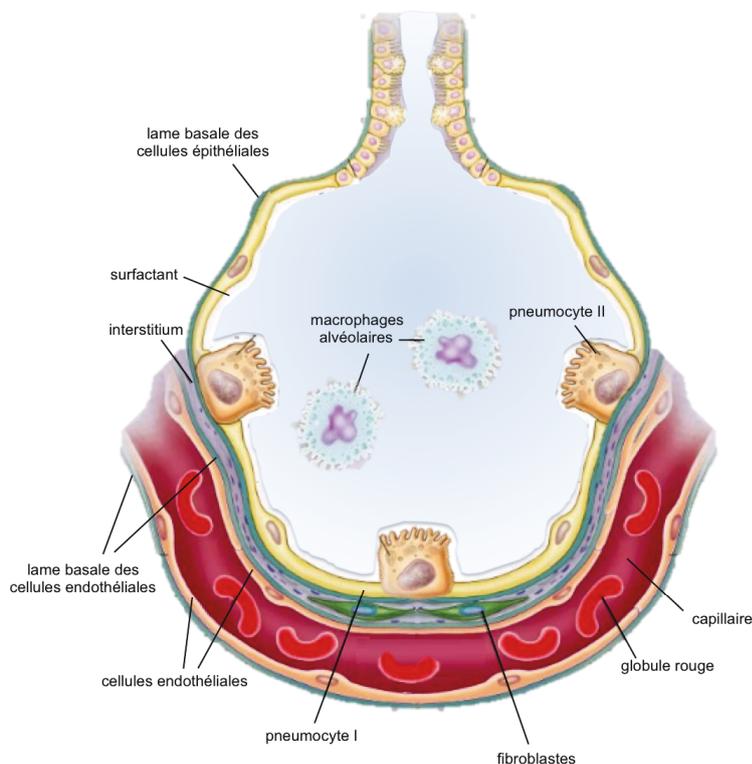
Les Adeno-associated virus (AAV) sont des virus non enveloppés qui peuvent être utilisés pour délivrer de l'ADN à des cellules cibles. Ils ont été découverts de façon fortuite comme des contaminant de préparation d'adénovirus (72). Ils appartiennent à la famille des parvovirus et leur réplication est dépendante d'une co-infection avec d'autres virus, principalement des adénovirus (72). Une recherche intense a été conduite afin de développer des AAVs recombinants (rAAVs) à des fins thérapeutiques, notamment dans les pathologies d'origine génétique et monogéniques (73). Récemment, ils ont été utilisés comme vecteur comme traitement d'une cécité d'origine génétique (mutation RP65) dans une population pédiatrique (74). Les rAAVs sont très peu immunogènes, en comparaison à des adénovirus. Ils sont également résistants aux variations de températures, de pH et donc très stables dans le temps. De fait, ils induisent une expression prolongée du gène d'intérêt pendant plusieurs semaines (voire année) en fonction du type cellulaire ciblé. Plusieurs variants de rAAVs existent (rAAV1, 2, 5, 6, 8, 9), le choix du variant à utiliser va dépendre de la cellule ciblée. L'interaction rAAVs-cellules est conditionnée par des liaisons avec différents sucres présents à la surface membranaire. A titre d'exemple, les rAAV9 se lient préférentiellement aux cellules exprimant du galactose à leur surface membranaire comme les cellules hépatiques. Le point limitant lié à la conception des rAAVs réside dans la taille de la cassette, incluant le promoteur et le

gène, situé entre les deux régions ITR. Un gène supérieur à 5kb conduira à une nette diminution de la surexpression (75).

L'utilisation de ces outils à des fins thérapeutiques dans la FPI nécessite au préalable de définir les acteurs cellulaires cibles.

### 1.2.2 Les cellules impliquées dans la FPI

L'alvéole pulmonaire est la partie la plus distale du parenchyme pulmonaire et constitue le lieu où s'effectuent les échanges gazeux entre l'air et le sang à travers la barrière alvéolo-capillaire. La structure alvéolaire et les cloisons inter-alvéolaires sont constituées par quatre grands types cellulaires : les cellules épithéliales et endothéliales, les fibroblastes et les macrophages alvéolaires (Figure 6).



**Figure 6** : Représentation schématique de l'alvéole pulmonaire

La structure alvéolaire est constituée de quatre types cellulaires majeurs : les cellules épithéliales alvéolaires de type I et II, composant l'épithélium alvéolaire, les cellules interstitielles (composées principalement de cellules mésenchymateuses), les cellules intra-alvéolaires (représentées majoritairement par les macrophages alvéolaires) et les cellules endothéliales tapissant la paroi des capillaires alvéolaires. Les cloisons inter-alvéolaires sont ainsi formées de l'épithélium alvéolaire, de l'endothélium capillaire alvéolaire, de cellules interstitielles et de MEC. Adapté de Ware and Matthay (76). MEC, matrice extracellulaire.

La paroi alvéolaire au contact est constituée de 2 types de cellules épithéliales

alvéolaires : les pneumocytes I et II.

Les pneumocytes de type I (PI) sont des cellules aplaties qui recouvrent plus de 90% de la surface alvéolaire. Ces cellules forment, avec les fibroblastes situés dans le secteur interstitiel, la barrière alvéolo-capillaire. C'est à travers celle-ci que s'effectuent les échanges gazeux respiratoires. Les PI sont également impliquées dans les échanges ioniques et hydriques depuis l'espace alvéolaire vers le tissu pulmonaire et le réseau lymphatique interstitiel. Du fait de leur caractère hautement différencié, les PI cellules sont très sensibles aux agressions et donc aux polluants, irritants ou pathogènes rencontrés dans l'espace alvéolaire.

Le pneumocyte de type II (PII) est une cellule cuboïdale sans extension cytoplasmique, préférentiellement située dans les angles alvéolaires. Cette cellule est très active sur le plan métabolique, comme en témoigne le nombre important de mitochondrie et le volumineux appareil de Golgi de ces cellules. Les PII sont la source de de surfactant, mélange tensioactif qui recouvre la paroi alvéolaire et qui permet le maintien de l'ouverture lors des cycles respiratoires. Le surfactant est stocké dans les corps lamellaires, qui sont des organites spécifiques des PII. (77). Enfin ces cellules jouent un rôle central dans le renouvellement et la régénération de l'épithélium alvéolaire. Après une lésion de l'épithélium alvéolaire une partie des PII a la capacité de proliférer et de se différencier en PI (78). En plus de ce rôle physiologique, ces cellules ont également un rôle immunologique. Elles sécrètent des molécules impliquées dans la défense innée de l'hôte et pourraient jouer un rôle de cellules présentatrices d'antigène (79).

En situation normale, les cellules inflammatoires contenues dans les espaces alvéolaires sont majoritairement représentées à 80-90 % par les macrophages alvéolaires, même si des lymphocytes (10 %) et des polynucléaires neutrophiles (0-3 %) sont également présents. Les macrophages résidents circulent à la surface épithéliale et dans les espaces interstitiels. Ces derniers assurent le maintien de l'homéostasie du tissu pulmonaire, notamment par phagocytose d'éventuels pathogènes et élimination des cellules sénescents.

Enfin, les fibroblastes interstitiels synthétisent et renouvèlent, en quantité très faible dans le parenchyme pulmonaire sain, l'espace interstitiel situé entre les alvéoles pulmonaires et correspondant au tissu conjonctif de soutien des alvéoles.

### **1.2.3. Les cellules épithéliales alvéolaires initient et entretiennent la fibrogénèse pulmonaire**

Le rôle majeur des cellules épithéliales dans la fibrogénèse est un concept qui a émergé et s'est renforcé grâce à l'observation du poumon fibreux en microscopie électronique (57). Le paradigme actuel, basé sur l'hypothèse de Selman *et al.* (80), considère la FPI comme le résultat de processus de réparation aberrant et prolongé suite à une lésion répétée de l'épithélium alvéolaire, menant à une fibrose progressive et irréversible. Ce concept a été récemment renforcé par l'étude de la génétique des fibroses pulmonaires familiales et la mise en évidence d'une niche alvéolaire, traduisant la forte interconnexion entre l'épithélium alvéolaire et les fibroblastes pulmonaires.

En effet, l'analyse du poumon de patient atteint de FPI a révélé que les PII, en particulier celles à proximité des lésions en rayons de miel, constituent la principale source de TGF- $\beta$ 1 (81,82). Le TGF- $\beta$ 1 est la cytokine centrale de la FPI impliquée dans la différenciation des fibroblastes pulmonaires en myofibroblastes. Les PII sont également une source de PDGF (83) et de CTGF (84), impliqués dans la migration, la différenciation myofibroblastique, la prolifération et la production de MEC (85). Les myofibroblastes amplifient l'agression épithéliale en induisant la rupture de l'intégrité des membranes basales et l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires (86,87) (Figure 7), empêchant une ré-épithélialisation appropriée de l'alvéole pulmonaire. Un dépôt excessif de MEC, accompagné d'une destruction des espaces alvéolaires et de lésions en rayon de miel, est le résultat final du dommage alvéolaire initial et de la communication aberrante entre cellules épithéliales alvéolaires et fibroblastes, aboutissant à la formation de zones de fibrose (88).

Les anomalies des PII dans la FPI peuvent être expliquées par plusieurs facteurs souvent concomitants. Certains sont exogènes tels que l'exposition à des polluants ou à la fumée de tabac et certains sont endogènes. Ainsi les données épidémiologiques et l'identification de mutations génétiques conduisant à un raccourcissement des télomères ont pointé la sénescence comme un moteur majeur de la fibrogénèse pulmonaire.

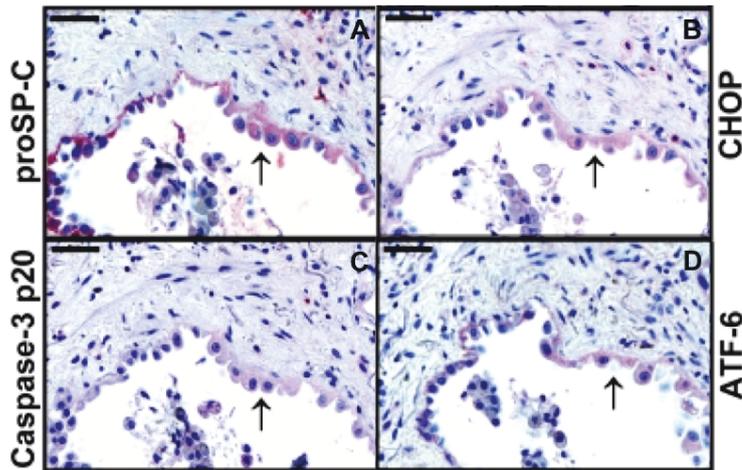
- **La sénescence des cellules épithéliales alvéolaires dans la FPI.**

Plusieurs travaux ont rapporté une augmentation l'expression des marqueurs de senescence (p16, p21,  $\beta$  galactosidase) au niveau des PII dans la FPI (89) associée de façon concomitante à des anomalies fonctionnelles et morphologiques mitochondriales (90). La senescence cellulaire est un processus activé par de nombreux phénomènes comme le stress oxydatif, les dommages liés à l'ADN, l'instabilité protéomique ou le raccourcissement des télomères. Ce dernier serait lié à une diminution de l'activité des télomérases qui aboutirait à une sénescence accélérée de ces cellules (30). Ceci aurait pour conséquence une apoptose des PII et une altération de la réparation épithéliale. Ces observations ont été confirmées dans des modèles murins de fibroses réalisées chez des souris d'âge différent. Les souris âgées (24 mois) présentaient une fibrose pulmonaire plus importante que les souris jeunes (2 mois) associé à une augmentation de l'apoptose PII (91), (92).

- **L'augmentation de l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires et l'augmentation du nombre de cellules basales**

La régulation de l'apoptose est un élément central de l'homéostasie alvéolaire notamment dans les processus normaux de réparation alvéolaire après une agression. Dans le poumon des patients FPI, il existe une augmentation anormale de l'apoptose des pneumocytes de type II à proximité des foyers fibroblastiques (86), mais également dans des zones saines (93). (94,95) Ce phénomène est également observé dans des modèles expérimentaux murins après administration de bléomycine (96). L'apoptose des cellules épithéliales semble être un élément important dans le processus de fibrogénese pulmonaire qui s'accompagnerait de façon compensatoire d'une prolifération des cellules basales. En effet, l'analyse comparative du séquençage cellule par cellule de l'épithélium alvéolaire et bronchique de patients atteints de FPI et de témoins a révélé que les cellules épithéliales alvéolaires issues de poumon fibreux co exprimaient des gènes spécifiques des cellules épithéliales et basales (97). Ceci laisse suggérer l'existence d'un recrutement de cellules épithéliales bronchiques proximale afin de ré épithélialiser les alvéoles pulmonaires (98). Cette hypothèse doit encore être confirmée par l'utilisation de lignées de souris transgénique permettant de suivre dans le temps la destinée des cellules basales au cours d'un modèle expérimental de fibrose pulmonaire murine Cependant des données issues de 3 cohortes de

patients atteints de FPI ont confirmé ce résultat. Comparativement à des patients atteints de BPCO ou de forme fibrosante de sarcoïdose, l'analyse transcriptomique de cellules présentes dans le LBA de patients atteints de FPI a révélé une forte augmentation de gènes normalement exprimés par les cellules épithéliales bronchiques basales. Cette signature était spécifique de la FPI et permettait de prédire la mortalité (99).



**Figure 7:** Immunodétection de cellules épithéliales exprimant des protéines de stress du réticulum endoplasmique, sur des coupes sériées de tissu pulmonaire provenant d'un patient FPI.

Epithélium hyperplasique (flèche) surplombant un foyer fibroblastique montrant un stress du réticulum endoplasmique et une apoptose consécutive. A. Immunodétection d'un marqueur spécifique des pneumocytes II. B. Immunodétection d'un marqueur apoptotique, la sous-unité p20 de la caspase 3 activée. C. Immunodétection d'un marqueur du stress pro-apoptotique du réticulum endoplasmique, CHOP. D. Immunodétection d'un autre marqueur du stress pro-apoptotique du réticulum, l'ATF-6. Grossissement x400 (barre = 50 µm). Adapté de Korfei et al. (236). ATF-6, facteur de transcription activateur 6; CHOP, protéine homologue de C/EBP; FPI, fibrose pulmonaire idiopathique ; SP-C, protéine C du surfactant.

- **Le stress du réticulum endoplasmique, l'hypoxie et la mitochondrie**

La perturbation de l'homéostasie du réticulum endoplasmique (RE) entraîne un stress du RE (100). Il est maintenant établi que ce phénomène est impliqué dans la pathogénèse et la progression de la FPI (28). Historiquement il a été mis en évidence, il y a une quinzaine d'année suite à la découverte de la mutation de gène codant pour la protéine C du surfactant (101). Cette mutation entraîne une protéine anormalement repliée qui va s'accumuler dans réticulum endoplasmique activant la

voie de réponse aux protéines mal repliées (UPR). Le stress du réticulum et la voie UPR sont impliqués dans l'apoptose des PII mais également dans la différenciation myofibroblastique. En effet, l'expression des protéines médiatrices du stress du RE, tels les facteurs de transcription ATF-4 et 6, est augmentée dans les poumons et dans l'épithélium alvéolaire issus de patients FPI (102,103). Une étude *in vivo* conduite chez la souris (104) a montré que l'induction du stress du RE dans l'épithélium alvéolaire favorisait la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine et favorisait l'apoptose des cellules épithéliales. Enfin, Baek *et al.* (105) ont aussi montré son implication dans la différenciation myofibroblastique et la synthèse de protéines de la MEC.

Les mutations du surfactant sont rares et d'autres facteurs ont été identifiés comme facteur influençant le stress du RE, en particulier l'hypoxie (106). L'hypoxie est fréquente dans la FPI. Elle peut survenir à l'effort ou au repos dans les formes les plus sévères, mais elle peut être également nocturne en cas de syndrome d'apnées du sommeil, comorbidité fréquente au cours de la FPI.

Plusieurs travaux ont établi l'implication de l'hypoxie dans les anomalies observées au niveau des PII ou des fibroblastes pulmonaires. L'exposition de PII primaires de rat à un taux d'oxygène de 1,5% induit l'expression du facteur  $1\alpha$  induit par l'hypoxie (HIF1 $\alpha$ ) qui s'accompagne de l'expression de marqueurs du stress du RE puis de marqueurs apoptotiques. HIF1 $\alpha$  a des propriétés pro fibrosantes puisque la surexpression de ce facteur en condition normoxique (FiO<sub>2</sub> à 21%) induit un résultat similaire à celui décrit en condition hypoxique. (106).

L'augmentation des marqueurs du stress du RE est également là la cause et la conséquence d'une dysfonction des mitochondries. Ces organites sont particulièrement affectés par la senescence. Les PII contiennent 50% des mitochondries présentent au niveau pulmonaire (107). Du fait du vieillissement, il existe une accumulation de mitochondries dysfonctionnelles caractérisées par des anomalies morphologiques et fonctionnelles au niveau des cardiomyocytes ou des neurones. (108), (109). Dans le poumon, il a été observé que les PII de patients atteints de FPI présentaient une accumulation de mitochondries dysmorphiques associées à une forte augmentation des marqueurs du stress du RE, en comparaison avec des témoins appareillés sur l'âge. Ces résultats ont été répétés chez des souris « âgées » de 20 à 24 mois suite à l'induction d'un stress du

réticulum (110). Les dysfonctions mitochondriales retrouvées dans le PII de patients atteints de FPI seraient liées à une diminution de l'activité d'un régulateur de l'homéostasie mitochondriale l'enzyme PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1). Cette enzyme a activité kinase est impliquée dans la physiopathologie de maladies neurodégénérative (90). Les souris déficientes pour PINK1 présentent une sensibilité accrue à la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, une augmentation de l'apoptose des PII (90)

### **Le stress oxydatif**

De nombreuses études ont rapporté le lien étroit entre le stress du RE et le stress oxydatif (111–114). Il a ainsi été suggéré que le stress oxydatif contribuait aussi à la progression de la fibrose dans la FPI, notamment par induction de l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires suite à la génération de ROS. En plus de la cellule inflammatoire (115), le fibroblaste pulmonaire est une des cellules productrices de ROS et en particulier d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (116,117), notamment lors de sa différenciation en myofibroblaste (118).

#### **1.2.4. Fibroblastes et myofibroblastes dans la FPI**

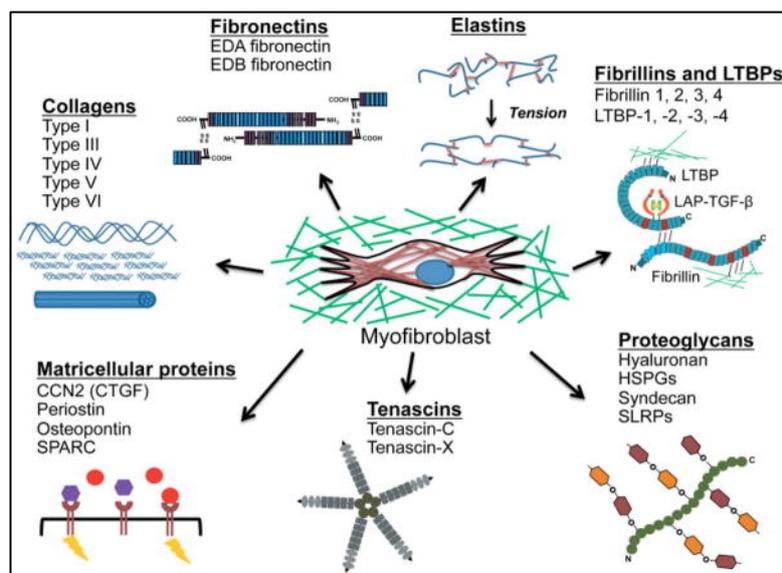
- **Le fibroblaste pulmonaire, le myofibroblaste et la réparation tissulaire**

Les fibroblastes sont des cellules mésenchymateuses allongées, localisés dans les tissus conjonctifs. C'est le type cellulaire le plus présent dans le secteur interstitiel du parenchyme pulmonaire. Ces cellules produisent la matrice extra cellulaire (MEC) présente au niveau de la membrane basale et des espaces interstitiels. La MEC est un complexe fibro-protéique dynamique composé de glycoprotéine et de protéoglycanes et dont la composition varie en fonction du type cellulaire et des conditions physiologiques ou pathologiques. A ce titre, les fibroblastes sont impliqués et essentiels dans la réparation. Leur différenciation en myofibroblaste contribue au remodelage et à la cicatrisation tissulaire (119).

- **Les myofibroblastes et les modifications de la MEC dans la FPI**

Ces cellules sont caractérisées par la formation de fibres de stress d'actine cytoplasmique et par l'expression de myosine et des protéines d'actine, notamment

l'alpha-actine du muscle lisse ( $\alpha$ -SMA) (120). Cette protéine, co exprimée par les cellules musculaires lisses et l'endothélium. C'est un marqueur de différenciation myofibroblastique. Le myofibroblaste a une activité contractile (121,122), essentielle pour faciliter la fermeture de la plaie lors de la cicatrisation, précédant son élimination (123,124). Dans la FPI, les myofibroblastes persistent dans les espaces interstitiels pulmonaires. Outre son caractère contractile, le myofibroblaste a la capacité de sécréter des protéines de la MEC (Figure 8) (120) , des espèces réactives de l'oxygène (116,117) des cytokines pro-inflammatoires et chimiokines pro-fibrosantes telles que le TGF- $\beta$  (125), le CTGF (120) et le PDGF (126). L'augmentation de la rigidité matricielle et l'augmentation de la tension au niveau de la paroi alvéolaire induiraient une boucle autocrine négative expliquant, au moins en partie, le caractère progressif de la fibrogénèse observé dans la FPI (91) (127).



**Figure 8:** La matrice myofibroblastique

L'environnement myofibroblastique est composé de nombreux composants de la MEC, parmi lesquels des protéoglycans, des ténascines, des collagènes, les fibronectines, des élastines ou encore des fibrillines. Les myofibroblastes participent à la modulation de l'expression de nombreux de ces composants. D'après Klingberg, Hinz et White (120). CTGF, facteur de croissance du tissu conjonctif ; LTBP, *latent TGF-beta binding proteins* ; MEC, matrice extracellulaire.

- **Origine des myofibroblastes dans la FPI**

Les myofibroblastes pulmonaires, notamment accumulés dans les foyers fibroblastiques sont au cœur de du processus de fibrogénèse pulmonaire.

L'identification des mécanismes à l'origine de l'amplification de ce pool de cellules a rapidement été identifiée comme une piste thérapeutique de premier ordre. Des travaux récents basés sur des techniques de transcriptomiques cellule par cellule et de lignage ont permis de cartographier les sous populations cellulaires pulmonaires mais également de tracer leur origine dans les modèles expérimentaux de fibrose pulmonaire murine. Ces données restent à confirmer dans la plupart des cas chez l'homme.

*Les cellules épithéliales et mésothéliales*

La plèvre est composée d'une couche monocellulaire de cellules mésothéliales. Du fait de l'histoire naturelle de la FPI qui débute dans les zones sous pleurales, plusieurs équipes se sont focalisées sur l'implication des cellules mésothéliales dans la fibrogénèse pulmonaire. Différents travaux ont montré que ces cellules pouvaient se différencier en myofibroblaste. Les cellules mésothéliales expriment le marqueur *Wt1* (Wilms Tumor1), de façon exclusive. L'utilisation d'une lignée de souris transgénique a permis tracer l'évolution de l'expression de ce marqueur dans des modèles expérimentaux de fibrose pulmonaire. Il est apparu que les cellules exprimant *Wt1* étaient capables de migrer dans le parenchyme pulmonaire et d'exprimer des marqueurs myofibroblastique après injection intra trachéale de TGF $\beta$  (128), (129). Chez l'homme, des cellules co-exprimaient *Wt1* et la vimentine, marqueur de cellules mésenchymateuses, étaient retrouvées dans le poumon de patients atteints de FPI (130), (131).

La transition épithelio-mésenchymateuse a longtemps été envisagée comme la principale source de fibroblastes, notamment en raison d'une co-expression de marqueurs épithéliaux et myofibroblastiques ( $\alpha$ -SMA et N-cadhérine). Cette hypothèse a été récemment infirmée. Le gène *sftpc*, codant pour la protéine C du surfactant a été utilisé comme gène rapporteur pour suivre le devenir des PII dans un modèle expérimental de fibrose pulmonaire murine. Il est apparu que moins de 5% de ces PII co exprimaient SMA démontrant qu'ils n'étaient pas la principale source de myofibroblastes(132). Plusieurs études basées sur une méthodologie similaire ont

confirmé ce résultat(133), (134). La capacité des cellules épithéliales bronchiques à exercer une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) reste, en revanche, à déterminer. En effet, l'analyse transcriptomique cellule par cellule de l'épithélium pulmonaire de patient atteint de FPI a révélé que certaines cellules co exprimaient des marqueurs de cellules basales (KRT5 et TP63) et mésenchymateux (Vimentine) (98). L'utilisation de lignées rapportrices KRT5 et TP63 permettra de vérifier l'existence d'une TEM dans ces cellules.

#### *Les péricytes*

Les péricytes regroupent une population hétérogène de cellules localisées dans des zones péri vasculaires et qui expriment des marqueurs mésenchymateux. Ils sont impliqués dans l'homéostasie vasculaire et l'angiogenèse. Ces cellules jouent un rôle important dans la l'homéostasie endothéliale et dans la réparation tissulaire après une agression. Des travaux de lignage cellulaires ont révélé qu'une sous population de péricytes (NG2+/FoxJ1 -) étaient une source de myofibroblastes (135), (136). Une étude récente a révélé que les péricytes de patients atteints de FPI avait une capacité à migrer et à produire des protéines de la MEC plus rapidement que des péricytes de patients témoins (137).

#### *Les fibroblastes pulmonaires résidents et les lipofibroblastes*

Les fibroblastes résidents sont ceux localisés dans l'interstitium pulmonaire, adjacents aux cellules épithéliales. Les lipofibroblastes ont été identifié comme une sous population de fibroblastes résidents qui semble jouer un rôle important dans l'homéostasie des PII, notamment via la synthèse de FGF10 (138). L'identification de marqueurs cellulaires permettant de différencier des fibroblastes pulmonaires, de lipofibroblastes et de péricytes, a permis de déterminer la contribution de ces sous populations au pool de myofibroblastes. Il apparait que les fibroblastes résidents participent à hauteur de 52% des cellules exprimant des marqueurs de myofibroblastes, 7 jours après l'installation de bléomycine (135).

La participation des lipofibroblastes a été confirmée en utilisant des souris transgéniques rapportrice du gène *Adipose Differentiation-Related Protein* (ADRP). Ces cellules sont capables de se différencier en myofibroblastes mais également de revenir à leur état initial. Dans un modèle de fibrose pulmonaire murine induite par la bléomycine , une partie des myofibroblastes se redifférenciait en lipofibroblastes à la phase de réparation de la fibrose (139). Cette capacité de différencier des

myofibroblastes en lipofibroblastes pourrait être une piste thérapeutique de premier ordre. Récemment, un travail a démontré que la metformine, un anti diabétique orale pouvait prévenir la différenciation de fibroblastes pulmonaires humain issus de poumon fibreux ou normal en myofibroblaste en induisant leur différenciation en lipofibroblaste. Ce résultat a été confirmé sur culture organotypique de tranches de poumon fibreux ou normal (140).

### *Les fibrocytes*

La contribution de la moelle hématopoïétique au pool de cellules mésenchymateuses a également été étudiée. Un influx de cellules hématopoïétiques exprimant des marqueurs mésenchymateux, les fibrocytes, a été mis en évidence dans le poumon de souris exposées à la bléomycine (141). In vitro, ces cellules exprimaient bien le collagène mais pas  $\alpha$ SMA après stimulation au TGF suggérant que des cellules pouvaient se différencier en fibroblastes pulmonaires mais pas en myofibroblaste. Les fibrocytes ont été mis en évidence dans le LBA et le sang de patients atteints de FPI (142), (143). Enfin, il a été démontré que l'inhibition de leur recrutement et de leur différenciation inhibe la fibrogénèse. En effet, l'administration de Pentatraxine inhibe le développement de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine notamment en diminuant le recrutement et la différenciation des fibrocytes en myofibroblastes (144). Un essai thérapeutique testant l'utilisation de pentatraxine dans la FPI est actuellement en cours.

- **Résistance des myofibroblastes à l'apoptose dans la FPI**

Il existe au cours de cette pathologie une augmentation de l'apoptose des PII et une diminution de l'apoptose des myofibroblaste. Plusieurs mécanismes, parfois synchrones peuvent expliquer ces phénomènes :

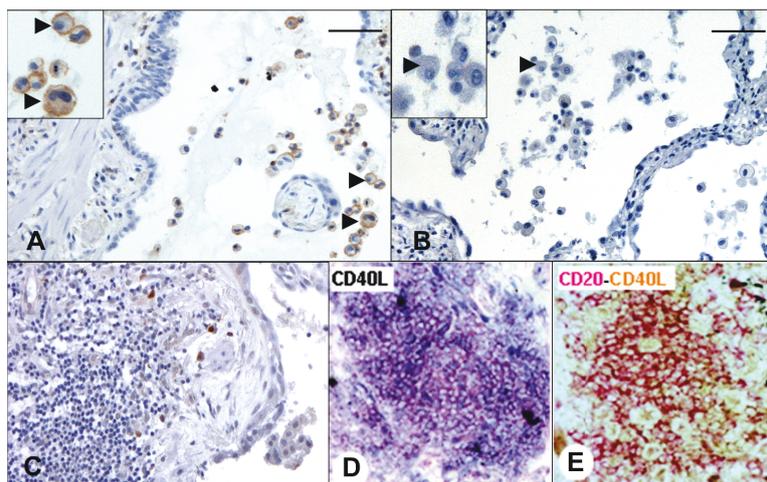
- une augmentation de l'expression de certaines protéines inhibitrices de l'apoptose, comme la survivine, dans les fibroblastes provenant des patients FPI (145,146).
- une augmentation de la concentration au niveau pulmonaire en TGF- $\beta$ 1 (147) (148). Outre son implication dans la différenciation myofibroblastique, il aurait une implication directe dans l'inhibition de leur apoptose (149).
- une diminution de l'expression pulmonaire de médiateurs anti apoptotique (150,151) et anti fibrotiques (152–154), chez les patients atteints de FPI tels que la Prostaglandine E2 (PGE<sub>2</sub>) (155).

- **La diminution du flux autophagique au cours de la FPI**

Un des mécanismes expliquant la résistance à l'autophagie serait lié à une diminution du flux autophagique qui touche les PII et les fibroblastes pulmonaire (156). L'autophagie est un processus impliqué dans la défense immunitaire, la survie cellulaire et activé par différentes formes de stress (157). Ce processus hautement régulé implique la séquestration de composants cytoplasmiques non fonctionnels dans un autophagosome qui sont par la suite adressés au lysosome et dégradés. Outre son rôle dans la dégradation de pathogènes internalisés, cette voie peut également permettre le renouvellement de certaines organelles comme les mitochondries. La diminution du flux autophagique aurait une incidence directe dans la différenciation myofibroblastique (158), la résistance à l'apoptose (159) mais également la senescence des cellules épithéliales alvéolaires (160).

### **1.2.5 Le rôle de l'inflammation du microbiome respiratoire dans la FPI**

Bien que l'inflammation ne tienne pas une place centrale dans la FPI, il existe une infiltration diffuse de cellules immunitaires inflammatoires dans le parenchyme pulmonaire fibrosé (161,162) (Figure 9). Un recrutement de monocytes se différenciant en jeunes macrophages est couramment décrit suite à la production de nombreuses cytokines et chimiokines au niveau des lésions épithéliales (163,164). Notre équipe a également montré que les poumons des patients FPI présentaient des signes d'une inflammation chronique, associant des infiltrats de cellules dendritiques et de lymphocytes B et T, parfois organisés en follicules lymphoïdes (161,162,165).



**Figure 9** : Infiltration de cellules inflammatoires dans les espaces alvéolaires et interstitiels

Infiltrations de cellules de l'inflammation : **A.** Immunodétection de macrophages alvéolaires, marqués par un anticorps anti-CD45 et **B.** Isotype contrôle de CD45. Grossissements x200 et x400 (barre = 100  $\mu$ m). [Données personnelles] **C.** Foyer lymphoïde non-marqué. Grossissement x200. [Données personnelles]. **D.** Immunodétection des lymphocytes B et T, marqués par un anticorps anti-DC40L et **E.** Immunodétection de lymphocytes B et T (marquage CD40L) et B (CD20). Grossissement x250. D'après Marchal-Sommé *et al.* (161). CD, cluster de différenciation, FPI, fibrose pulmonaire idiopathique.

De récents travaux suggèrent que cette inflammation chronique aurait davantage un rôle dans l'exacerbation aiguë et la progression rapide de la maladie plutôt que dans son initiation (161,166). Cette inflammation pourrait être causée ou entretenue par une dysbiose du microbiome respiratoire

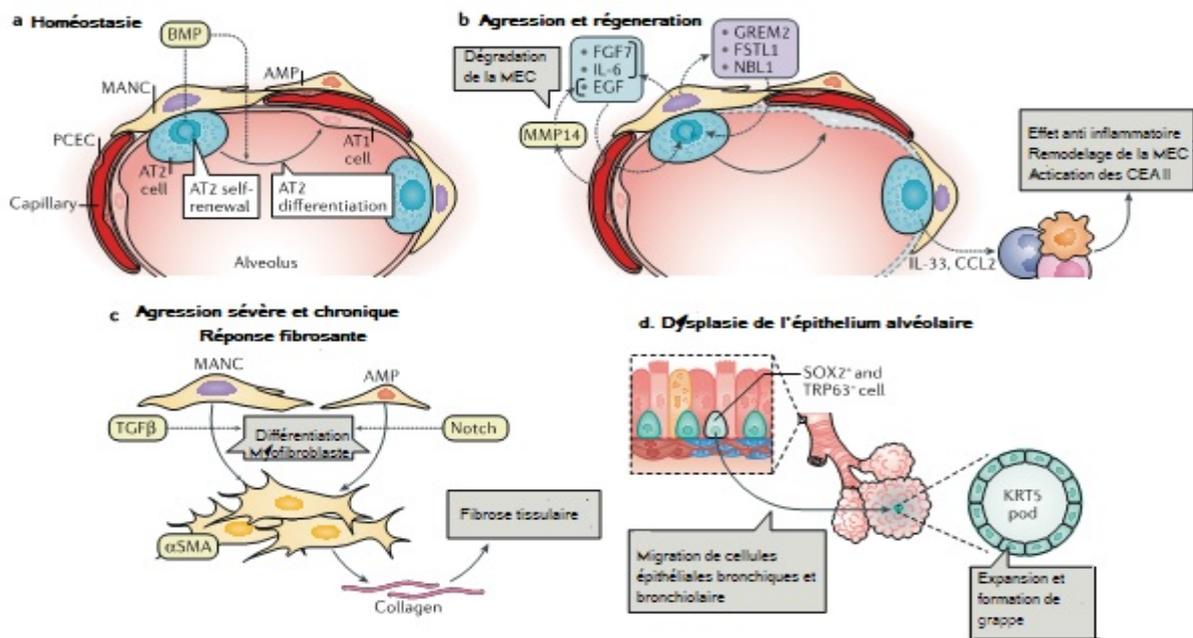
Plusieurs travaux ont en effet rapporté des perturbations quantitatives et qualitatives du microbiome respiratoire dans la FPI. Il y aurait deux fois plus de bactéries présentes dans le LBA de patients atteints de FPI comparativement à celui de patients atteints de BPCO ou contrôles (167). Récemment, il a été montré que les modifications quantitatives mais également qualitatives du microbiome pulmonaire permettait de prédire la progression de la maladie (168). Cependant, le rôle précis de la dysbiose du microbiome pulmonaire comme cause ou conséquence du processus de fibrogénèse pulmonaire, doit encore être confirmé mais pourrait constituer des approches thérapeutiques innovantes (169).

## 1.2.5 La niche alvéolaire et son implication dans fibrogènese pulmonaire

La niche alvéolaire est une unité fonctionnelle du poumon, qui permet à l'alvéole de résister aux agressions et de se régénérer en quelques semaines (170). La compréhension du rôle des interactions cellulaires entre l'épithélium alvéolaire et le mésenchyme pulmonaire a beaucoup progressé grâce au séquençage transcriptomique à cellule unique. Ces techniques ont permis de caractériser le dysfonctionnement de ces niches et leur implication dans des modèles expérimentaux de fibrose pulmonaire murine notamment en précisant le rôle de sous type cellulaires impliqués dans la fibrogènese (171). Par le biais de lignées de souris rapportrices, plusieurs sous populations de cellules mésenchymateuses ont été identifiées et localisées à proximité des alvéoles pulmonaires. L'une d'elle, appelée *Mesenchymal Alveolar Niche Cell* (MANC) contribue au renouvellement des PII. L'autre, appelée *Axin 2+ Myofibrogenic progenitor* (AMP,) contribue à la différenciation des fibroblastes pulmonaires en myofibroblastes. Les cellules MANC expriment faiblement Axin 2, protéine marquant l'activation de la voie WNT, et PDGFR $\alpha$ , marqueur de cellules pro génitrices mésenchymateuses. Ces cellules favoriseraient *ex vivo*, la croissance, la prolifération et la différenciation des PII en PI par la sécrétion d'IL-6, de Grem2 et de FGF7. A l'inverse, les cellules AMP, fortement positives pour l'Axine 2 favoriseraient l'acquisition de l'expression de l'actine du muscle lisse et la différenciation myofibroblastique (Figure 10). Ces résultats ont été reproduits dans des études ultérieures, confirmant que l'activation des cellules Actin 2+ contribuait au renouvellement, pathologique des myofibroblastes. A l'inverse, l'inhibition de la voie Wnt induisait la différenciation des PII en PI (172).

Ces travaux ont également éclairé les mécanismes moléculaires impliqués dans l'augmentation des cellules basales. Ces cellules expriment les marqueurs KRT5 et TRP63 et sont anormalement retrouvées dans l'épithélium alvéolaire de patients atteints de FPI (173). Des travaux de lignage ont démontré que ces cellules provenaient d'un sous type cellulaire exprimant SOX2 et qu'elles migraient vers les zones d'épithélium alvéolaire détruit (174). Ces cellules KRT5 positives jouent

probablement un rôle péjoratif dans la physiologie respiratoire et les échanges gazeux (Figure 10)



**Figure 10** : Réponse de la niche alvéolaire à une agression tissulaire.

**a** | La niche alvéolaire est composée de PI et de PII. Parmi les PII, il existe une sous population de cellules progénitrices dont l'action est sous la dépendance de la voie Wnt. En situation normale, ces cellules progénitrices se renouvellent et se différencient en PI. Ce processus est régulé par la voie des Bone morphogenetic protein (BMP), qui limite le renouvellement des PII et favorise la différenciation en PI. Au niveau mésenchymateux, il existe deux sous populations Des cellules situées à proximité des PII, exprimant le platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$  (PDGFR $\alpha$ ) et qui définissent la niche mesenchymal alveolar niche cells (MANCs). D'autres fibroblastes expriment la protéine Axine 2 préférentiellement localisés à proximité des capillaires. Ces cellules sont des précurseurs de myofibroblastes et définissent la niche alveolar myofibroblast progenitors (AMPs).

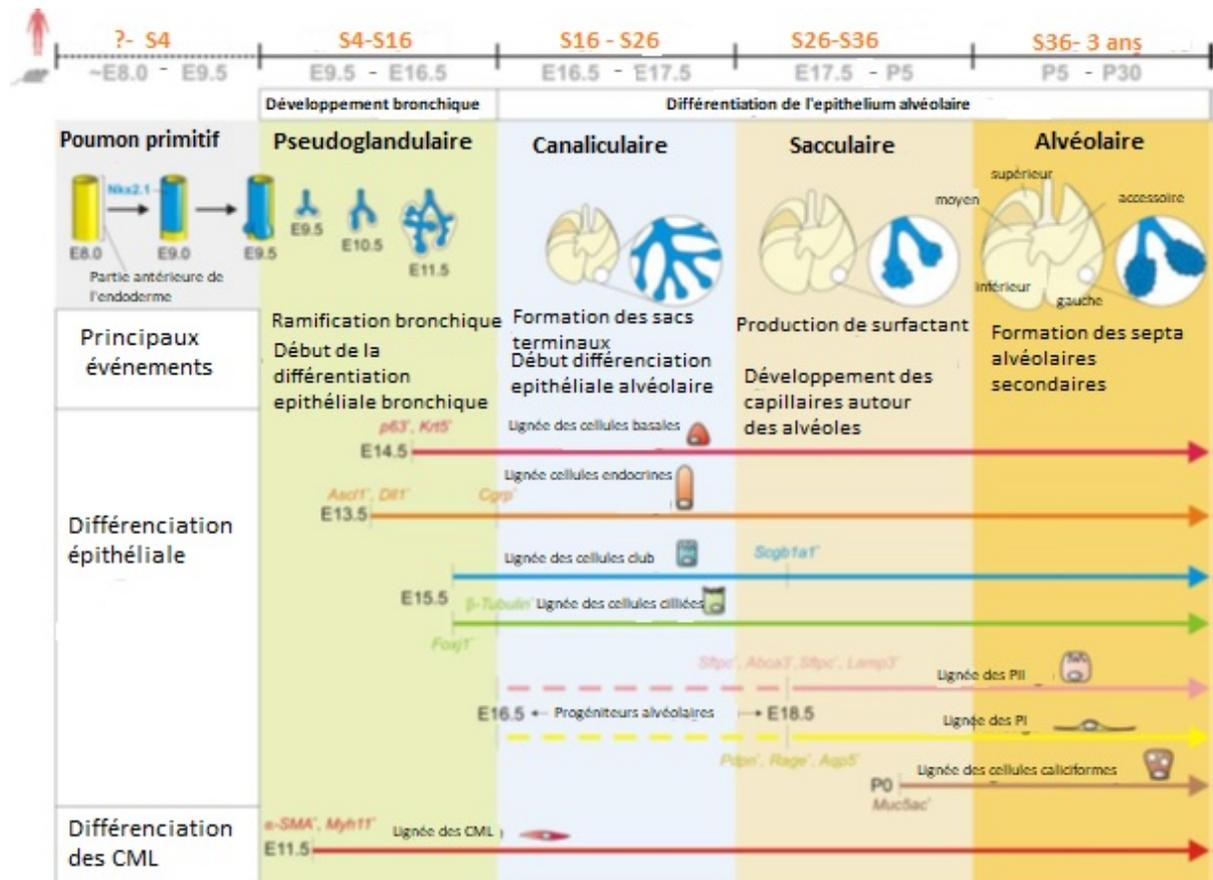
**b** | En réponse à une agression alvéolaire, l'expression de plusieurs facteurs va induire la prolifération des PII et leur différenciation en P I. Ces derniers sont les cellules les plus sensibles en cas d'agression. Les cellules endothéliales répondent également à l'agression en augmentant la production de MMP14 qui va digérer la matrice et participer au relargage de facteur de croissance stimulant la prolifération épithéliale. Les cellules MANC produisent du FGF7, de l'IL6 et des antagonistes de la voie BMP (NBL1, GREM2 and FSTL1) conduisant à la prolifération des PII. Les P II vont produire des chimiokines, CCL2 et IL-33 permettant le recrutement de monocytes et de cellules lymphoïdes qui inhibent la réponse inflammatoire en induisant la polarisation M2 des macrophages recrutés.

**c** | Une agression sévère ou chronique peut conduire à une fibrose et à une dysplasie de l'épithélium alvéolaire. La fibrose est liée à la prolifération et la différenciation des cellules AMP en myofibroblastes responsables d'une accumulation de protéins de la MEC. Cette différenciation est sous la dépendance du TGF $\beta$ . En cas de destruction importante de l'épithélium alvéolaire, des cellules épithéliales basales SOX2-et TRP63- vont migrer des voies des bronches ou bronchioles vers les alvéoles. Ces cellules vont ensuite proliférer et former des grappes de cellules exprimant KRT5. La formation de ces grappes semble être médiée par l'hypoxie et correspond à un mécanisme de réparation de l'épithélium alvéolaire. D'après Zepp et Morissey, (170)

## **1.3 La réactivation des voies impliquées dans le développement pulmonaire au cours de la FPI**

### **1.3.1 Le développement pulmonaire humain et murin**

Le développement pulmonaire désigne l'ensemble des évènements conduisant à la formation du poumon normal. Il débute au cours de la 4<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'homme et 9 jours post coitum chez la souris. Il prend son origine au niveau de la partie antérieure de l'endoderme primitif puis va se diviser selon l'axe dorso-ventral pour séparer la trachée primitive de l'œsophage et donner naissance aux deux bourgeons pulmonaires primaires (Figure 11) .(175)



**Figure 11** : Formation du système respiratoire.

Le poumon et la trachée se développent à partir d'un groupe de cellules pro génitrices *Nkx2.1* et localisé dans la partie antérieure de l'endoderme. Le tube digestif primitif va se séparer dans sa partie antérieure un tube antérieur qui donnera la trachée et les bourgeons pulmonaires primitifs et en un tube postérieur, l'œsophage relié au système digestif.

D'après Volckaert et al.(176)

Une division asymétrique va ensuite conduire à la formation d'un poumon gauche et d'un poumon droit. Un épithélium dérivé de l'endoderme va progressivement se différencier en épithélium respiratoire.

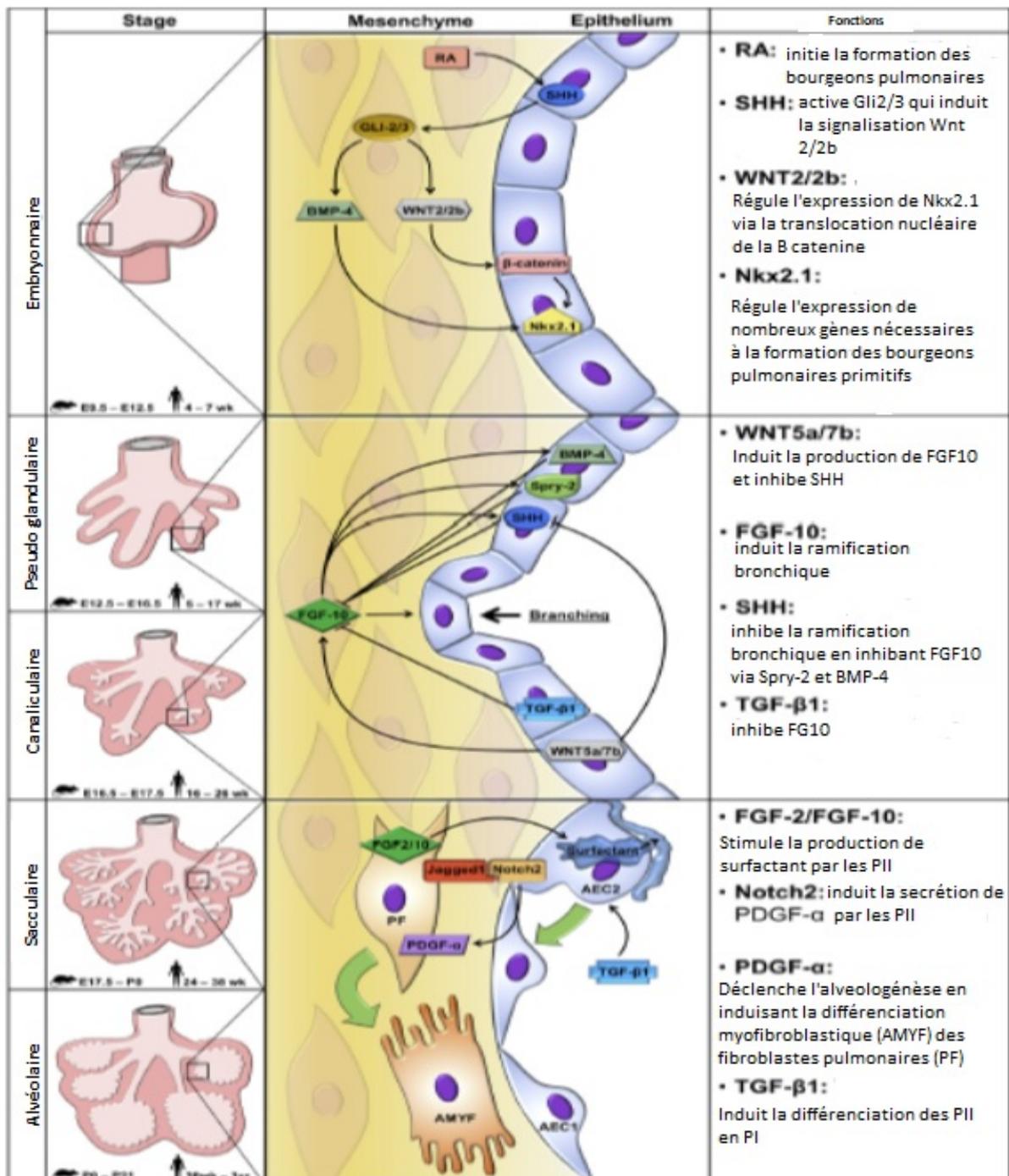
Il existe 4 stades dans le développement pulmonaire :

- Le stade pseudo-glandulaire (E9.5 à 16,6) qui au cours duquel se développe l'arbre respiratoire bronchique et bronchiolaire. Ces phénomènes reposent en partie sur les interactions entre le mésenchyme pulmonaire et l'épithélium respiratoire pseudo-glandulaire.
- Le stade canaliculaire (16ème à la 24ème semaine de gestation chez l'homme E16.6 à E17.4 chez la souris) au cours duquel se forment les bronchioles terminales et la vascularisation pulmonaire conduisant à la formation des échangeurs gazeux avec l'apparition des PI et des PII

- Le stade sacculaire (24eme semaine à la 36eme semaine de gestation chez l'homme, de E17.4 à P5.5 jours post natal chez la souris) durant lequel se mettent en place les sacs alvéolaires terminaux et la vascularisation alvéolaire. Ces changements s'accompagnent d'une forte diminution du volume mésenchymateux et d'une diminution de l'épaisseur de la membrane alvéolaire. Les PI et les PII sont à ce stade bien identifiables
- Le stade alvéolaire (36eme semaine de gestation jusqu'à l'adolescence, P5 à P30 chez la souris) qui correspond à la maturation des parties distales des bronches et des alvéoles. A ce stade ces dernières sont composées de PI et de PII qui reposent sur une membrane basale, au contact de l'endothélium. Bien que les alvéoles soient formées à la naissance, leur maturation commence durant la période post natal. En effet, il y aurait environ 20 millions de ces alvéoles primaires à la naissance et ce chiffre serait de 300 millions à l'âge de 8 ans. Ce nombre reste ensuite constant. En revanche, leur volume augmente avec celui de la cage thoracique au moment de l'adolescence.

### **1.3.2 Les voies de signalisations impliquées dans le développement pulmonaire et réactivées au cours de la FPI**

La compréhension des voies de signalisation impliquées dans le développement pulmonaire s'est grandement améliorée au cours des 20 dernières années. Les voies du TGF $\beta$ , de Wnt, hedgehog, Notch et la voie des FGFs sont fortement impliquées dans ce processus alors qu'elles sont normalement quiescentes à l'âge adulte. Elles sont réactivées de façon physiologique et aigue au décours d'une agression ou de façon pathologique et chronique au cours de pathologies pulmonaires liées à la senescence (177).



**Figure 12** : Les voies de signalisation principales impliquées dans le développement pulmonaire des mammifères.

Le développement pulmonaire murin débute au jours 9.5 avec la formation des deux bourgeons pulmonaires primitifs. L'acide rétinoïque active la voie SHH qui à son tour induit la voie Wnt2/2B qui régule l'expression de Nkx2.1, facteur à l'origine de la formation de ces bourgeons. FGF10 tient un rôle central dans la formation des voies aériennes. FGF10 est induit par Wnt5a. Ce phénomène est régulé par l'inhibition liée à la voie SHH via BMP4 et Sprouty 2. Durant l'alvéologénèse, la voie Notch et la voie du TGFβ sont nécessaires à la formation des alvéoles pulmonaires, à la différenciation des PII alors que FGF10 est nécessaire à la production de surfactant par les PII. D'après Chanda et al, (177). RA: Acide rétinoïque, FGF: Fibroblast Growth Factor, SHH: Sonic Hedgehog, PDGF: Platelet derived growth factor, PF: fibroblaste pulmonaire, AMYP: myofibroblaste

- **La voie du TGF $\beta$  et des SMADs**

Le Transforming growth factor –  $\beta$  (TGF $\beta$ ) est membre d'une famille comprenant une trentaine de facteurs protéiques.(178) Il existe 3 isoformes du TGF $\beta$ , impliquées dans le développement pulmonaire et deux récepteurs (TGF $\beta$ R1 et R2). Ces facteurs se lient à leur récepteur membranaire conduisant à la dimérisation des récepteurs, à l'activation de la tyrosine kinase et à celles de plusieurs voies de signalisation : une voie SMAD dépendante (canonique) et une voie SMAD indépendante (non canonique). Les protéines SMADs sont au nombre de 8 chez les mammifères mais seuls SMAD 2 et 3 sont des facteurs de transcriptions qui vont induire l'expression de gène cible du TGF $\beta$ . Ils sont fortement impliqués dans la régulation de la ramification pulmonaire au cours du développement (179).

Le TGF $\beta$  et les SMAD 2 et 3 tiennent une place centrale dans la fibrogénèse pulmonaire, notamment en induisant la différenciation de fibroblastes pulmonaires en myofibroblastes. La liaison du TGF $\beta$  à son récepteur va conduire à la translocation nucléaire SMAD 2 et SMAD 3 et à la transcription de nombreux gènes pro fibrosants tels qu'ACTA 2, COLA1, COLA2, COL3A1. Le TGF $\beta$  induit donc une accumulation de protéines de matrice extra cellulaire via une augmentation de leur synthèse et inhibant leur dégradation de cette matrice par les métalloprotéinase (180).

- **La voie WNT/  $\beta$  catenine**

Cette famille est composée de 19 glycoprotéines qui se lient à la surface membranaire à des récepteurs appelés Frizzled. Il existe 10 récepteurs Frizzled codés par 9 gènes. La liaison ligand récepteur conduit à l'inhibition de la phosphorylation de la  $\beta$  catenine et à sa translocation nucléaire. Elle va alors induire plusieurs gènes impliqués dans la régulation des métalloprotéinases, du cycle cellulaire ou de facteurs de croissance angiogéniques (181).

La voie Wnt est impliquée de façon très précoce dans le développement pulmonaire et notamment dans la formation de la trachée et des bourgeons pulmonaire primaires via le facteur de transcription Nkx2.1.(182) Elle est également impliquée dans la phase pseudo-glandulaire notamment en induisant la synthèse de FGF10 et de BMP-4 afin de permettre la formation des bronches (183).

Dans la FPI, plusieurs travaux ont rapporté une réactivation anormale de cette voie (184). Alors que l'expression de la  $\beta$  catenine est normalement limitée aux cellules endothéliales et épithéliales, il existe une accumulation de cette protéine dans les noyaux de cellules épithéliales alvéolaires lésées et dans les foyers fibroblastiques. Plusieurs études ont également rapporté une augmentation de l'expression de certains de ses membres (Wnt1, Wnt7b, Wnt10b) ou récepteurs (Frizzled-2,-3) dans le poumon fibreux (185). Cette voie est directement impliquée dans la différenciation, *in vitro* (186) mais également *in vivo*. L'inhibition de cette voie de signalisation (via un ARN interférent ou via un inhibiteur de la transcription de la Beta catenine) conduit à l'atténuation de l'extension de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine notamment en prévenant la différenciation myofibroblastique (187).

- **La voie Sonic Hedgehog**

La voie hedgehog est impliquée dans la morphogenèse de nombreux organes. Sonic Hedgehog (SHH) est le ligand de cette voie le plus exprimé au niveau pulmonaire. La liaison à son récepteur Patched 1 (PTCH1) conduit à la libération de la protéine G transmembranaire SMO située au niveau du cil primaire et permet la libération des facteurs de transcriptions Gli et leur translocation (188).

Durant le développement pulmonaire, SHH est exprimé par la partie ventrale de l'endoderme à partir de E10 chez la souris alors que son récepteur PTCH1 et les Gli sont exprimés à partir de E11.5. SHH joue un rôle central dans la formation des bourgeons pulmonaires primaires en induisant l'expression de Wnt2/2b et de BMP-4. SHH est également impliqué lors de la phase pseudo glandulaire en inhibant la sécrétion de FGF10 et favorise la prolifération et la différenciation des cellules mésenchymateuses (188).

Il existe une augmentation de l'expression de SHH et de ses effecteurs dans l'épithélium alvéolaire altéré et dans les zones de fibroses au cours de la FPI (189). Cette augmentation est également observée dans les modèles murins de fibrose pulmonaire. D'autre part, l'inhibition pharmacologique de Gli était associée à une diminution de la fibrose dans ces modèles induits par la bléomycine (190).

- **La voie Notch**

. Cette famille est composée de 4 récepteurs Notch et de 5 ligands (Jagged1-2, delta-like canonical Notch ligands (Dll1, Dll3 et Dll4) (191). La liaison ligand récepteur va induire un clivage de du domaine intra cellulaire du récepteur ce qui va en retour induire l'expression de gènes cibles de cette voie de signalisation tels que c-Myc, p21 (192).

Cette voie est impliquée dans la formation des bourgeons pulmonaires primitifs et de façon plus tardive lors de l'alvéologénèse. Son inactivation conduit à une altération de la synthèse de surfactant, à une diminution du nombre d'alvéoles et à des lésions emphysémateuses (193).

A l'âge adulte, cette voie est impliquée dans l'homéostasie des niches de cellules progénitrices alvéolaires, en particulier lors des agressions, et donc dans les phénomènes de réparation alvéolaire (194), (98). Il existe une réactivation de cette voie de signalisation au cours de la FPI (195). L'inhibition de la voie Jagged1/Notch1 dans les cellules mésenchymateuses est associée à une diminution des lésions de fibrose induite par la bléomycine (195).

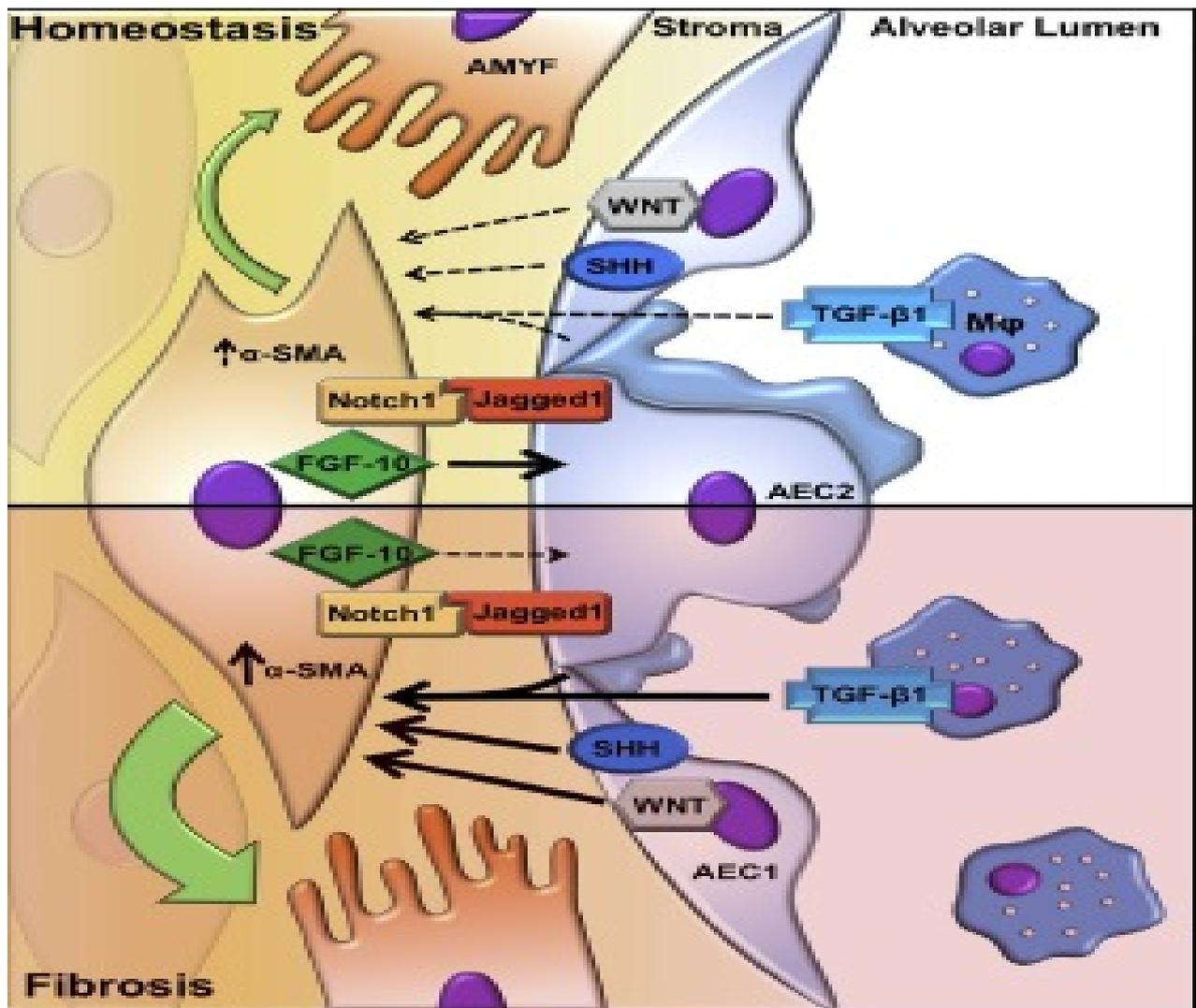
- **Interaction entre la voie du TGF $\beta$  et les voies impliquées dans le développement pulmonaire au cours de la FPI**

La voie du TGF $\beta$  semble jouer un rôle central activant et orchestrant la réactivation de ces voies (180). Le TGF $\beta$  amplifie la signalisation de la voie Wnt au cours de la FPI (196). Son inhibition (via l'administration de SMAD7, inhibiteur de la voie canonique) induit une dégradation de la  $\beta$  catenine et conduit à une extinction du signal Wnt (197). L'extinction de cette voie prévient la fibrose induite par la bléomycine chez la souris (198).

Plusieurs travaux ont rapporté une synergie entre la voie Notch et la voie TGF $\beta$  (196). Une perte de la signalisation de cette voie dans des cellules musculaires sénescents est associée à une diminution de la signalisation TGF- $\beta$ /SMAD-3 (199). Au niveau pulmonaire, l'interaction entre les voies Jagged-1/Notch et TGF- $\beta$ 1/SMAD amplifie la différenciation myofibroblastique dans des modèles murins de fibrose pulmonaire (200), (201). Ces travaux suggèrent un effet synergique de la voie Notch sur la voie du TGF  $\beta$

La voie Sonic Hedgehog régule de façon positive la prolifération, la migration et la survie des fibroblastes pulmonaires (202). La voie TGF $\beta$ /SMAD active

l'expression des facteurs de transcriptions Gli 1 et 2, deux effecteurs de la voie SHH (203). Cette activation est associée à une diminution de l'expression par les fibroblastes pulmonaires de FGF10, impliqué dans l'homéostasie et la réparation de l'épithélium alvéolaire (204). FGF10 est un membre de la famille des Fibroblast Growth Factors. Dans la suite du manuscrit nous allons détailler l'implication de cette voie dans le développement pulmonaire et dans la FPI.



**Figure 13** Interaction entre l'épithélium et le mésenchyme en condition physiologique et lors de la fibrose pulmonaire impliquent la réaction des voies du développement pulmonaire :

**Partie haute** : Au cours d'une agression alvéolaire, existe une réactivation des voies Wnt, Notch, SHH, FGFs sous l'action du TGF $\beta$ , synthétisés par les macrophages alvéolaires et par les cellules épithéliales alvéolaires. Ceci va conduire à activation des voies SHH et Wnt au niveau épithélial induisant la différenciation des fibroblastes pulmonaires en myofibroblastes. Ces phénomènes sont régulés amplifié par la voie Noth. En retour il existe une production de FGF10 par les cellules mésenchymateuses. Le FGF10 joue un rôle central dans la réparation épithéliale notamment en régulant la différenciation et la prolifération des cellules progénitrices. L'activation de cette voie cesse après la restitution ad integrum de l'épithélium alvéolaire.

**Partie basse** : Dans le cadre de la fibrose pulmonaire, il existe une réactivation aberrante et chronique de ces voies qui conduit à une prolifération continue des myofibroblastes et à une accumulation de protéines de la MEC. Les voies du TGF $\beta$  et de SHH inhibent la production mésenchymateuse de FGF10 et donc la différenciation de cellules progénitrices épithéliales. Dans cette figure, la perturbation de ce signal est figurée par les flèches. Elles sont pleines en cas de fort signal, en pointillé en cas de signal faible. D'après Chanda et al.(177)

### **3. Les FGFs, le développement et la FPI.**

Les FGFs sont une famille de polypeptides très conservés tout au long du règne animal. Leur activité biologique est médiée par les FGF récepteurs qui ont une activité tyrosine kinase. Cette voie de signalisation est fortement impliquée dans l'embryogénèse de nombreux organes mais également dans l'homéostasie et la réparation tissulaire à l'âge adulte (205).

#### **3.1 La famille des FGFs**

##### **3.1.1 Les FGFs**

Les FGF sont des protéines monomériques de 17 à 34 kDa regroupées au sein d'une famille multigénique formée à ce jour de 22 facteurs (134). Les FGF sont composés d'une région centrale dite "core", fortement conservée entre les différents FGF, qui permet la liaison aux récepteurs de haute affinité (les FGFR) et aux récepteurs de basse affinité (les protéoglycanes). La majorité des FGF possèdent un peptide signal en N-terminal facilitant leur sécrétion vers le milieu extracellulaire mais ils sont parfois internalisés avec une localisation nucléaire ou nucléolaire (135). Chaque FGF peut se lier à plusieurs FGFR et réciproquement, chaque FGFR peut lier plusieurs FGF (208).

La famille des FGF régule un grand nombre de processus biologiques notamment dans le développement embryonnaire et l'homéostasie tissulaire. Ainsi, les FGF sont impliqués de nombreux processus biologiques fondamentaux tels que la prolifération, la survie, la migration, la différenciation et le métabolisme cellulaire (120). Durant l'embryogénèse, plusieurs FGF exercent un rôle central lors de la gastrulation, dans la différenciation de la masse cellulaire interne, induisant le lignage endodermique à l'origine de l'épithélium digestif et respiratoire. Plus tardivement dans le développement, au cours de l'organogénèse, la signalisation FGF est impliquée de façon quasi ubiquitaire, jouant un rôle-clé dans l'interaction

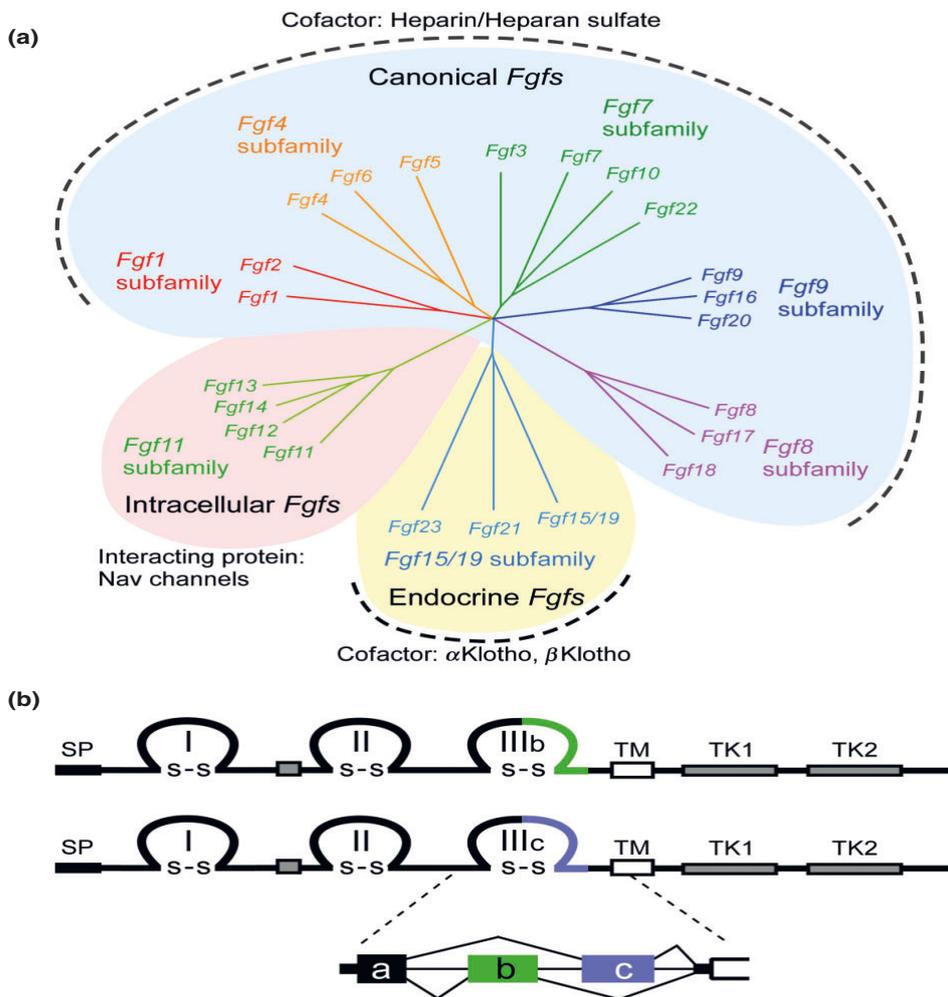
entre cellules épithéliales et mésenchyme et donc dans la formation des bourgeons des membres, dans l'organogénèse de nombreux organes dont le poumon (209).

A l'âge adulte, cette famille est fortement impliquée dans les processus de réparation tissulaire. Ainsi, il a été montré que la perte de fonction de certains FGF ou FGFR affecte certains processus de réparation tissulaire notamment au niveau cutané ; à l'inverse l'activation de certains membres pourrait favoriser le processus de cicatrisation(136)

Il existe 7 sous familles de FGF secrètes définies par des fonctions communes et des similitudes de séquence - chacune comprenant un à cinq membres (Figure 14).

- La sous famille FGF1 comprend FGF1 et FG2. Bien que ces protéines n'aient pas de signal d'adressage extra cellulaire, elles sont tout de même secrétées à travers la membrane cytoplasmique. Ce phénomène pourrait mettre en jeu une interaction avec HSP90. FGF1 aurait une action nucléaire et serait impliqué dans la régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose et de la différenciation cellulaire. FGF1 est le seul FGF capable de se lier à tous les FGF récepteurs
- La sous famille FGF4 comprend FGF4, FGF5 et FGF6. Toutes ces protéines sont secrétées. Leur domaine N terminal est clivable et peut se lier isoformes et à FGFR4
- La sous famille FGF7 regroupe FGF3, FGF7, FGF10 et FGF22 ; Ils activent préférentiellement les isoformes IIIb de FGFR2
- La sous famille FGF8 regroupe FGF8, FGF17 et FGF18 qui activent les isoformes IIIc de FGFR1-3 et de FGFR4.
- Les sous familles FGF9 (contenant FGF9, FGF16 et FGF20) et FGF19 (contenant FGF19, son orthologue murin FGF15, FGF21 et FGF23) seront décrites plus tard dans le manuscrit
- Enfin, il existe des FGF intra cellulaires regroupés dans la sous famille FGF11 qui comprend FGF11, FGF12, FGF13, FGF14. Ces FGFs non secrétés, n'ont pas d'interaction avec les FGFRs et sont impliquées dans le développement neuronale, dans l'excitabilité des neurones et des cardiomyocytes chez l'adulte.(211)

Tous les FGFs sécrétés ont une activité paracrine, hormis la sous famille des FGFs 19 qui ont une activité endocrine et la sous famille des FGF11 qui ont une action intracellulaire pure. Les FGFs agissent via l'activation de récepteurs (FGFR)



**Figure 14:** La famille des FGFs,

**(a)** Les analyses phylogénétiques suggèrent que les 22 gènes codant pour des FGF peuvent être classés en 7 sous familles contenant chacune 2 à 4 membres. La longueur des branches de cette figure est proportionnelle à la distance d'évolution entre chaque gène.

**(b)** Représentation schématique des protéines FGFRs. Les FGFRs sont des protéines d'environ 800 acides aminés composées de plusieurs domaines incluant 3 domaines extra membranaires immunoglobuline-like (I, II, et III), un domaine transmembranaire (TM) et deux domaines intra cellulaires (TK1 and TK2). SP est une séquence de signal qui est clivée. Il existe 4 récepteurs transmembranaires, Fgfr1-Fgfr4. Pour Fgfr1-Fgfr3 il existent des variants liés à l'épissage alternatif des domaines III, conduisant à la formation d'isoformes IIIb and IIIc, qui conditionnent l'affinité du ligand. D'après Ornitz et al. (209)

### 3.1.2 Les FGFRs

Les FGFRs présentent 3 domaines extracellulaires immunoglobulines like (D1-D3), un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire avec activité tyrosine kinase. D1 est impliqué dans l'auto-inhibition du récepteur alors que les D2 et D3 sont impliqués dans la liaison spécifique au ligand. Il existe 4 récepteurs différents aux FGFs : FGFR1, 2, 3 et 4, codés par 4 gènes distincts. L'existence d'un épissage alternatif au niveau du domaine immunoglobuline-like III aboutit à la production de 2 isoformes différentes : l'isoforme -b à expression épithéliale et l'isoforme -c à expression mésenchymateuse. Cet épissage alternatif s'applique pour FGFR1, 2 et 3 mais pas pour FGFR4.

Chaque FGF se lie soit à des isoformes épithéliaux soit à des isoformes mésenchymateux sauf le FGF1 qui peut se lier à tous les FGFR (Figure 14), (134). La liaison d'un FGF paracrine à un FGFR nécessite la présence d'un co-récepteur héparane sulfate pour les FGFs paracrines et  $\alpha$  ou  $\beta$  Klotho(138) pour les FGFs endocrines. La spécificité des différents FGF pour leurs récepteurs a été étudié, *in vitro*, à partir de la mesure d'une activité mitogénique induite ou d'une mesure directe de l'affinité aux FGFRs. L'utilisation de lignées cellulaire de type BaF3 et L6 myoblast a été particulièrement utile car ces cellules n'expriment que très faiblement les FGFR. La transfection de ces cellules avec différents variants de FGFR (Fgfr1b, 1c, 2b, 2c, 3c, 4) a permis d'étudier l'activité mitogénique de tous les FGFs secrétés, en présence ou en l'absence d'héparine (208), (213), (214) .

L'existence de ces différents variants (les isoformes b et c) conditionne l'affinité spécifique des différents FGFs. L'expression différentielle de ces isoforme, mésenchymateuse, ou épithéliale, est déterminante pour le développement de nombreux organes comme les membres, la peau, ou le développement pulmonaire (211).

Sous Famille	FGF	Co récepteur	Spécificité récepteur
Sous famille FGF1	FGF1	+ héparane sulfate ou héparine	FGFR 1c, 3c > 2c, 1b, 4
	FGF2		Tous les FGFRs
Sous Famille FGF4	FGF4		FGFR 1c, 2c > 3c > 4
	FGF5		
	FGF6		
Sous Famille FGF7	FGF3		FGFR 2b > 1b
	FGF7		
	FGF10		
	FGF22		
Sous Famille FGF8	FGF8		FGFR 3c > 4 > 2c > 1c >> 3b
	FGF17		
	FGF18		
Sous Famille FGF9	FGF9	FGFR 3c > 2c > 1c, 3b > 4	
	FGF16		
	FGF20		
Sous Famille FGF19	FGF15/19	+ β Klotho	FGFR 1c, 2c, 3c, 4
	FGF21	+ α Klotho	FGFR 1c, 3c
	FGF23		FGFR 1c, 3c, 4

**Tableau 2** : Affinité des FGF pour leurs récepteurs :

Les six sous familles de FGFs utilisent des co récepteurs héparane sulfate/ héparine ou klotho (alpha ou β). Ces données sont issues de expériences utilisant des myoblastes n'exprimant pas de FGF récepteurs et transfectés avec des variant de FGFRs

### 3.1.3 Les co récepteurs des FGFRs

- Les proteoglycans de type héparane sulfate

L'héparane sulfate (HS) est un co-facteur de la voie canonique ou paracrine des FGFs. C'est dans les années 80, qu'il a été démontré que l'héparine potentialisait l'action de FGF1 ainsi que son affinité pour le récepteur. HS est une longue chaîne d'hydrate de carbone qui peut se lier de façon covalente à différentes protéines transmembranaires (les syndecans) ou à des protéines localisées dans la matrice extra cellulaire. HS peut se lier soit aux FGFS, soit aux FGFRs. HS augmente l'affinité de l'un pour l'autre. Ce complexe FGF-HS-FGFR (1 : 1 : 1) conduit à un changement conformation et à une dimérisation (2 : 2 : 2). Cette dimérisation permet d'activer les domaines tyrosine kinase et donc d'activer une voie de signalisation

Cette dimérisation du récepteur qui permet la phosphorylation des domaines intracellulaires tyrosine kinase et l'activation de 3 voies de signalisation (120) :

- RAS-MAPK impliquée dans la prolifération cellulaire
- PI3K-AKT qui promeut la survie cellulaire
- PLC $\gamma$ 1 qui favorise la motilité cellulaire

HS est un composant de la MEC et peut également séquestrer certains FGFs notamment pour former des gradients de concentrations comme on peut le voir avec FGF7 et FGF10 lors du processus de ramification de l'arbre bronchique.

- La famille Klotho

La famille Klotho est composée de 3 membres  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Ces protéines transmembranaires ont une partie intra cytoplasmique de fonction inconnue et une partie extra membranaire. Cette dernière partie est composée de deux domaines KL1 et KL2. Ces protéines sont des co-facteurs de la liaison des FGFs endocrines à leur récepteur (215).

B klotho est une protéine exprimée de façon prédominante dans le foie et le tissu adipeux. C'est un cofacteur de FGF19/15 et de FGF21 pour la liaison au récepteur FGFR4. Parmi les FGFRs, FGFR4 est le seul récepteur de cette famille capable de lier à la fois des FGFs paracrine et des FGFs endocrine en fonction de la présence ou de l'absence des co récepteurs héparane sulfate ou klotho(216).

### 3.1.4 Régulation de la voie de signalisation

- Les inhibiteurs de la voie de signalisation

Sprouty (SPRY) est un inhibiteur intra cellulaire de récepteur à activité tyrosine kinase incluant les FGFR, les VEGFRs les PDGFRs et les NGFR. Cette famille est composée de 4 membres SPRY 1-4, exprimés au cours de la vie embryonnaire et adulte. Dans la voie de signalisation des FGFS, SPRY inhibe l'activation de la voie RAS MAP kinase. Leur dérégulation est souvent observée dans des pathologies cancéreuses ou auto-immunes (217).

SEF (similar expression to Fgf) est une protéine transmembranaire qui a une action antagoniste dans la voie de signalisation des FGFs. Elle se lie à la protéine

MEK, empêchant la dissociation du complexe formé par MEK-MAPK et la translocation nucléaire de la forme phosphorylée de ERK (218).

- La régulation de la réponse cellulaire après l'activation de FGFR

Il est important de souligner que la réponse cellulaire à l'activation de la voie FGF varie d'un type cellulaire à un autre. D'une part, le signal induit est dépendant du nombre de FGFR présents à la surface cellulaire mais également de l'intégration du signal des différents de FGFR activés. A titre d'exemple, FGF1 stimule les cellules épithéliales conduisant à une ramification bronchique au cours de développement pulmonaire alors que l'expression de FGF7 conduit à la formation de kystes à partir de ces mêmes cellules. Cette différence peut s'expliquer par le fait que FGF1 active FGFR2 et FGFR4 alors que FGF7 n'active que FGFR2. D'autre part, différentes voies de signalisation intra cytoplasmique peuvent être activées après la liaison FGF-FGFR. FGF7 et FGF10 appartiennent à la même sous famille et présente de nombreuses similarités. Cependant leur liaison au récepteur FGFR2b induit dans un cas la migration cellulaire et dans l'autre une prolifération cellulaire et une dégradation du récepteur pour une raison qui demeure encore inconnue (219), (220).

### **3.2 Rôle des FGF et FGFR dans le développement pulmonaire**

Plusieurs membres de cette famille, ligands et récepteurs, jouent un rôle central dans le développement pulmonaire notamment dans la maintenance du pool de cellules progénitrices, dans la différenciation des cellules épithéliales et mésenchymateuses et dans le phénomène de branching et dans la morphogénèse. Plusieurs ligands interviennent dans ces processus comme FGF7, FGF8, FGF9, FGF10, et FGF18. L'implication de FGF9 dans le développement pulmonaire ne sera pas détaillée dans ce chapitre.

Parmi ces ligands, seul FGF10 est absolument nécessaire à la formation du bourgeon pulmonaire initial (221). Les souris déficientes en Fgf10 ou en son principal récepteur Fgfr2b vont présenter une agénésie pulmonaire (222), (223) ; en revanche le développement trachéal est préservé chez ces souris.

Fgf10 est exprimé au niveau mésenchymateux et active le récepteur Fgfr2b exprimé par les cellules épithéliales. Cette liaison induit la transcription du facteur de transcription Nkx2. 1, nécessaire à la formation du bourgeon pulmonaire (221). De plus Fgf10 contribue au maintien des cellules progénitrices pulmonaires dans un état indifférencié (224). Certaines de ces cellules expriment Fgf10, et c'est ce pool qui va conduire à la formation des cellules musculaires lisses autour des bronches et des vaisseaux (225). Enfin, une inactivation conditionnelle de Fgf10 ou de son récepteur Fgfr2 après la formation du bourgeon pulmonaire conduit à une inhibition du branching (226).

L'expression de Fgf7 est détectée au niveau pulmonaire à partir de E14.5 au niveau du mésenchyme (227). L'inactivation de Fgf7 n'affecte pas la morphogénèse pulmonaire du fait de la compensation de son expression par d'autres Fgfs comme Fgf10 (227). La surexpression épithéliale de Fgf7 augmente la taille du poumon, induit une prolifération épithéliale anormale et conduit à la formation de kystes (228).

Fgf8 et Fgf18 sont deux membres de la même sous-familles, tous deux exprimés par l'épithélium lors du développement pulmonaire. En revanche, la déficience de ces Fgfs conduit à des phénotypes différents. En effet, les souris FGF18 déficientes présentent une hypoplasie pulmonaire associée à une diminution de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales (229). Alors que les souris Fgf8 déficientes vont présenter une hyperplasie pulmonaire associée à une prolifération des cellules mésenchymateuses et des cellules épithéliales alvéolaires associées à des anomalies dans la différenciation cellulaire (230)

Le récepteur FGFR4 n'est pas indispensable pour un développement pulmonaire normal. (231). Les souris déficientes pour Fgfr4 présentent une morphologie pulmonaire normale à la naissance et en post natale. En revanche l'absence concomitante de Fgfr4 et de Fgfr3 engendre des anomalies de septation des alvéoles pulmonaires liée à une accumulation d'élastine. Ce récepteur est impliqué dans l'autophagie et notamment au niveau osseux (232).

### 3.3 Implication de l'axe FGF/FGFR dans la fibrogénèse pulmonaire

De nombreux travaux ont rapporté l'implication des FGF dans la FPI. Cependant l'effet exact de ces ligands et récepteurs au cours de la maladie est complexe et dépend probablement d'un type voire d'un sous type cellulaire. Ainsi l'effet de certains FGFs pourrait être anti ou pro fibrosant ou les deux. Les données probablement les plus robustes proviennent de l'effet de l'inhibition des récepteurs de cette famille.

#### 3.3.1 Les FGF récepteurs

Comparativement à un poumon sain, il existe une augmentation de l'expression des isoformes c (expression mésenchymateuse) des FGFR ainsi qu'une diminution des isoformes b (expression épithéliale) dans le poumon de patients atteints de FPI(233). Dans une étude récente, une perte inductible de l'expression des récepteurs FGFR1-3 au niveau du mésenchyme pulmonaire était associée à une diminution des lésions de fibrose induite par la bléomycine (234) Bien que FGFR 1, 2 et 3 soient des cibles du nintedanib, un inhibiteur de tyrosine kinase validé comme traitement anti fibrosant (135), le rôle pro ou anti fibrosant de ces différents récepteurs et isoformes reste encore à caractériser.

Récemment il a été montré que le récepteur FGFR2 était nécessaire à la réparation après une agression alvéolaire et conditionnait la survie de souris présentant une fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (235) . A l'inverse, un travail a montré que l'inhibition de FGFR2c prévenait, *in vitro*, l'expression de marqueur de différenciation myofibroblastique , induite par le TGF $\beta$  , par des cellules épithéliales alvéolaires ou des fibroblastes pulmonaires humains (236). Cet effet s'expliquait par une diminution de l'expression du récepteur du TGF $\beta$ , en favorisant son adressage au protéasome et sa dégradation. Cet effet anti fibrosant a été confirmé *in vivo* (237). Ces données laissent à penser que le ciblage des FGFRs localisés au niveau mésenchymateux pourrait être bénéfique dans la FPI. Alors que l'inhibition de ces récepteurs a un effet anti fibrosant, la plupart des FGFs ont une action anti fibrosante (Tableau 3).

### 3.3.2 Les FGF

Ce paradoxe des FGF est bien illustré par FGF1, capable de se lier à tous les FGFRs. L'expression de FGF1 est augmentée dans le sérum et au niveau de l'épithélium alvéolaire de patients atteints de FPI (238). Récemment, il a été montré *in vitro*, que FGF1 prévenait l'expression marqueurs myofibroblastique, par des cellules épithéliales alvéolaires et des fibroblastes pulmonaires humains, issus de contrôles et de patients atteints de FPI, induite par le TGF $\beta$ . Dans un modèle murin, la surexpression de FGF1 viro-induite, diminuait l'extension de la fibrose pulmonaire murine. Cette action serait en partie médiée par FGFR1 qui serait aussi impliqué dans les propriétés anti fibrosantes de FGF2. En effet, FGF2 prévenait la différenciation myofibroblastique de fibroblastes pulmonaires de patients atteints de FPI ou de contrôle. *In vivo*, la surexpression de FGF2 était associée à une diminution de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (239). Une étude a également rapporté un rôle protecteur de FGF2 sur l'épithélium alvéolaire après une agression pulmonaire par le la bléomycine ou du naphthalène chez la souris (240) .

L'implication de la sous famille FGF7 a particulièrement été étudiée dans la FPI. L'administration de FGF7 (ou KGF) par voie intra-trachéale chez le rat est associée à une diminution des lésions de fibrose induite par la bléomycine dans un schéma d'administration préventif. Cet effet protecteur s'accompagne de la prolifération des pneumocytes de type II (241). Concernant le FGF10, son expression est diminuée au niveau de l'épithélium alvéolaire de patients présentant une FPI d'évolution progressive comparativement à ceux présentant une forme stable de la maladie (177). De façon similaire à son action au cours du développement pulmonaire, FGF10 peut cibler les cellules épithéliales alvéolaires en maintenant la régénération des PII et en prévenant leur apoptose induite par le stress oxydatif. Cet effet protecteur touche aussi le mésenchyme (242). La surexpression du FGF10 durant les phases inflammatoire et fibrosante prévient la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez des souris déficiente pour Fgf10 (243).

Plus récemment, l'implication des FGFs endocrine, FGF21 et FGF23 a également été étudiée au cours de la fibrogénèse pulmonaire. Dans un modèle murin de fibrose pulmonaire, la surexpression de FGF21 diminuait les lésions de

fibrose pulmonaire murine induite par la bléomycine. L'action anti fibrosante de FGF21 pourrait s'expliquer la diminution du stress oxydatif notamment sur les cellules épithéliales alvéolaires (244). La concentration plasmatique de FGF23 est augmentée chez les patients atteints de FPI comparée à des patients contrôles. Son expression était aussi augmentée chez la souris après administration de bléomycine. Bien que le FGF23 ne prévienne pas la différenciation myofibroblastique induite par le TGF $\beta$ , son administration associée au co récepteur klotho diminuait l'extension de la fibrose pulmonaire chez la souris (245)

	Homme	Souris/Rat	Récepteur impliqué
FGF1	- Augmenté dans la FPI - Prévient la différenciation myofibroblastique des fibroblastes pulmonaires et de PII	- Diminution de la fibrose induite par la bléomycine	FGFR1
FGF2	- Prévient la différenciation myofibroblastique des fibroblastes pulmonaires	- Diminution de la fibrose induite par la bléomycine - Réparation de l'épithélium alvéolaire, utilisation de souris déficientes pour FGF2	FGFR1
FGF7	- Prévient l'apoptose de PII , lignée A549	- Diminution de la fibrose induite par la bléomycine - Prolifération des PII	FGFR2
FGF10	- Diminué dans la FPI - Prévient l'apoptose des PII et induit leur prolifération	- Diminution de la fibrose induite par la bléomycine ou post irradiation	FGFR2
FGF18	- Inhibe la prolifération des fibroblastes pulmonaires - Augmente la migration des fibroblastes pulmonaires		FGFR3
FGF9	- Prévient la différenciation myofibroblastique - Augmente la migration des fibroblastes pulmonaires		FGFR3
FGF21	Diminue le stress oxydatif des PII (A549)	Diminution de la fibrose induite par la bléomycine	?
FGF23	- Augmenté dans la FPI - Ne prévient pas la différenciation myofibroblastique	- Augmenté par l'administration de bléomycine - Diminution de la fibrose induite par la bléomycine	?

**Tableau 3** : Implication des FGF dans la fibrogénèse pulmonaire

Au total, il existe une forte implication de la famille des FGF dans la fibrogénèse pulmonaire. Au cours de mon travail de thèse, mon attention s'est focalisée sur l'implication de deux membres, FGF9 et FGF19 dans ce processus.

## 4- Le Fibroblast Growth Factor 9

Le FGF-9 est une protéine de 23kDa qui appartient à la sous famille FGF9 qui comprend également le FGF16 et le FGF20 (Figure 14) qui agissent de façon paracrine. Les peptides de cette sous famille ont la particularité d'avoir une séquence N terminale hydrophobe. Celle-ci agit comme un signal de non clivage lors du transport dans le réticulum endoplasmique et la sécrétion par les cellules (246). Les membres de cette sous famille activent les variants IIIb de FGFR3, FGFR4 et les variants IIIc de FGFR1, 2, 3. Plusieurs pathologies liées à des mutations du gène FGF9 ont été décrites chez l'homme. Le syndrome des synostoses multiples est une pathologie autosomique dominante liée à une mutation non-sens de FGF9. Cette mutation engendre une diminution de la liaison FGF9-à son récepteur et aboutit à une prolifération chondrocytaire, une augmentation de différenciation des ostéoblastes et à une minéralisation de la matrice osseuse conduisant à une fusion des articulations (247). Le syndrome des cellules de Sertoli seules est lié à une mutation du promoteur du gène de FGF9. Cette mutation une nette diminution de l'expression de FGF19 par les cellules de Sertoli. Ceci a pour conséquence un hypogonadisme, une atrophie testiculaire, une azoospermie (248)

### 4.1 Implication de FGF9 dans le développement pulmonaire

Le FGF9 est impliqué dans le développement de nombreux organes. Les souris déficientes pour FGF9 ne sont pas viables du fait d'une hypoplasie des cavités cardiaques, de l'intestin grêle, du caecum, du rein et de l'oreille interne. De plus ces souris vont présenter des anomalies de développement au niveau squelettique et au niveau de l'oreille interne (249).

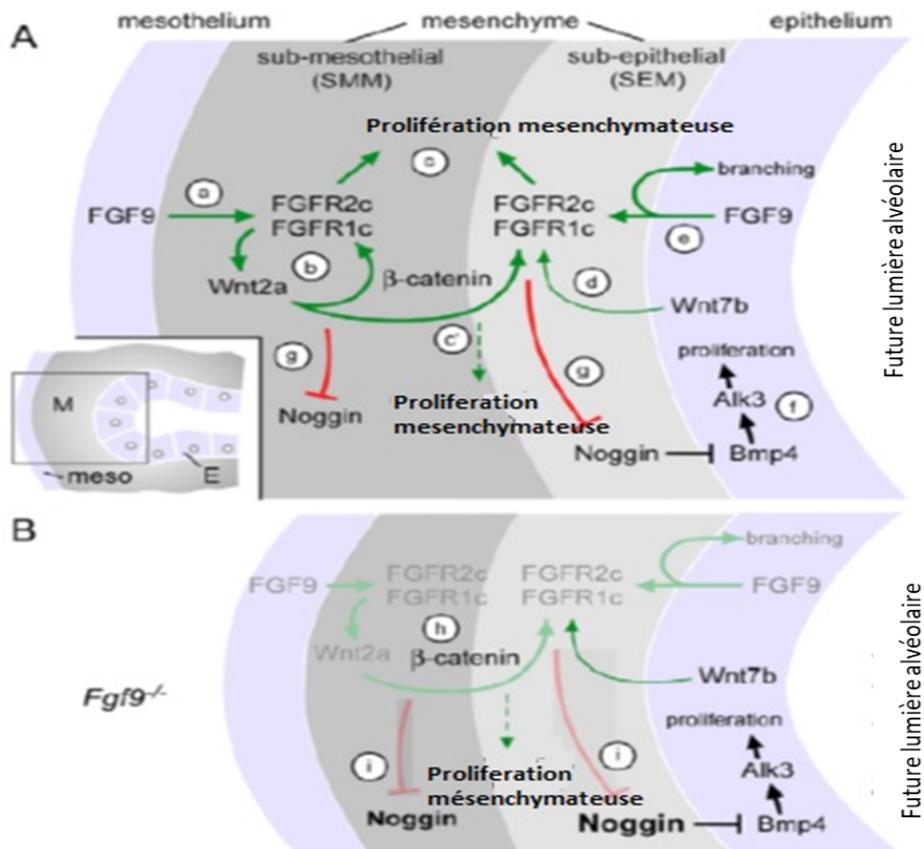
Le FGF-9 est indispensable au développement pulmonaire normal. Les souris knock-out (KO) présentent une hypoplasie pulmonaire et meurent durant la période périnatale (250).

Lors du développement pulmonaire, FGF-9 est à la fois exprimé par l'épithélium et le mésothélium et conduit à la différenciation mésenchymateuse via la voie de

signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine.(251). A partir de E12.5 son expression est exclusivement mésothéliale (252), (253).

Au niveau mésothélial, Fgf9 contrôle la prolifération des cellules mésenchymateuses localisées dans les régions sous pleurales via l'isoforme c des récepteurs FGFR 1et 2 (251) ,. Les souris déficientes pour Fgf9 présentent une diminution de la prolifération mésenchymateuse, une ramification bronchique anormale dès le stade pseudo-glandulaire (250). Fgf9 induit la différenciation des cellules mésenchymateuses exprimant du Fgf10 et inhibe la formation des cellules musculaires lisses situées autour des bronches (252).

Au niveau épithélial, il participe à la régulation de la ramification bronchique en activant de façon autocrine les FGFR présent au niveau épithélial et en activant la voie SHH impliquée dans la prolifération et la différenciation épithéliale (250), (254).



**Figure 15** : Les souris déficientes pour *Fgf9*, (*Fgf9*<sup>-/-</sup>) développent une hypoplasie

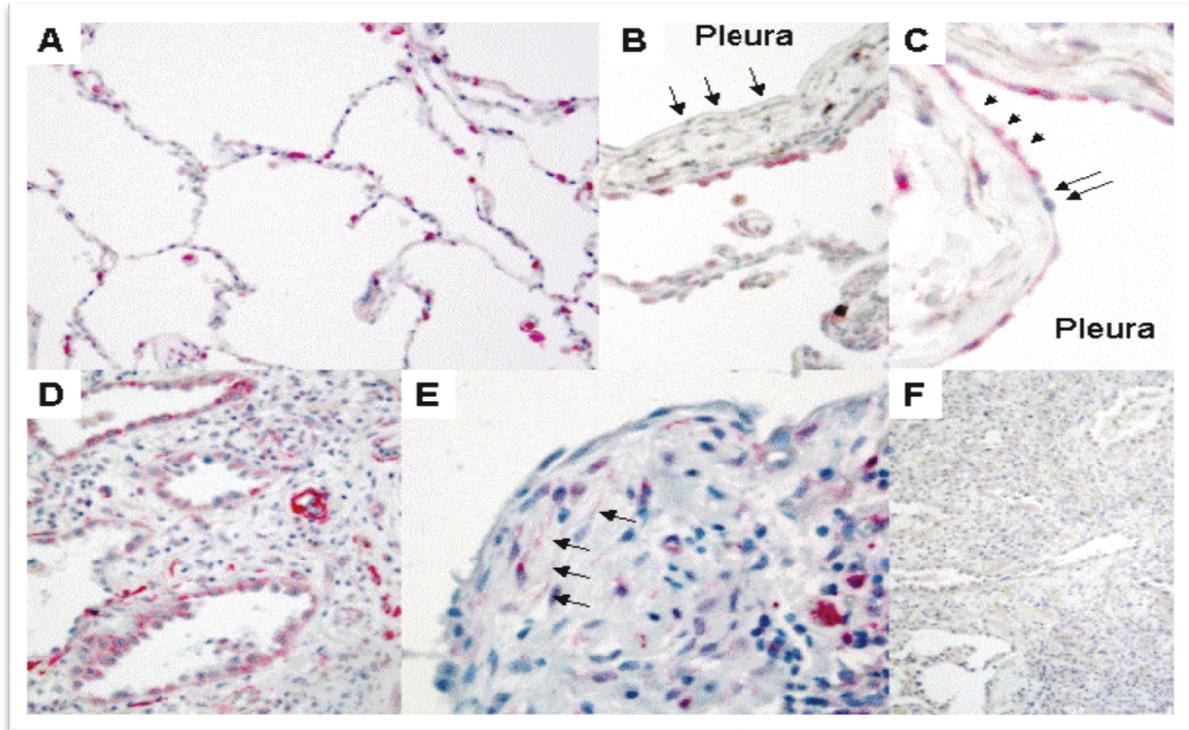
**A)** Les cellules mésothéliales secrètent FGF9 qui se lie aux récepteurs FGFR1C et FGFR2C localisés dans le mésenchyme et qui régule la prolifération mésenchymateuse ainsi que l'expression de *Wnt2a*. (b) La voie de signalisation  $\beta$  catenine au niveau du mésenchyme est nécessaire pour l'expression mésenchymateuse des FGFR et donc l'action de FGF9 (c) La voie de signalisation des FGFR régule la prolifération mésenchymateuse sous la dépendance de la voie WNT/ $\beta$ -catenine. En l'absence d'expression mésenchymateuse des FGFR, la voie WNT/ $\beta$ -catenine ne peut induire la prolifération mésenchymateuse. (d) *Wnt7b*, est exprimé par l'épithélium bronchique et régule l'expression mésenchymateuse de  $\beta$ -catenine. (e) FGF9 régule la ramification bronchique par un effet autocrine conduisant à l'activation des FGFR exprimés par l'épithélium. (f) BMP4, est exprimé par l'épithélium. Il exerce une action autocrine en régulant la prolifération épithéliale agissant sur le récepteur BMPR1A (ALK3). (g) La signalisation de la voie FGF- WNT/ $\beta$ -catenine est inhibée par l'expression de *Noggin*

**(B)** En cas d'absence de *Fgf9* la boucle FGF-Wnt/ $\beta$ -catenine est dérégulée (gris) et seulement la signalisation induite par *Wnt7b* persiste. (h) En l'absence de *Fgf9*, la catenine est toujours exprimé mais l'expression de *Fgfr1* and *Fgfr2* expression est inhibée (i) La perte de la signalisation FGF-Wnt/ $\beta$ -catenine induit une diminution de l'expression de *Noggin* dans le mésenchyme et au niveau épithélial. Ceci a pour conséquence une diminution de la prolifération des cellules épithéliales. E, épithélium ; M, mésenchyme.

D'après White et al.(255)

### 4.3 Implication de FGF9 dans la FPI

Plusieurs travaux ont rapporté que FGF9 était exprimé dans le poumon de patient contrôle et atteint de FPI, (Figure 15), (256), (257). Notre équipe a établi que FGF9 avait des propriétés anti-fibrosantes et influençait plusieurs fonctions cellulaires impliquées dans la fibrogénèse (256). Notre groupe a montré qu'il était capable de prévenir la différenciation myofibroblastique de fibroblastes pulmonaires primaires humains (contrôle et FPI) induite par le TGF $\beta$ . D'autre part, FGF9 diminuait l'apoptose des fibroblastes primaires issus de poumon contrôle. Enfin FGF9 augmentait la migration des fibroblastes pulmonaires et modulait l'activité de métalloprotéinase. L'utilisation d'un ARN interférence ciblant l'expression de FGFR3 a permis de montrer que ces effets étaient médiés par ce récepteur.



**Figure 16** : Expression de FGF9 dans le poumon normal et fibreux

Le FGF-9 est détecté par immunohistochimie dans le poumon normal (A, B) et dans le poumon provenant de patients atteints de FPI (C-F). Dans le poumon normal, les macrophages alvéolaires et les pneumocytes de type II expriment le FGF-9 tandis que les cellules mésothéliales ne sont pas marquées (Panneau B, flèche). Dans le poumon de FPI, une partie des cellules mésothéliales est marquée (panneau C, flèche). Dans les zones de fibrose, les cellules épithéliales alvéolaires hyperplasiques sont intensément marquées tout comme les cellules endothéliales (panneau D) tandis que les cellules épithéliales alvéolaires ne sont pas marquées en regard d'un foyer fibroblastique (panneau E). Par ailleurs, dans les foyers fibroblastiques certains fibroblastes étaient marqués (panneau E, flèches). Aucun marquage n'est retrouvé sur les coupes incubées avec une IgG de chèvre (contrôle négatif, panneau F).

Données issues du laboratoire

## 5. Le Fibroblast Growth Factor 19

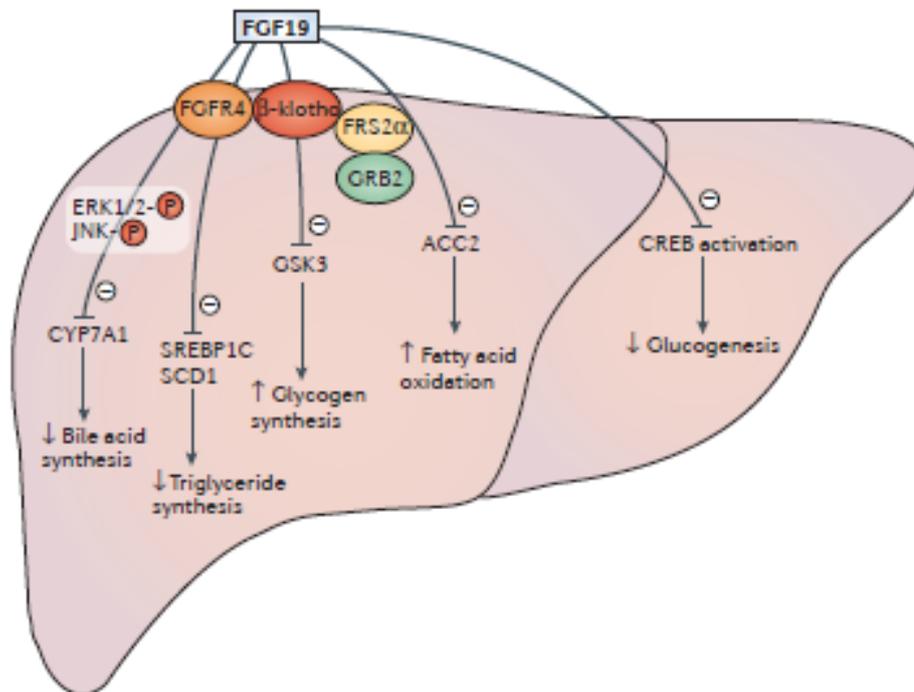
La sous famille FGF19 regroupe le FGF19 (dont l'orthologue murin est le FGF15), le FGF21 et le FGF23. Ce sont les seuls FGF ayant une action endocrine en partie liée à leur faible affinité pour l'héparane sulfate (211). Leur action est médiée par les FGFR en présence de co récepteurs de type Klotho. FGF19/15 et FGF21 requièrent la présence de  $\beta$  klotho et  $\alpha$  Klotho est nécessaire à FGF23 pour la liaison à son récepteur. Il a été montré, *in vitro*, que FGF19 se lie préférentiellement à FGFR4 mais qu'il peut également activer les isoformes c de FGFR1, 2, 3. FGF21 se lie aux isoformes c de FGFR1 et de FGFR3. Enfin FGF23 se lie en présence d' $\alpha$  Klotho à FGFR1c, FGFR3c et FGFR4.

Ces FGFS jouent un rôle central dans la communication endocrine entre les différents organes et dans l'homéostasie de l'organisme. En effet, ils sont impliqués dans la modulation du métabolisme des acides biliaires, du glucose, des lipides et du calcium et de la vitamine D. De fait, des concentrations plasmatiques anormales de ces FGF sont associées à de nombreuses pathologies telles que le diabète, l'obésité, les pathologies cardiovasculaires ou néoplasiques(258), (259).

### 5.1. Découverte et rôle lors de l'embryogénèse

FGF19 a initialement été découvert dans le cadre de l'identification de nouveaux FGFs dans le cerveau fœtal (260). Alors que la plupart des Fgfs sont très conservés entre l'homme et les rongeurs, FGF19 ne partage que 50% des acides aminés avec Fgf15, son orthologue murin (261). Malgré ces différences, l'expression tissulaire est identique et localisée au niveau du cerveau fœtal et de l'iléon et ils produisent des effets métaboliques similaires chez l'homme et la souris (262). Lors du développement embryonnaire, FGF19 est impliqué dans le maintien à l'état indifférencié du neuroépithélium. Les embryons de souris déficientes pour Fgf15 présentent une différenciation et une prolifération des cellules progénitrices neuronales conduisant à des anomalies de l'épithélium neuronal (261).

Dans le foie, FGF19 est le ligand préférentiel de FGFR4, en présence du co récepteur  $\beta$  Klotho. La formation de ce complexe protéique va induire une cascade de signalisation impliquant le recrutement de protéines adaptatrices comme le FGF receptor substrate 2 $\alpha$  (FRS2 $\alpha$ ) et les protéines Growth Factor receptor-bound protein 2 (GRB2) (258). Ce complexe joue un rôle dans le métabolisme glucidique, lipidique (Figure 16)



**Figure 17** : Action de FGF19 au niveau hépatique

Fibroblast growth factor 19 (FGF19) se lie préférentiellement au récepteur FGFR4 et au co récepteur  $\beta$ -klotho pour former un complexe qui va déclencher une cascade de signalisation induisant le recrutement de protéines adaptatrices cytoplasmiques comme fibroblast growth factor receptor substrate 2 $\alpha$  (FRS2 $\alpha$ ) et growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2). Ce complexe FGFR4– $\beta$ -klotho –FGF19 joue un rôle central dans le métabolisme des acides biliaires, du glucose et des lipides. En inhibant la cholestérol-7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1), et le sterol regulatory element-binding protein 1C (SREBP1C) et l'activation de la cAMP-response element-binding protein (CREB), FGF19 inhibe la synthèse des acides biliaires, de triglycérides et de glucose. FGF19 est capable d'induire la synthèse de glycogène et induire l'oxydation des acides gras en inhibant les enzymes glycogen synthase kinase 3 (GSK3) et acetyl-CoA carboxylase 2 (ACC2). ERK, extracellular signal-regulated kinase; JNK, JUN N-terminal kinase; SCD1; stearoyl-CoA desaturase 1.

D'après Degirolamo et al. (258)

## **5.2 Rôle physiologique de FGF19**

### **5.2.1 FGF19 et la régulation du métabolisme des acides biliaires**

Les acides biliaires sont des molécules amphipatiques (à la fois hydrophobes et hydrophile) relarguées en post prandial de la vésicule biliaire vers l'intestin grêle permettant de solubiliser les lipides ingérés (263). Après avoir traversé l'intestin, 95% des acides biliaires sont réabsorbés au niveau de l'iléon et retournent dans la vésicule biliaire. Du fait de leur toxicité, la régulation de leur synthèse est finement régulée. Le principal facteur de transcription contrôlant leur synthèse est le farnésoid X récepteur (FXR) qui appartient à la super famille des récepteurs nucléaires. Ce récepteur est activé par les acides biliaires conduisant à la synthèse de FGF19/15 par les entérocytes. FGF19/15 va ensuite se fixer FGFR4 en présence du co récepteur  $\beta$ klotho au niveau hépatique. La liaison ligand récepteur conduit à réprimer l'expression du gène codant pour la cholestérol 7 hydroxylase (CYP1A7), première enzyme indispensable au métabolisme des acides biliaires (264). En conséquence, les souris déficientes pour Fgf15, Fgfr4 ou  $\beta$  klotho présentent une forte augmentation de la sécrétion des acides biliaires, associée à une augmentation de l'expression et de l'activité de CYP1A7. L'administration de FGF19 corrige ces phénomènes chez les souris déficientes pour Fgf15 mais pas chez les souris déficientes pour FGFR4 ou  $\beta$  klotho.

### **5.2.2 FGF19 et la régulation de l'homéostasie énergétique**

L'utilisation de souris transgéniques a également permis d'identifier l'implication de FGF19 dans l'homéostasie énergétique. En effet, une surexpression plasmatique de FGF19 chez des souris transgéniques était associée à une diminution pondérale, une diminution de la masse grasse malgré un régime hypercalorique (265). De plus, la glycémie, la cholestérolémie et la triglycéridémie étaient normalisées chez ces souris. Les souris déficientes pour Fgfr4 présentaient un phénotype opposé associant syndrome métabolique, intolérance glucidique, hypercholestérolémie et hypertriglycéridémie (266). De façon paradoxale, ces souris obèses Fgfr4 déficientes présentaient une diminution du contenu hépatique en triglycérides et en cholestérol. L'administration de FGF19 à ces souris soumises à un

régime hypercalorique induisait une perte de poids et permettait de normaliser la triglycéridémie et la cholestérolémie mais pas la glycémie ou l'insulinorésistance. Ces phénomènes s'expliquaient par un hypercatabolisme lié à une augmentation de l'oxydation des acides gras au niveau hépatique via l'inhibition de deux enzymes l'acetyl co A carboxylase et la steaoryl-CoA desaturase (265), (267).

### **5.2.3 FGF19 et le métabolisme glucidique**

FGF19 régule le métabolisme glucidique via plusieurs organes, le tissu adipeux et le foie. En effet, bien que FGFR4 soit le ligand préférentiel de FGF19, ce dernier peut également se lier à FGFR1c exprimé au niveau du tissu adipeux. Ce récepteur n'est pas au niveau hépatique. La stimulation d'adipocyte par du FGF19 est associée à une augmentation de la captation de glucose par ces cellules en présence de B klotho.

Par ailleurs, les souris déficientes pour Fgf15 présentent une diminution de plus de 50% du contenu hépatique en glycogène. A l'inverse l'administration de FGF19 à des souris est associée à une augmentation la synthèse hépatique de glycogène en induisant la phosphorylation et l'activation du glycogène synthase 3 $\alpha$  et 3 $\beta$ .

En plus de ces mécanismes plusieurs travaux ont démontré que FGF19 inhibait la néoglucogénèse. En effet les souris Fgf15 et soumises à un régime hyperglycémique présentaient un maintien de la néoglucogénèse de façon inadapté. Ce phénomène est lié à l'inhibition du facteur de transcription CREB, un régulateur central de PPARgamma impliqués dans la néoglucogénèse.

L'effet de FGF19 sur le métabolisme glucidique ne semble pas être régulé par FGFR4. En effet, l'administration de FGF19 à des souris FGFR4 KO permet de normaliser la glycémie capillaire. Différents travaux ont identifié FGFR1c comme le récepteur impliqué dans le métabolisme glucidique (268).

### **5.2.4 FGF19 et la prolifération cellulaire**

La liaison FGF19/FGFR4 induit la voie FGF19 induit la prolifération des hépatocytes via l'activation du récepteur FGFR4 en présence du co récepteur  $\beta$  klotho. Cette liaison induit la formation d'un complexe agglomérant les protéines FGF receptor substrate 2 (FRS2) et growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2),

conduisant à l'activation des voies Ras–Raf –ERK1/2MAPK and PI3K–Akt impliquées dans la prolifération cellulaire et dans l'inhibition de l'apoptose.

L'axe FGFR4/FGF19 joue un rôle central dans l'oncogenèse du carcinome hépatocellulaire (269), (266). En vue de développer des thérapeutiques ciblant l'obésité ou le diabète, plusieurs travaux ont essayé d'identifier les mécanismes sous-jacents à l'effet mitogénique de FGF19. En partant de travaux basés sur FGF21, une équipe a réalisé une mutagénèse combinée de 5 acides aminés localisés dans la partie N terminale de FG19 et du domaine de liaison à l'héparane sulfate (270). In vitro, ce variant de FGF19 tronqué appelé FGF19 CTD pouvait activer le récepteur FGFR1c mais pas le FGFR4. Les souris traitées avec le FGF19CTD ne présentaient pas de prolifération hépatocytaire ni d'intolérance glucidique mais il existait en revanche des perturbations du métabolisme des acides biliaires (270). D'autres variants ont par la suite été développés et notamment le variant NGM 282. Ce dernier permet d'activer sélectivement le récepteur FGFR4 mais sans induire de la prolifération hépatocytaire (271)°.

### **5.3. Implication de FGF19 en pathologie**

#### **5.3.1 FGF19 et cancer**

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le 6ème cancer le plus fréquent dans le monde et associé à une forte mortalité (272). Il peut être d'origine alcoolique, virale ou métabolique. Une surexpression de FGF19 chez la souris est associée au développement d'un carcinome hépatocellulaire, à l'âge de 10, 12 mois (273). L'administration d'un anticorps neutralisant le FGF19 prévient le développement tumoral (274). Cette surexpression a également été identifiée dans les tumeurs de patients atteints de CHC. Dans des modèles de xénogreffes murines, l'utilisation d'anticorps neutralisant FGF19 permettait de bloquer la progression tumorale (269). L'expression de FGFR4 est également augmentée au cours du CHC (275) et il est directement impliqué dans les effets pro oncogéniques de FGF19 (276). De fait plusieurs essais thérapeutiques de phase I ou II sont actuellement en cours afin d'évaluer l'efficacité d'inhibiteur spécifique de FGFR4 dans le traitement du CHC (272).

La surexpression de FGF19 a été objectivée dans d'autres pathologies comme le cancer du sein ou du poumon. Ainsi une forte expression tumorale de FGF19 est un facteur de mauvais pronostic, associé à des tumeurs agressives et rapidement progressives. L'inhibition génétique ou pharmacologique dans des modèles de xénogreffe murine est associé à une diminution de la progression tumorale. Enfin, des données récentes suggèrent son implication dans le carcinome épidermoïde, type histologique retrouvé dans les cancers pulmonaires et dans les cancers de la sphère ORL (277), (278).

### **5.3.2 FGF19 et syndrome métabolique**

Chez l'homme, le pic de FGF19 survient 2 heures après un repas, ses concentrations sont inversement proportionnelles à celles de la glycémie sont augmenté chez les patients présentant un syndrome métabolique. Le développement de variants de FGF19 dépourvus d'activité mitogénique a ouvert la voie l'utilisation de ces derniers comme cible thérapeutique du syndrome métabolique. Ainsi l'administration du variant M70 est associé à une perte de poids chez les souris obèses sans induire de carcinome hépatocellulaire (279). Ces données précliniques ont récemment été validées au cours d'un essai thérapeutique contre placebo testant le variant M70 (NGM282) chez des patients atteints de stéato-hépatite non alcoolique.(NASH) (280).La NASH est une complication du syndrome métabolique liée à une stéatose hépatique conduisant à une inflammation puis à une fibrose hépatique. Dans cette étude, les patients ayant reçu le composé NGM282 pendant 52 semaines présentaient une diminution significative de la stéatose hépatique avec un bon profil de tolérance. D'autres études sont actuellement en cours sur cette molécule dans le cadre du traitement du diabète de type II, de la cirrhose biliaire primitive. D'autres variants de FGF19 sont également en cours d'évaluation comme NGM-313 qui est un agoniste spécifique de FGFR1c/ $\beta$  Klotho dans le cadre du traitement de l'obésité.

### 5.3.3 Implication de FGF19 dans la fibrogénèse

Au cours de la dernière décennie, de nombreuses études ont focalisé leur attention sur l'implication des FGFs paracrines dans la Fibrose pulmonaire idiopathique. Ce n'est que récemment que des travaux portant sur l'implication des FGFs endocrine le FGF21 et le FGF23 ont été publiés (244), (245).

Concernant FGF19, alors que son action n'a jamais été étudiée au niveau pulmonaire, plusieurs travaux ont démontré son action anti fibrosante au niveau hépatique. Tout d'abord, la diminution de FGF19 chez l'homme est associée au développement d'une cirrhose hépatique (281). La surexpression de FGF19 est associée à une diminution des lésions de fibrose hépatique et à la diminution de l'apoptose des hépatocytes chez la souris après exposition au tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>) (282), (283). Les mécanismes sous-jacents à cet effet protecteur n'ont à ce jour pas été élucidés, l'effet anti fibrosant de FGF19 serait associé à une diminution du stress du RE et à une diminution de facteur pro apoptotique. Le récepteur FGFR4 est impliqué dans les effets protecteurs de FGF19. Les souris déficientes pour FGFR4 présentaient une augmentation des lésions de fibrose après exposition au CCl<sub>4</sub> (284). Enfin l'utilisation d'un variants de FGF19, le NGM282 était associée une diminution significative des biomarqueurs de fibrose hépatique chez des patients atteints de cirrhose en lien avec une NASH (285).

## Résumé de la problématique et objectifs

---

La fibrose pulmonaire idiopathique est caractérisée par une réactivation aberrante des voies impliquées dans le développement pulmonaire, dont la famille des Fibroblast Growth Factors. Cependant le rôle de plusieurs membres de cette famille reste à définir ou à préciser.

Dans une étude préliminaire issue du laboratoire, il a été montré, *in vitro*, que FGF9 prévenait la différenciation myofibroblastique induite par le TGF $\beta$  et leur prolifération mais augmentait leur migration. Alors qu'il est exprimé au niveau pleural son action sur les cellules mésothéliales restait à ce jour inconnu.

Le FGF19 est un FGF endocrine impliqué dans de nombreuses voies métaboliques et qui a des propriétés anti fibrosantes au niveau hépatique. Son expression et son action au niveau pulmonaire n'avaient jusqu'alors jamais été étudiées.

Dans ce projet, nos objectifs principaux étaient donc de :

- Caractériser l'expression pleurale de FGF9 et l'expression de FGF19 chez des patients atteints de FPI et chez des patients contrôles
- D'évaluer l'effet d'une surexpression pleurale de FGF9 ou pulmonaire de FGF19 dans des modèles expérimentaux de fibrose pulmonaire murine
- De déterminer, *in vitro*, les mécanismes des effets observés *in vivo en travaillant sur des* fibroblastes pulmonaires primaires des cellules épithéliales ou des cellules mésothéliales murines.

Ce projet de recherche reposait sur des approches intégrées faisant appel à l'utilisation de matériel humain issu de patients contrôles ou atteints de FPI (Plasma, biopsie pulmonaire, pièce opératoire, LBA) obtenus via la collaboration avec les différents services hospitaliers : le Service de Pneumologie A, le Service de Chirurgie vasculaire et thoracique et au Département d'Anatomo-pathologie de l'Hôpital Xavier Bichat. Des collaborations, nationales et internationales, nous ont permis d'acquérir des adénovirus recombinés nécessaires à notre modèle expérimental et de surexpression.



# **FGF9 prévient la fibrose pleurale induite par l'injection d'un adénovirus chez la souris**

Justet et al. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2017 Nov 1;313(5):L781-L795.

## **CONTEXTE ET JUSTIFICATION DE LA RECHERCHE**

Les cellules mésothéliales forment une monocouche cellulaire couvrant la surface de la plèvre pariétale et viscérale. Ces cellules jouent un rôle central dans l'homéostasie pleurale après une agression. Plusieurs études ont démontré leur implication dans la FPI. Elles pourraient jouer un rôle à l'initiation de la maladie qui débute dans les zones sous pleurales. Ces cellules pourraient également être impliquées dans la progression de la fibrose via la capacité de ces cellules à se différencier en myofibroblastes et à migrer dans le parenchyme pulmonaire. Au cours du développement pulmonaire, FGF9 est exprimé par l'épithélium et le mesothélium et contrôle la ramification bronchique et le développement du mésenchyme pulmonaire. Un travail réalisé au sein de l'unité a montré que FGF9 avait des propriétés anti apoptotiques, pro migratrices et qu'il prévenait la différenciation des fibroblastes pulmonaires (contrôle et FPI) en myofibroblaste.

Dans ce travail, nous avons :

- caractérisé l'expression mésothéliale de FGF9 et des FGFR dans le poumon normal humain et murin et dans le poumon de patients atteints de FPI
- surexprimé du FGF9 en injectant un adénovirus recombiné dans la cavité pleurale de souris et nous avons déterminé l'effet de cette surexpression au niveau pleural.
- Nous avons confirmé l'effet de FGF9 sur des cellules mésothéliales, *in vitro*, et déterminé le récepteur impliqué

## **RESUME DES PRINCIPAUX RESULTATS**

### **FGF9 est réexprimé par les cellules mésothéliales au cours de la FPI**

Nous avons tout d'abord examiné l'expression pleurale de FGF9 et des chez des patients contrôles et atteints de FPI par immunohistochimie. Il existait une forte expression de FGF9 au niveau mésothélial dans le poumon fibreux, non retrouvée dans le poumon témoin. Par ailleurs, seuls FGFR1 et FGFR3 étaient détectés au niveau pleural dans les deux populations.

Chez la souris, à l'état basal, quelques cellules mésothéliales exprimaient FGF9, et FGFR3 était le seul récepteur exprimé au niveau pleural.

### **L'injection d'un adénovirus contrôle induit l'expression de Fgf9 par les cellules mésothéliales**

Nous avons ensuite réalisé une injection intra pleurale à des souris C57Bl6, mâles de 8 semaines d'un adénovirus contrôle (AdCont) ou d'un adénovirus recombiné FGF9 (AdFGF9). Ces deux virus ne différaient que par l'insertion du gène FGF9. Dans le groupe de souris AdCont, le FGF9 humain n'était pas détecté dans la cavité pleurale des souris. En revanche il existait une augmentation de l'expression du Fgf9 murin qui était maximale 5 jours après l'injection et qui persistait jusqu' à 14 jours après celle-ci.

Dans le groupe de souris injectées avec AdFGF9, la concentration pleurale de FGF9 était deux fois plus élevée que celle mesurée dans le groupe contrôle. Par immunohistochimie, nous avons identifié les cellules mésothéliales comme étant la principale source de cette protéine.

### **La surexpression de FGF9 prévient le remodelage pleural induit par l'adénovirus contrôle et inhibe l'accumulation de myofibroblastes**

Dans le groupe AdCont, il existait un épaississement et un remodelage pleural débutant 5 jours après l'injection et maximal 14 jours après. Ces anomalies morphologiques s'accompagnaient d'une augmentation du nombre de cellules pleurales exprimant des marqueurs de myofibroblastes ( $\alpha$  SMA et la vimentine), 14 jours après l'injection.

Comparativement, il existait dans le groupe AdFGF9 une diminution significative de l'épaisseur pleurale, du contenu en protéines de la matrice extra cellulaire, des marqueurs myofibroblastique ainsi qu'une diminution des médiateurs pro fibrosants tels que *Ctgf* ou *Pai-1*.

### **FGF9 prévenait partiellement la différenciation des cellules mésothéliales induite par le TGFB et son action est médiée par FGFR3**

Ces données ont été confirmées, *in vitro*, sur des lignées de cellules mésothéliales murines, les MLE15. *In vitro*, la stimulation des cellules mésothéliales par du FGF9 (20 ng/mL) prévenait partiellement la différenciation myofibroblastique induite par le TGF (1 ng/ml). La stimulation avec du FGF19 était associé à une diminution de l'expression protéique du Collagène et d'ACTA 2 mais ne permettait pas de rétablir l'expression du marqueur de cellules mésothéliales, WT-1. De plus le FGF9 diminuait la migration des cellules mésothéliales. En utilisant la technologie Crispr Cas-9 nous avons montré que ces effets dépendaient en partie du récepteur FGFR3.

**MANUSCRIT DE L'ARTICLE**

RESEARCH ARTICLE | *Translational Research in Acute Lung Injury and Pulmonary Fibrosis*

FGF9 prevents pleural fibrosis induced by intrapleural adenovirus injection in mice

Aurélien Justet,<sup>1,2,3,4,5\*</sup> Audrey Joannes,<sup>1,2,3,4\*</sup> Valérie Besnard,<sup>1,2,3,4</sup> Joëlle Marchal-Sommé,<sup>1,2,3,4</sup> Madeleine Jaillet,<sup>1,2,3,4</sup> Philippe Bonniaud,<sup>6</sup> Jean Michel Sallenave,<sup>1,2,3,4</sup> Brigitte Solhonne,<sup>1,2,3,4</sup> Yves Castier,<sup>1,2,3,4,7</sup> Pierre Mordant,<sup>1,2,3,4,7</sup> Hervé Mal,<sup>1,2,3,4,8</sup> Aurélie Cazes,<sup>1,2,3,4,9</sup> Raphaël Borie,<sup>1,2,3,4,5</sup> Arnaud A. Mailleux,<sup>1,2,3,4</sup> and Bruno Crestani<sup>1,2,3,4,5</sup>

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1152, Paris, France; <sup>2</sup>Département Hospitalo-Universitaire Fibrosis Inflammation and Remodeling (DHU FIRE), Paris, France; <sup>3</sup>Labex Inflammex, Paris, France; <sup>4</sup>Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; <sup>5</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bichat, Service de Pneumologie A, Paris, France; <sup>6</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U866, Université de Bourgogne, Dijon, France; <sup>7</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bichat, Service de Chirurgie Thoracique et Vasculaire, Paris, France; <sup>8</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bichat, Service de Pneumologie et Transplantation, Paris, France; and <sup>9</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bichat, Département d'Anatomie Pathologique, Paris, France

Submitted 14 November 2016; accepted in final form 10 July 2017

Justet A, Joannes A, Besnard V, Marchal-Sommé J, Jaillet M, Bonniaud P, Sallenave JM, Solhonne B, Castier Y, Mordant P, Mal H, Cazes A, Borie R, Mailleux AA, Crestani B. FGF9 prevents pleural fibrosis induced by intrapleural adenovirus injection in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 313: L781–L795, 2017. First published July 20, 2017; doi:10.1152/ajplung.00508.2016.—Fibroblast growth factor 9 (FGF9) is necessary for fetal lung development and is expressed by epithelium and mesothelium. We evaluated the role of FGF9 overexpression on adenoviral-induced pleural injury in vivo and determined the biological effects of FGF9 on mesothelial cells in vitro. We assessed the expression of FGF9 and FGF receptors by mesothelial cells in both human and mouse lungs. Intrapleural injection of an adenovirus expressing human FGF9 (AdFGF9) or a control adenovirus (AdCont) was performed. Mice were euthanized at days 3, 5, and 14. Expression of FGF9 and markers of inflammation and myofibroblastic differentiation was studied by qPCR and immunohistochemistry. In vitro, rat mesothelial cells were stimulated with FGF9 (20 ng/ml), and we assessed its effect on proliferation, survival, migration, and differentiation. FGF9 was expressed by mesothelial cells in human idiopathic pulmonary fibrosis. FGF receptors, mainly FGFR3, were expressed by mesothelial cells in vivo in humans and mice. AdCont instillation induced diffuse pleural thickening appearing at day 5, maximal at day 14. The altered pleura cells strongly expressed  $\alpha$ -smooth muscle actin and collagen. AdFGF9 injection induced maximal FGF9 expression at day 5 that lasted until day 14. FGF9 overexpression prevented pleural thickening, collagen and fibronectin accumulation, and myofibroblastic differentiation of mesothelial cells. In vitro, FGF9 decreased mesothelial cell migration and inhibited the differentiating effect of transforming growth factor- $\beta$ 1. We conclude that FGF9 has a potential antifibrotic effect on mesothelial cells.

fibroblast growth factor 9; mesothelial cells; differentiation

MESOTHELIAL CELLS FORM a monolayer, known as the mesothelium, that lines the pleural cavity with visceral and parietal surfaces covering the lung and the thoracic wall, respectively (2). Mesothelial cells play critical roles in the maintenance of pleural homeostasis in response to injury, inflammation, and immunoregulation (36). Mesothelial cells are also central cells in pleural repair, secreting inflammatory mediators, chemokines, growth factors, and extracellular matrix components (36). During fetal lung development, mesothelial cells interact with other cell types to regulate the harmonious development of lung structures (55).

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive, irreversible, and lethal lung disease of unknown etiology (3, 26). IPF is characterized by excessive extracellular matrix deposition and leads to severe restrictive lung disease (14). IPF begins in the subpleural region and then extends centrally. Three-dimensional morphometric analysis of the IPF lung suggests that fibroblast foci are the leading edge of a complex fibroblast reticulum that is highly interconnected and extends from the pleura into the underlying parenchyma (8). Several studies suggest that the mesothelial cells may be involved in IPF pathogenesis (11, 34). Mesothelial cells can be induced to undergo mesothelial-to-mesenchymal transition and then differentiate into myofibroblasts (7, 37, 62). Decolgne et al. previously developed an experimental model of pleural fibrosis induced by adenoviral transfer of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) in mesothelial cells (11). The authors observed the development of a progressive pleural fibrosis that extended into the lung parenchyma while mesothelial cells underwent mesothelial-to-mesenchymal transition. Similar findings were observed after the intrapleural injection of bleomycin combined with carbon particles in mice (12). This phenotypic change was also observed in vitro with mesothelial cells treated with recombinant TGF- $\beta$  (37, 41). More recent mouse models of fibrogenic lung injury have also supported this observation by showing that mesothelial cells invade the lung parenchyma and

\* A. Justet and A. Joannes contributed equally to this work.  
Address for reprint requests and other correspondence: B. Crestani, Service de Pneumologie A, Hôpital Bichat, 46 rue Henri Huchard, 75018 Paris, France (e-mail: bruno.crestani@aphp.fr).

adopt a myofibroblastic phenotype after intratracheal TGF- $\beta$ 1 administration, leading to fibrosis (62). Most importantly, immunohistochemical analysis of human IPF lung sections showed Wilms tumor-1 (WT-1)-positive mesothelial cells in the pleura and lung parenchyma (62). Collectively, these studies indicate potential contributions of pleural mesothelial cells as a source of myofibroblast in IPF.

IPF is characterized by the reactivation of key developmental pathways involved in lung development such as the Gli/hedgehog pathway (5, 33), the canonical/noncanonical WNT pathway (22, 27), or the fibroblast growth factor (FGF)/FGF receptor (FGFR) pathway (20, 24, 48). The FGF pathway comprises 22 members acting on five FGF receptors (FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, and FGFR5) (39). Alternative splicing in the extracellular IgIII loop generates either a IIIb isoform (preferentially expressed by epithelial cells) or a IIIc isoform (preferentially expressed by mesenchymal cells) (16), which differ in their ligand-binding affinity and tissue distribution. FGF/FGFR signaling is essential for all stages of lung morphogenesis and actively contributes to epithelium-mesenchymal interactions (43, 54). In particular, FGF9 has an important role in lung ontogenesis (56). Interestingly, FGF9 is expressed in mesothelium and epithelium and controls epithelial branching and mesenchymal proliferation (58), mainly during the pseudoglandular stage of embryonic lung development. Mice homozygous for a targeted disruption of *Fgf9* show lung hypoplasia and early postnatal death (7). *Fgf9*<sup>-/-</sup> lungs present reduced mesenchyme and decreased airways branching (7).

Recently, we showed that FGF9 had anti-apoptotic and promitogenic properties on human lung fibroblast and maintained fibroblasts in an undifferentiated state. These effects were partially driven by FGFR3 (24). Expression of FGF9 by mesothelial cells and the biological effect of FGF9 on mesothelial cells have never been addressed.

In the current study, we asked whether FGF9 expression by mesothelial cells could participate in the pleural repair process. We determined the pattern of expression of FGF9 and FGFR by mesothelial cells in the normal human and mouse lungs as well as in IPF lung. We next overexpressed human FGF9 in vivo in mesothelial cells, using a recombinant adenovirus injected in the pleural cavity, and we determined the effect of FGF9 in the mesothelial repair process in vivo. Finally, we examined the effect of FGF9 on mesothelial cell properties in vitro. Our results demonstrate for the first time that FGF9 has potent anti-fibrotic effects in the pleura in vivo and inhibits differentiation and migration in vitro.

#### MATERIALS AND METHODS

**Human lung samples.** IPF lung samples were obtained from patients undergoing open lung biopsy or at the time of lung transplantation ( $n = 39$ ; median age, 59.3 yr; range, 50.7–69.9 yr). IPF was diagnosed according to American Thoracic Society/European Respiratory Society/Japanese Respiratory Society/Latin American Thoracic Association criteria, including histopathological features of usual interstitial pneumonia (9, 44). Lung samples obtained after cancer surgery, away from the tumor, were used as controls; normalcy of control lungs was verified histologically ( $n = 36$  patients; median age, 62.2 yr; range, 30–82.7 yr). Some of these patients were included in a previous work (24). This study was approved by the local ethics

committee (CPP Ile de France 1, no. 0811760). Written informed consent was obtained from all subjects.

**Recombinant adenovirus.** Recombinant nonreplicative and nonintegrative adenoviruses were obtained from Applied Biological Materials (Teddington, UK). The sequence of control (AdCont) and recombinant (AdFGF-9) adenovirus (BC103978) differs only in the human FGF-9 gene inserted in the recombinant virus. This sequence remains empty in the control adenovirus. The viruses were amplified on HEK293 cells and purified by centrifugation. The final product was desalted, assayed spectrophotometrically, and then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use (32).

**Animal treatment.** C57BL/6N mice from Janvier Laboratories (Le Genest Saint Isle, France) were treated in accordance to the guidelines of the French Ministry of Research. All experiments were approved by the animal ethical committee of Université Paris-Diderot (agreement no. C75-18-01). Adenovirus ( $100\ \mu\text{l}$ ,  $1 \times 10^8$  plaque-forming units/ml) or saline serum was injected in the pleural cavity as described by Decolgne et al. (11). Mice were euthanized 3, 5, 14, and 25 days after adenoviral injection. Lung, pleural lavage and bronchoalveolar lavage (BALF) fluids were collected as previously described (12, 33).

**Morphological analysis.** Hematoxylin-eosin and picrosirius staining was performed to evaluate the morphology of the lung. The slides were scanned using a motorized microscope coupled to Calopix acquisition software (TRIBVN, Châtillon, France). The whole area of each pleural section was manually delineated. The pleural thickness was calculated by dividing the total pleural area by the length of the pleura. A semiquantitative analysis of intrapleural collagen by picrosirius stain was performed as previously published by Charpin et al. (4).

**Immunohistochemistry.** The paraffin-embedded sections were treated as previously described (33). Primary antibodies for immunohistochemistry were anti-FGF9 (clone C-19; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); anti-WT-1 (clone C-19; Santa Cruz Biotechnology); anti-FGFR1 (ab10646), anti-FGFR2 (ab10648), anti-FGFR3 (EPR2305) (ab137084, all Abcam, Cambridge, MA); anti-FGFR4 (HPA027369; Sigma-Aldrich), anti- $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) (clone 1A4; Sigma-Aldrich), anti-vimentin (clone V9; Sigma-Aldrich), anti-collagen I (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL), and anti-fibronectin (ab 2413). To test the specificity of immunostaining, primary antibodies were replaced by an isotype-matched control. For semiquantitative assessment of anti-Ki-67 (Ebio-science, San Diego, CA), the positive cells and the total number of cells (nuclei) were enumerated in the lung, excluding the vessels and bronchi, using Calopix Software (TRIBVN). For the semiquantitative analysis of pleural staining in five IPF patients and five other controls, three of us, including one pathologist (AC) independently quantified the staining (from 0 to 3+). Species source and species cross-reactivity of FGF9 and FGFR antibodies are given in Table 1.

**Cell culture.** Rat lung mesothelial cells (6/4-RM-4 cell line; ATCC-CRL216) were obtained from ATCC (LGC Standards; Molsheim, Scientific, Rochester, NY), supplemented with 15% fetal bovine serum (GIBCO), and grown in DMEM-F-10 (GIBCO). Thermofisher

Table 1. Species source and species cross-reactivity of FGF9 and FGFR antibodies

Antibody	Species Source	Species Reactivity	Isotype	Ref. No.
FGF9	Goat	Mouse, rat, human	IgG	(29)
FGFR1	Rabbit	Mouse, rat, human	IgG	(49)
FGFR2	Rabbit	Mouse, rat, human	IgG	(47)
FGFR3	Rabbit	Human	IgG	(24)
FGFR4	Rabbit	Human	IgG	(42)
WT-1	Rabbit	Human, mouse, rat, avian	IgG	(25)

FGF, fibroblast growth factor; FGFR, fibroblast growth factor receptor; WT-1, Wilms tumor-1.

Table 2. *Taqman gene expression assay*

Gene	Assay ID
<i>FGF9</i>	Hs00181829_m1
$\beta_2m$	Hs00187842_m1
<i>Fgf9</i>	Mm00442795_m1
$\beta_2m$	Mm00437762_m1

RM-4 cells were treated for 48 h with human recombinant FGF9 (20 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MI), in the presence of heparin choay (100  $\mu$ g/ml) because heparin is essential for FGF signaling (45, 57). Heparin alone was used as a control condition.

For immunoblot analysis and mRNA analysis, mesothelial cells were plated in six-well plates for 24 h and then starved in DMEM-F10 with 1% fetal calf serum for 16 h before stimulation. For TGF- $\beta$ 1-induced mesothelial differentiation experiments, serum-starved mesothelial cells were cultured for 1 h with FGF9 (20 ng/ml), and then media was removed and TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml) (R&D Systems) was added for the next 48 h with FGF9 (20 ng/ml).

For cell growth assay, 4/4RM-4 cells were cultured for 48 h with FGF9 (20 ng/ml) in medium containing 1% fetal calf serum. The proliferation rate of fibroblasts was assessed by cell counting and cell viability with the use of a V-Cell counter (Beckman Coulter, Villepinte, France). Cell viability was assessed by Trypan blue exclusion assay.

For FGFR3 knockdown experiments with CRISPR-Cas9 plasmid, cells were transfected at 50–60% confluency in six-well dishes. All transfection experiments were performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen), in accordance with the manufacturer's instructions. To suppress endogenous FGFR3 expression, we used specific CRISPR-Cas9 against FGFR3 from Dharmacon. CRISPR-Cas9 Negative Control plasmid was used as a negative control. Cell population was selected with blasticidin (10  $\mu$ g/ml; Invivogen, Toulouse, France) and treated with FGF9 for 48 h.

**mRNA analysis.** Total mRNA was extracted from mouse right lower lobe lung homogenates and from cultured mesothelial cells; cDNA was obtained by standard techniques as described (2).  $\beta_2$ -

Microglobulin ( $\beta_2m$ ) transcripts were used as an endogenous RNA control. FGF9 and FGFR mRNA were quantified by TaqMan Gene Expression Assays (Life technologies, Saint Aubin, France), and collagen, actine- $\alpha_2$  (Acta2), fibronectin, vimentin, TGF- $\beta$ 1 (Tgfb1), plasminogen activator inhibitor-1 (Pai-1), and connective tissue growth factor (Ctgf) were quantified with SybrGreen real-time PCR master mix (see Tables 2 and 3 for primers) with use of PCR ABI 7500 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA).

**Protein analysis.** Right upper lobe and 6/4RM-4 cells in culture were lysed on ice in RIPA buffer supplemented with protease inhibitor cocktail as described (2). Primary antibodies were anti- $\alpha$ -SMA (clone 1A4; Sigma-Aldrich), anti-collagen I (Southern Biotechnology Associates), anti-phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2; Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>; 197G2, Cell signaling), anti-p44/42 MAPK (ERK1/2; 9101; Cell Signaling), anti-pSTAT3 (TYR<sup>705</sup>, 9131; Cell Signaling); anti-STAT3 (79D7; Cell Signaling), anti-vimentin (Clone V9; Sigma), anti-GAPDH (ab9485; Abcam), anti-WT-1 (ab89901; Abcam), and anti- $\beta$ -tubulin (ab6046; Abcam). Digital images were acquired with a gel imaging system (PXi; Syngene, Cambridge, UK) equipped with a CCD camera. Western blot analysis was quantified with Gene tools software (Syngene).

**FGF9 ELISA.** FGF9 was determined from BALF and pleural fluid supernatants using an ELISA kit (R&D Systems) according to the recommendations of the manufacturer. The detection range of this assay is 62.5–4,000 pg/ml. In preliminary experiments, we observed that this assay detected both human and murine FGF9.

**Modified Boyden chamber migration assay.** Migratory properties of 4/4RM-4 cells were assessed by a modified Boyden chamber assay, with a Transwell permeable support (6.5 mm, 8  $\mu$ m; Corning, Tewksbury, MA) as described (6). FGF9 (20 ng/ml) was placed in the lower compartment. Migration was assessed by counting the number of cells at the lower surface of the filters after a 24-h incubation at 37°C.

**Immunofluorescence for  $\alpha$ -SMA.** Mesothelial cells were cultured on Permax Laboratory-Tek Chamber Slides (Nunc; Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY) as described elsewhere (5).

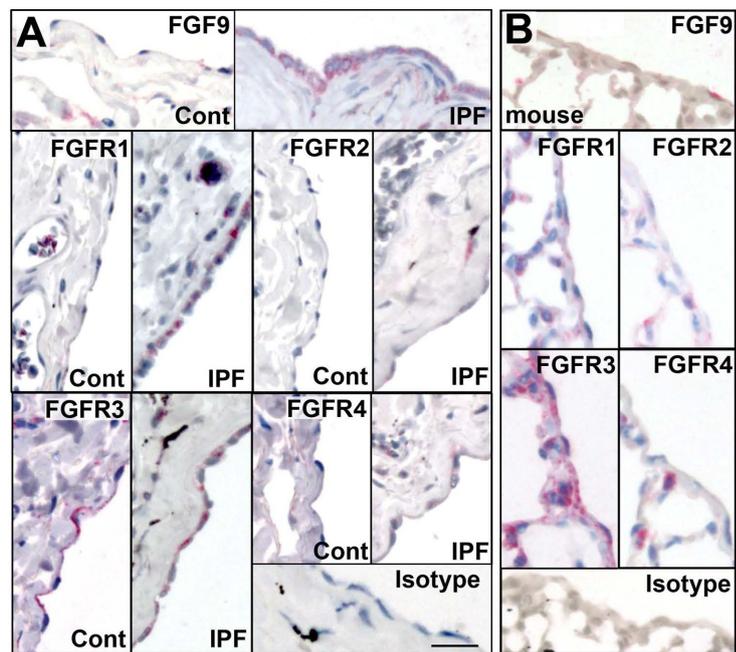
**Statistical analysis.** Data are expressed as means  $\pm$  SD. Statistical analysis used Prism 6 software (GraphPad Software, La Jolla, CA). A

Table 3. *Primer sequences for quantitative PCR*

Mice	Forward	Reverse
<i>ocol-1</i>	5'-GTGACCCCTGGTCTTCTGGT-3'	5'-GTATGTTCCGGCTTCCCATTC-3'
<i>Acta-2</i>	5'-AGTCGCTGTCCAGGAACCCCTGAGA-3T	5'-ATTGTCGCACACCCAGGGCTGTG-3T
$\beta_2m$	5'-GTGACCCCTGGTCTTCTGGT-3'	5'-GTATGTTCCGGCTTCCCATTC-3'
<i>Ctgf</i>	5'-GAGTGTGCACTGCCAAAGAT-3'	5'-GGCAAAGTCGATGGTATTTG-3'
<i>Fibronectin</i>	5'-TGGTGGCCACTAAATACGAA-3'	5'-GGAGGGCTAACATTCTCCAG-3'
<i>Pai-1</i>	5'-TCACAAGTCTTCCGACCAA-3'	5'-AGGCTGTGGAGGAAGACG-3'
<i>Vimentin</i>	5'-ATCAGCTCACCAACGACAA-3'	5'-GCATCTCCTCCTGCAATTT-3'
<i>Tgfb</i>	5'-ACTGATACGCCTGAGTGGCT-3'	5'-CCCTGTATTCCGTCTCCTTG-3'
<i>WT-1</i>	5'-CAGGTCATGCATTCAGCTG-3'	5'-AGGCTTTCCTGCTGAGGA-3'
Rat	Forward	Reverse
<i>Fgfr1IIIb</i>	5'-GGCCTTCCTGATCTCCTGTA-3'	5'-CAGCTTATGCACAGCCATCT-3G
<i>Fgfr1IIIc</i>	5'-CAGCGCATCCATGAAGT-3'	5'-vGGGAGCTCATATTGAGAGCG-3'
<i>Fgfr2IIIb</i>	5II-GTTCAATGTGACGGAGATGG-3'	5'-GACAGTGAGCCAGGCGA-3'
<i>Fgfr2IIIc</i>	5'-CCGAATGAAGACCCAGCA-3'	5'-CTGTTACCTGTCTCCGAGG-3'
<i>Fgfr3IIIb</i>	5'-CGGGTGTCTCAGCTAC-3'	5'-AGACGGCAGAGCGTCACT-3'
<i>Fgfr3IIIc</i>	5II GAAGTCCAAACACCTCTCG-3'	5'-AGGACAGGACCTTCTCCGTA-3'
<i>Fgfr4</i>	5'-TACCCGAGAGGGAAGAC-3'	5'-CAAAGCCAGTGAGCCAGATA-3'
$\alpha_1col-1$	5'-GGAAGAGGGAGAGTACTGG-3'	5'-TTGCAGTAGACCTGTATGGC-3'
$\alpha_2col-1$	5'-GTGGCAGCCAGTTTGAATAC-3'	5'-CAGGTACGCAATGCTGTCT-3'
$\alpha_3col-1$	5'-ACCAGGGTGCAGTTGGTACT-3'	5'-TGGATGTCACCTTGATCCAT-3'
<i>Fibronectin</i>	5'-AATGGAGCGGTTATCTGAC-3'	5'-AATCGCATCTGAAATGACCA-3'
<i>Acta-2</i>	5'-AGGCTGTGCTGCTCCCTAT-3'	5'-GTTGTGAGTCAAGCCATCTC-3'
$\beta_2m$	5'-CTGAATTCACACCCAGGAGA-3'	5'-TTACATGTCTCGTCCAGGT-3'

$\beta_2m$ ,  $\beta_2$ -microglobulin; Ctgf, connective tissue growth factor; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; Tgfb, transforming growth factor- $\beta$ ; col-1, collagen I; Acta2, actine- $\alpha_2$ .

Fig. 1. Expression and localization of human fibroblast growth factor (FGF) 9 and fibroblast growth factor receptor (FGFR) and mice FGFR in the pleura. *A*: immunodetection (red staining) of FGF9, FGFR1, FGFR2, FGFR3, and FGFR4 in human lung pleura. Nuclei were counterstained with hematoxylin (scale bar, 50  $\mu$ m). Semiquantitative analysis of FGF9 and FGFR3 staining is summarized in Table 4. *B*: immunodetection (red staining) of FGF9, FGFR1, FGFR2, FGFR3, and FGFR4 in mice pleura. Nuclei were counterstained with hematoxylin (scale bar, 50  $\mu$ m). IPF, idiopathic pulmonary fibrosis; Cont, control.



Mann Whitney *U*-test was used for comparisons between groups.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

*FGF9* was expressed by mesothelial cells in IPF. We examined FGF9 and FGFR expression by mesothelial cells in human lung samples obtained from control and IPF patients by immunohistochemistry (Fig. 1A), and we performed a semiquantitative analysis of pleural staining in five IPF samples and five controls (Table 4). In IPF, mesothelial cells were strongly positive for FGF9, FGFR3, and FGFR1. In controls, FGF9 was never detected while FGFR3 was detected in 3/5 samples and FGFR1 in 5/5 samples. FGFR2 and FGFR4 were not detected in control and IPF pleural mesothelial cells (Fig. 1A and Table 4).

We then assessed FGF9 and FGFR immunolocalization in normal mouse pleura. Only a few mesothelial cells were positive for FGF9 in the normal pleura (Fig. 1B). With regards

Table 4. Semiquantitative analysis of FGF9 and FGFR3 staining by mesothelial cells

Mesothelial Cell Staining	Controls	IPF
FGF9	Absent	Positive in 5/5 (++++)
FGFR1	Absent	Positive in 5/5 (+++/++++)
FGFR2	Absent	Absent
FGFR3	Positive in 3/5 (+)	Positive in 5/5 (+++/++++)
FGFR4	Absent	Absent

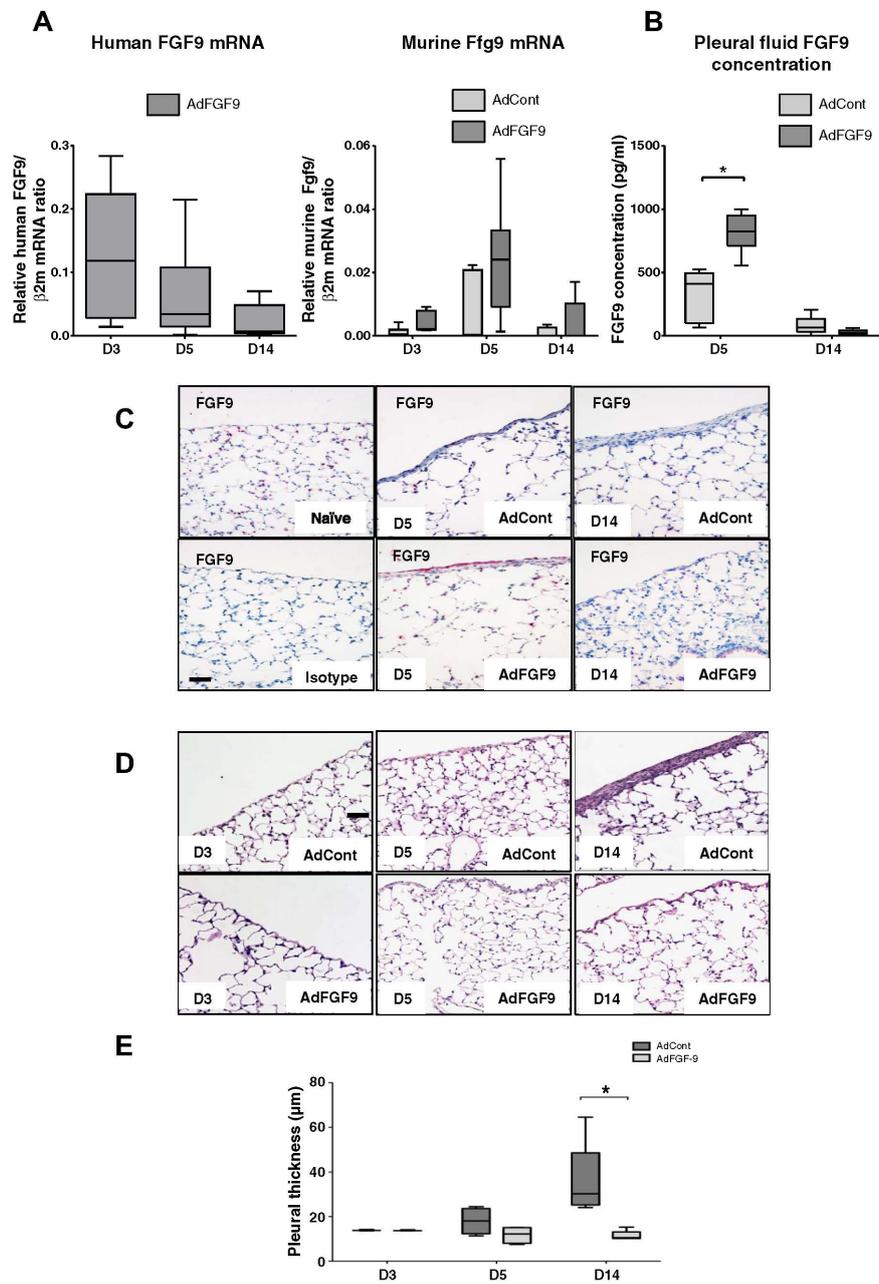
IPF, idiopathic pulmonary fibrosis.

to FGFR, FGFR3 was strongly detected in pleural mesothelial cells, compared with FGFR1 and FGFR2, which were present at a weaker level. Meanwhile, FGFR4 was not detected in mouse mesothelial cells (Fig. 1B).

*FGF9* expression kinetics in vivo after adenoviral infection. Because FGF9 expression was associated with activated mesothelial cells in human lung fibrosis (Fig. 1A), we undertook to investigate the effects of FGF9 overexpression on mouse mesothelial cells in vivo. To characterize and to validate our model of FGF9 overexpression, we first focused on FGF9 expression kinetics at both mRNA and protein levels. Thus, lungs were harvested at various time points after adenovirus administration in the right pleural space. We measured human and murine FGF9 mRNA expression in whole lung homogenates. As expected, human *FGF9* mRNA was not detected after AdCont injection, whereas human *FGF9* mRNA was detected at all time points in the animals receiving AdFGF9 (Fig. 2A). Human *FGF9* mRNA level peaked on day 3 and decreased from days 5 to 14 (Fig. 2A).

Interestingly, adenoviral infection of the pleural cavity induced the expression of murine *Fgf9* mRNA, which peaked on day 5 and persisted on day 14 (Fig. 2A). The magnitude of the response was similar in control and recombinant adenovirus. Murine *Fgf9* mRNA was not detected in mice injected with saline (data not shown).

We measured FGF9 protein level by ELISA in the pleural lavage fluid at days 3, 5, and 14 after adenovirus injection. FGF9 was not detected on day 3, was maximal on day 5, and remained slightly increased on day 14 after adenoviral injection.



*AJP-Lung Cell Mol Physiol* • doi:10.1152/ajplung.00508.2016 • www.ajplung.org  
 Downloaded from www.physiology.org/journal/ajplung at INSERM (193.054.110.061) on January 20, 2020.

tion (Fig. 2B). FGF9 was never detected in untreated mice or in mice receiving an intrapleural injection of saline solution (data not shown). FGF9 concentration was twofold higher in the animals receiving the AdFGF9 compared with the AdCont group (Fig. 2B). These data demonstrate that AdFGF9 infection induces a moderate but still measurable increase in soluble FGF9 level in the pleural space.

To identify the source of FGF9, we performed FGF9 immunostaining in naïve mice and in intrapleurally injected mice with AdFGF9 and AdCont (Fig. 2C). In naïve mice, alveolar epithelial cells were immunoreactive to FGF9, whereas mesothelial cells were not. Consistently with FGF9 mRNA expression kinetics, mesothelial cells were strongly positive in the AdFGF9 group and faintly positive in the AdCont group at day 5. At day 14, some mesothelial cells were still immunoreactive for FGF9 in the AdFGF9 group while they were negative in the AdCont group (Fig. 2C).

**FGF9 prevented adenoviral-induced pleural remodeling.** Histology revealed that intrapleural injection of adenovirus induced marked pleural changes, with a pleural thickening starting at day 5 with a maximum on day 14 in the animals receiving the control adenovirus (Fig. 2C). These changes were spontaneously resolved on day 28 (data not shown). Although limited remodeling of the pleura was observed at day 5 in the animals treated with AdFGF9, the pleura displayed a normal morphology at day 14 in the animals treated with the FGF9 adenovirus (Fig. 2C). Measure of pleural thickness confirms these observations, showing a significant decrease of pleural thickness at day 14 in the AdFGF9 group compared with the AdCont group (Fig. 2D). Interestingly, the subpleural lung showed limited changes with no evidence of fibrosis (data not shown).

We quantified extracellular matrix components in animals treated with control or FGF9 adenovirus. Morphological analysis revealed that control adenoviral infection was associated with the accumulation of collagen (Fig. 3, A and D) and fibronectin (Fig. 3, B and D) in the thickened pleura associated with an increased expression of *α1Col1*, *α1Col3*, and *fibronectin* mRNA (Fig. 3C). Most importantly, these changes were prevented by FGF9 overexpression as assessed by histomorphometry (Fig. 3, A and B), mRNA expression (Fig. 3C), and protein content analysis (Fig. 3D).

**FGF9 prevented accumulation of myofibroblasts in remodeled pleura upon adenovirus transduction in vivo.** We used immunohistochemistry to characterize the phenotypic changes of pleural cells induced by adenoviral infection. Control adenoviral infection was associated with an increase of  $\alpha$ -SMA (Fig. 4A) and vimentin-positive (Fig. 4B) cells in the remodeled pleura at day 14. Most importantly, FGF9 overexpression completely prevented these cellular changes (Fig. 4, A and B). However, at the mRNA level, we did not observe any change of total lung expression of *Vimentin* or *Acta2* mRNAs between

AdCont and AdFGF9 groups, suggesting the phenotypic change were restricted to pleura (Fig. 4, A and B).

WT-1 expression by mesothelial cells was assessed by immunostaining and mRNA expression. WT-1 is known to regulate mesothelial cell plasticity (25). In naïve mice, most mesothelial cells did express WT-1 as assessed by immunostaining (data not shown). On day 14, some WT-1 cells were observed at the surface of the remodeled pleura in AdCont and AdFGF9 groups, with a similar pattern between groups (Fig. 4C). Similarly, WT-1 mRNA level was similar in both groups on day 14 (Fig. 4C).

Pleural remodeling induced by adenoviral infection was associated with an increased expression of key soluble factors at the mRNA level involved in myofibroblast differentiation (17, 18, 38, 50), such as *Tgfb1*, *Ctgf*, and *Pai-1* (Fig. 4D). Conversely, FGF9 overexpression significantly decreased *Ctgf* and *Pai-1* mRNA levels on day 14 (Fig. 4D), while no significant difference was observed with regards to *Tgfb1* mRNA.

**FGF9 inhibited cell proliferation and apoptosis in remodeled pleura after adenoviral transduction in vivo.** To elucidate the mechanisms associated with the in vivo protective effect of FGF9 overexpression on pleural remodeling, we evaluated the proliferation and apoptosis in remodeled pleura.

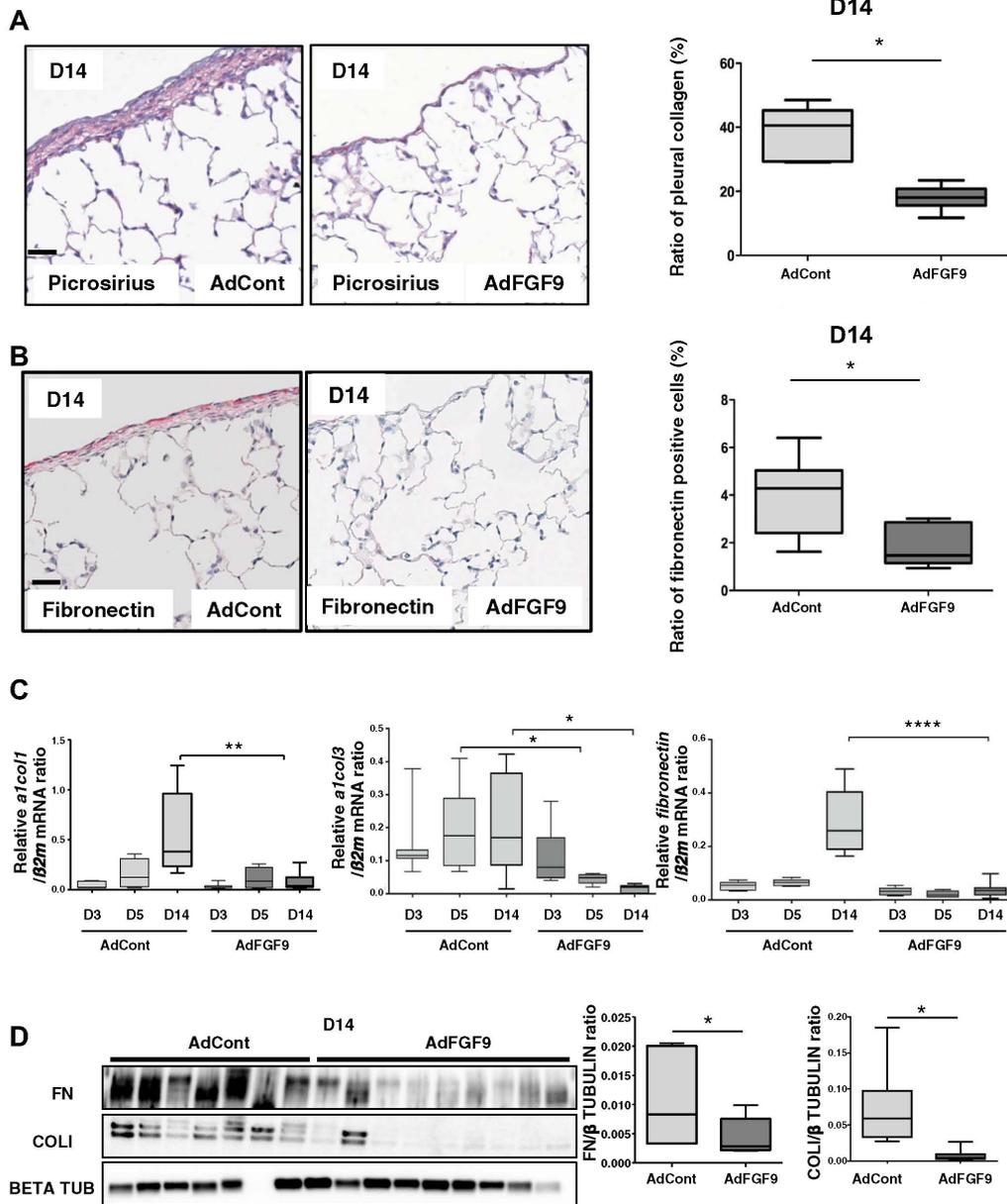
The number of Ki-67-positive cells (a marker of cell proliferation) was strongly increased in the remodeled pleura after control adenoviral infection, and this was again prevented by FGF9 overexpression (Fig. 5A).

We next evaluated the apoptosis process in AdCont animals compared with AdFGF9 ones. We observed that the apoptotic process was activated in the animals infected with the control adenovirus, with an increased expression of cleaved caspase-3 and cleaved poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) as assayed by Western blot. FGF9 overexpression was associated with decreased levels of cleaved caspase-3 (day 5) and cleaved PARP (day 14) compared with control adenovirus (Fig. 5B), pointing to an inhibition of the apoptotic process.

**In vitro, FGF9 decreased migration of mesothelial cells in vitro.** Altogether, our in vivo results suggest that FGF9 promotes early repair of the mesothelium after adenoviral injury. To decipher the molecular mechanisms involved in FGF9 response, we studied the effect of exogenous recombinant human FGF9 on rat lung mesothelial cells (6/4-RM-4 cell line) in vitro.

We first analyzed the pattern of FGFR expression by mesothelial cells in vitro. The mesenchymal-associated IIIc FGFR isoforms were the most detected, and the FGFR3IIIc was strongly expressed compared with FGFR2IIIc and FGFR1IIIc (Fig. 6A), whereas FGFR4 was not detected. However, 6/4-RM-4 mesothelial cells also expressed the epithelial IIIb isoform.

Fig. 2. FGF9 prevents pleural thickening induced by control adenovirus. A: human and murine FGF9 mRNA expression in total lung was examined by quantitative PCR. Levels are relative to that of  $\beta_2$ -microglobulin ( $\beta_2m$ ). Data are medians (25–75th percentile; minimum and maximum) from 6–9 mice/condition. B: FGF9 pleural concentration was quantified by ELISA at days (D) 3, 5, and 14 in control adenovirus (AdCont)- and adenovirus expressing human FGF9 (AdFGF9)-treated animals. Data are medians (25th–75th percentile; minimum and maximum) from 6–9 mice/condition. \* $P < 0.05$ . C: FGF9 immunolabeling in naïve mice and in treated animals at days 5 and 14 (scale bar, 50  $\mu$ m). D: morphological assessment of pleural thickening on days 3, 5, and 14 after adenovirus pleural injection. Hematoxylin and eosin staining (scale bar, 50  $\mu$ m). E: histomorphometric analysis of pleural thickening over time in treated animals using Calopix software. From 6–9 mice/condition, \* $P < 0.05$ .



AJP-Lung Cell Mol Physiol • doi:10.1152/ajplung.00508.2016 • www.ajplung.org  
 Downloaded from www.physiology.org/journal/ajplung at INSERM (193.054.110.061) on January 20, 2020.

Next, we assessed the effect of FGF9 (20 ng/ml) on mesothelial cells. We observed that FGF9 strongly stimulated ERK phosphorylation and decreased pSTAT3 phosphorylation in mesothelial cells (Fig. 6B). These results indicated that 6/4-RM-4 mesothelial cells did respond to FGF9 stimulation in vitro.

Our in vivo results clearly indicate that FGF9 overexpression in mice pleura affects mesothelial cell proliferation and apoptosis. However, FGF9 did not modulate mesothelial cell proliferation in vitro over 24–96 h of stimulation (Fig. 6C).

Migration contributes to mesothelial cell dispersion in lung parenchyma and may participate to subpleural fibrosis (62). We tested the effect of FGF9 on mesothelial cell migration in a modified Boyden chamber assay. FGF9 decreased the cell migratory capacities by 50% (Fig. 6D).

*FGF9 decreased basal differentiation and partially prevented TGF $\beta$ -induced differentiation of mesothelial cells in vitro.* Mesothelial-to-mesenchymal transition has been identified as a profibrotic cellular pathway in the lung. In this process close to epithelial-to-mesenchymal transition, mesothelial cells lose their mesothelial characteristics and acquire mesenchymal properties. TGF- $\beta$  is a well-characterized inducer of mesothelial-to-mesenchymal transition (37).

We assessed mesothelial and mesenchymal markers in mesothelial cells cultured in vitro with FGF9 (20 ng/ml) for 48 h with or without TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml). In the absence of TGF- $\beta$ , FGF9 decreased collagen-1 and  $\alpha$ -SMA protein content while vimentin and WT-1 were unchanged (Fig. 6, E, F, and G). As expected, TGF- $\beta$ 1 increased collagen-1,  $\alpha$ -SMA, and vimentin and decreased WT-1 content in mesothelial cells (Fig. 6, E, F, and G). FGF9 prevented TGF- $\beta$ 1-induced collagen-1 and  $\alpha$ -SMA protein upregulation but did not affect vimentin expression or WT-1 expression (Fig. 6, E, F, and G).

Taken together, our results indicate that FGF9 modulates mesothelial plasticity and partially prevents the mesothelial-to-mesenchymal transition process in vitro.

*FGF9 effects were partially driven by FGFR3 in 4/4-RM-4 mesothelial cells.* FGFR3 is the main receptor for FGF9 response (40, 59). To determine the role of FGFR3 in FGF9 response in vitro, we knocked down *Fgfr3* in rat mesothelial cells with CRISPR-Cas9 gene editing assay. We obtained a population of mesothelial cells with 50% *Fgfr3* inhibition at the mRNA level. We observed that the effect of FGF9 on collagen-1 and  $\alpha$ -SMA protein content was partially blocked in *Fgfr3* CRISPR-Cas9 mesothelial cells (Fig. 7). These data indicate that FGFR3 partially drives the effect of FGF9 on mesothelial cell differentiation in vitro.

## DISCUSSION

FGF9 is implicated in the communication between epithelium and mesenchyme during fetal lung development (56, 58). Indeed, FGF9 is the only FGF expressed by the mesothelium

during the lung pseudoglandular stage, and FGF9 controls mesenchyme proliferation. Recently, we reported that FGF9 played a role in IPF as an anti-apoptotic and promigratory growth factor on human lung fibroblast and maintained fibroblasts in an undifferentiated state (24). In the current study, we observed that FGF9 and its preferential receptor, FGFR3, were strongly expressed in IPF pleura. We demonstrated that in vivo intrapleural FGF9 overexpression prevented pleural remodeling, impacted myofibroblastic differentiation of pleural mesothelial cells, and inhibited mesothelial proliferation and apoptosis induced compared with intrapleural injection of a control adenovirus. In vitro, we demonstrated that FGF9 modulated mesothelial plasticity and partially prevented myofibroblastic differentiation of mesothelial cells induced by TGF- $\beta$ 1. Finally we demonstrated that FGF9 effects on mesothelial cells were, at least partially, driven by FGFR3.

To our knowledge, this is the first attempt to characterize in depth FGFR expression in vivo, in control and IPF human mesothelial cells, mouse lung pleura, as well as in vitro in a rat mesothelial cell line. We observed that FGFR3 and FGFR1 were the most expressed receptors by pleural mesothelial cells, in mice and humans, in control and IPF tissue. MacKenzie et al. reported in a recent work a strong expression of FGF1 and of c-isoform of FGFR1/2/3 in the fibrotic region (30). In our study, we observed an increased expression of FGFR3 by mesothelial cells as assessed by immunohistochemistry (Fig. 1). In mice, FGFR expression and localization were not affected by adenoviral infection (data not shown). FGFR3 is the main receptor for FGF9, but FGFR1 is also a target for FGF9 (40, 59). Coffey et al. previously detected FGF9 expression by mesothelial cells in IPF (6). This is an important feature that fits with the general observation that IPF is characterized by a reactivation of signaling pathways involved in lung development (5, 10, 22, 27, 33).

Pleural fibrosis affects patients suffering from complicated parapneumonia pleural effusions, empyema, or asbestosis-related injury. This thickened pleura contributes to decreased lung volume, decreased lung compliance and led to lung restriction (23, 51). Pleural mesothelial cells undergo a process called mesothelial-mesenchymal transition. During this process, mesothelial cells acquire a myofibroblast-like phenotype characterized by a change of morphology, an increased expression of myofibroblast marker such as  $\alpha$ -SMA, and an increase of matrix protein expression such as collagen-1. To our knowledge, pleural remodeling induced by the intrapleural injection of a control adenovirus has not been previously described. Interestingly, the pleural alterations observed in our study present some similarities, but with less intensity, to those described in experimental pleural fibrosis induced by adenoviral gene transfer of TGF- $\beta$  to the pleura (11) or with coinstitution of bleomycin and carbon particles (12). However, these alterations are spontaneously resolutive in the current

Fig. 3. FGF9 overexpression is associated with the decrease of pleural fibrosis markers. *A*: evaluation of pleural collagen content with picrosirius staining at day 14 (scale bar, 50  $\mu$ m). The column graph represents a quantitative assessment (Calopix software) for 6–9 mice/group. \* $P$  < 0.05. *B*: evaluation of pleural fibronectin content with immunolabeling at day 14 (scale bar, 50  $\mu$ m). The column graph represents a quantitative assessment (Calopix software) for 6–9 mice/group. \* $P$  < 0.05. *C*: quantification of lung mRNA expression for collagen 1, collagen 3, and fibronectin in AdCont- and AdFGF9-treated animals at days 3, 5, and 14. From 6–9 mice/condition, \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, and \*\*\*\* $P$  < 0.0001. *D*: representative Western blot analysis of lung fibronectin and collagen 1 expression at day 14 in AdCont- and AdFGF9-treated animals. Collagen I and fibronectin were quantified and normalized with  $\beta$ -tubulin loading control (column graphs). Results were expressed in fold induction compared with control; 6–9 mice/condition, \* $P$  < 0.05.

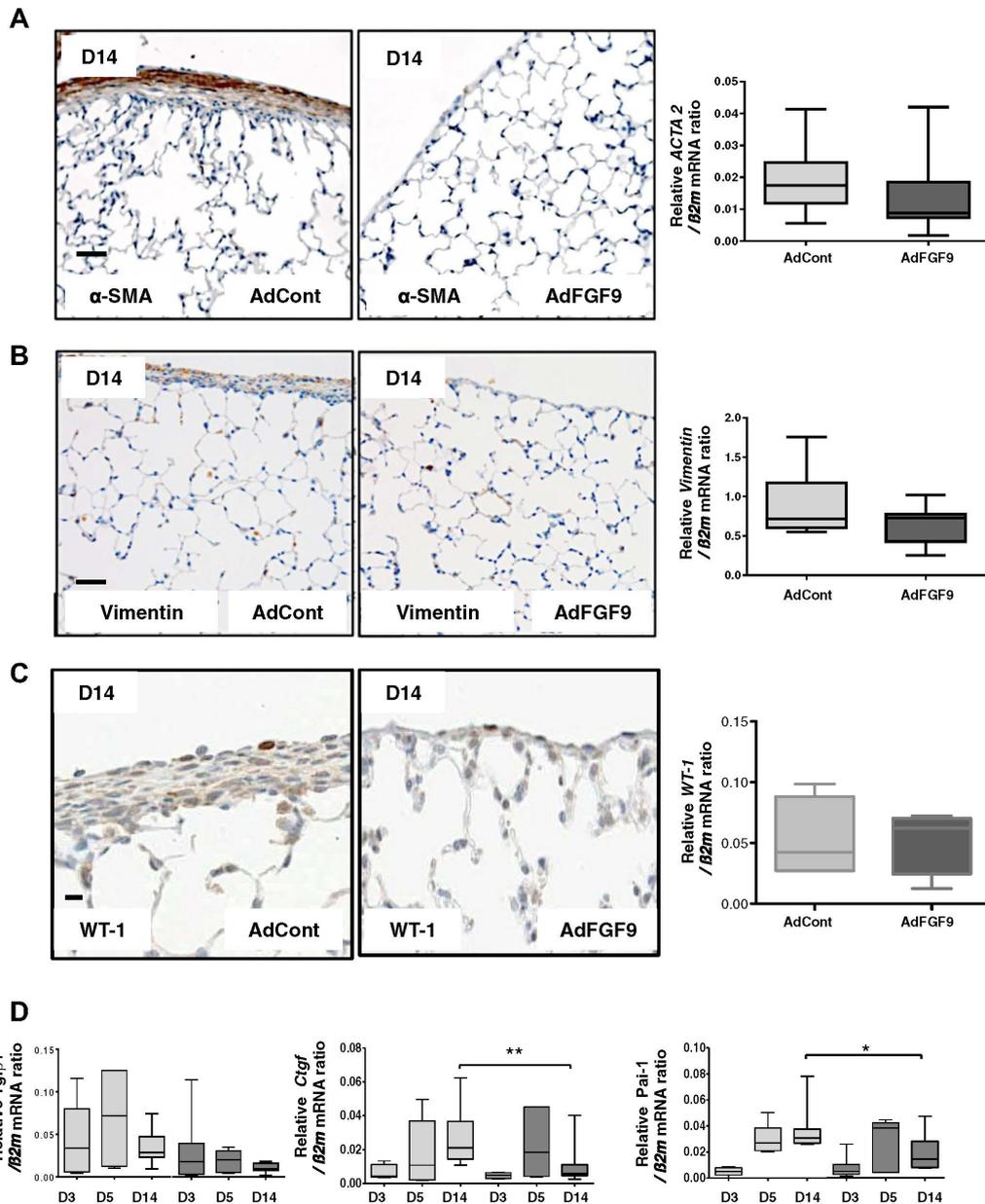


Fig. 4. FGF9 prevented myfibroblast differentiation in the pleura and decreased profibrotic mediator expression in vivo. Immunolabeling and quantitative PCR of  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA, A), vimentin (B), and Wilms tumor-1 (WT-1, C) on day 14 in treated animals (scale bar, 50  $\mu$ m). Mesothelial cells strongly expressed SMA and vimentin in AdCont-treated animals, whereas the AdFGF9-treated animals were protected. Mesothelial cells expressed similar levels of WT-1 in both groups (scale bar, 50  $\mu$ m). D: quantitative PCR analysis of mRNA levels for transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), CTGF, and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) on days 3, 5, and 14. Levels are relative to that of  $\beta$ 2m; 6–9 mice/condition, \* $P$  < 0.05 and \*\* $P$  < 0.01.

AJP-Lung Cell Mol Physiol • doi:10.1152/ajplung.00508.2016 • www.ajplung.org  
 Downloaded from www.physiology.org/journal/ajplung at INSERM (193.054.110.061) on January 20, 2020.

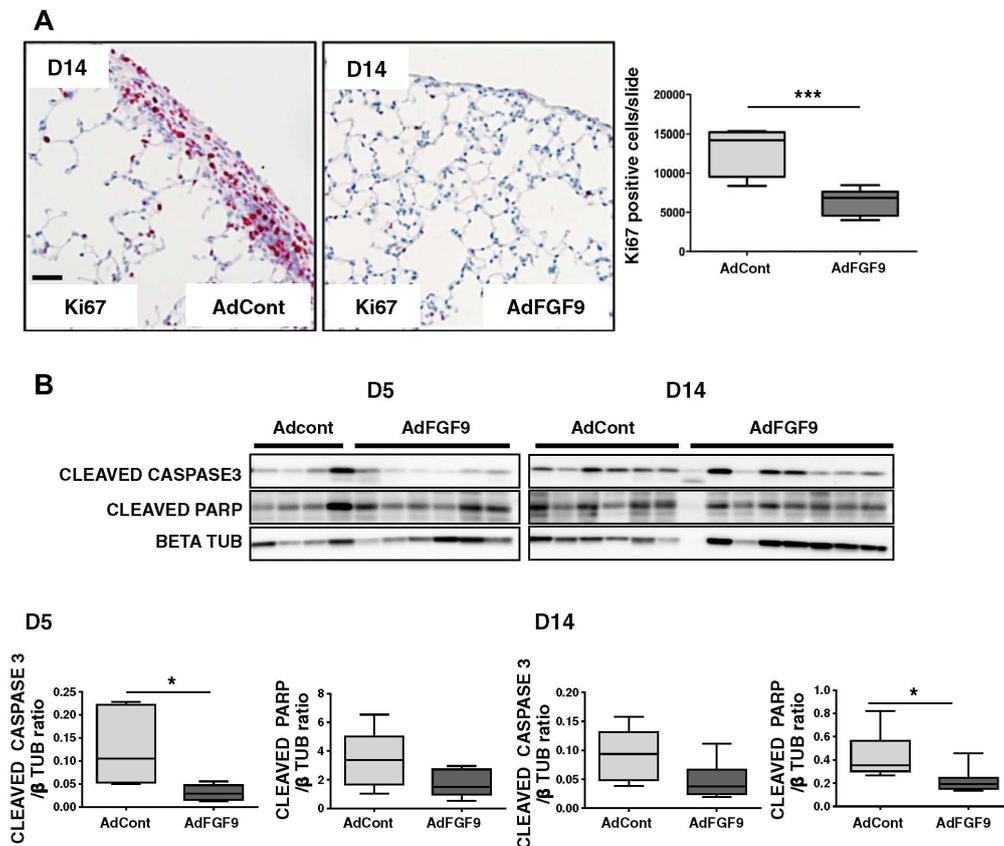


Fig. 5. FGF9 inhibited mesothelial proliferation and apoptosis activation in vivo. *A*: Ki-67 immunolabeling at *day 14* in AdCont- and AdFGF9-treated animals. Graph column represents the quantification of positive Ki-67 cells, using Calopix software,  $***P < 0.001$ . *B*: representative Western blot analysis of cleaved caspase-3 and cleaved poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in AdCont- and AdFGF9-treated animals. Graph column represents the quantification of Western blot. Protein levels were quantified and normalized with  $\beta$ -tubulin ( $\beta$  Tub) loading control and expressed as fold induction compared with control.  $*P < 0.05$ .

model. Recently, another study also reported that a fibrotic process could be triggered upon adenoviral transduction in vivo. Zhou et al. demonstrated that the intratracheal instillation of a high dose of adenoviral vectors was sufficient to induce lung injury with an inflammatory cell influx, increased TGF- $\beta$  concentration in bronchoalveolar lavage, and subsequent fibrosis in mice (61).

One limitation of our study is the use of an empty adenovirus as a control. An adenovirus containing a nonsense sequence could have been a better control. However, except for the sequence of the human FGF9 gene insert in the recombinant adenovirus, both adenoviruses were identical and they induced a similar inflammatory reaction at *days 3* and *5*, as assessed by pleural cellularity (data not shown) and pleural thickening (Fig. 2, *C* and *D*). Interestingly, the AdFGF9 virus induced a mild overexpression of FGF9. Indeed, we only observed a twofold higher intrapleural concentration of FGF9 in the AdFGF9

group compared with the AdCont group (Fig. 2A). Considering the difference of pleural morphology at *day 14* between the two groups, this result suggests a very strong biological effect of FGF9. However, different factors such as the dilution associated with pleural lavage technique and the ability of heparan sulfate to bind FGF9 may have led to an underestimation of FGF9 intrapleural concentration. Indeed, the mesothelial cells secrete surface glycosaminoglycans, predominantly hyaluronan (35), able to sequester FGF but also to modulate and increase FGF/FGFR affinity (31, 45, 53).

We observed that the adenoviral infection of the pleural cavity induced the expression of FGF9 in mice injected with the control adenovirus. It is known that FGF9 may be produced in other tissues after injury. In a model of peritonitis induced by thioglycollate in mice, Lam et al. observed an increased production of FGF9 in the peritoneal fluid and plasma (28). Antoine et al. observed overexpression of FGF9 by stellar liver

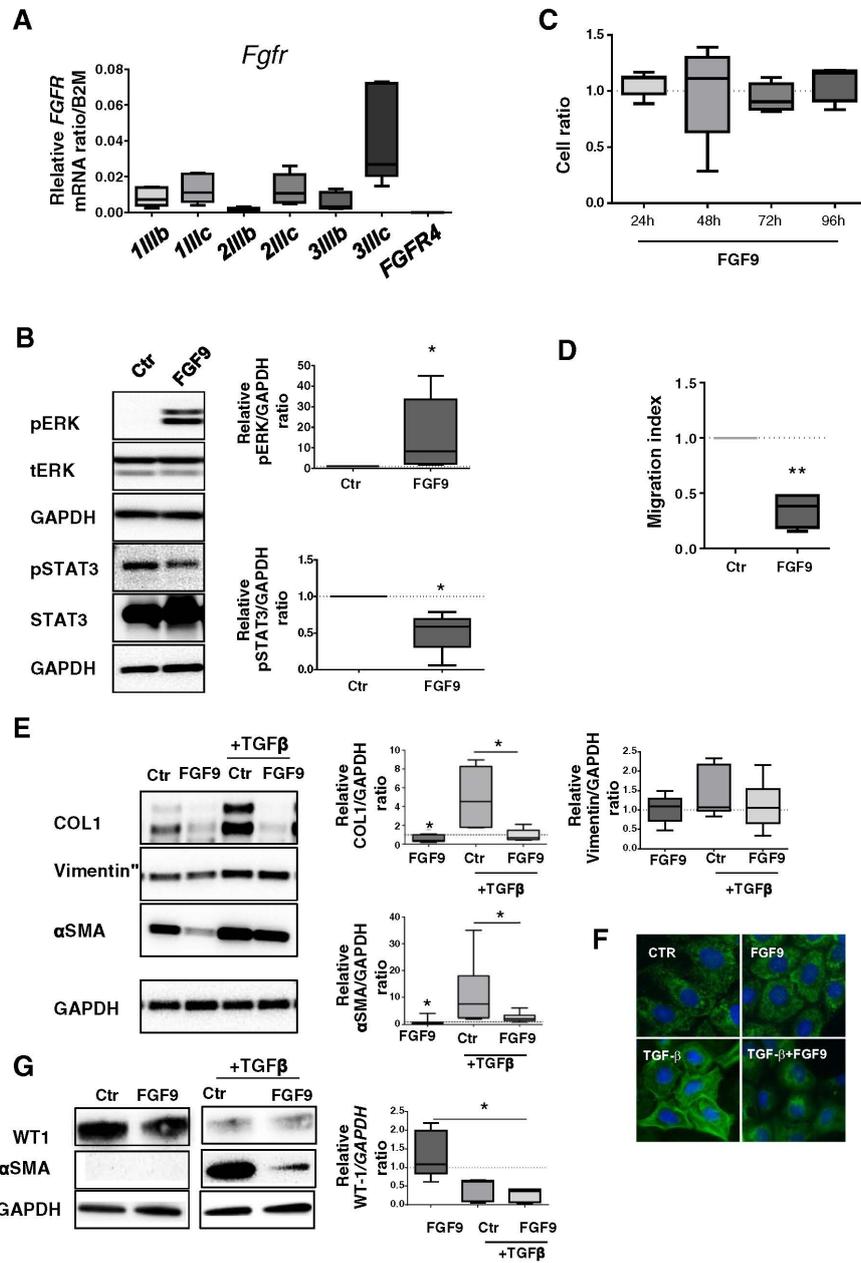
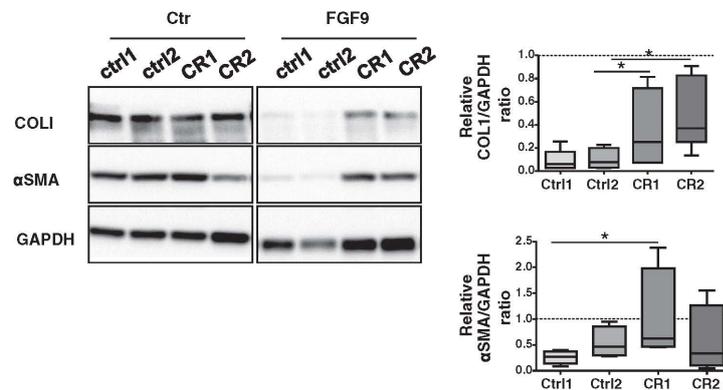


Fig. 7. FGFR3 partial knockdown repressed FGF9 effect on differentiation in mesothelial cells. Mesothelial cells were transfected with FGFR3 CRISPR-Cas9 gene editing assay; cells were selected with antibiotics and treated with FGF9 for 48 h. Representative Western blot analysis of collagen 1 and  $\alpha$ -SMA content in mesothelial cells. Collagen 1 and  $\alpha$ -SMA content were quantified and normalized with GAPDH loading control. Results were expressed as fold induction compared with CRISPR-Cas9 control condition (2 different experiments were performed). \* $P < 0.05$ .



cells after exposition to carbon tetrachloride, as an acute liver injury model (1). Zheng et al. observed an increased expression of FGF9 in the skin after laser-induced injury (60). In our model, we cannot assess the role of mesothelial cells and inflammatory cells in FGF9 accumulation in the pleural space, since we were not able to confidently detect FGF9 in mice.

We showed that pleural FGF9 overexpression was associated with a decrease in mRNA expression of profibrotic factors such as CTGF and PAI-1, an inhibition of the accumulation of myofibroblasts as well as extracellular matrix components such as collagen and fibronectin in the thickened pleura. This observation was confirmed in vitro where FGF9 inhibited the acquired expression of a myofibroblastic phenotype by mesothelial cells. Part of the protective effect of FGF9 may be the result of an interaction with TGF- $\beta$ . Indeed, a cross talk between FGF9 and TGF- $\beta$  signaling has been previously reported in the small intestine where FGF9 is known to play a key role in fetal development. In that tissue, FGF9 targets a subpopulation of mesenchymal stem cells and downregulates TGF- $\beta$  signaling through the production of TGF- $\beta$  inhibitors (15). Similarly, in human lung fibroblasts, we showed that FGF9 prevented TGF- $\beta$ 1-induced myofibroblast differentiation (24). Karki et al. demonstrated that WT-1 regulated mesothelial cell plasticity and that its loss of expression would lead to mesothelial-to-mesenchymal transition (25). Using WT-1 immunolabeling, we observed a decreased expression of WT-1 by mesothelial cells in the remodeled pleura at *day 14*,

without difference between the AdCont and AdFGF9 groups (Fig. 4C). In vitro we observed that TGF- $\beta$ 1 induced a decrease of WT-1 expression (Fig. 6G), whereas FGF9 did not influence its expression.

We observed that FGF9 overexpression was associated with decreased mesothelial cell proliferation and reduced apoptosis in vivo. In vitro, FGF9 had no effect on cell proliferation of the immortalized rat 6/4-RM-4 mesothelial cell line. This apparent discrepancy may reflect the complexity of the in vivo milieu where multiple mediators may interact to produce a given effect. Interestingly, FGF9 was identified as a survival promoter of germ cells in the fetal testis (6, 7, 13) and as promoter of malignant transformation in gastric cancer (46). The anti-apoptotic properties of FGF9 and its overexpression in IPF could contribute to the high incidence of lung cancer in this population. Resistance to apoptosis has been identified as a cause of the increased pool of fibroblast and myofibroblast in the fibrotic lung (50). Recently our group demonstrated that FGF9 promoted survival of lung fibroblast in vitro (24). Alternatively, FGF9 may be enhancing adenovirus-induced DNA damage, since other FGFs, such as FGF2 (21) or FGF10 (52), have been shown to act against oxidative stress.

The acquisition of migration properties is a key feature in the mesothelial-to-mesenchymal transition process. Zolak et al. and Decologne et al. have demonstrated that transdifferentiated mesothelial cells could enter in the lung parenchyma and participate in the fibrotic process and increase the myofibro-

Fig. 6. Effect of FGF9 on proliferation, migration, and differentiation of 6/4-RM-4 mesothelial cells in vitro. A: quantitative PCR analysis of relative mRNA levels of FGFR1, FGFR2, and FGFR3 isoforms and FGFR4 in mesothelial cells. Levels are relative to that of  $\beta$ 2m. Data are means  $\pm$  SE of 6 experiments. B: representative Western blot of pERK and pSTAT3 activation in mesothelial cells treated with FGF9 (20 ng/ml) for 10 min. Content of pERK and pSTAT3 was quantified and normalized with GAPDH loading control. Data are expressed as fold induction relative to the respective control (ctr). \* $P < 0.05$ . C: mesothelial cell proliferation was analyzed by cell counting after FGF9 stimulation (20 ng/ml for 24, 48, 72, and 96 h). Data are means  $\pm$  SE of 5 samples/group. Data are fold induction relative to the respective control condition (heparin alone). D: migration properties of mesothelial cells in modified Boyden chamber assay. FGF9 (20 ng/ml) was used as chemoattractant. Data are expressed as fold induction relative to the respective control. Data are means  $\pm$  SE of 5 samples/group. \*\* $P < 0.01$ . E: representative Western blot analysis of FGF9 effect (20 ng/ml; 48 h) on COL-1, vimentin, and  $\alpha$ -SMA content, with and without TGF- $\beta$ 1 stimulation of mesothelial cells. COL-1, vimentin, and  $\alpha$ -SMA were quantified and normalized with GAPDH loading control. Results are expressed as fold induction compared with control (baseline). \* $P < 0.05$ . F: immunofluorescence detection of  $\alpha$ -SMA (green). Mesothelial cells were cultured for 48 h with and without TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml) and FGF9 (20 ng/ml). Nuclei were stained with DAPI (blue) (scale bar, 10  $\mu$ m). FGF9 prevented  $\alpha$ -SMA accumulation in mesothelial cells after TGF- $\beta$ 1 stimulation. G: representative and reordered Western blot analysis of FGF9 effect (20 ng/ml; 48 h) on WT-1 content with (*right*) and without (*left*) TGF- $\beta$ 1 stimulation on mesothelial cells. WT-1 was quantified and normalized with GAPDH loading control. Results were expressed in fold induction compared with control (baseline). \* $P < 0.01$ .

blast pool (11, 62). In this study, we observed that FGF9 decreased the migration of mesothelial cells in vitro. Our team previously reported that FGF9 enhanced human lung fibroblast migration in vitro. This divergent result could result from the differential expression of FGFR by different cell types, mesothelial cells expressing both epithelial and mesenchymal isoforms as assessed by PCR (Fig. 6A). Indeed, FGF9 can activate the mesenchyme-specific "c"-splice forms of FGFR and has also the unique ability to activate epithelial FGFR signaling after binding IIIb isoforms (58). Alternatively, this apparent discrepancy in the effect of FGF9 on mesothelial cells and fibroblasts may just reflect the positive and preventative effects of FGF9 related to resolution of damage, typical of other FGFs (19, 48), whereas in the IPF context, the overexpression of FGF9 may represent failed attempts to resolve overwhelming damage. Evaluating mesothelial repair in FGF9-deficient mice would be critical to further confirm the role of FGF9 in pleural homeostasis; however, these mice were not available to us.

In conclusion, we observed that the injection of an adenovirus in the pleural cavity induced transient fibrotic remodeling of the pleura. This phenomenon was prevented by the pleural overexpression of FGF9. These results suggest that the expression of FGF9 by mesothelial cells is a physiological response to injury and that FGF9 has anti-fibrotic properties promoting mesothelial repair after infectious injury, but is not sufficient to resolve overwhelming damage in IPF.

#### ACKNOWLEDGMENTS

Present address for A. Joannes: INSERM U1085, IRSET Institut de Recherche sur la Santé, l'Environnement et le Travail, Université de Rennes-1, France.

#### GRANTS

This work was supported by Agence Nationale pour la Recherche Grant ANR-11-BSV1-0011, the LABEX Inflammex, Fonds de Dotation pour la Recherche en Santé Respiratoire, Boehringer Ingelheim, Intermune, BMBS COST Action BM1201 and the Association pour la Fibrose Pulmonaire Idiopathique Pierre ENJALRAN, and by a generous donation from Angelo and Maria Angelucci.

#### DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

A. Justet, A. Joannes, M.J., P.x., J.-M.S., Y.C., P.M., H.M., A.C., R.B., A.A.M., and B.C. conceived and designed research; A. Justet, A. Joannes, V.B., J.M.-S., M.J., and B.S. performed experiments; A. Justet, A. Joannes, J.M.-S., M.J., B.S., A.A.M., and B.C. analyzed data; A. Justet, A. Joannes, V.B., J.M.-S., M.J., P.x., J.-M.S., Y.C., P.M., H.M., A.C., R.B., A.A.M., and B.C. interpreted results of experiments; A. Justet, A. Joannes, V.B., J.M.-S., A.A.M., and B.C. prepared figures; A. Justet, A. Joannes, V.B., J.M.-S., P.x., J.-M.S., B.S., Y.C., P.M., H.M., A.C., R.B., A.A.M., and B.C. drafted manuscript; A. Justet, A. Joannes, V.B., J.M.-S., M.J., P.x., J.-M.S., B.S., Y.C., P.M., H.M., A.C., R.B., A.A.M., and B.C. edited and revised manuscript; A. Justet, A. Joannes, V.B., J.M.-S., M.J., P.x., J.-M.S., B.S., Y.C., P.M., H.M., A.C., R.B., A.A.M., and B.C. approved final version of manuscript.

#### REFERENCES

- Antoine M, Wirz W, Tag CG, Gressner AM, Marvituna M, Wycislo M, Hellerbrand C, Kiefer P. Expression and function of fibroblast growth factor (FGF) 9 in hepatic stellate cells and its role in toxic liver injury. *Biochem Biophys Res Commun* 361: 335–341, 2007. doi:10.1016/j.bbrc.2007.06.189.
- Batra H, Antony VB. Pleural mesothelial cells in pleural and lung diseases. *J Thorac Dis* 7: 964–980, 2015. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2015.02.19.
- Borie R, Justet A, Beltramo G, Manali ED, Pradère P, Spagnolo P, Crestani B. Pharmacological management of IPF. *Respirology* 21: 615–625, 2016. doi:10.1111/resp.12778.
- Charpin C, Giusiano S, Charfi S, Secq V, Carpentier S, Andrac L, Lavant MN, Allasia C, Bonnier P, Garcia S. Quantitative immunohistochemical expression of c Kit in breast carcinomas is predictive of patients' outcome. *Br J Cancer* 101: 48–54, 2009. doi:10.1038/sj.bjc.6605113.
- Cigna N, Farrokhi Moshai E, Brayer S, Marchal-Somme J, Wémeau-Stervinou L, Fabre A, Mal H, Lesèche G, Dehoux M, Soler P, Crestani B, Mailloux AA. The hedgehog system machinery controls transforming growth factor- $\beta$ -dependent myofibroblastic differentiation in humans: involvement in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 181: 2126–2137, 2012. doi:10.1016/j.ajpath.2012.08.019.
- Coffey E, Newman DR, Sannes PL. Expression of fibroblast growth factor 9 in normal human lung and idiopathic pulmonary fibrosis. *J Histochem Cytochem* 61: 671–679, 2013. doi:10.1369/0022155413497366.
- Colvin JS, White AC, Pratt SJ, Ornitz DM. Lung hypoplasia and neonatal death in Fgf9-null mice identify this gene as an essential regulator of lung mesenchyme. *Development* 128: 2095–2106, 2001.
- Cool CD, Groshong SD, Rai PR, Henson PM, Stewart JS, Brown KK. Fibroblast foci are not discrete sites of lung injury or repair: the fibroblast reticulum. *Am J Respir Crit Care Med* 174: 654–658, 2006. doi:10.1164/rccm.200602-205OC.
- Cottin V, Crestani B, Valeyre D, Wallaert B, Cadranel J, Dalphin J-C, Delaval P, Israel-Biet D, Kessler R, Reynaud-Gaubert M, Aguilaniu B, Bouquillon B, Carré P, Danel C, Faivre J-B, Ferretti G, Just N, Kouzan S, Lebagry F, Marchand-Adam S, Philippe B, Prévot G, Stach B, Thivolet-Béjui F, Cordier JF; French National Reference Centre; Network of Competence Centres for Rare Lung Diseases. Diagnosis and management of idiopathic pulmonary fibrosis: French practical guidelines. *Eur Respir Rev* 23: 193–214, 2014. doi:10.1183/09059180.00001814.
- Crestani B, Marchand-Adam S, Quesnel C, Plantier L, Borensztajn K, Marchal J, Mailloux A, Soler P, Dehoux M. Hepatocyte growth factor and lung fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 9: 158–163, 2012. doi:10.1513/pats.201202-018AW.
- Decolgne N, Kolb M, Margets PJ, Menetrier F, Artur Y, Garrido C, Gaudie J, Camus P, Bonniaud P. TGF- $\beta$ 1 induces progressive pleural scarring and subpleural fibrosis. *J Immunol* 179: 6043–6051, 2007. doi:10.4049/jimmunol.179.9.6043.
- Decolgne N, Wettstein G, Kolb M, Margets P, Garrido C, Camus P, Bonniaud P. Bleomycin induces pleural and subpleural fibrosis in the presence of carbon particles. *Eur Respir J* 35: 176–185, 2010. doi:10.1183/09031936.00181808.
- El Ramy R, Verot A, Mazaud S, Odet F, Magre S, Le Magueresse-Battistoni B. Fibroblast growth factor (FGF) 2 and FGF9 mediate mesenchymal-epithelial interactions of peritubular and Sertoli cells in the rat testis. *J Endocrinol* 187: 135–147, 2005. doi:10.1677/joe.1.06146.
- Fernandez IE, Eickelberg O. New cellular and molecular mechanisms of lung injury and fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 380: 680–688, 2012. doi:10.1016/S0140-6736(12)61144-1.
- Geske MJ, Zhang X, Patel KK, Ornitz DM, Stappenbeck TS. Fgf9 signaling regulates small intestinal elongation and mesenchymal development. *Development* 135: 2959–2968, 2008. doi:10.1242/dev.020453.
- Goetz R, Mohammadi M. Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 166–180, 2013. doi:10.1038/nrm3528.
- Grinnell F. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biol* 124: 401–404, 1994. doi:10.1083/jcb.124.4.401.
- Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a mediator of TGF- $\beta$  action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev* 8: 171–179, 1997. doi:10.1016/S1359-6101(97)00010-5.
- Gupte VV, Ramasamy SK, Reddy R, Lee J, Weinreb PH, Violette SM, Guenther A, Warburton D, Driscoll B, Minoo P, Belluscio S. 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, 2009. doi:10.1164/rccm.200811-1794OC.
- Guzy RD, Stoilov I, Elton TJ, Mechem RP, Ornitz DM. Fibroblast growth factor 2 is required for epithelial recovery, but not for pulmonary fibrosis, in response to bleomycin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 52: 116–128, 2015. doi:10.1165/rccm.2014-0184OC.

21. Harfouche G, Vaigot P, Rachidi W, Rigaud O, Moratille S, Marie M, Lemaitre G, Fortunel NO, Martin MT. Fibroblast growth factor type 2 signaling is critical for DNA repair in human keratinocyte stem cells. *Stem Cells* 28: 1639–1648, 2010. doi:10.1002/stem.485.
22. Henderson WR Jr, Chi EY, Ye X, Nguyen C, Tien YT, Zhou B, Borok Z, Knight DA, Kahn M. Inhibition of Wnt/beta-catenin/CREB binding protein (CBP) signaling reverses pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 14309–14314, 2010. doi:10.1073/pnas.1001520107.
23. Huggins JT, Sahn SA. Causes and management of pleural fibrosis. *Respirology* 9: 441–447, 2004. doi:10.1111/j.1440-1843.2004.00630.x.
24. Joannes A, Brayer S, Besnard V, Marchal-Somme J, Jaillet M, Mordant P, Mal H, Borie R, Crestani B, Mailleux AA. 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–L629, 2016. doi:10.1152/ajplung.00185.2015.
25. Karki S, Surolia R, Hock TD, Guroji P, Zolak JS, Duggal R, Ye T, Thannickal VJ, Antony VB. Wilms' tumor 1 (Wt1) regulates pleural mesothelial cell plasticity and transition into myofibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *FASEB J* 28: 1122–1131, 2014. doi:10.1096/fj.13-236828.
26. King TE Jr, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 378: 1949–1961, 2011. doi:10.1016/S0140-6736(11)60052-4.
27. Lam AP, Herazo-Maya JD, Sennello JA, Flozak AS, Russell S, Mutlu GM, Budinger GRS, DasGupta R, Varga J, Kaminski N, Gottardi CJ. Wnt coreceptor Lrp5 is a driver of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 190: 185–195, 2014. doi:10.1164/rccm.201401-0079OC.
28. Lam D, Harris D, Qin Z. Inflammatory mediator profiling reveals immune properties of chemotactic gradients and macrophage mediator production inhibition during thioglycollate elicited peritoneal inflammation. *Mediators Inflamm* 2013: 931562, 2013. doi:10.1155/2013/931562.
29. Land SC, Darakhshan F. Thymulin evokes IL-6-C/EBP $\beta$  regenerative repair and TNF- $\alpha$  silencing during endotoxin exposure in fetal lung explants. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L473–L487, 2004. doi:10.1152/ajplung.00401.2002.
30. MacKenzie B, Korfei M, Henneke I, Sibinska Z, Tian X, Hezel S, Dilai S, Wasnick R, Schneider B, Wilhelm J, El Agha E, Klepetko W, Seeger W, Schermuly R, Günther A, Belluscì S. Increased FGF1-FGFR expression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res* 16: 83, 2015. doi:10.1186/s12931-015-0242-2.
31. McKeenan WL, Kan M. Heparan sulfate fibroblast growth factor receptor complex: structure-function relationships. *Mol Reprod Dev* 39: 69–82, 1994.
32. McMichael JW, Maxwell AI, Hayashi K, Taylor K, Wallace WA, Govan JR, Dorin JR, Sallenave J-M. Antimicrobial activity of murine lung cells against *Staphylococcus aureus* is increased in vitro and in vivo after elafin gene transfer. *Infect Immun* 73: 3609–3617, 2005. doi:10.1128/IAI.73.6.3609-3617.2005.
33. Moshai EF, Wémeau-Stervinou L, Cigna N, Brayer S, Sommé JM, Crestani B, Mailleux AA. Targeting the hedgehog-glioma-associated oncogene homolog pathway inhibits bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 51: 11–25, 2014. doi:10.1165/rccb.2013-0154OC.
34. Mubarak KK, Montes-Worboys A, Regev D, Nasreen N, Mohammed KA, Faruqi I, Hensel E, Baz MA, Akindipe OA, Fernandez-Bussy S, Nathan SD, Antony VB. Parenchymal trafficking of pleural mesothelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 39: 133–140, 2012. doi:10.1183/09031936.00141010.
35. Mutsaers SE. Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair. *Respirology* 7: 171–191, 2002. doi:10.1046/j.1440-1843.2002.00404.x.
36. Mutsaers SE, Birnie K, Lansley S, Herrick SE, Lim C-B, Prêle CM. Mesothelial cells in tissue repair and fibrosis. *Front Pharmacol* 6: 113, 2015. doi:10.3389/fphar.2015.00113.
37. Nasreen N, Mohammed KA, Mubarak KK, Baz MA, Akindipe OA, Fernandez-Bussy S, Antony VB. Pleural mesothelial cell transformation into myofibroblasts and haptotactic migration in response to TGF- $\beta$ 1 in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297: L115–L124, 2009. doi:10.1152/ajplung.90587.2008.
38. Omori K, Hattori N, Senoo T, Takayama Y, Masuda T, Nakashima T, Iwamoto H, Fujitaka K, Hamada H, Kohno N. Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 attenuates transforming growth factor- $\beta$ -dependent epithelial mesenchymal transition and differentiation of fibroblasts to myofibroblasts. *PLoS One* 11: e0148969, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0148969.
39. Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2: REVIEWS3005, 2001.
40. Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, Goldfarb M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 271: 15292–15297, 1996. doi:10.1074/jbc.271.25.15292.
41. Owens S, Jeffers A, Boren J, Tsukasaki Y, Koenig K, Ikebe M, Idell S, Tucker TA. Mesomesenchymal transition of pleural mesothelial cells is PI3K and NF- $\kappa$ B dependent. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 308: L1265–L1273, 2015. doi:10.1152/ajplung.00396.2014.
42. Padrisa-Altés S, Bachofner M, Bogorad RL, Pohlmeier L, Rossolini T, Böhm F, Liebisch G, Hellerbrand C, Koteliensky V, Speicher T, Werner S. Control of hepatocyte proliferation and survival by Fgf receptors is essential for liver regeneration in mice. *Gut* 64: 1444–1453, 2015. doi:10.1136/gutjnl-2014-307874.
43. Perl AK, Gale E. FGF signaling is required for myofibroblast differentiation during alveolar regeneration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297: L299–L308, 2009. doi:10.1152/ajplung.00008.2009.
44. Raghu G, Rochberg B, Zhang Y, Garcia CA, Azuma A, Behr J, Brozek JL, Collard HR, Cunningham W, Homma S, Johkoh T, Martínez FJ, Myers J, Protzko SL, Richeldi L, Rind D, Selman M, Theodore A, Wells AU, Hoogsteden H, Schünemann HJ, American Thoracic Society, European Respiratory Society, Japanese Respiratory Society, Latin American Thoracic Association. An Official ATS/ERS/RS/ALAT Clinical Practice Guideline: Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Update of the 2011 Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med* 192: e3–e19, 2015. doi:10.1164/rccm.201506-1063ST.
45. Rapraeger AC, Krufka A, Olwin BB. Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science* 252: 1705–1708, 1991. doi:10.1126/science.1646484.
46. Ren C, Chen H, Han C, Fu D, Wang F, Wang D, Ma L, Zhou L, Han D. The anti-apoptotic and prognostic value of fibroblast growth factor 9 in gastric cancer. *Oncotarget* 7: 36655–36665, 2016. doi:10.18632/oncotarget.9131.
47. Salm F, Cwiek P, Ghosal A, Lucia Buccarello A, Largely F, Wotzkow C, Höland K, Styp-Rekowska B, Djonov V, Zlobec I, Bodmer N, Gross N, Westermann F, Schäfer SC, Arcaro A. RNA interference screening identifies a novel role for autocrine fibroblast growth factor signaling in neuroblastoma chemoresistance. *Oncogene* 32: 3944–3953, 2013. doi:10.1038/onc.2012.416.
48. Shimbori C, Bellay PS, Xia J, Gaudie J, Ask K, Ramos C, Becerril C, Pardo A, Selman M, Kolb M. Fibroblast growth factor-1 attenuates TGF- $\beta$ 1-induced lung fibrosis. *J Pathol* 240: 197–210, 2016. doi:10.1002/path.4768.
49. Sneddon WB, Ruiz GW, Gallo LI, Xiao K, Zhang Q, Rbaibi Y, Weisz OA, Apodaca GL, Friedman PA. Convergent signaling pathways regulate parathyroid hormone and fibroblast growth factor-23 action on NPT2A-mediated phosphate transport. *J Biol Chem* 291: 18632–18642, 2016. doi:10.1074/jbc.M116.744052.
50. Thannickal VJ, Lee DY, White ES, Cui Z, Larios JM, Chacon R, Horowitz JC, Day RM, Thomas PE. Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 278: 12384–12389, 2003. doi:10.1074/jbc.M208544200.
51. Tucker TA, Jeffers A, Alvarez A, Owens S, Koenig K, Quaid B, Komissarov AA, Florova G, Kothari H, Pendurthi U, Mohan Rao LV, Idell S. Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency augments visceral mesothelial organization, intrapleural coagulation, and lung restriction in mice with carbon black/bleomycin-induced pleural injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 50: 316–327, 2014. doi:10.1165/rccb.2013-0300OC.
52. Upadhyay D, Panduri V, Kamp DW. Fibroblast growth factor-10 prevents asbestos-induced alveolar epithelial cell apoptosis by a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32: 232–238, 2005. doi:10.1165/rccb.2004-0242OC.
53. Vlodavsky I, Miao HQ, Medalion B, Danagher P, Ron D. Involvement of heparan sulfate and related molecules in sequestration and growth promoting activity of fibroblast growth factor. *Cancer Metastasis Rev* 15: 177–186, 1996. doi:10.1007/BF00437470.

54. Volckaert T, De Langhe SP. Wnt and FGF mediated epithelial-mesenchymal crosstalk during lung development. *Dev Dyn* 244: 342–366, 2015. doi:10.1002/dvdy.24234.
55. Warburton D, El-Hashash A, Carraro G, Tiozzo C, Sala F, Rogers O, De Langhe S, Kemp PJ, Riccardi D, Torday J, Bellusci S, Shi W, Lubkin SR, Jesudason E. Lung organogenesis. *Curr Top Dev Biol* 90: 73–158, 2010. doi:10.1016/S0070-2153(10)90003-3.
56. White AC, Xu J, Yin Y, Smith C, Schmid G, Ornitz DM. FGF9 and SHH signaling coordinate lung growth and development through regulation of distinct mesenchymal domains. *Development* 133: 1507–1517, 2006. doi:10.1242/dev.02313.
57. Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 64: 841–848, 1991. doi:10.1016/0092-8674(91)90512-W.
58. Yin Y, Wang F, Ornitz DM. Mesothelial- and epithelial-derived FGF9 have distinct functions in the regulation of lung development. *Development* 138: 3169–3177, 2011. doi:10.1242/dev.065110.
59. Zhang X, Ibrahimi OA, Olsen SK, Umemori H, Mohammadi M, Ornitz DM. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J Biol Chem* 281: 15694–15700, 2006. doi:10.1074/jbc.M601252200.
60. Zheng Z, Kang HY, Lee S, Kang S-W, Goo B, Cho SB. Up-regulation of fibroblast growth factor (FGF) 9 expression and FGF-WNT/ $\beta$ -catenin signaling in laser-induced wound healing. *Wound Repair Regen* 22: 660–665, 2014. doi:10.1111/wrr.12212.
61. Zhou Q, Chen T, Bozkanat M, Ibe JCF, Christman JW, Raj JU, Zhou G. Intratracheal instillation of high dose adenoviral vectors is sufficient to induce lung injury and fibrosis in mice. *PLoS One* 9: e116142, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0116142.
62. Zolak JS, Jagirdar R, Surolia R, Karki S, Oliva O, Hock T, Guroji P, Ding Q, Liu R-M, Bolisetty S, Agarwal A, Thannickal VJ, Antony VB. Pleural mesothelial cell differentiation and invasion in fibrogenic lung injury. *Am J Pathol* 182: 1239–1247, 2013. doi:10.1016/j.ajpath.2012.12.030.



## DISCUSSION DE L'ARTICLE

Il s'agit de la première étude visant à caractériser l'expression pleurale de FGF9 et des récepteurs FGFR dans le poumon humain, sain et fibreux, et murin. FGFR1 et FGFR3 étaient les principaux récepteurs exprimés au niveau pleural chez l'homme et la souris. FGF9 peut se lier à ces deux récepteurs et son expression mésothéliale est augmentée au cours de la FPI. Cette observation a confirmé une observation préalable publiée par Coffet et al (257).

La fibrose pleurale est un processus retrouvé dans de nombreuses pathologies y compris infectieuse. Ce phénomène a des conséquences sur la compliance pulmonaire. Il s'agit de la première étude rapportant un effet pro fibrosant lié à un adénovirus contrôle. Les altérations retrouvées au niveau de la plèvre remodelée présentent plusieurs similarités avec celles observées lors de l'injection intra pleurale d'un adénovirus recombiné AdTGF $\beta$  (70) ou de bleomycine (286) avec une intensité moindre. De plus ce remodelage n'est que transitoire dans notre modèle. D'autres études ont rapporté des fibroses viro induites. Zhou et collaborateurs ont rapporté que de fortes doses d'adénovirus suffisaient à initier une fibrogénèse pulmonaire chez la souris (287).

Une des limites de cette étude réside dans l'utilisation d'un adénovirus vide comme contrôle. L'utilisation d'un adénovirus contenant une mutation non-sens de FGF9 aurait été plus appropriée. Cependant nous avons observé que les deux adénovirus induisaient une réaction inflammatoire équivalente jours après l'injection intra pleurale.

D'autre part, l'AdFGF9 induit une surexpression intra pleurale modérée de FGF9 mais associée à un effet biologique important. Il est possible que la concentration pleurale ait été sous-estimée du fait de la dilution induite par le lavage pleural, de la séquestration du FGF9 à des héparanes sulfates qui tapissent la cavité pleurale (288).

Nous avons observé que l'infection de la cavité pleurale par l'adénovirus contrôle induisait l'expression de FGF9 murin. Ceci a été rapporté dans d'autres situation similaires et notamment en cas d'infection péritonéale ou après une agression hépatique par du tetrachloride de carbone, ou au niveau cutané (289), (290).

La surexpression de FGF9 était associée à une diminution de l'expression des ARN messagers de facteurs pro fibrosants et prévenait l'accumulation de myofibroblastes et de protéines de la MEC au niveau de la plèvre des souris. Ces données ont été confirmées *in vitro*. Le mécanisme d'action de FGF9 est incertain mais pourrait induire l'expression d'inhibiteur du TGFB à l'instar de son action au niveau de l'intestin grêle (291). Dans ce travail, FGF9 ne modulait pas l'expression de WT-1 dont la perte d'expression est associée à la transition mésothélio-mésenchymateuse (292).

La migration est une propriété importante dans la transition mésothélio-mésenchymateuse. Dans plusieurs études, il a été observé que les cellules mésothéliales pouvaient migrer dans le parenchyme pulmonaire et augmenter le pool de myofibroblaste pulmonaire (293). Nous avons observé, *in vitro*, que FGF9 diminuait la migration de ces cellules. Notre équipe avait rapporté un effet inverse au niveau des fibroblastes pulmonaires humains issus de patients atteints de FPI ou témoins qui peut s'expliquer par l'activation d'isoformes différentes du récepteur. Contrairement aux fibroblastes pulmonaires qui n'expriment que l'isoforme -c, les cellules mésothéliales expriment les isoformes b et c des FGFR qui peuvent être tout deux activées par FGF9 pourrait expliquer l'effet opposé observé au niveau de ces deux types cellulaires.

L'injection d'un adénovirus dans la cavité pleurale de souris induit une fibrose pleural transitoire. Ce phénomène peut être prévenu par la surexpression de FGF9 par les cellules mésothéliales. Ces données suggèrent que la sécrétion de FGF9 par les cellules mésothéliales est une réponse physiologique à une agression et que FGF9 a des propriétés anti fibrosantes utiles après une infection mais insuffisante pour influencer la fibrogénèse pulmonaire observées au cours de la FPI.

# **FGF19 est diminué dans la FPI et inhibe la survenue de la fibrose pulmonaire chez la souris.**

Justet et al., Manuscrit en cours de préparation

## **CONTEXTE ET JUSTIFICATION DE LA RECHERCHE**

Alors que l'implication des FGF paracrines a été particulièrement étudiée au cours de la FPI, ce n'est que récemment que des travaux ont porté sur l'implication des FGF endocrines (244), (245).. Dans ce travail notre intérêt s'est porté sur l'implication du FGF19. Le FGF19 est sécrété au niveau iléal et joue un rôle central dans le métabolisme des acides biliaires et l'homéostasie énergétique. Il est le principal ligand du récepteur FGFR4 très exprimé au niveau hépatique mais peut également se lier à d'autres FGFR comme le FGFR1c exprimé au niveau du tissu adipeux (258).

L'intérêt porté sur le FGF19 au niveau pulmonaire s'explique par ses propriétés anti fibrosantes observées au niveau hépatique. En effet une surexpression d'un variant non mitogénique de FGF19 est associée à une diminution des lésions de fibrose hépatique et à la diminution de l'apoptose des hépatocytes chez la souris après exposition au tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>) (294). Les mécanismes sous-jacents à cet effet protecteur n'ont à ce jour pas été clairement élucidés. L'effet anti fibrosant de FGF19 serait associé à une diminution du stress du RE et à son effet anti apoptotique. L'utilisation d'un variants d FGF19, le NGM282 était associée une diminution significative des biomarqueurs de fibrose hépatique chez des patients atteints de cirrhose en lien avec une NASH (285).

Nous avons donc émis l'hypothèse que le FGF19 pouvait avoir des propriétés anti fibrosantes au niveau pulmonaire.

Nos objectifs étaient de :

- Quantifier et comparer la concentration plasmatique de FGF19 chez des patients atteints de FPI et de témoins

- Etudier l'effet de la surexpression de FGF19 dans deux modèles expérimentaux de fibrose pulmonaire murine
- Etudier l'effet de FGF19 sur deux types cellulaires qui jouent un rôle clé dans la FPI, les cellules épithéliales alvéolaires et les fibroblastes pulmonaires.

**MANUSCRIT DE L'ARTICE**

1 **FGF19 is downregulated in idiopathic pulmonary fibrosis and inhibits lung fibrosis in**  
2 **mice**

3

4 **Authors**

5 Aurelien Justet<sup>1,2</sup>, Tiara Boghanim<sup>1</sup>, Mouna Hachem<sup>1</sup>, Madeleine Jaillet<sup>1</sup>, Aurélie Vadel<sup>1</sup>, ,  
6 Audrey Joannes<sup>3</sup>, Mada Ghanem<sup>1,2</sup>, Pierre Mordant<sup>1,4</sup>, Philippe Bonniaud<sup>5</sup>, Martin Kolb<sup>6</sup>, Lei  
7 Ling<sup>7</sup>, Aurélie Cazes<sup>1,8</sup>, Hervé Mal<sup>1,9</sup>, Arnaud Mailleux<sup>1</sup>, Bruno Crestani<sup>1,2</sup>

8

9 **Affiliation**

10 <sup>1</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR1152, Université de Paris,  
11 Faculté de médecine Xavier Bichat, 75018 Paris, France;

12 <sup>2</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bichat, Service de Pneumologie A, 75018,  
13 Paris, France.

14 <sup>3</sup>INSERM U1085, IRSET Institut de Recherche sur la Santé, l'Environnement et le Travail,  
15 Université de Rennes-1

16 <sup>4</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bichat, Service de Chirurgie Thoracique et  
17 vasculaire, 75018, Paris, France.

18 <sup>5</sup>Inserm U866, Université de Bourgogne, Dijon, France

19 <sup>6</sup>Firestone Institute for Respiratory Health, Research Institute at St Joseph's Healthcare,  
20 Department of Medicine, McMaster University, Hamilton, ON, Canada.

21 <sup>7</sup>NGM biopharmaceuticals, San Francisco, United States of America

22 <sup>8</sup>Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Hôpital Bichat, Département  
23 d'Anatomopathologie, Paris, France

24 <sup>9</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bichat, Service de Pneumologie et  
25 Transplantation, 75018, Paris, France.

26

27

28 **Short title:** FGF19 inhibits lung fibrosis

29 **Corresponding author:** Pr. Bruno Crestani, Service de Pneumologie A, Hôpital Bichat, 46  
30 rue Henri Huchard, 75018 Paris, France

31 E-mail: bruno.crestani@aphp.fr

32 Phone: +331 40 25 68 00; Fax: +331 40 25 88 18

33

34 **Abbreviation list:**

- 35 AAV: Adeno- associated virus  
36 A1COL1: collagen-1 alpha 1  
37 ACTA2: alpha smooth muscle actin  
38 AECII: alveolar epithelial type 2 cell  
39 COL: Collagen  
40 CTL: Control  
41 ECM: Extracellular matrix  
42 FGF7: Fibroblast growth factor-7  
43 FGF10: Fibroblast growth factor-7  
44 FGF19: fibroblast growth factor-19  
45 FN: Fibronectin 1  
46 GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase  
47 HGF: Hepatocyte Growth Factor  
48 IL1 $\beta$ : Interleukin 1  $\beta$   
49 IL6: Interleukin 6  
50 IPF: idiopathic pulmonary fibrosis  
51 MLE15: Murine Lung Epithelial-15  
52 PAI1: Plas: minogen Activator 1  
53 PDGF: Platelet derived growth factor  
54 Pro SPC: Pro surfactant protein C  
55 TGF $\beta$ 1: transforming growth factor beta-1  
56 TNF $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor alpha  
57 TUB:  $\beta$ -tubulin

58

59

60

61 **ABSTRACT** (198/200 words)

62

63 IPF is a devastating lung disease, characterized by a reactivation of developmental pathways  
64 such as Fibroblast Growth Factors (FGF). FGF19, an endocrine FGF, was shown to prevent  
65 experimental liver fibrosis. We hypothesized that FGF19 could have anti-fibrotic properties in  
66 the lung. We found that FGF19 was decreased in plasma of IPF patients compared to  
67 controls. Then, we determined the effect of increased FGF19 plasma levels induced by an  
68 adeno-associated virus (AAV) in two experimental models of murine lung fibrosis. Increased  
69 FGF19 was associated with a marked decrease of bleomycin-induced lung fibrosis and  
70 adenovirus-TGF-beta-induced lung fibrosis in mice. In vitro, FGF19 decreased type 2  
71 alveolar epithelial cell apoptosis through the decrease of the proapoptotic BIM protein  
72 expression, and prevented TGF- $\beta$ -induced myofibroblast differentiation through the inhibition  
73 of JNK phosphorylation. Altogether these data indicate that FGF19 has anti fibrotic properties  
74 in the lung and point it as a potential therapeutic target in IPF.

75

76

77 **INTRODUCTION**  
78

79 Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), the most frequent idiopathic interstitial pneumonia  
80 <sup>1</sup>, is a devastating disease characterized by a very poor prognosis. Two drugs are currently  
81 approved in IPF, pirfenidone and nintedanib, and have been shown to slow disease  
82 progression. Lung transplantation is the only curative treatment <sup>2</sup>. According to the current  
83 paradigm, IPF would be the consequence of repeated aggression of a senescent alveolar  
84 epithelium leading to alveolar type II cell apoptosis, and myofibroblast and extracellular  
85 matrix protein accumulation. During this process, several pathways implicated in lung  
86 development are abnormally reactivated, including members of the fibroblast growth factor  
87 (FGF) family <sup>3</sup>. FGFs contribute to intercellular communication through specific receptors  
88 (FGFRs), and are involved at all stage of lung development and in repair process. The FGF  
89 family contains 22 members and 4 receptors (FGFR1-4). FGF19, FGF21 and FGF23 belong  
90 to the endocrine FGF subfamily and exert their action mainly in an endocrine mode <sup>4</sup>. FGF19  
91 (FGF15 in mice) is expressed by the ileum and targets the liver and the gallbladder. FGF19  
92 is known to play a key role in glucose and acid biliary metabolisms <sup>5</sup>. FGF19 has anti-fibrotic  
93 properties in experimental liver steatosis and liver fibrosis models <sup>6</sup>. Recently, NGM282, an  
94 engineered FGF19 analogue, induced significant reduction of non-invasive serum fibrosis  
95 biomarkers in patients with non-alcoholic steatohepatitis in a clinical trial <sup>7</sup>. In view of these  
96 data, we hypothesized that FGF19 could exert anti-fibrotic properties in the lung. First, we  
97 performed a comparative analysis of FGF19 level in bronchoalveolar lavage (BAL) and  
98 plasma from IPF and controls patients. Then we assessed the effect of FGF19  
99 overexpression in two experimental models of lung fibrosis. Finally, we investigated and  
100 deciphered the effect of FGF19 stimulation on the two key cellular actors of IPF, the lung  
101 fibroblast and the alveolar epithelial cell.

102

103 **MATERIAL AND METHODS**

104

105 **Human Lung Samples**

106 IPF lung samples were obtained from patients undergoing open lung biopsy or at the time of  
107 lung transplantation ( $n=39$ ; median age 61 years; range 51–70 years). IPF was diagnosed  
108 according to ATS/ERS/JRS/ALAT 2011 criteria <sup>8</sup>, including histopathological features of  
109 usual interstitial pneumonia. Lung samples obtained after cancer surgery, away from the  
110 tumor, were used as controls; normalcy of control lungs was verified histologically ( $n =35$   
111 patients; median age 64 years, range 28–83 years). Bronchoalveolar lavage (BAL) was  
112 obtained from 15 patients with IPF and 10 controls subjects. Plasma samples were obtained  
113 from 22 IPF patients and 15 controls, matched for age, body mass index, and tobacco  
114 exposure (Table 1). IPF or control subjects with previous or current history of cholestasis,  
115 chronic haemodialysis or non alcoholic fatty liver disease, were excluded from this study.

116 To assess FGF19 concentration, venous blood was collected on EDTA tubes after 8 hours  
117 fasting, centrifuged 15 min at 1000g within 30 minutes from collection, and the plasma was  
118 immediately aliquoted and stored at -80°C until assay.

119 This study was approved by the local ethics committee (CPP Ile de France 1, No.0811760).

120 Written informed consent was obtained from all subjects.

121

122 **Experimental murine lung fibrosis**

123 C57BL/6N mice from Janvier Labs (Le Genest Saint Isle, France) were treated in accordance  
124 to the guidelines of the French ministry of Research. We used two experimental models of  
125 mice lung fibrosis by using intra-tracheal bleomycin or TGF- $\beta$ 1 adenovirus <sup>9</sup>. Bleomycin or  
126 saline was injected intra-tracheally and mice were sacrificed 3, 7 and 14 days after  
127 bleomycin administration as previously described <sup>10</sup>. In some experiments, we induced lung  
128 fibrosis by the intra-tracheal injection of TGF- $\beta$ 1 adenovirus (Ad-TGF $\beta$ ) or control virus (Ad-  
129 Ctrl), as previously described <sup>11</sup>. Ad-TGF $\beta$  or Ad-Ctrl were provided by Dr Martin Kolb

130 (McMaster University, Canada).  $2 \times 10^8$  plaque-forming units (PFU) in 50 $\mu$ l sterile saline  
131 were intra-tracheally administered and mice were sacrificed 21 days after instillation.  
132 Plasma and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were collected as previously described <sup>12,13</sup>.  
133 Hematoxylin-eosin and picosirius staining were performed to evaluate the morphology of the  
134 left lung. Semiquantitative histological grading of lung injury was performed by two  
135 independent observers according to Inoshima and colleagues <sup>14</sup>. Total RNA was extracted  
136 from mouse lung homogenates (middle lobe), and the expression of the genes of interest  
137 was quantified by real-time PCR, as previously described <sup>15</sup>. Proteins were extracted from  
138 lung homogenates (upper lobe) and western blotting was performed by standard techniques  
139 as previously described <sup>16</sup>. Total collagen content was assessed by hydroxyproline assay  
140 from the lower lobe <sup>17</sup>.  
141 All animal experiments were conducted with the approval of the local animal ethics  
142 committee (Paris Nord n°121", APAFiS #8795).

143

#### 144 **FGF19 overexpression *in vivo***

145 Recombinant non-replicative and non-integrative adeno-associated-viruses (AAV) were  
146 obtained from NGM Biopharmaceuticals Inc. (San Francisco, California). AAVs were  
147 already formulated in ready-to-inject solution. The sequence of control (AAV-GFP) and  
148 recombinant (AAV-FGF19) AAV differed only in the human FGF19 gene or GFP gene  
149 inserted into the AAV. AAVs were stored at -80 °C until use. We injected  $6 \times 10^{10}$  AAV  
150 genome per mouse via the tail vein 14 days before the intratracheal administration of  
151 bleomycin or before the intratracheal administration of Ad-TGF $\beta$  or Ad-Ctrl.

152

#### 153 **Human lung fibroblast culture**

154 Primary lung fibroblasts were isolated from IPF and control lung tissue samples according to  
155 a previously described protocol <sup>18</sup>. Fibroblasts were cultured in DMEM (ThermoFischer  
156 Scientific, Waltham, USA) supplemented with 10% fetal calf-serum (FCS) and antibiotics.  
157 Primary lung fibroblasts were used between passages 3 and 6 passed according to routine

158 procedures. Unless stated otherwise, fibroblasts were washed twice with PBS and serum-  
159 starved 16 hours before stimulation, as previously described <sup>19</sup>.

160

161 Study of myofibroblast differentiation:

162 In preliminary dose-finding experiments, we determined that a concentration of 5 ng/ml for  
163 FGF19 was optimal to induce ERK phosphorylation at 10 min (data not shown). Primary  
164 human lung fibroblasts were plated in 6-well plates for 24 h then starved in DMEM with 0%  
165 fetal calf serum for 16 h before stimulation. Serum-starved fibroblasts were cultured for 1 h  
166 with or without FGF19 (5 ng/mL), then the media was removed and FGF19 (5 ng/ml) or TGF-  
167  $\beta$ 1 (1 ng/ml) (R&D Systems) or both (for the cells pre stimulated with FGF19) were added for  
168 the next 48 hours. Absence of stimulation was used as the basal condition.

169 **Murine alveolar type II cell culture and apoptosis assay**

170 MLE15, an immortalized mouse lung epithelial cell line that maintains some morphological  
171 and functional characteristics of AEC2, a generous gift from Jeffrey Whitsett (Cincinnati,  
172 USA),  
173 were cultured in hydrocortisone, insulin, transferrin, estradiol and selenium (HITES) medium  
174 <sup>20</sup>. For apoptosis assay, MLE15 were cultured for 1 h with or without FGF19 (5 ng/ml), then  
175 apoptosis was induced by incubation with staurosporine (1  $\mu$ M) for 16 h in presence or  
176 absence of FGF19 (5 ng/mL).

177

178 **Elisa**

179 FGF19 levels were measured in plasma and BAL samples from controls and IPF patients,  
180 and from mice injected with AAV, using an Elisa kit (RD191107200R; Bio Vendor, Brno,  
181 Czech Republic). IPF patients were classified according to their GAP stage<sup>21</sup> and we  
182 compared FGF19 levels between the different stages.

183 FGF15 is the murine orthologue of FGF15. We quantified FGF15 using an Elisa Kit  
184 (SEL154Mu; Cloud-Clone Corp, Wuhan, China).

185 Murine TGF $\beta$  levels were quantified in the BAL of the mice injected with AAVs using an Elisa  
186 kit (DY1679; R&D systems, Minnesota, US)

187

#### 188 **Immunohistochemistry**

189

190 The paraffin-embedded sections were treated as previously described <sup>15</sup>. Antibodies are  
191 reported in Supplemental Table S1. To test the specificity of immunostaining, antibodies  
192 were replaced by a matched control Isotype. All digital images of light microscopy were  
193 acquired with a DM400B microscope (Leica) equipped with a Leica DFC420 CDD camera  
194 and analyzed with Calopix software (TRIBVN). For semi quantitative assessment of pro-SPC  
195 expression (Ebioscience, San Diego, USA) by immunochemistry, the positive cells and the  
196 total number of cells (nuclei) were enumerated in the lung, excluding the vessels and  
197 bronchi, using Calopix Software (TRIBVN), as previously described <sup>22</sup>.

198

#### 199 **mRNA analysis**

200 Total mRNA was extracted from mice lung (middle lobe) and cells. cDNA was obtained by  
201 standard techniques as described <sup>23</sup>. 18S transcripts were used as an endogenous RNA  
202 control. FGF19 mRNA was quantified by TaqMan<sup>®</sup> gene expression assays (Life  
203 technologies, Saint Aubin, France). All the other transcripts were quantified with SybrGreen  
204 real-time PCR master mix (see Supplemental Table S2 for primers sequences) with use of  
205 PCR ABI 7500 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA).

#### 206 **Protein analysis**

207 Lung of mice (upper lobe) and cells were lyzed on ice in RIPA buffer supplemented with  
208 protease inhibitor cocktail as described <sup>15</sup>. See Supplemental Table S1 for primary antibodies  
209 used in this work. Digital images were acquired with a gel imaging system (PXi, Syngene,

210 Cambridge, UK) equipped with a CCD camera. Western blot analysis was quantified with  
211 Gene tools software (Syngene, Cambridge, UK).

#### 212 **Collagen content analysis**

213 Right lower lobe was weighed and lyzed on ice in saline serum. Total collagen was quantified  
214 with the hydroxyproline assay protein kit (Sigma Aldrich), according to the manufacturer  
215 instructions.

#### 216 **Statistical analysis**

217 Data are presented as dot plot with median. Statistical analysis used Prism 6 software  
218 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Experimental groups were compared first with a  
219 nonparametric ANOVA equivalent (the Kruskal-Wallis test) and, if significant, pairwise  
220 comparisons were performed with the Dunns test. Comparison of histological scores on Day  
221 14 was performed with Fisher's exact test.  $p < 0.05$  was considered statistically significant.  
222

223 **RESULTS**

224

225 **FGF19 plasma levels are decreased in IPF patients**

226 We first assessed FGF19 concentration in plasma and BAL fluid from IPF patients and  
227 controls patients. Controls and IPF were similar on age, tobacco exposure and BMI (Table  
228 1). FGF19 was never detected in BAL fluid of IPF or control patients. FGF19 plasma  
229 concentration was decreased in IPF patients compared to controls (Figure 1A). To determine  
230 if FGF19 concentration was related with IPF prognosis, we compared FGF19 levels in IPF  
231 patients classified according to their GAP score, a validated score to predict the mortality  
232 related to IPF course<sup>24</sup>. Patients with a less severe disease (GAP I) had higher FGF19  
233 plasma levels than patients with a more severe disease (GAP II or III) (Figure 1B).

234

235

236 **AAV-induced FGF19 overexpression in naive mice**

237 Then, we undertook to investigate the effect of FGF19 overexpression in an experimental  
238 model of murine lung fibrosis using an AAV approach. AAV is a small (25-nm), nonenveloped  
239 virus that packages a linear single-stranded DNA genome. We took advantage of the lack of  
240 pathogenicity and immunogenicity of AAV in order to overexpress FGF19 in a bleomycin-  
241 induced lung fibrosis model.

242 In a first set of experiments, we injected naive mice with AAV-GFP or AAV-FGF19 and we  
243 assessed FGF19 plasma levels on day 14 and day 28 after AAV injection. FGF19 was never  
244 detected in mice injected with AAV-GFP whereas FGF19 plasma concentration increased  
245 gradually until day 28 in mice injected with AAV-FGF19 (Supplementary Figure 1A). The  
246 mean plasma FGF19 concentration measured in mice injected with AAV-FGF19 was 0.8  
247 ng/mL at D28 ([Supplementary Figure 1A](#)).

248 Mice injected with saline serum or AAV-GFP or AAV-FGF19 had normal lung morphology  
249 (Supplementary Figure 1B) and showed a similar expression of lung fibrosis markers,  
250 ACTA2, COL1a1, FNI, at mRNA and protein levels (Supplementary Figure 1D, 1E, 1G) and a

251 similar lung collagen content as assessed by hydroxyproline assay (Supplementary Figure  
252 1F). .  
253  
254 **Characterization of FGF19 overexpression in the experimental model of lung fibrosis**  
255 First, we investigated whether the levels of FGF15, the murine orthologue of FGF19, were  
256 potentially perturbed in our experimental model of lung fibrosis. We assessed FGF15 plasma  
257 and BAL concentration in naive mice or 14 days after an intra tracheal administration of  
258 saline or bleomycin (Supplementary Figure 1C). Intratracheal bleomycin did not influence the  
259 FGF15 level in plasma (Supplementary Figure 1E). *Fgf15* mRNA was not detected in the lung  
260 of these mice (data not shown).  
261 To induce a peak of FGF19 during the fibrotic phase of our experimental model , we injected  
262 AAV-FGF19 in mice 14 days before intratracheal bleomycin administration (Figure 2A);  
263 based upon our results in naive mice treated with AAV-FGF19 (see Figure Supplemental 1).  
264 Control mice received AAV-GFP. We measured FGF19 concentration in plasma (Figure 2B)  
265 and BAL fluid harvested 3, 7, and 14 days after AAV bleomycin injection (Figure 2C). FGF19  
266 was never detected in mice injected with AAV-GFP. FGF19 concentration increased  
267 gradually in plasma and was detected in BAL 14 days after bleomycin. .  
268 To investigate the source of FGF19 production, we assessed the mRNA expression of  
269 FGF19 both in lung and liver (Figure 2C). As expected, FGF19 mRNA was not detected in  
270 AAV-GFP mice, neither in the liver or the lung. FGF19 mRNA was strongly expressed in the  
271 liver of AAV-FGF19 mice, while it was detected at a very low level in the lung in 5/10 mice on  
272 day 7 after bleomycin and in 2/20 mice on day 14 after bleomycin. GFP immunostaining  
273 confirmed the liver as the main target of the AAVs since hepatocytes were strongly positive  
274 whereas no GFP immunostaining was detected in the lung (Figure 2D).  
275  
276  
277

278 **FGF19 overexpression protects from lung fibrosis induced by bleomycin or AdTGF $\beta$**   
279 **intra tracheal administration**

280 We assessed the effect of FGF19 overexpression on lung fibrosis development in mice. At  
281 D14 after bleomycin administration, mice injected with AAV-FGF19 showed less lesions than  
282 those injected with AAV-GFP as assessed by an histological score (Figure 3A-B). These  
283 morphological observations were associated with a significant decrease of collagen and  
284 fibronectin content at mRNA and protein level in AAV-FGF19 group compared to AAV-GFP  
285 group (Figure 3C-E). Additionally, the decrease of lung collagen content in the AAV-FGF19  
286 group was supported by hydroxyproline assay (Figure 3F) and morphologically by picrosirius  
287 staining (Figure 3G).

288 We confirmed the FGF19 anti-fibrotic properties in a second experimental model of lung  
289 fibrosis. AAV-GFP or AAV-FGF19 was injected 14 days before intra-tracheal administration  
290 of AdTGF $\beta$  (Figure 4A). Mice of AAV-FGF19 group showed a significant decrease of fibrosis  
291 extent (Figure 4B) with a significant decrease of lung collagen content (Figure 4C) and a  
292 significant decrease of Collagen 1 and Fibronectin expression at protein level (Figure 4D,  
293 4E) and at mRNA level (Figure 4F) as compared to the the mice of the AAV-GFP group.  
294 Altogether, these data indicate that systemically delivered FGF19 exerts a potent antifibrotic  
295 effect in the lung.

296 **FGF19 overexpression is associated with a decrease of pro-fibrotic mediators**

297 In order to understand the anti-fibrotic properties of FGF19, we first investigated the effect of  
298 FGF19 overexpression on the lung expression of pro- and anti-fibrotic mediators during  
299 bleomycin-induced injury. From D3 to D14, TGF $\beta$  levels in BAL fluid were significantly  
300 decreased in AAV-FGF19 group compared to AAV-GFP group (Figure 5A), while lung mRNA  
301 content of *Tgf $\beta$* , *Ctgf* and *Pai-1* were decreased at D14 (Figure 5B). By contrast, the  
302 expression of *Fgf7*, *Fgf10* and *Hgf*, three anti-fibrotic mediators, were similar in both groups  
303 (Figure 5C).

304 Analysis of BAL cytology (Figure 5D) revealed a moderate but significant decrease of BAL  
305 cellularity at D3 and D7 in the AAV-FGF19 group, whereas there was no difference regarding

306 the cell differential. Lung content of *Tnfa*, *Il1*, and *Il6* mRNA, typical proinflammatory  
307 cytokines was similar in both groups at D3, D7 and D14 (Figure 5E).

308

### 309 **FGF19 overexpression protects from apoptosis in the lung**

310 Type 2 alveolar epithelial cell apoptosis has been identified as a crucial trigger of lung  
311 fibrogenesis course <sup>25</sup>. Poly ADP polymerase (PARP) is one of several known cellular  
312 substrates of caspases. Cleavage of PARP-1 by caspases is considered to be a hallmark of  
313 apoptosis <sup>26</sup>. Cleaved PARP accumulates in the fibrotic lung after bleomycin-induced lung  
314 injury <sup>27</sup>. In vivo, we observed that cleaved PARP content was decreased in the lung of AAV-  
315 FGF19 treated mice at D7 and at D14 after bleomycin, compared to the mice receiving the  
316 AAV-GFP (Figure 6A, 6B). To further explore the apoptotic process, we analyzed the  
317 expression of proteins of the BCL2 family, which are involved in the control of the apoptosis  
318 process <sup>28</sup>. The pro-apoptotic BAX and BAK proteins are considered as gatekeepers for the  
319 mitochondrial apoptotic pathway, while BIM and BID, BH3-only protein members of the BCL2  
320 family, are key upstream regulators of BAX and BAK activation <sup>28</sup>. We observed that Bid,  
321 Bax and Bak lung content was similar in both groups [at protein level](#) (data not shown) while  
322 BIM protein content was significantly decreased in AAV-FGF19 at D7 and D14 (Figure 6C-D)  
323 whereas *Bim* mRNA content was similar in both groups (Figure 6E).

324 Interestingly, Pro-SPC immunostaining revealed a significant increase of positive cells in  
325 AAV-FGF19 treated mice compared to the AAV-GFP group on day 14 (Figure 7A-B). To  
326 investigate the effect of FGF19 on the apoptotic process in the alveolar epithelium, we  
327 triggered apoptosis in murine alveolar epithelial cells (MLE15) with staurosporin (1 $\mu$ M), in the  
328 presence or absence of FGF19 (5 ng/mL) and we assessed cleaved PARP content (Figure  
329 7C-D). We observed that FGF19 inhibited staurosporin-induced increase in cleaved PARP in  
330 MLE15 cells. FGF19 stimulation was associated with a significant decrease of *Bim* at mRNA  
331 and protein levels (Figure 7E-G).

332 These data suggest that FGF19 exerts part of its antifibrotic action through the modulation of  
333 the apoptosis machinery with a decrease of Bim content and the consequent inhibition of  
334 alveolar epithelial cell apoptosis.

335

336 **FGF19 prevents myofibroblast differentiation by decreasing JNK phosphorylation.**

337 IPF is characterized by the differentiation of lung fibroblast into myofibroblast responsible of  
338 the accumulation of extra cellular matrix protein. To determine whether FGF19 could  
339 modulate fibroblast to myofibroblast differentiation, we assessed the expression of collagen  
340 and fibronectin by lung fibroblasts from IPF or control patients at mRNA and protein levels  
341 after TGF $\beta$  stimulation in vitro. We observed that FGF19 partially inhibited TGF $\beta$ -stimulated  
342 collagen and fibronectin expression in vitro (Figure 9A-B), with a concomitant decrease of  
343 *Pai-1*, *Ctgf* or *Gli1* mRNA (Figure 9A). These factors are expressed consecutively to TGF $\beta$   
344 pathway activation. This led us to hypothesize that FGF19 directly interfered with TGF $\beta$   
345 transduction pathway. We first assessed the phosphorylation of Smad-3 as a marker of the  
346 activation of the TGF $\beta$  canonical pathway in vitro. TGF $\beta$ -induced Smad-3 phosphorylation  
347 was not influenced by FGF19 (Figure 9B-C), suggesting that FGF19 targeted non-canonical  
348 TGF $\beta$  transduction pathways. TGF $\beta$  has been consistently shown to activate the JNK  
349 pathway<sup>29</sup> and JNK activation is a prominent event in lung fibrosis<sup>30</sup>. We observed that  
350 FGF19 stimulation prevented TGF $\beta$ -induced JNK phosphorylation TGF $\beta$  (Figure 9D, 9E).  
351 Altogether, these data suggest that FGF19 prevented myofibroblast differentiation induced  
352 by TGF $\beta$  by inhibiting JNK phosphorylation.

353

354 **DISCUSSION**

355 To our knowledge, this is the first attempt to study the influence of FGF19 in IPF  
356 pathophysiology. In this work, we demonstrated that, 1) FGF19 plasma concentration was  
357 decreased in IPF patients compared to controls, 2) FGF19 overexpression prevented  
358 bleomycin-induced lung fibrosis in mice, 3) FGF19 prevented alveolar epithelial cells  
359 apoptosis by decreasing the content of the pro-apoptotic protein BIM, and 4) FGF19  
360 prevented TGF $\beta$ -induced myofibroblast differentiation by decreasing JNK phosphorylation in  
361 vitro . Altogether, these results strongly support the anti-fibrotic properties of FGF19 in the  
362 lung and identify reduced FGF19 in IPF patients as an innovative therapeutic target in IPF.

363 The influence of paracrine FGFs, such as FGF1<sup>31</sup>, FGF2<sup>32</sup>, FGF7<sup>33</sup>, FGF9<sup>22</sup>, FGF10<sup>34</sup> and  
364 FGF18<sup>15</sup>, on lung fibrogenesis course has been intensively investigated over the past  
365 decade, while it was only recently that endocrine FGF, FGF21 and FGF23, were identified  
366 as possible modulators of the fibrotic response <sup>35 36</sup>. FGF15/19 is secreted from ileal  
367 enterocytes and circulates as a hormone. By targeting the liver, FGF15/19 acts as a potent  
368 regulator of bile acid and metabolic homeostasis<sup>5</sup>. FGF15/19 binds to a receptor complex  
369 composed of FGFR1/4 and the transmembrane protein  $\beta$ -Klotho (KLB), which leads to  
370 activation of the extracellular-signal-regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2) and other  
371 downstream kinases. The co-receptor KLB enables FGF15/19 to signal through FGFR1/4,  
372 and is thus recognized as essential for the biological functions of FGF19. We previously  
373 reported that FGFR1 and FGFR4 were detected in the fibrotic lung <sup>19</sup>

374 In this study, we observed that IPF patients showed lower plasma FGF19 levels than age-  
375 matched control patients with similar BMI, the lower levels being observed in the most severe  
376 patients, as assessed by the GAP index. FGF19 is down-regulated in several pathological  
377 conditions such as metabolic syndrome and obesity <sup>37, 38</sup>. The decrease of FGF19 in IPF  
378 patients must be confirmed in a larger cohort but could be linked to the increased prevalence  
379 of metabolic syndrome in this population. Indeed, IPF patients have a 2 to 4-fold increased

380 prevalence of diabetes mellitus, and a 2-3-fold increased relative risk of developing  
381 cardiovascular comorbidities <sup>39</sup>.

382 Using an AAV approach, we successfully induced FGF19 expression in the liver with  
383 circulating FGF19 that reached the lung and was detected in BAL fluid. A very low  
384 expression of *FGF19* mRNA was detected in the lung in some mice. The mean plasma  
385 FGF19 concentration measured in mice injected with AAV-FGF19 was similar to that  
386 measured in healthy subjects. Indeed, fasting FGF19 plasma concentration in control  
387 subjects is 0.19 ng/ml (range 0.05–0.59 ng/ml) and this doubles after meals in response to  
388 absorption of bile acids by the intestine <sup>40</sup>. We showed that mice exposed to FGF19 were  
389 partially protected from bleomycin-induced and TGF $\beta$ -induced lung fibrosis. To our  
390 knowledge, this is the first demonstration that FGF19 has anti-fibrotic properties in the lung.  
391 Based on this observation, we decided to induce a high physiological concentration of  
392 FGF19 in an experimental model of murin lung fibrosis and to stimulate lung fibroblast and  
393 alveolar type II cell with FGF19.

394 Our in vitro and in vivo observations indicate that FGF19 inhibited AEC2 apoptosis. AEC  
395 injury and death are a consistent finding in the lung of IPF patients <sup>41</sup> and bleomycin-induced  
396 pulmonary fibrosis is characterized by early induction of reactive oxygen species (ROS)-  
397 dependent AEC death <sup>42</sup>. In this study, we identified BIM, a pro apoptotic mediator, as a  
398 target of FGF19. The BH3-only BIM protein is a major determinant for initiating the intrinsic  
399 apoptotic pathway under both physiological and pathophysiological conditions <sup>43</sup>.  
400 Endoplasmic reticulum stress (ER stress) is a major trigger of AEC2 apoptosis in pulmonary  
401 fibrosis <sup>44</sup>. ER stress induces apoptosis through BIM activation <sup>45</sup>. MAP kinases are involved  
402 in the regulation of the pro-apoptotic activity of BIM <sup>46</sup>. ERK-mediated phosphorylation  
403 targets Bim for ubiquitination and proteasomal degradation, allowing to keep low level of BIM  
404 <sup>47</sup>. Phosphorylation of BIM by ERK1/2 at Ser69, induced by FGF2, was shown to rescue cells  
405 from serum-deprivation-induced apoptosis <sup>48</sup>. JNK has also been shown to control BIM <sup>47</sup>.  
406 We were not able to detect phosphorylated Bim in epithelial cells nor in fibroblasts after

407 FGF19 stimulation in vitro. This may be due to a rapid degradation of phosphorylated BIM.

408 Beside preventing AEC2 apoptosis, FGF19 may also exert its antifibrotic effect by targeting  
409 lung fibroblast. Indeed, we showed that FGF19 prevented TGF $\beta$ -induced myofibroblast  
410 differentiation through the inhibition of the JNK pathway. The JNK pathway has been  
411 previously implicated in lung fibrosis. The activation of this pathway leads to the  
412 phosphorylation of c-Jun and to a cascade of downstream molecules phosphorylation, and  
413 regulates many functions implicated in the cell behavior such as survival, apoptosis and  
414 fibroblast-to-myofibroblast differentiation. Indeed, inhibition of JNK phosphorylation was  
415 previously demonstrated to prevent myofibroblast differentiation induced by TGF $\beta$  <sup>49</sup>. *In vivo*,  
416 JNK deficient mice are protected from bleomycin-induced pulmonary fibrosis <sup>50</sup>.

417 Our result emphasized the anti-fibrotic properties of FGF19 observed in the liver <sup>51</sup>. Indeed,  
418 FGF19 overexpression has been previously shown to deliver antisteatotic activities, to  
419 decrease collagen, smooth muscle actin, desmin, and vimentin expression and to reduce  
420 TGF $\beta$  expression in the liver of mice after CCL4 exposure. Anti-apoptotic properties of  
421 FGF19 were also observed in the liver. Indeed, mice treated with AAV-FGF19 showed a  
422 decrease of Bax and Bid, two key factors of cell death machinery <sup>52</sup>. These results were  
423 recently translated in human. NGM282, an engineered FGF19 analogue, was shown to  
424 decrease liver fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis<sup>53</sup>. Our data strongly  
425 support the evaluation of FGF19 analogues in patients with fibrotic lung disorders.  
426

427 **Acknowledgement**

428 We thank Olivier Thibaudeau and Laure Wingertsmann (Morphology Platform, Inserm U1152  
429 of X. Bichat Medical School, Paris) for their efficient collaboration. We also thank Dr. Virginie  
430 Fossey-Diaz (Service de gériatrie générale et soins palliatifs, Hôpital Bretonneau, Paris  
431 France) for providing plasma samples from control patients. We thank Valerie Besnard and  
432 Martin Kold who provided MLE15 lineage and adenovirus TGF $\beta$  respectively. This work was  
433 supported by the ANR (Bruno), by grants from the Chancellery of Paris Universities (Poix  
434 Legacy), and by the "Association Pierre ENJALRAN pour la fibrose pulmonaire idiopathique-  
435 APEFPI". A. Justet was supported by the "Fondation Recherche Médicale" (Grant FRM  
436 2016, FDM41320); The authors declare no conflicts of interest.

437

438 **Bibliography**

- 439 1. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various  
440 fibroproliferative diseases. *J Clin Invest.* 2007;117(3):524-529. doi:10.1172/JCI31487
- 441 2. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement:  
442 idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and  
443 management. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183(6):788-824. doi:10.1164/rccm.2009-  
444 040GL
- 445 3. Richeldi L, Collard HR, Jones MG. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet.*  
446 2017;389(10082):1941-1952. doi:10.1016/S0140-6736(17)30866-8
- 447 4. Goetz R, Mohammadi M. Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens  
448 of structural biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(3):166-180. doi:10.1038/nrm3528
- 449 5. Degirolamo C, Sabbà C, Moschetta A. Therapeutic potential of the endocrine  
450 fibroblast growth factors FGF19, FGF21 and FGF23. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15(1):51-  
451 69. doi:10.1038/nrd.2015.9
- 452 6. Zhou M, Learned RM, Rossi SJ, DePaoli AM, Tian H, Ling L. Engineered fibroblast  
453 growth factor 19 reduces liver injury and resolves sclerosing cholangitis in Mdr2-  
454 deficient mice. *Hepatology.* 2016;63(3):914-929. doi:10.1002/hep.28257
- 455 7. Harrison SA, Rinella ME, Abdelmalek MF, et al. NGM282 for treatment of non-  
456 alcoholic steatohepatitis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled,  
457 phase 2 trial. *Lancet.* 2018;391(10126):1174-1185. doi:10.1016/S0140-  
458 6736(18)30474-4
- 459 8. Raghu G, Remy-Jardin M, Myers JL, et al. Diagnosis of Idiopathic Pulmonary  
460 Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care*  
461 *Med.* 2018;198(5):e44-e68. doi:10.1164/rccm.201807-1255ST
- 462 9. Moore BB, Hogaboam CM. Murine models of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol*  
463 *Lung Cell Mol Physiol.* 2008;294(2):L152-160. doi:10.1152/ajplung.00313.2007
- 464 10. Bantsimba-Malanda C, Marchal-Sommé J, Goven D, et al. A role for dendritic cells  
465 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice? *Am J Respir Crit Care Med.*  
466 2010;182(3):385-395. doi:10.1164/rccm.200907-1164OC
- 467 11. Besnard V, Dagher R, Madjer T, et al. Identification of periplakin as a major  
468 regulator of lung injury and repair in mice. *JCI Insight.* 2018;3(5).  
469 doi:10.1172/jci.insight.90163
- 470 12. Decolonne N, Wettstein G, Kolb M, et al. Bleomycin induces pleural and subpleural  
471 fibrosis in the presence of carbon particles. *Eur Respir J.* 2010;35(1):176-185.  
472 doi:10.1183/09031936.00181808
- 473 13. Moshai EF, Wémeau-Stervinou L, Cigna N, et al. Targeting the hedgehog-glioma-  
474 associated oncogene homolog pathway inhibits bleomycin-induced lung fibrosis in mice.  
475 *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014;51(1):11-25. doi:10.1165/rcmb.2013-0154OC
- 476 14. Inoshima I, Kuwano K, Hamada N, et al. Anti-monocyte chemoattractant protein-1  
477 gene therapy attenuates pulmonary fibrosis in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*  
478 2004;286(5):L1038-1044. doi:10.1152/ajplung.00167.2003
- 479 15. Joannes A, Brayer S, Besnard V, et al. FGF9 and FGF18 in idiopathic pulmonary  
480 fibrosis promote survival and migration and inhibit myofibroblast differentiation of  
481 human lung fibroblasts in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* January  
482 2016;ajplung.00185.2015. doi:10.1152/ajplung.00185.2015
- 483 16. Cigna N, Farrokhi Moshai E, Brayer S, et al. The hedgehog system machinery  
484 controls transforming growth factor- $\beta$ -dependent myofibroblastic differentiation in  
485 humans: involvement in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* 2012;181(6):2126-  
486 2137. doi:10.1016/j.ajpath.2012.08.019

- 487 17. Bardou O, Menou A, François C, et al. Membrane-anchored Serine Protease  
488 Matriptase is a Trigger of Pulmonary Fibrogenesis. *Am J Respir Crit Care Med*. November  
489 2015. doi:10.1164/rccm.201502-02990C
- 490 18. Menou A, Flajolet P, Duitman J, et al. Human airway trypsin-like protease exerts  
491 potent, antifibrotic action in pulmonary fibrosis. *FASEB J*. 2018;32(3):1250-1264.  
492 doi:10.1096/fj.201700583R
- 493 19. Joannes A, Brayer S, Besnard V, et al. FGF9 and FGF18 in idiopathic pulmonary  
494 fibrosis promote survival and migration and inhibit myofibroblast differentiation of  
495 human lung fibroblasts in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016;310(7):L615-  
496 629. doi:10.1152/ajplung.00185.2015
- 497 20. Wikenheiser KA, Vorbroke DK, Rice WR, et al. Production of immortalized distal  
498 respiratory epithelial cell lines from surfactant protein C/simian virus 40 large tumor  
499 antigen transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(23):11029-11033.  
500 doi:10.1073/pnas.90.23.11029
- 501 21. Ley B, Ryerson CJ, Vittinghoff E, et al. A multidimensional index and staging  
502 system for idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann Intern Med*. 2012;156(10):684-691.  
503 doi:10.7326/0003-4819-156-10-201205150-00004
- 504 22. Justet A, Joannes A, Besnard V, et al. FGF9 prevents pleural fibrosis induced by  
505 intrapleural adenovirus injection in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*.  
506 2017;313(5):L781-L795. doi:10.1152/ajplung.00508.2016
- 507 23. Cigna N, Farrokhi Moshai E, Brayer S, et al. The hedgehog system machinery  
508 controls transforming growth factor- $\beta$ -dependent myofibroblastic differentiation in  
509 humans: involvement in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*. 2012;181(6):2126-  
510 2137. doi:10.1016/j.ajpath.2012.08.019
- 511 24. Ley B, Ryerson CJ, Vittinghoff E, et al. A multidimensional index and staging  
512 system for idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann Intern Med*. 2012;156(10):684-691.  
513 doi:10.7326/0003-4819-156-10-201205150-00004
- 514 25. Thannickal VJ. Evolving Concepts of Apoptosis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis.  
515 *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2006;3(4):350-356.  
516 doi:10.1513/pats.200601-001TK
- 517 26. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*.  
518 2007;35(4):495-516. doi:10.1080/01926230701320337
- 519 27. Hu B, Wu Z, Hergert P, Henke CA, Bitterman PB, Phan SH. Regulation of  
520 myofibroblast differentiation by poly(ADP-ribose) polymerase 1. *Am J Pathol*.  
521 2013;182(1):71-83. doi:10.1016/j.ajpath.2012.09.004
- 522 28. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the  
523 balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(3):175-193.  
524 doi:10.1038/s41580-018-0089-8
- 525 29. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res*. 2009;19(1):128-  
526 139. doi:10.1038/cr.2008.328
- 527 30. van der Velden LJ, Ye Y, Nolin JD, et al. JNK inhibition reduces lung remodeling  
528 and pulmonary fibrotic systemic markers. *Clinical and Translational Medicine*.  
529 2016;5(1). doi:10.1186/s40169-016-0117-2
- 530 31. Shimbori C, Bellaye P-S, Xia J, et al. Fibroblast growth factor-1 attenuates TGF- $\beta$ 1-  
531 induced lung fibrosis. *J Pathol*. 2016;240(2):197-210. doi:10.1002/path.4768
- 532 32. Koo HY, El-Baz LM, House S, et al. Fibroblast growth factor 2 decreases  
533 bleomycin-induced pulmonary fibrosis and inhibits fibroblast collagen production and  
534 myofibroblast differentiation. *J Pathol*. 2018;246(1):54-66. doi:10.1002/path.5106

- 535 33. Marchand-Adam S, Plantier L, Bernuau D, et al. Keratinocyte growth factor  
536 expression by fibroblasts in pulmonary fibrosis: poor response to interleukin-1beta. *Am*  
537 *J Respir Cell Mol Biol*. 2005;32(5):470-477. doi:10.1165/rcmb.2004-0205OC
- 538 34. Gupte VV, Ramasamy SK, Reddy R, et al. Overexpression of fibroblast growth  
539 factor-10 during both inflammatory and fibrotic phases attenuates bleomycin-induced  
540 pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(5):424-436.  
541 doi:10.1164/rccm.200811-1794OC
- 542 35. Zhang S, Yu D, Wang M, et al. FGF21 attenuates pulmonary fibrogenesis through  
543 ameliorating oxidative stress in vivo and in vitro. *Biomed Pharmacother*.  
544 2018;103:1516-1525. doi:10.1016/j.biopha.2018.03.100
- 545 36. Barnes JW, Duncan D, Helton S, et al. Role of fibroblast growth factor 23 and  
546 klotho cross talk in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*.  
547 2019;317(1):L141-L154. doi:10.1152/ajplung.00246.2018
- 548 37. Gallego-Escuredo JM, Gómez-Ambrosi J, Catalan V, et al. Opposite alterations in  
549 FGF21 and FGF19 levels and disturbed expression of the receptor machinery for  
550 endocrine FGFs in obese patients. *Int J Obes (Lond)*. 2015;39(1):121-129.  
551 doi:10.1038/ijo.2014.76
- 552 38. Alakhras M, Decker PA, Nadrous HF, Collazo-Clavell M, Ryu JH. Body mass index  
553 and mortality in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. 2007;131(5):1448-  
554 1453. doi:10.1378/chest.06-2784
- 555 39. Dalleywater W, Powell HA, Hubbard RB, Navaratnam V. Risk factors for  
556 cardiovascular disease in people with idiopathic pulmonary fibrosis: a population-based  
557 study. *Chest*. 2015;147(1):150-156. doi:10.1378/chest.14-0041
- 558 40. Feng S, Dakhova O, Creighton CJ, Ittmann M. Endocrine fibroblast growth factor  
559 FGF19 promotes prostate cancer progression. *Cancer Res*. 2013;73(8):2551-2562.  
560 doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4108
- 561 41. Myers JL, Katzenstein AL. Epithelial necrosis and alveolar collapse in the  
562 pathogenesis of usual interstitial pneumonia. *Chest*. 1988;94(6):1309-1311.  
563 doi:10.1378/chest.94.6.1309
- 564 42. Wallach-Dayana SB, Izbicki G, Cohen PY, Gerstl-Golan R, Fine A, Breuer R.  
565 Bleomycin initiates apoptosis of lung epithelial cells by ROS but not by Fas/FasL  
566 pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;290(4):L790-L796.  
567 doi:10.1152/ajplung.00300.2004
- 568 43. Sionov RV, Vlahopoulos SA, Granot Z. Regulation of Bim in Health and Disease.  
569 *Oncotarget*. 2015;6(27):23058-23134. doi:10.18632/oncotarget.5492
- 570 44. Burman A, Tanjore H, Blackwell TS. Endoplasmic reticulum stress in pulmonary  
571 fibrosis. *Matrix Biol*. 2018;68-69:355-365. doi:10.1016/j.matbio.2018.03.015
- 572 45. Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, et al. ER stress triggers apoptosis by  
573 activating BH3-only protein Bim. *Cell*. 2007;129(7):1337-1349.  
574 doi:10.1016/j.cell.2007.04.027
- 575 46. Sionov RV, Vlahopoulos SA, Granot Z. Regulation of Bim in Health and Disease.  
576 *Oncotarget*. 2015;6(27):23058-23134. doi:10.18632/oncotarget.5492
- 577 47. Ley R, Ewings KE, Hadfield K, Cook SJ. Regulatory phosphorylation of Bim: sorting  
578 out the ERK from the JNK. *Cell Death Differ*. 2005;12(8):1008-1014.  
579 doi:10.1038/sj.cdd.4401688
- 580 48. Grãos M, Almeida AD, Chatterjee S. Growth-factor-dependent phosphorylation of  
581 Bim in mitosis. *Biochem J*. 2005;388(Pt 1):185-194. doi:10.1042/BJ20041385
- 582 49. Hashimoto S, Gon Y, Takeshita I, Matsumoto K, Maruoka S, Horie T. Transforming  
583 growth factor-beta1 induces phenotypic modulation of human lung fibroblasts to

584 myofibroblast through a c-Jun-NH2-terminal kinase-dependent pathway. *Am J Respir*  
585 *Crit Care Med.* 2001;163(1):152-157. doi:10.1164/ajrccm.163.1.2005069  
586 50. Alcorn JF, van der Velden J, Brown AL, McElhinney B, Irvin CG, Janssen-Heininger  
587 YMW. c-Jun N-terminal kinase 1 is required for the development of pulmonary fibrosis.  
588 *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009;40(4):422-432. doi:10.1165/rcmb.2008-0174OC  
589 51. Yu C, Wang F, Jin C, Wu X, Chan W, McKeehan WL. Increased carbon  
590 tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in FGFR4-deficient mice. *Am J Pathol.*  
591 2002;161(6):2003-2010. doi:10.1016/S0002-9440(10)64478-1  
592 52. Zhou M, Learned RM, Rossi SJ, DePaoli AM, Tian H, Ling L. Engineered FGF19  
593 eliminates bile acid toxicity and lipotoxicity leading to resolution of steatohepatitis and  
594 fibrosis in mice. *Hepatol Commun.* 2017;1(10):1024-1042. doi:10.1002/hep4.1108  
595 53. Harrison SA, Rinella ME, Abdelmalek MF, et al. NGM282 for treatment of non-  
596 alcoholic steatohepatitis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled,  
597 phase 2 trial. *Lancet.* 2018;391(10126):1174-1185. doi:10.1016/S0140-  
598 6736(18)30474-4  
599  
600  
601

602 Table 1  
603

	Controls	IPF	p
Age (Years)	75.4 ± 2	73.6 ± 9.2	0.63
Sex ratio (male/female)	7/5	18/4	0.39
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	29.1 ± 5.3	31.5 ± 3.1	0.56
Tobacco exposure (pack.years)	15.8 ± 3.2	25.0 ± 6.2	0.32

604  
605

606 Figure legends

607

608 **Figure 1: Plasma FGF19 concentration is decreased in IPF patients**

609 (A) Dot plots with median and SD showing FGF19 plasma concentration in controls (n= 12)

610 and IPF patients (n=22) assessed by Elisa. (B) Dot plots with median showing FGF19

611 plasma concentrations in IPF patients classified according to their GAP stage. (C) Dot plots

612 with median showing mice lung mRNA expression of *Acta 2*, *Collagen 1  $\alpha$  1*, *Fibronectin*, 14

613 days after bleomycin administration. (D) Dot plots with median showing FGF15 plasma

614 concentration in mice 14 days after bleomycin administration, assessed by Elisa. Mann

615 Whitney U test, \*p $\leq$ 0.05, \*\*p $\leq$ 0.01, \*\*\*<0,001

616

617 **Figure 2: Characterization of FGF19 overexpression in an experimental mice lung**  
618 **fibrosis.**  
619 (A) Treatment protocols is as follows, AAV-GFP ( $6 \times 10^{10}$  adeno associated virus genome) or  
620 AAV-FGF19 were intravenously injected in C57Bl6 mice 14 days before intracheal bleomycin  
621 administration. Mice were sacrificed 3 days, 7 days and 14 days after bleomycin  
622 administration. (B) Dot plots with mean and SD showing FGF19 concentrations in plasma  
623 (left panel) and Bal at D3, D7 and D14 after bleomycin administration. (C) Dot plot with  
624 median showing FGF19 mRNA expression in liver and lung of mice sacrificed at D14 (D)  
625 Representative immunohistochemistry images (n=5 per group) showing GFP staining  
626 (maroon) in liver (up panels) and lung (right panels) of mice injected with AAV-GFP or AAV-  
627 FGF19 and sacrificed at D14. Nuclei were counterstained with hematoxylin. Note the  
628 absence of GFP staining in the lung or in the liver of mice injected with AAV-FGF19. GFP  
629 positive were only detected in the liver of AAV-GFP group, where as no positive cells were  
630 detected in the lung (Scale bar: 80 $\mu$ m).  
631

632 **Figure 3: FGF19 overexpression inhibits lung fibrosis in mice induced by intra**  
633 **tracheal administration of bleomycin.**  
634 (A) Representative Hematoxylin and eosin staining of lung tissue sections from mice injected  
635 with saline serum or AAV-GFP or AAV-FGF19 and sacrificed at D14. (Scale bar: 1000  $\mu$ m in  
636 low magnification images and 40  $\mu$ m in high magnification ones). (B) Injury score at day 14 of  
637 bleomycin mice injected with AAV-GFP or AAV-FGF19. (C) Dot plots with median showing  
638 mRNA expression, *Collagen 1  $\alpha$  1*, Fibronectin in mice treated with AAV-GFP or AAV-  
639 FGF19. (D) Representative immunoblots showing Fibronectin, collagen and  $\alpha$  SMA content  
640 of mice treated with AAV-GFP or AAV-FGF19. (E) Immunoblot analysis, dot plot with median  
641 showing SMA, collagen, fibronectin lung expression mice  $\beta$  tubulin was used as a loading  
642 control. (F) Dot plots with medians showing lung collagen content ( $\mu$ g/lobe) in mice treated  
643 with AAV-GFP or AAV-FGF19. (G) Representative immunochemistry images showing  
644 picrosirius staining at day 14 in mice treated with AAV-GFP or AAV-FGF19. Fisher's exact  
645 test (A), \$ p<0,05, Mann Whitney U test (C, E, F) \*p $\le$ 0.05, \*\*p $\le$ 0.01, \*\*\*<0,001  
646  
647

648 **Figure 4: FGF19 overexpression inhibits lung fibrosis in mice induced by intra**  
649 **tracheal administration of AdTGF $\beta$**   
650 (A) Treatment protocols is as follows, AAV-GFP ( $6 \times 10^{10}$  adeno associated virus genome) or  
651 AAV-FGF19 were intravenously injected in C57Bl6 mice 14 days before intratracheal AdTGF $\beta$   
652 administration and were sacrificed 21 days after AdTGF $\beta$  administration. (B) Representative  
653 Hematoxylin and eosin staining of lung tissue sections from mice injected or AAV-GFP or  
654 AAV-FGF19 and sacrificed at D21. (Scale bar: 1000  $\mu$ m in low magnification images and 40  
655  $\mu$ m in high magnification ones). (C) Injury score at day 21 after AdTGF $\beta$  administration in  
656 lung of mice injected with AAV-GFP or AAV-FGF19. (D) Dot plots with medians showing lung  
657 collagen content ( $\mu$ g/lobe) in mice treated with AAV-GFP or AAV-FGF19. (E) Representative  
658 immunoblots showing Fibronectin, collagen and  $\alpha$  SMA content of mice treated with AAV-  
659 GFP or AAV-FGF19. (F) Immunoblot analysis, dot plot with median showing SMA, collagen,  
660 fibronectin lung expression mice  $\beta$  tubulin was used as a loading control. (G) Dot plots with  
661 median showing mRNA expression , *Collagen 1  $\alpha$  1*, Fibronectin in mice treated with AAV-  
662 GFP or AAV-FGF19 Fisher's exact test (A),\*\*\*  $p < 0.001$ , Mann Whitney U test (D, E, F)  
663 \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$   
664  
665

666  
667 **Figure 5: FGF19 overexpression is associated with a decrease of pro fibrotic**  
668 **mediators**  
669 (A) Each dots with median showing TGF  $\beta$  levels in BAL of mice treated with AAV-GFP or  
670 AAV-FGF19 and sacrificed at day 3 (left panel), day 7 (medium panel) and day 14 (right  
671 panel). (B) Dot plots with median showing lung mRNA expression of *Tgf $\beta$*  (left panel), *Ctgf*  
672 (middle panel), *Pai-1* (right panel), of mice treated with AAV-GFP or AAV-FGF19 and  
673 sacrificed at day 3, day 7 and day 14. (C) Dot plots with median showing lung mRNA  
674 expression of *Fgf7* (left panel), *Fgf10* (middle panel) and *Hgf* (right panel), of mice treated  
675 with AAV-GFP or AAV\_FGF19 and sacrificed at day 3, day 7 and day 14. (D) Each dots plots  
676 with mean and SD showing BAL cellularity of in mice treated with AAV-GFP or AAV\_FGF19  
677 and sacrificed at day 3, day 7 and day 14. (E) Dot plots with median showing lung mRNA  
678 expression of *Il1 $\beta$*  (left panel), *Il6* (middle panel) and *Tnf  $\alpha$*  (right panel), of mice treated with  
679 AAV-GFP or AAV\_FGF19 and sacrificed at day 3, day 7 and day 14. Mann Whitney U test  
680 \*p $\leq$ 0.05, \*\*p $\leq$ 0.01

681 **Figure 6: FGF19 overexpression is associated with a decrease of apoptosis in the lung**  
682 **and induced a decrease of Bim expression.**  
683 (A) Representative immunoblots showing Cleaved PARP lung content of mice treated with  
684 AAV-GFP or AAV-FGF19 and sacrificed at day 7 (left panel) and at day 14 (right panel). (B)  
685 Immunoblot analysis, dot plot with median showing Cleaved PARP lung expression of mice  
686 at day 7 and at day 14.  $\beta$  tubulin was used as a loading control. (C) Representative  
687 immunoblots showing Bim lung content of mice treated with AAV-GFP or AAV-FGF19 and  
688 sacrificed at day 7 (left panel) and at day 14 (right panel). (D) Immunoblot analysis, dot plot  
689 with median showing Cleaved PARP lung expression of mice at day 7 and at day 14.  $\beta$   
690 tubulin was used as a loading control. (E) Each dot plots with median showing lung mRNA  
691 expression of *Bim* treated with AAV-GFP or AAV-FGF19 and sacrificed at day 7 and at day  
692 14. Mann Whitney U test \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$   
693

694 **Figure 7 FGF19 exerts anti fibrotic properties by decreasing apoptosis of alveolar**  
695 **epithelial cells.**

696 (A) Representative immunohistochemistry images (n=5 per group) showing pro SPC staining  
697 (red) in lung of mice injected with AAV-GFP or AAV-FGF19 and sacrificed at D14. Nuclei  
698 were counterstained with hematoxylin. (B) Dot with mean and SD showing percentage of  
699 positive cells in lung of mice treated with AAV-GFP or AAV-FGF19 at day 14. (C)  
700 Representative immunoblots showing Cleaved PARP expression by murine alveolar  
701 epithelial cells (MLE15 lineage) stimulated for 17 hours with DMSO, FGF19 (5 ng/mL),  
702 Staurosporine (1 $\mu$ M) or FGF19 and staurosporine. GAPDH was used as a loading control.  
703 (D) Quantification of Cleaved PARP expression compared to DMSO condition (E)  
704 Representative immunoblots showing Bim expression by murine alveolar epithelial cells  
705 (MLE15 lineage) stimulated for 17 hours with DMSO, FGF19 (5 ng/mL), Staurosporine (1 $\mu$ M)  
706 or FGF19 and staurosporine GAPDH was used as a loading control.(F) Quantification of  
707 Cleaved PARP expression compared to DMSO condition. Mann Whitney U test \*p $\leq$ 0.05,  
708 Wilcoxon signed-rank test, \$ p $\leq$ 0.05.  
709

710 **Figure 8: FGF19 prevents myofibroblast differentiation induced by TGF $\beta$**   
711 (A) Representative immunoblots showing expression of ACTA2, Collagen and Fibronectine  
712 by primary lung fibroblast from IPF and controls patients after a 48 hours FGF19 (5 ng/mL)  
713 stimulation with or without TGF $\beta$  (1ng/mL). GAPDH was used as a loading control. (B) Each  
714 dot with median showing quantification of ACTA2, Collagen and fibronectin compared to  
715 basal condition. (C) Each dot with median showing Acta2, Col1a1, Fibronectin expression  
716 from IPF and controls primary lung fibroblast after a 48 hours FGF19 (5 ng/mL) stimulation  
717 with or without TGF $\beta$  (1ng/mL). Wilcoxon signed-rank test, \* p $\leq$ 0.05, \*\* p $\leq$ 0.001  
718

719 **Figure 9: FGF19 inhibits non canonical TGF $\beta$  pathway.**  
720 (A) Each dots plots with median showing mRNA expression of profibrotic mediators  
721 expression from IPF and controls primary lung fibroblast after a 48 hours FGF19 (0,5 ng/mL)  
722 stimulation with or without TGF $\beta$  (1ng/mL): Pai-1 (upper panel), Ctgf (middle panel) and Gli1  
723 (lower panel). (B) Immunoblots showing Phospho-SMAD 3 and SMAD 3 expression from IPF  
724 and controls primary lung fibroblasts after 30 minutes FGF19 stimulation with or without  
725 TGF $\beta$  (1ng/mL) (left panel) SMAD was used as a loading control. Each dot with median  
726 showing quantification of Phospho-SMAD 3 compared to basal condition. (C) Immunoblots  
727 showing Phospho-JNK and JNK expression from IPF and controls primary lung fibroblasts  
728 after 30 minutes FGF19 stimulation with or without TGF $\beta$  (1ng/mL) (left panel) JNK was used  
729 as a loading control. Each dot with median showing quantification of Phospho-JNK compared  
730 to basal condition (right panel). Wilcoxon signed-rank test, \* p $\leq$ 0.05, \*\* p $\leq$ 0.001

731

732

733

734

735

736

737

738

739

740

741

742

743

744

745

746

747

748

749

750

751

752

753

754

755

756

757

758

759



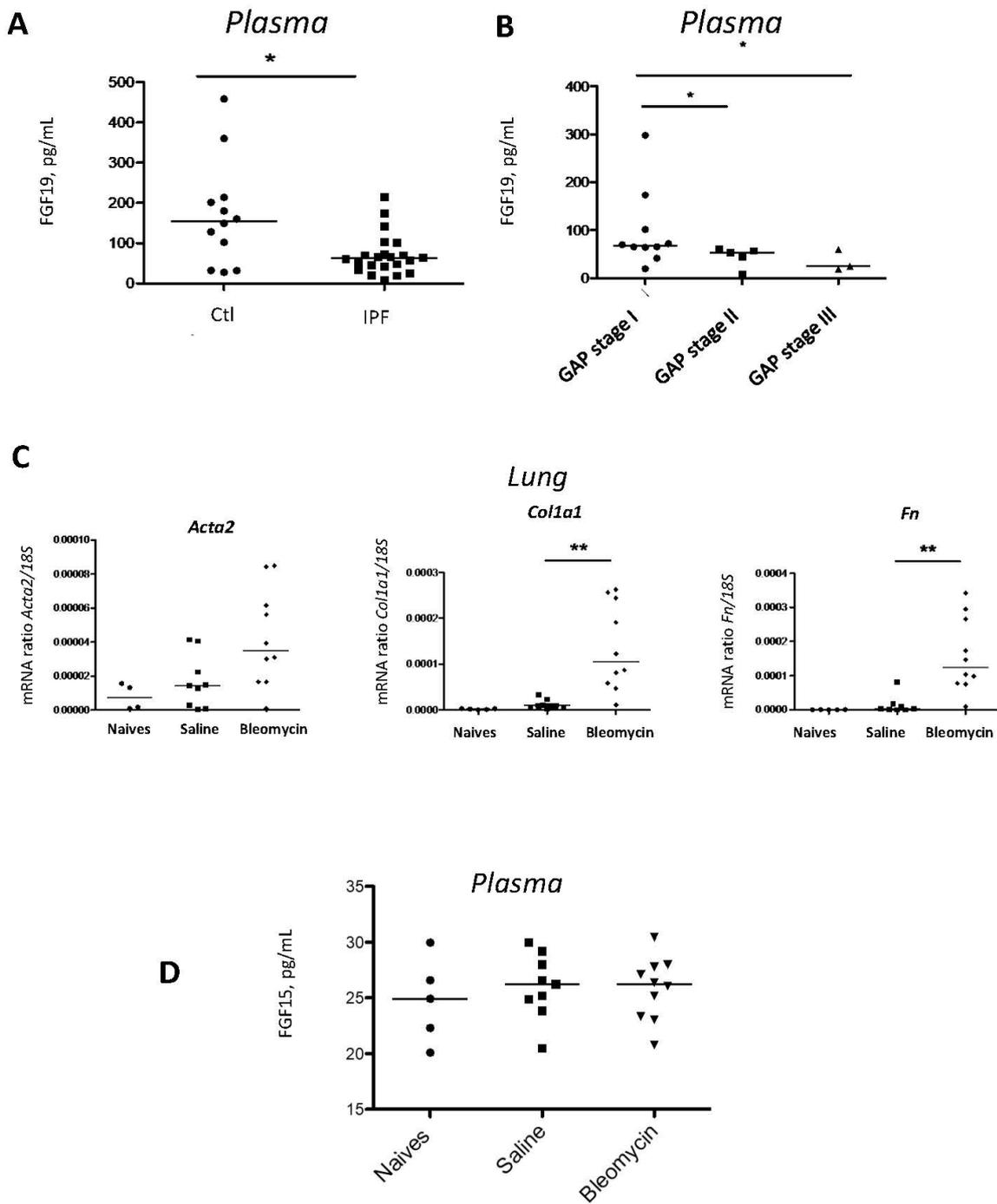


Figure 1

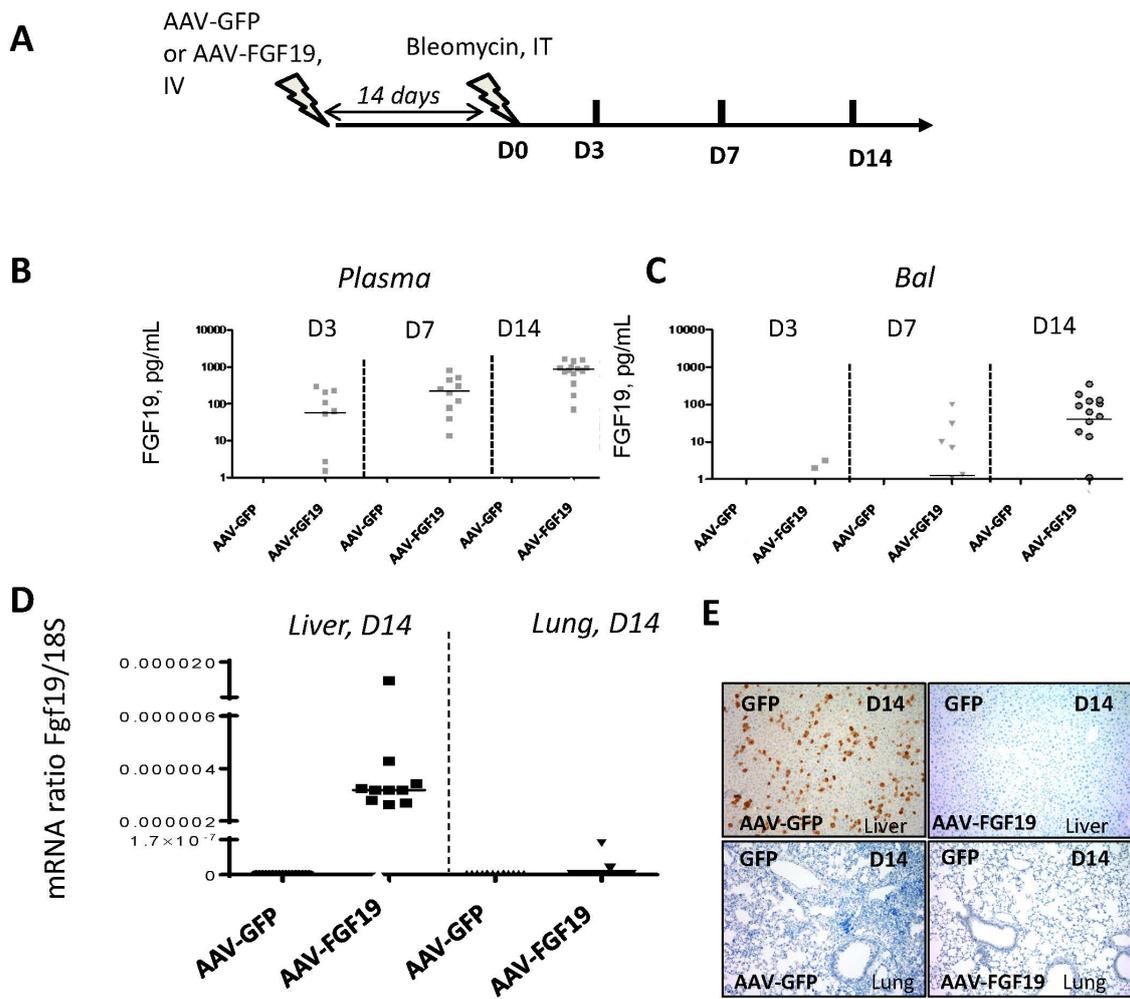


Figure 2

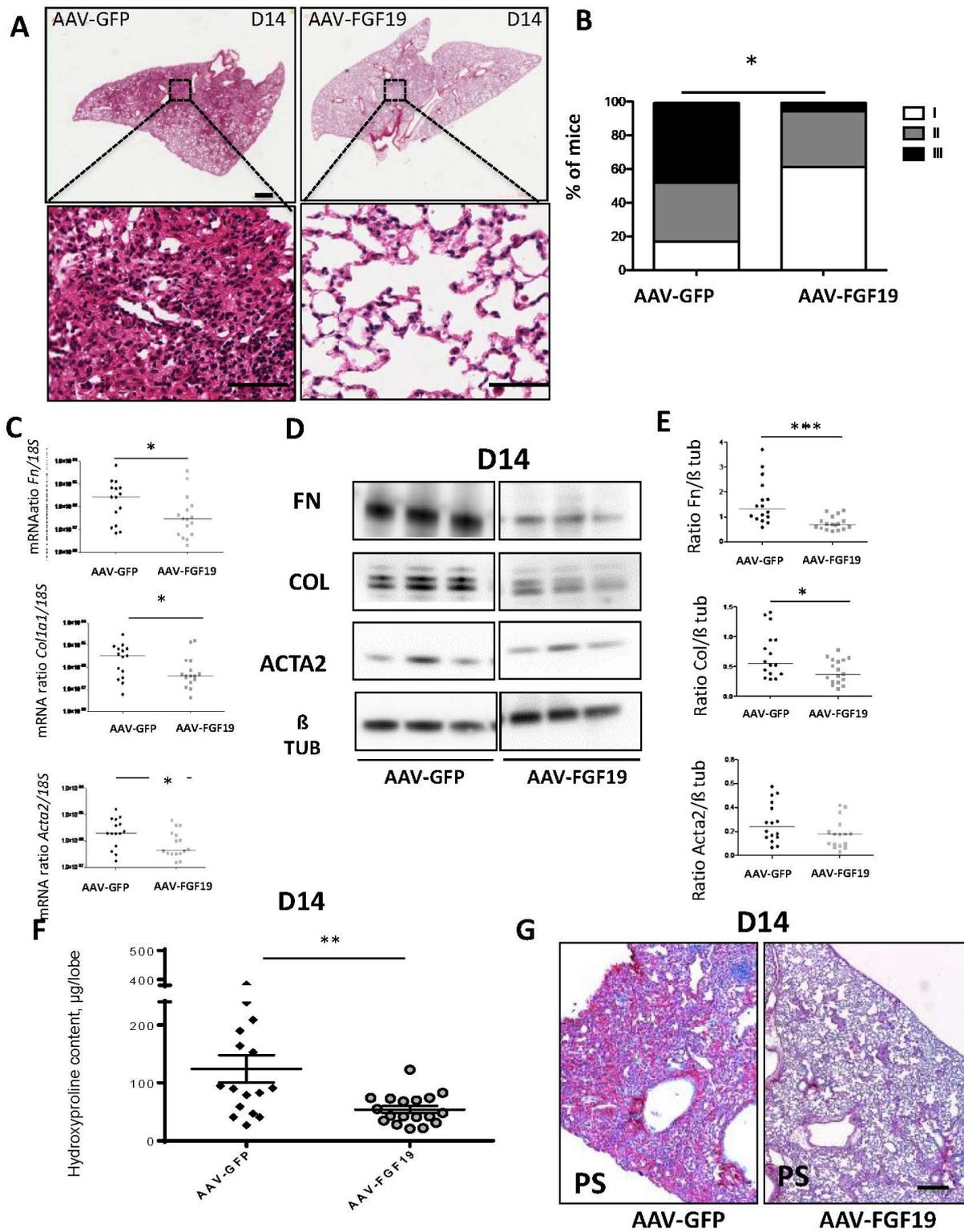


Figure 3

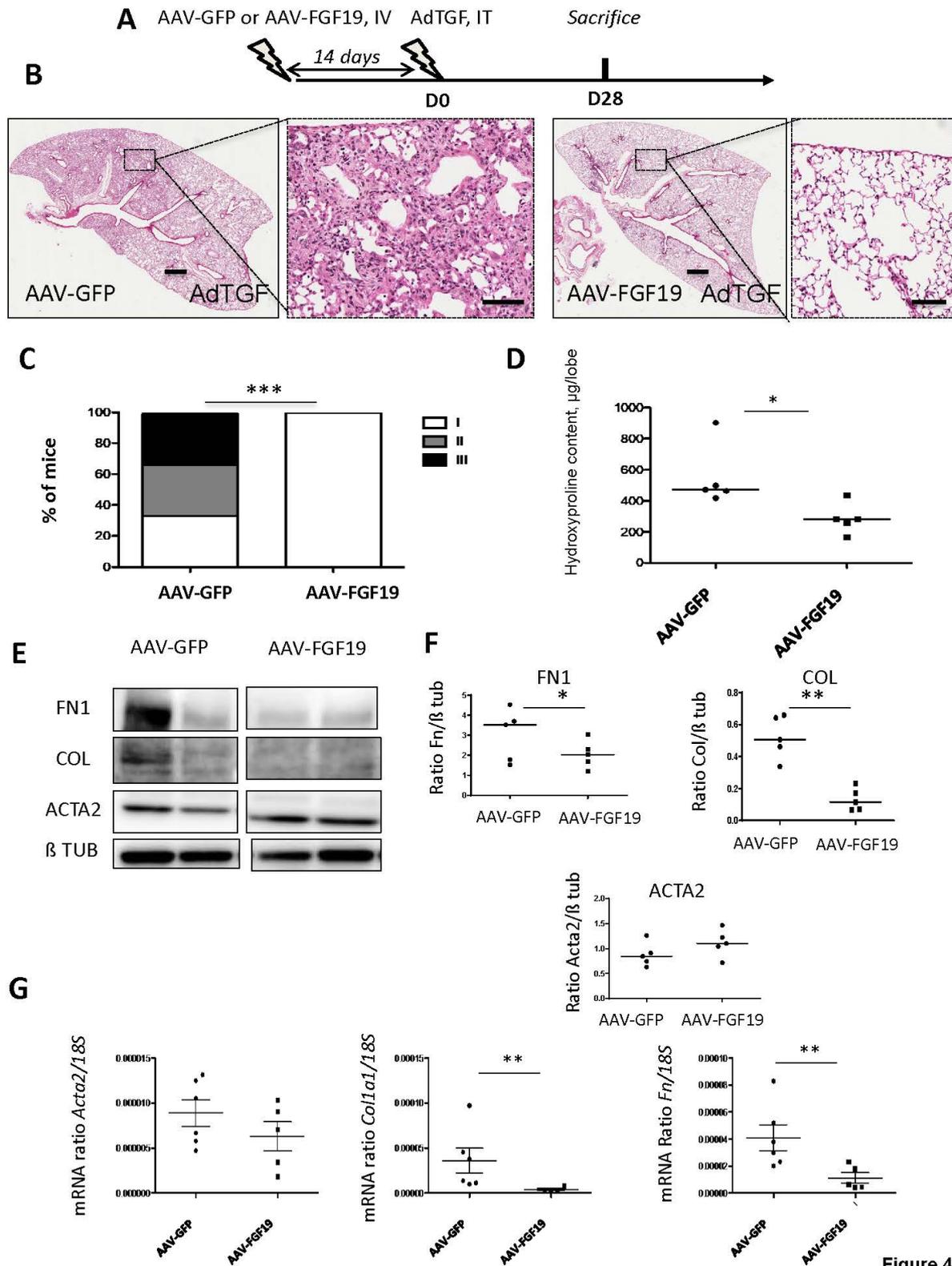


Figure 4

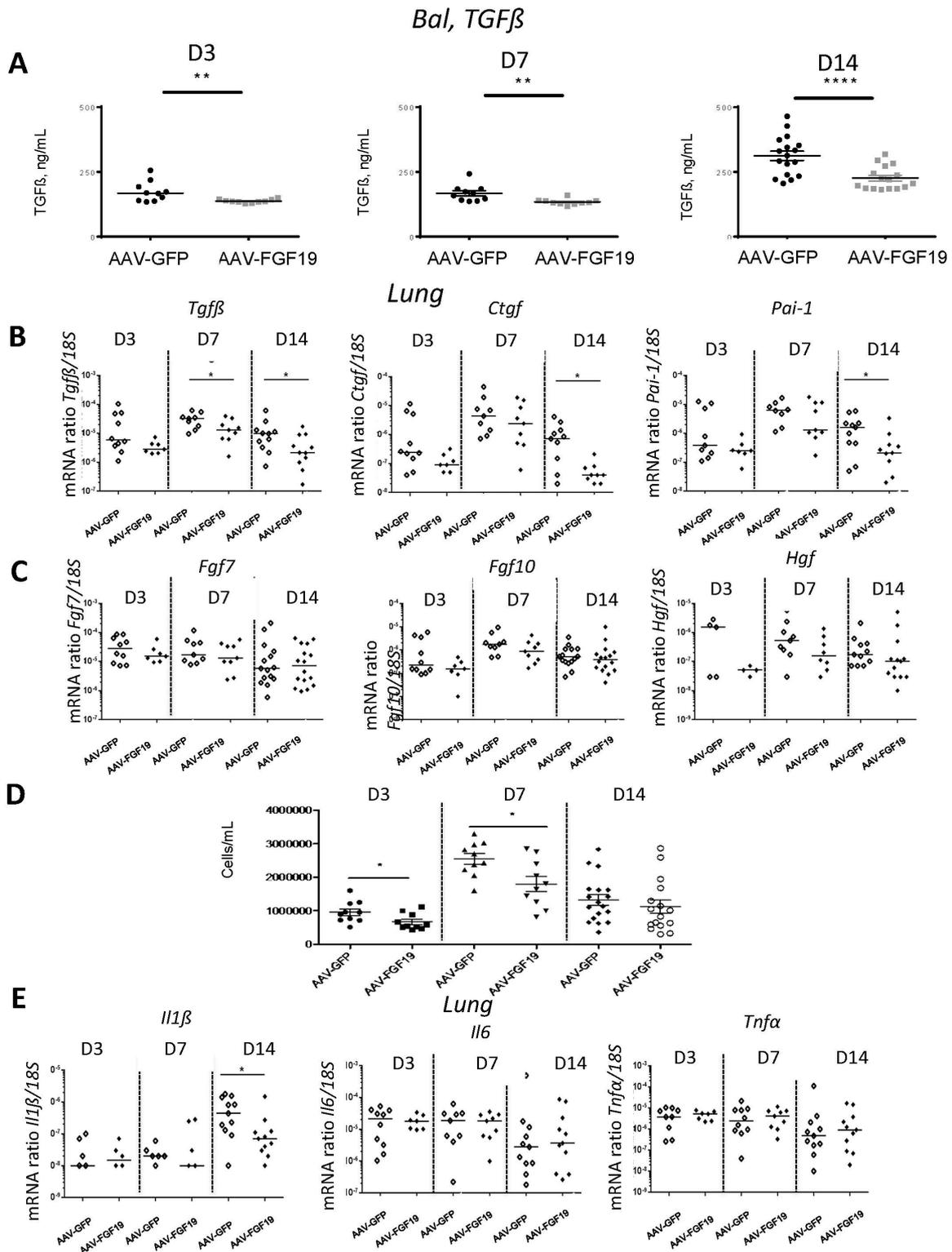


Figure 5

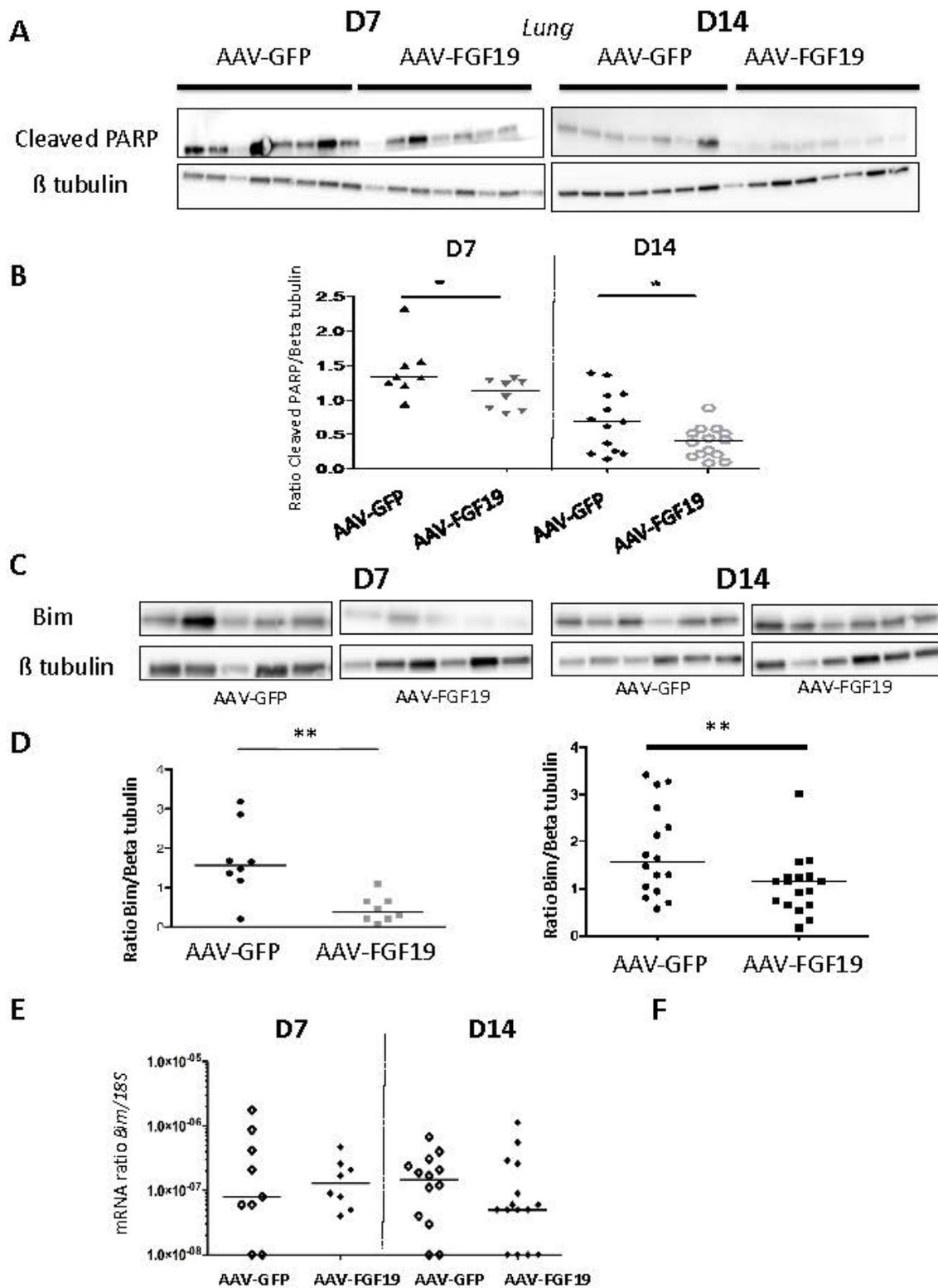


Figure 6

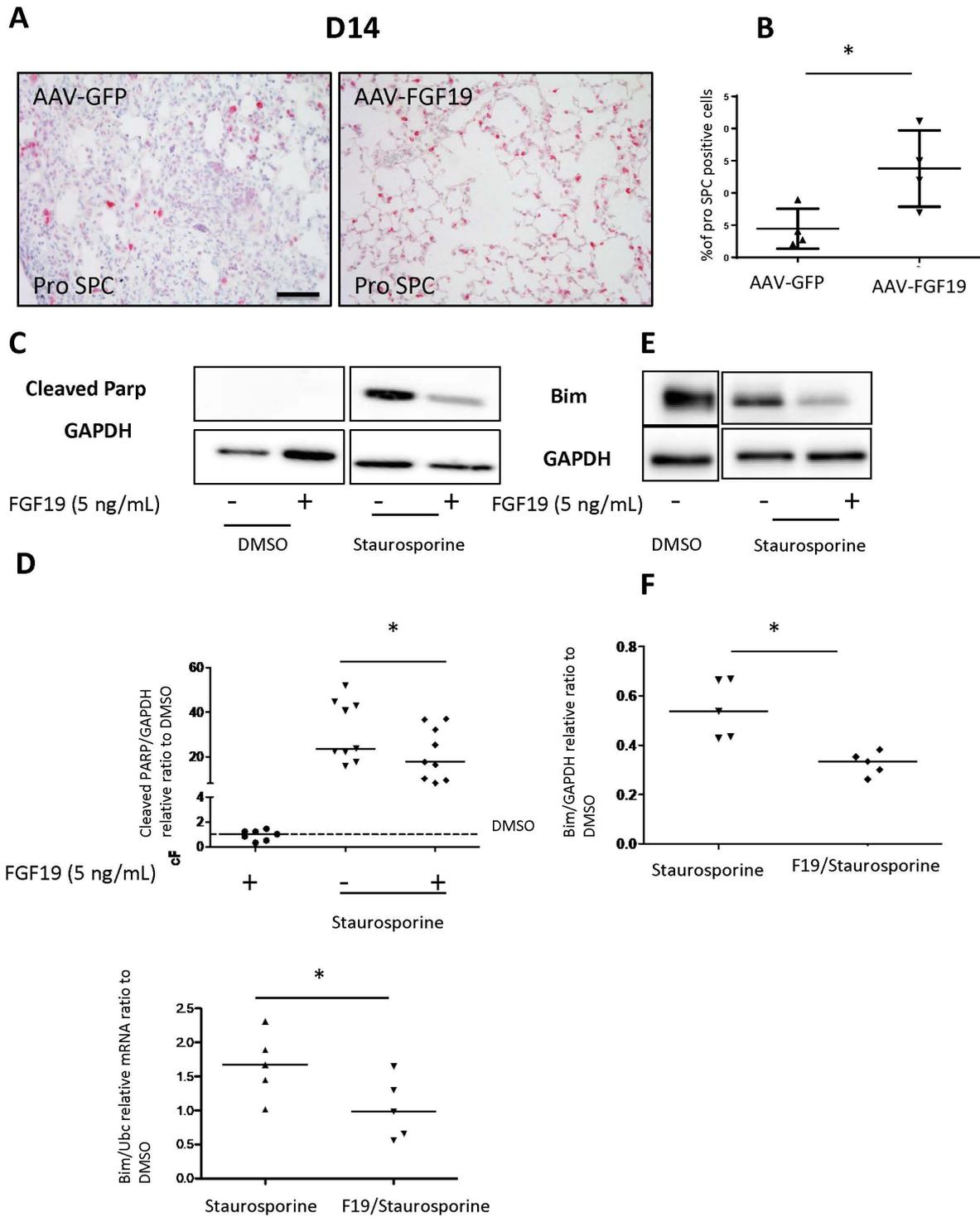


Figure 7

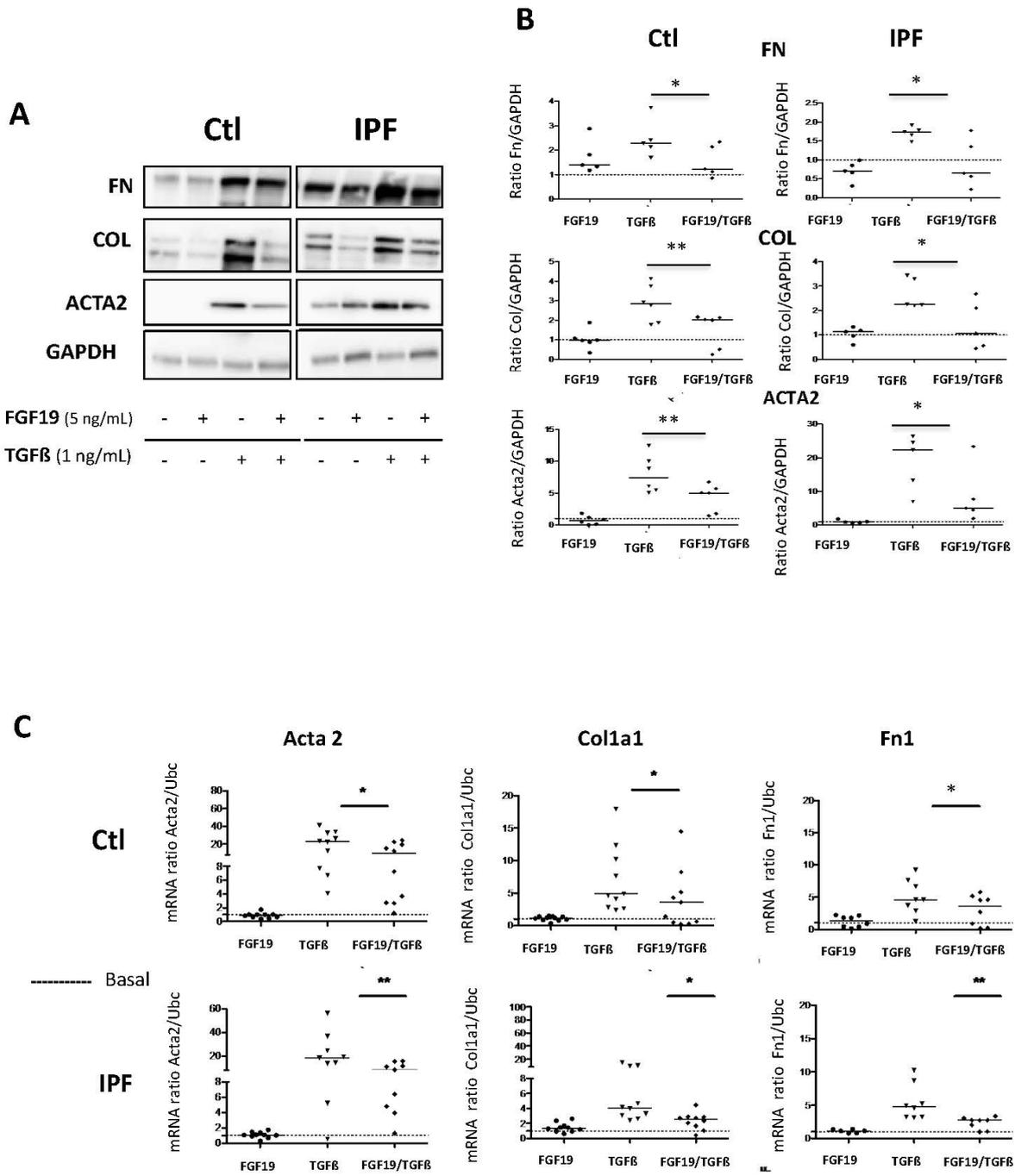


Figure 8



1 **Supplemental figure legends**

2 **Supplemental Figure 1 :: Characterization of FGF19 overexpression in basal condition**

3 Treatment protocol is as follows: 8 weeks old C57Bl6 male mice were injected with AAV-GFP

4 or AAV-FGF19. Mice were sacrificed 14 days (D14) and 28 days (D28) after AAV injection.

5 (A) FGF19 concentration at D14 and D28 in blood of mice injected with AAV-GFP or AAV-

6 FGF19 (left panel) and FGF19 levels at D28 in BAL of mice injected with AAV-FGF19 or

7 AAV-GFP (right panel). (B) Representative Hematoxylin and eosin staining of lung tissue

8 sections from mice injected with saline serum or AAV-GFP or AAV-FGF19. (C) Immunoblot

9 showing SMA, Collagen and Fibronectin expression in lung of mice injected with AAV-GFP

10 or AAV-FGF19.  $\beta$  tubulin was used as a loading control. (D) Immunoblot analysis, dot plot

11 with median showing SMA, collagen, fibronectin lung expression mice  $\beta$  tubulin was used as

12 a loading control (E) Hydroxyprolin assay, dot plot with median showing collagen content per

13 lobe in each groups. (G) Dot plots with median showing mice lung mRNA expression of *Acta*

14 *2*, *Collagen 1  $\alpha$  1*, *Fibronectin*. Mann Withney U test, \* $p \leq 0.05$

15

16 **Supplemental Figure 2: Pulmonary effect of FGF19 overexpression in mice 3 and 7**  
17 **days after bleomycin administration**

18 (A) Representative Hematoxylin and eosin staining of lung tissue sections from mice injected

19 with saline serum or AAV-GFP or AAV-FGF19 and sacrificed at D3 and D7. (Scale bar:

20 1000  $\mu$ m in low magnification images and 40  $\mu$ m in high magnification ones). (B)

21 Representative immunoblots showing Fibronectin, collagen and  $\alpha$  SMA content of mice

22 treated with AAV-GFP or AAV-FGF19. (C) Immunoblot analysis, dot plot with median

23 showing SMA, collagen, fibronectin lung expression mice  $\beta$  tubulin was used as a loading

24 control. (D) Dot plots with medians showing lung collagen content ( $\mu$ g/lobe) in mice treated

25 with AAV-GFP or AAV-FGF19. Mann Whitney U test (C, E, F) \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

26  
27 **Supplemental Figure 3: FGF19 overexpression inhibits lung fibrosis 21 days after**  
28 **intratracheal administration of AdTGF**

29

30 (A) Representative immunoblots showing Fibronectin, collagen and  $\alpha$  SMA content of mice

31 treated with AAV-GFP or AAV-FGF19. (C) Immunoblot analysis, dot plot with median

32 showing SMA, collagen, fibronectin lung expression mice  $\beta$  tubulin was used as a loading

33 control. Mann Whitney U test (C, E, F) \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $< 0.001$

34

35

36

37 **Supplemental Tables**

38

39

40

**Supplemental Table S1: PCR primer sequences**

<b>Gene</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
<i>hUBC</i>	GTGGTGCGTCCAGAGAGAC	GGCCTTCGCCATATCCTTTTC
<i>hACTA2</i>	GAAGAGCATCCCACCCTGC	ATTTTCTCCCGGTTGGCCT
<i>hCOL1A1</i>	GCCAAGACGAAGACATCCCA	GTTTCCACACGTCTCGGTCA
<i>hFN1</i>	AGCAAGCCCGGTTGTTATGA	CCCCTCGGTAAGTGTTC
<i>hGli1</i>	CATGTCACCGTTCCTCTTG	CCAATGGTTTTCTGGGTCCA
<i>hCTGF</i>	TGGCCACCTGTATTATCTGGG	TCCCAGCTTAAATCAGGCA
<i>hPAI-1</i>	ATGTACGTCGCCATTCAAGC	TCTCTCTCAGCTGTGGTCAC
<i>mRna18S</i>	CTTAGAGGGACAAGTGGCG	ACGCTGAGCCAGTCAGTGTA
<i>mActa2</i>	AGTCGCTGTCAGGAACCCTGAGA	ATTGTCGCACACCAGGGCTGTG
<i>mCol1a1</i>	GTGTGTGACAAGGGTGAGACA	GAGAACCAGGAGAACCAGGA
<i>mFn1</i>	TGGTGGCCACTAAATACGAA	GGAGGGCTAACATTCTCCAG
<i>m Ctgf</i>	GAGTGTGCACTGCCAAAGAT	GGCAAGTGCATTGGTATTTG
<i>mPai-1</i>	TCACAAGTCTTTCCGACCAA	AGGCTGTGGAGGAAGACG
<i>mTNF<math>\alpha</math></i>	TCGTAGCAAACCACCAAGTG	TTGTCTTTGAGATCCATGCC
<i>mI6</i>	AGTCCGGAGAGGAGACTTCA	TTGCCATTGCACAACCTTTT
<i>mI1<math>\beta</math></i>	GCTTCCTTGTGCAAGTGTCT	GGTGGCATTTCACAGTTGAG
<i>mFgf7</i>	CACCTCGTCTGTCTAGTGGG	GTCCCTTTCACCTTGCCTCG
<i>mFgf10</i>	AGGCTGTTCTCCTCACCAA	TCCCCTTCTTGTTCATGGCT
<i>mHgf</i>	AACTACTCTTACCAAGGAAGACC	CCAGTAGCATCGTTTTCTTGA

41

42

43 **Supplementary Table S2: Antibody list**

44

45

<b>Antibody</b>	<b>Reference</b>	<b>Application</b>
GAPDH	Mouse monoclonal, Covalab, Villeurbanne, France (00006513)	Western Blot
$\beta$ -TUBULIN	Rabbit polyclonal, Abcam, Cambridge, USA (ab6046)	Western Blot
COL-I	Goat polyclonal, Southern Biotech, Birmingham, USA (1310-01)	Western Blot
FN-1	Rabbit polyclonal, Abcam, Cambridge, UK (ab2413)	Western Blot
ACTA2	Mouse monoclonal, clone 1A4, Sigma, Saint-Louis, USA (A5228)	Western Blot and immunochemistry
Phospho(S423+S425) SMAD3	Rabbit monoclonal, Abcam, Cambridge, USA (ab52903)	Western Blot
SMAD3	Rabbit polyclonal, Abcam, Cambridge, UK (ab28379)	Western Blot
Phospho-JNK (Tyr705)	Rabbit polyclonal, (9131), Cell signaling, Leiden, Netherlands	Western Blot
JNK	Rabbit polyclonal, 79D7, Cell signaling, Leiden, Netherlands	Western Blot
Cleaved PARP	Rabbit Polyclonal, Abcam Cambridge, UK (ab32064)	Western Blot
BIM	Rabbit polyclonal, Abcam Cambridge, UK (ab32158)	Western Blot

46

47

48

49

50

51

52 **Supplemental Material and Methods**

53

54 **Study of proliferation (Supplemental)**

55 Human lung fibroblast from IPF and control patients and MLE 15 proliferation was assayed  
56 after 24 hours FGF19 (0.5ng/mL) stimulation. The proliferation rate was measured by  
57 CyQUANT NF Cell Proliferation Assays (Thermofisher, Waltham, USA), which quantify cellular  
58 DNA content using a microplate reader (Infinite® 200 PROTECAN, Männedorf, Suisse).

59

60 **Study of migration (Supplemental)**

61 Migratory properties of HLF from IPF or control patients cells were assessed by a modified  
62 Boyden chamber assay, with a Transwell permeable support (6.5 mm, 8 µm) (Corning,  
63 Tewksbury, MA, USA) as described (6). FGF19 (5 ng/ml) or PDGF or both was placed in the  
64 lower compartment. Migration was assessed by counting the number of cells at the lower  
65 surface of the filters after a 24 hours incubation at 37 °C.

66

67

68

69

70

71

72

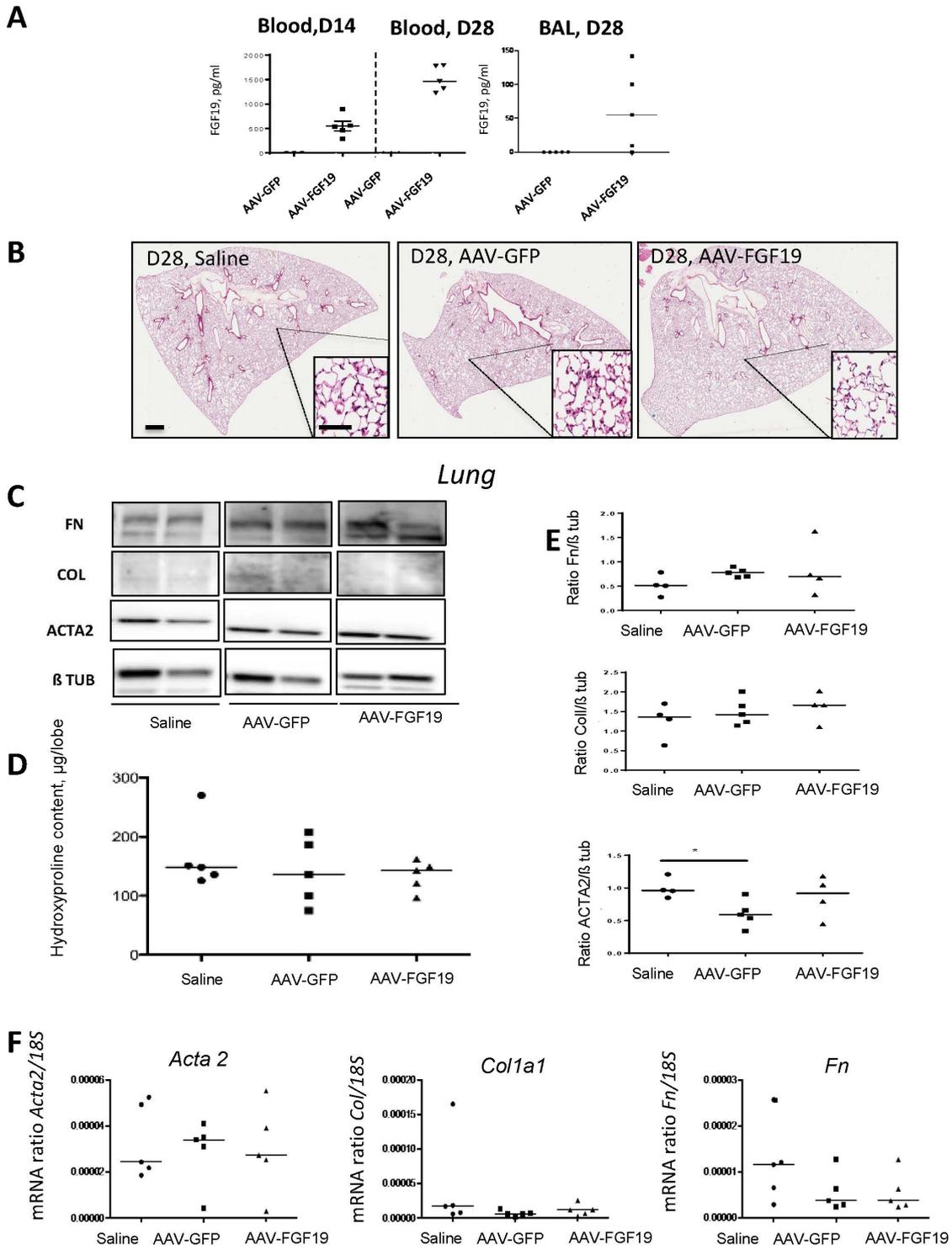
73

74

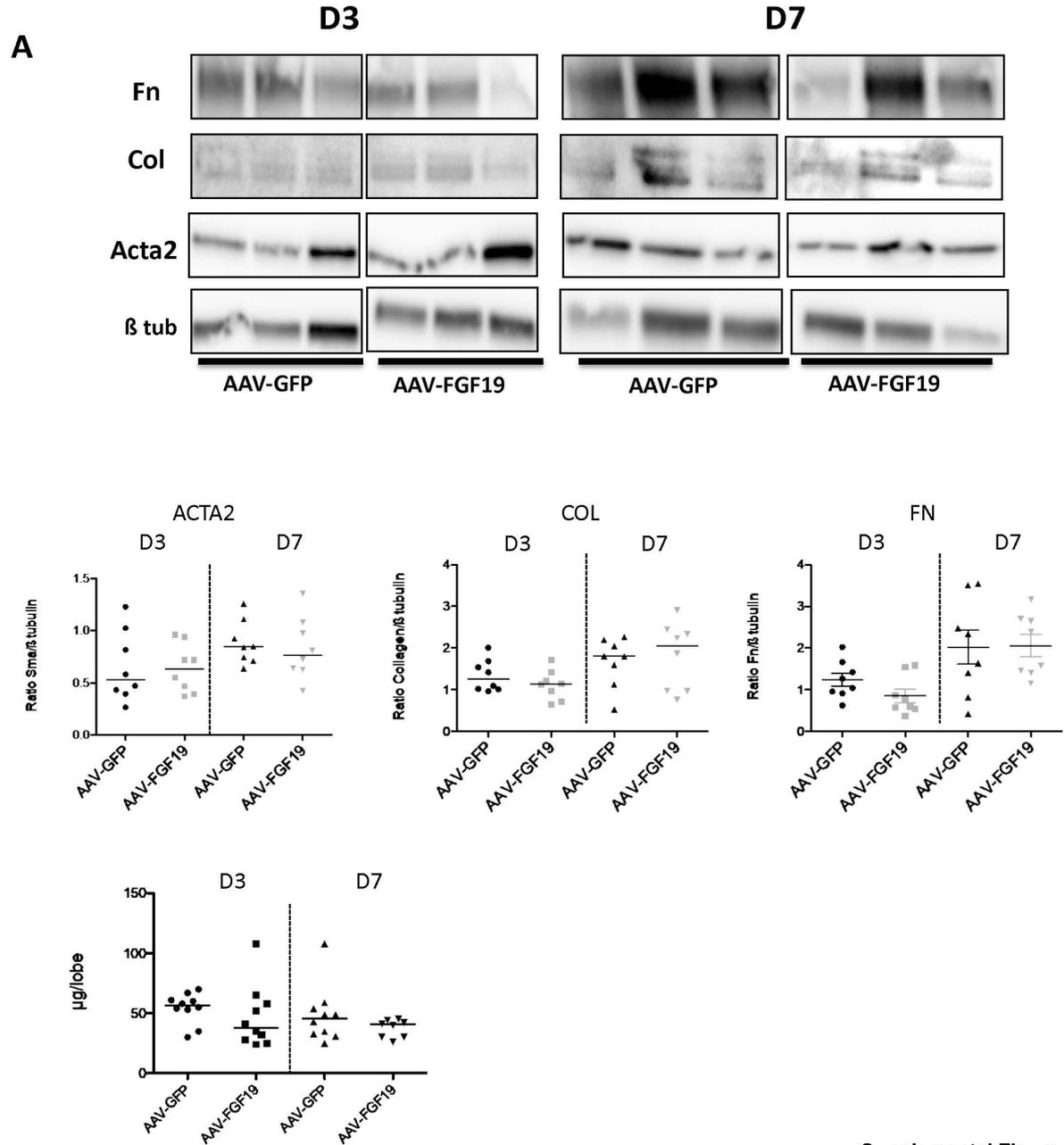
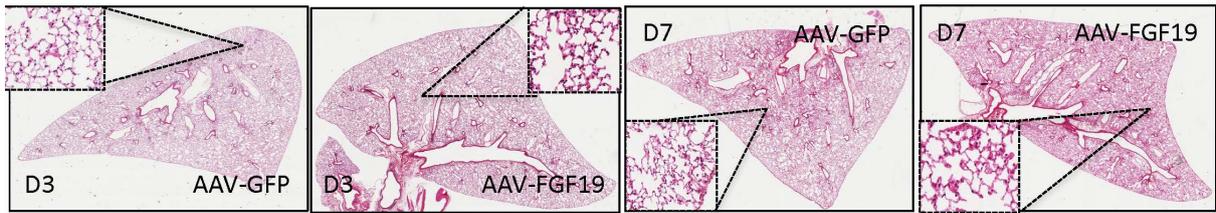
75

76

77



Supplementary Figure 1

**A**

Supplemental Figure 2

## **RESUME DES PRINCIPAUX RESULTATS**

### **La concentration plasmatique de FGF19 est diminuée chez les patients atteints de FPI**

La concentration plasmatique de FGF19 est significativement diminuée chez des patients atteints de FPI comparativement à des patients contrôles appariés sur l'âge, le sexe et le tabagisme.

Les patients ont été classés en 3 groupes selon l'index GAP, index pronostic validé dans la FPI. Les patients avec un mauvais pronostic avaient une concentration plus basse suggérant que FGF19 pourrait être relié au pronostic de la FPI

En revanche, FGF19 n'était jamais détecté dans le lavage broncho-alvéolaire dans ces deux populations.

### **La surexpression de FGF19 inhibe le développement de la fibrose induite par l'instillation intra trachéale de bléomycine ou d'adénovirus recombiné AdTGF $\beta$**

Dans deux modèles expérimentaux de fibrose pulmonaire induits par l'instillation intratrachéale de bléomycine ou d'un adénovirus recombiné TGF $\beta$ , une injection intraveineuse d'un AAV recombinant FGF19 (AAV-FGF19) ou d'un AAV contrôle (AAV-GFP) était réalisée 14 jours avant l'induction de la fibrose. L'objectif était de générer une surexpression de FGF19 au cours de la phase fibrosante de ces modèles.

Après la validation de la surexpression de FGF19, nous avons observé que celle-ci était associée à une diminution de l'extension de la fibrose pulmonaire dans les deux modèles expérimentaux et comparativement au groupe de souris injectées avec un AAV contrôle. De façon concomitante, la surexpression de FGF19 était associée à une diminution, au niveau de l'ARN messager et protéique, de marqueurs de différenciation myofibroblastique et de protéines de la matrice extra cellulaire. Enfin il existait une diminution du contenu pulmonaire en collagène, apprécié par une mesure de l'hydroxyproline, dans le groupe AAV-FGF19 en comparaison au groupe AAV-GFP.

Ceci s'accompagnait d'une diminution l'expression pulmonaire de l'ARNm de médiateurs profibrotique dans le groupe de souris AAV-FGF19 sans diminution de médiateur pro inflammatoire.

### **La surexpression de FGF19 prévient l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires**

Nous avons observé une diminution de l'expression pulmonaire de la protéine Cleaved-PARP, marqueur d'apoptose dans le groupe de souris AAV-FGF19. Celle-ci s'accompagnait d'une diminution de la protéine pro-apoptotique Bim. La réalisation d'une immuno histochimie pro SPC, marqueur des PII a révélé une augmentation du nombre positive de cellules dans le groupe AAV-FGF19.

*In vitro*, nous avons confirmé les propriétés anti apoptotiques de FGF19 en utilisant une lignée de PII murines les MLE15. FGF19 prévenait l'apoptose de ces cellules induites par la staurosporine, via une diminution de l'expression de Bim. L'ensemble de ces données suggéraient donc que FGF19 prévenait l'apoptose des PII *in vitro* et *in vivo*.

### **FGF19 prévient la différenciation myofibroblastique des fibroblastes pulmonaires en diminuant la phosphorylation de la voie JNK.**

*In vitro*, nous avons confirmé les propriétés anti fibrosantes de FGF19 observées *in vivo*. La stimulation par du FGF19 (0,5ng/mL) de fibroblastes pulmonaires contrôles ou FPI permettait de partiellement prévenir la différenciation myofibroblastique induite par du TGF $\beta$  (1 ng/mL), après 48 heures de stimulation. Il existait de façon concomitante une diminution de l'expression de l'ARN messager de cytokines pro fibrosantes induites par le TGF $\beta$  comme le Ctgf, Pai-I ou Gli-1.

Nous avons donc supposé que FGF19 inhibait la voie du TGF $\beta$ . Il est apparu que la FGF19 n'influençait pas avec la voie canonique, Smad dépendante mais la voie non canonique du TGF $\beta$ . En effet, la stimulation des cellules par du FGF19 induisait une diminution de la phosphorylation de JNK. Ces données suggéraient donc que FGF19 prévenait la différenciation myofibroblastique en inhibant la voie non canonique du TGF $\beta$ , la voie JNK.

## DISCUSSION DE L'ARTICLE

Il s'agit de la première étude visant à étudier l'effet du FGF19 dans la fibrogénèse pulmonaire.

FGF19 est synthétisé par les entérocytes au niveau de l'iléon et joue un rôle central dans le métabolisme des acides biliaires et du métabolisme énergétique (258). Son action au niveau hépatique et adipocytaire passe par les récepteurs FGFR1 et FGFR4, tout deux exprimés au niveau pulmonaire (256).

Dans ce travail, nous avons observé que FGF19 était diminué dans le plasma de patients atteints de FPI par rapport à des témoins et que sa concentration était liée au pronostic de la maladie. Ce résultat doit être confirmé sur une plus grande cohorte mais pourrait en partie expliquer l'augmentation de la prévalence du syndrome métabolique chez les patients atteints de FPI.

Au regard de la diminution de la concentration plasmatique de FGF19 dans la FPI, nous avons décidé d'induire une surexpression de FGF19 à l'aide d'un adeno-associated virus (AAV).

Cette surexpression plasmatique a engendré une régression partielle mais majeure des lésions de fibrose. Le modèle expérimental de fibrose pulmonaire murine basé sur l'instillation intra trachéale de bléomycine est caractérisé par une apoptose des PII. Or, nous avons observé *in vitro et in vivo* que FGF19 prévenait ce phénomène en diminuant l'expression de la protéine pro apoptique Bim. Cette protéine joue un rôle central dans la voie intrinsèque de l'apoptose. Sa dégradation est médiée par plusieurs voies de signalisation comme la voie des MAP kinases ou la voie JNK. Ces voies modulent la phosphorylation de Bim qui induit sa dégradation par le protéasome. Cependant, nous n'avons pas été en mesure de mettre évidence l'expression forme phosphorylée de Bim par les fibroblastes pulmonaires ou les cellules épithéliales alvéolaires. Ceci pourrait être la conséquence d'une dégradation trop rapide de la protéine.

En plus de son action au niveau alvéolaire, nous avons démontré que le FGF19 prévenait la différenciation myofibroblastique en inhibant la phosphorylation de JNK. Ces données sont cohérentes avec les données publiées dans la littérature. En effet, il a été démontré que l'inhibition de la phosphorylation de JNK inhibait la

différenciation myofibroblastique. D'autre part, les souris déficientes pour JNK sont protégées de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine.

Enfin, nos résultats sont cohérents avec ceux observés au niveau hépatique. D'une part, la surexpression de FGF19 induite par un AAV diminuait les lésions de fibrose hépatiques induites par le CCL4. D'autre part, FGF19 avait des propriétés anti apoptotique au niveau hépatique en diminuant l'expression de Bid et Bad, deux protéines pro apoptotiques de la même famille que Bim. Dans le foie ces données ont amené à la réalisation d'un essai de phase II portant sur un variant de FGF19, NGM282, dénué de toute activité mitogénique. Dans cette étude, NGM282 semblait diminuait les lésions de fibrose hépatiques chez les patients atteints de NASH avec un bon profil de tolérance. Les données issues de notre travail invitent donc à étudier les effets des variants de FGF19 chez des patients atteints de FPI.

## DISCUSSION GENERALE

---

Ce travail est centré sur l'étude du FGF9 et du FGF19 dans la FPI et de leur implication dans la fibrogénèse pulmonaire. Nous avons observé :

- Une dérégulation de l'expression de ces protéines au cours de la FPI comparativement à des patients témoins. Cette dérégulation pourrait en partie expliquer notamment la prévalence élevée de certaines comorbidités associées à la FPI
- Un effet anti fibrosant de ces FGF au niveau des cellules mésothéliales et des fibroblastes pulmonaires mais également un effet anti apoptotiques au niveau des cellules épithéliales alvéolaires.
- L'effet de la surexpression de ces FGF dans des modèles murins de fibrose pulmonaire a conduit à les identifier comme des cibles thérapeutiques innovantes potentiellement utiles pour le traitement de la FPI.

Bien que cette identification soit un préambule indispensable au développement de traitement innovant, de nombreuses questions doivent encore être éclaircies en vue de transposer ces résultats à l'homme. Un des problèmes posés par une surexpression de FGF9 ou de FGF19 est d'induire le développement de cancer (295). Ce risque peut être prévenu par l'induction d'une surexpression localisée à un organe cible voir à un type cellulaire cible. A titre d'exemple, la délivrance de FGF19 par voie inhalée pourrait permettre d'en limiter les effets systémiques et le développement de carcinome hépato cellulaire. D'autre part et de façon similaire à l'approche utilisée dans le traitement de la fibrose hépatique associée à la NASH (280), l'utilisation de variant dénué d'effet mitogéniques et sous forme inhalée sera également nécessaire pour prévenir le risque d'oncogénèse.

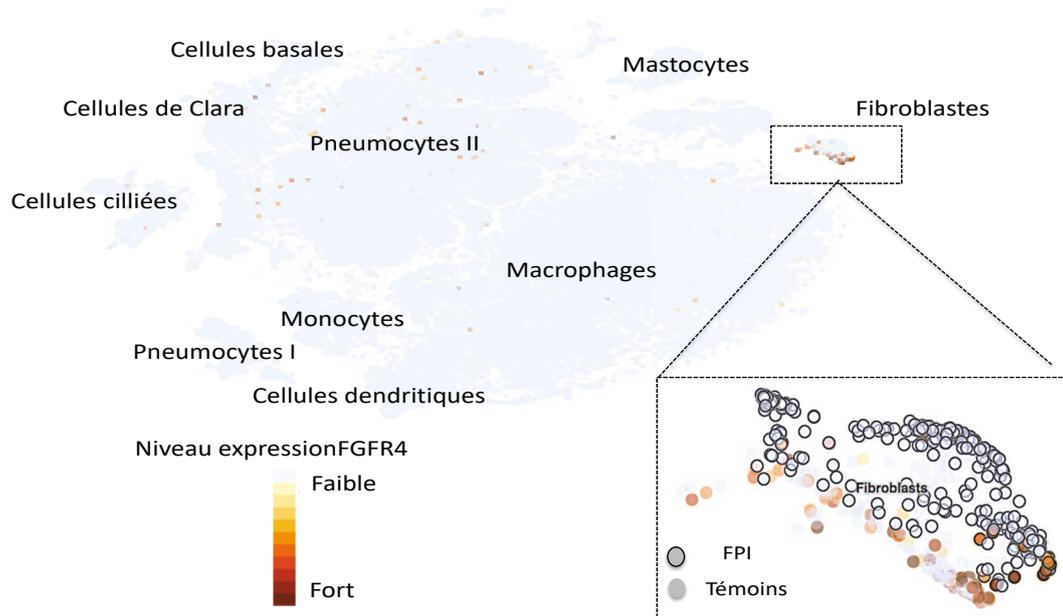
Malgré toutes les avancées récentes dans la compréhension de la fibrogénèse pulmonaire, il existe un paradoxe encore inexpliqué concernant l'implication des membres de cette famille et de leurs récepteurs qui pourrait être un frein à la transposition de ces résultats. A l'instar de plusieurs FGF paracrine, exprimés au niveau pulmonaires (FGF1, 2, 7, 10), et des FGF endocrine 21 et 23, FGF9 et FGF19 ont des propriétés anti fibrosante. Paradoxalement, le nintedanib,

traitement anti fibrosant validé dans la FPI inhibe les récepteurs FGFR1, FGFR2, FGFR3 ainsi que les récepteurs du PDGF et du VEGF (53). *In vivo*, les souris déficientes pour les FGFR1 - 3 semblent également protégées de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (234). Ces résultats illustrent les limites de nos approches *in vitro*, basées sur un type cellulaire, et les limites de nos modèles expérimentaux murins. De nombreux travaux issus de la recherche sur le développement pulmonaire ont montré que la réponse cellulaire à l'activation de la voie FGF varie d'un type cellulaire à autre (209). Cet effet est probablement la résultante de l'intégration de l'activation de plusieurs récepteurs présents à la surface cellulaire variant d'un type cellulaire à l'autre. Les progrès récents dans la compréhension de la niche alvéolaire ont permis d'identifier certains sous type cellulaires clés au sein des cellules épithéliales ou mésenchymateuse dans la fibrogénèse pulmonaire (170). Il apparaît donc déterminant pour comprendre l'effet d'un FGF à l'échelle d'un organe, de comprendre son effet sur chaque sous-type cellulaire ainsi que son impact sur les interactions cellulaires.

Dans ce travail, nous avons observé que l'action de FGF9 était, au niveau pleural, partiellement dépendante de FGFR3. Un des points communs entre FGF9 et FGF19 est leur capacité à se lier au récepteur FGFR4. Une des perspectives ouvertes par ce travail serait de déterminer l'implication de FGFR4 dans la FPI. Ce récepteur joue un rôle important dans l'alveologenèse pulmonaire (296) et il est exprimé dans le poumon adulte normal ou fibreux (256). FGFR4 est également impliqué dans l'ostéogénèse notamment en régulant l'autophagie, phénomène perturbé au cours de la FPI (49). Au niveau hépatique, les souris déficientes pour ce récepteur présentent des lésions accrues de fibrose après exposition au tétrachlorure de carbone. Ces données suggèrent donc que FGFR4 est impliqué dans les propriétés anti fibrosantes de FGF19. De façon intéressante, FGFR4 est le seul récepteur de cette famille qui ne soit pas ciblé par le nintedanib, traitement anti fibrosant validé dans la FPI (297) et la modulation de son activité pourrait influencer la fibrogénèse pulmonaire.

Au cours de ma thèse, j'ai travaillé sur l'implication de FGFR4 dans la FPI et plusieurs données préliminaires ont été générées. A l'instar des FGF étudiés dans ce travail, il existe une dérégulation de l'expression de ce récepteur au cours de la FPI. L'analyse transcriptomique par l'étude de données single-cell a permis de montrer

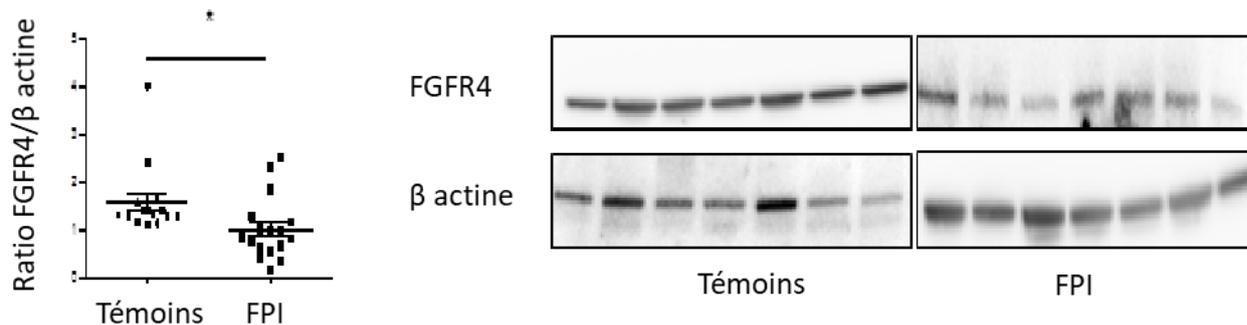
que l'ARNm de *Fgfr4* est retrouvé dans les cellules du mésenchyme pulmonaire (Figure 18), et l'épithélium alvéolaire et que son expression est diminuée chez les patients atteints de FPI (298).



**Figure 18** : L'expression de l'ARN messager de *Fgfr4* est diminuée dans la FPI

Cette analyse de transcriptomique cellule par cellule, montre les différentes populations cellulaires issues de poumons de patients contrôles et atteints de FPI exprimant *Fgfr4*. Données issues de l'étude de Reyffman et collaborateurs ([www.nupulmonary.org/resources/](http://www.nupulmonary.org/resources/)). Chaque cercle représente une cellule, regroupées dans l'espace en fonction des différents sous-types cellulaires connus. La couleur attribuée est fonction du niveau d'expression de l'ARNm *Fgfr4*. Au niveau de la sous-population des fibroblastes (zoom), les points encadrés en noirs sont des fibroblastes pulmonaires issus de patients atteints de FPI et les autres sont issus de patients témoins.

Des données préliminaires issues du laboratoire ont confirmé ces résultats. Il existe une diminution de l'expression de l'ARNm et de la protéine FGFR4 dans le poumon de patients atteints de FPI comparativement à des patients témoins (Figure 19). D'autre part, nous avons également observé cette diminution dans un modèle expérimental de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine. Des expérimentations sont actuellement en cours, notamment pour déterminer l'effet d'une surexpression de FGF19 induite par un AAV chez des souris déficiente pour le récepteur FGFR4.



**Figure 19** : Expression pulmonaire de FGFR4

Analyse en Western-Blot de FGFR4 sur hydrolysats de poumon total humain témoin (Ctrl) et FPI. La  $\beta$ -actine a été utilisée comme protéine de charge. Données du laboratoire.

Au début de ce travail de thèse, l'implication des FGF endocrines était totalement inconnue. Le FGF21 puis le FGF23 sont apparus comme ayant des propriétés anti-fibrosantes (244), (245), à l'instar du FGF19. L'implication des FGF endocrines dans la FPI pourrait modifier le paradigme physiopathologique actuel. En effet, ces protéines ont des actions pléiotropiques sur le métabolisme glucidique, lipidique, phosphocalcique et agissent sur de nombreux organes, incluant le poumon, le foie, le cerveau et l'os et le tissu adipeux. Des perturbations de l'expression des FGF endocrines pourraient induire des communications anormales inter-organes et influencer la fibrogénèse pulmonaire faisant ainsi la connexion entre certaines données épidémiologiques observées et la physiopathologie de la FPI. Cette hypothèse pourrait se vérifier au niveau du tissu adipeux, un des organes cibles des FGF endocrines. Le tissu adipeux est constitué d'adipocytes qui peuvent se différencier en des cellules proches des myofibroblastes, en cas d'obésité (299). Ces cellules différenciées vont sécréter de façon dérégulée plusieurs adipokines (300), dont certaines ont été impliquées dans la FPI. Ainsi, la leptine induit l'expression de marqueurs myofibroblastiques par les cellules épithéliales alvéolaires et perturbe le flux autophagique de ces cellules (301). D'autre part, il a été montré qu'une augmentation de sa concentration plasmatique était associée à un moins bon pronostic en cas d'exacerbation de la FPI (302). De façon similaire, il existerait une augmentation de la concentration de l'adiponectine au cours de la FPI. Ces adipokines pourraient être des marqueurs pronostiques dans cette pathologie. Un travail récent a montré que le ratio plasmatique Adiponectine/leptine permettait de

prédire la mortalité en cas d'exacerbation la maladie (303). L'implication des anomalies de communications entre le tissu adipeux et le poumon fibreux, sera probablement un futur axe de recherche qui sera développé dans le laboratoire.

# Bibliographie

---

1. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest.* mars 2007;117(3):524-9.
2. Pottier N, Cauffiez C, Perrais M, Barbry P, Mari B. FibromiRs: translating molecular discoveries into new anti-fibrotic drugs. *Trends Pharmacol Sci.* mars 2014;35(3):119-26.
3. Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE, Lynch DA, Nicholson AG, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 sept 2013;188(6):733-48.
4. Martinez FJ, Collard HR, Pardo A, Raghu G, Richeldi L, Selman M, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat Rev Dis Primer.* 20 oct 2017;3:17074.
5. Raghu G, Rochweg B, Zhang Y, Garcia CAC, Azuma A, Behr J, et al. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline: Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Update of the 2011 Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 juill 2015;192(2):e3-19.
6. George PM, Patterson CM, Reed AK, Thillai M. Lung transplantation for idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet Respir Med.* mars 2019;7(3):271-82.
7. Raghu G, Weycker D, Edelsberg J, Bradford WZ, Oster G. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 oct 2006;174(7):810-6.
8. Fernández Pérez ER, Daniels CE, Schroeder DR, St Sauver J, Hartman TE, Bartholmai BJ, et al. Incidence, prevalence, and clinical course of idiopathic pulmonary fibrosis: a population-based study. *Chest.* janv 2010;137(1):129-37.

9. Nalysnyk L, Cid-Ruzafa J, Rotella P, Esser D. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: review of the literature. *Eur Respir Rev Off J Eur Respir Soc.* 1 déc 2012;21(126):355-61.
10. Duchemann B, Annesi-Maesano I, Jacobe de Naurois C, Sanyal S, Brillet P-Y, Brauner M, et al. Prevalence and incidence of interstitial lung diseases in a multi-ethnic county of Greater Paris. *Eur Respir J.* août 2017;50(2):1602419.
11. Raghu G, Chen S-Y, Yeh W-S, Maroni B, Li Q, Lee Y-C, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis in US Medicare beneficiaries aged 65 years and older: incidence, prevalence, and survival, 2001-11. *Lancet Respir Med.* juill 2014;2(7):566-72.
12. Dalleywater W, Powell HA, Hubbard RB, Navaratnam V. Risk factors for cardiovascular disease in people with idiopathic pulmonary fibrosis: a population-based study. *Chest.* janv 2015;147(1):150-6.
13. King CS, Nathan SD. Idiopathic pulmonary fibrosis: effects and optimal management of comorbidities. *Lancet Respir Med.* 2017;5(1):72-84.
14. Raghu G, Remy-Jardin M, Myers JL, Richeldi L, Ryerson CJ, Lederer DJ, et al. Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 sept 2018;198(5):e44-68.
15. Behr J, Kreuter M, Hoepfer MM, Wirtz H, Klotsche J, Koschel D, et al. Management of patients with idiopathic pulmonary fibrosis in clinical practice: the INSIGHTS-IPF registry. *Eur Respir J.* juill 2015;46(1):186-96.
16. Lynch DA, Sverzellati N, Travis WD, Brown KK, Colby TV, Galvin JR, et al. Diagnostic criteria for idiopathic pulmonary fibrosis: a Fleischner Society White Paper. *Lancet Respir Med.* 2018;6(2):138-53.
17. Myers JL, Katzenstein A-LA. Beyond a consensus classification for idiopathic interstitial pneumonias: progress and controversies. *Histopathology.* janv

2009;54(1):90-103.

18. Myers JL, Katzenstein AL. Epithelial necrosis and alveolar collapse in the pathogenesis of usual interstitial pneumonia. *Chest*. déc 1988;94(6):1309-11.
19. Katzenstein AL, Myers JL. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med*. avr 1998;157(4 Pt 1):1301-15.
20. Katzenstein A-LA, Mukhopadhyay S, Myers JL. Diagnosis of usual interstitial pneumonia and distinction from other fibrosing interstitial lung diseases. *Hum Pathol*. sept 2008;39(9):1275-94.
21. Kasper M, Haroske G. Alterations in the alveolar epithelium after injury leading to pulmonary fibrosis. *Histol Histopathol*. avr 1996;11(2):463-83.
22. Borie R, Le Guen P, Ghanem M, Taillé C, Dupin C, Dieudé P, et al. The genetics of interstitial lung diseases. *Eur Respir Rev Off J Eur Respir Soc*. 30 sept 2019;28(153).
23. Seibold MA, Wise AL, Speer MC, Steele MP, Brown KK, Loyd JE, et al. A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 21 avr 2011;364(16):1503-12.
24. Ley B, Newton CA, Arnould I, Elicker BM, Henry TS, Vittinghoff E, et al. The MUC5B promoter polymorphism and telomere length in patients with chronic hypersensitivity pneumonitis: an observational cohort-control study. *Lancet Respir Med*. août 2017;5(8):639-47.
25. Peljto AL, Zhang Y, Fingerlin TE, Ma S-F, Garcia JGN, Richards TJ, et al. Association between the MUC5B promoter polymorphism and survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *JAMA*. 5 juin 2013;309(21):2232-9.
26. Borie R, Tabèze L, Thabut G, Nunes H, Cottin V, Marchand-Adam S, et al. Prevalence and characteristics of TERT and TERC mutations in suspected genetic

- pulmonary fibrosis. *Eur Respir J.* 2016;48(6):1721-31.
27. van Moorsel CHM, van Oosterhout MFM, Barlo NP, de Jong PA, van der Vis JJ, Ruven HJT, et al. Surfactant protein C mutations are the basis of a significant portion of adult familial pulmonary fibrosis in a dutch cohort. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 déc 2010;182(11):1419-25.
28. Kropski JA, Lawson WE, Young LR, Blackwell TS. Genetic studies provide clues on the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Dis Model Mech.* janv 2013;6(1):9-17.
29. Blackburn EH, Epel ES, Lin J. Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science.* 4 déc 2015;350(6265):1193-8.
30. Alder JK, Chen JJ-L, Lancaster L, Danoff S, Su S, Cogan JD, et al. Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2 sept 2008;105(35):13051-6.
31. Newton CA, Batra K, Torrealba J, Kozlitina J, Glazer CS, Aravena C, et al. Telomere-related lung fibrosis is diagnostically heterogeneous but uniformly progressive. *Eur Respir J.* déc 2016;48(6):1710-20.
32. Dressen A, Abbas AR, Cabanski C, Reeder J, Ramalingam TR, Neighbors M, et al. Analysis of protein-altering variants in telomerase genes and their association with MUC5B common variant status in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: a candidate gene sequencing study. *Lancet Respir Med.* août 2018;6(8):603-14.
33. Borie R, Kannengiesser C, Hirschi S, Le Pavec J, Mal H, Bergot E, et al. Severe hematologic complications after lung transplantation in patients with telomerase complex mutations. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant.* avr 2015;34(4):538-46.

34. Papiris SA, Tsirigotis P, Kannengiesser C, Kolilekas L, Gkirkas K, Papaioannou AI, et al. Myelodysplastic syndromes and idiopathic pulmonary fibrosis: a dangerous liaison. *Respir Res.* 13 août 2019;20(1):182.
35. Taskar VS, Coultas DB. Is idiopathic pulmonary fibrosis an environmental disease? *Proc Am Thorac Soc.* juin 2006;3(4):293-8.
36. Conti S, Harari S, Caminati A, Zanobetti A, Schwartz JD, Bertazzi PA, et al. The association between air pollution and the incidence of idiopathic pulmonary fibrosis in Northern Italy. *Eur Respir J.* janv 2018;51(1).
37. Sesé L, Nunes H, Cottin V, Sanyal S, Didier M, Carton Z, et al. Role of atmospheric pollution on the natural history of idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax.* févr 2018;73(2):145-50.
38. Winterbottom CJ, Shah RJ, Patterson KC, Kreider ME, Panettieri RA, Rivera-Lebron B, et al. Exposure to Ambient Particulate Matter Is Associated With Accelerated Functional Decline in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Chest.* 9 août 2017;
39. King TE, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, du Bois RM, Leff JA, et al. All-cause mortality rate in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Implications for the design and execution of clinical trials. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 avr 2014;189(7):825-31.
40. Ley B, Bradford WZ, Vittinghoff E, Weycker D, du Bois RM, Collard HR. Predictors of Mortality Poorly Predict Common Measures of Disease Progression in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 sept 2016;194(6):711-8.
41. Collard HR, Ryerson CJ, Corte TJ, Jenkins G, Kondoh Y, Lederer DJ, et al. Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An International Working Group Report. *Am J Respir Crit Care Med.* août 2016;194(3):265-75.

42. King TE, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet Lond Engl*. 3 déc 2011;378(9807):1949-61.
43. Flaherty KR, Mumford JA, Murray S, Kazerooni EA, Gross BH, Colby TV, et al. Prognostic implications of physiologic and radiographic changes in idiopathic interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 sept 2003;168(5):543-8.
44. du Bois RM, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Leff JA, Noble PW, et al. 6-Minute walk distance is an independent predictor of mortality in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. mai 2014;43(5):1421-9.
45. Ley B, Ryerson CJ, Vittinghoff E, Ryu JH, Tomassetti S, Lee JS, et al. A multidimensional index and staging system for idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann Intern Med*. 15 mai 2012;156(10):684-91.
46. Wakwaya Y, Brown KK. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Epidemiology, Diagnosis and Outcomes. *Am J Med Sci*. 2019;357(5):359-69.
47. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 mars 2011;183(6):788-824.
48. Conte E, Gili E, Fagone E, Fruciano M, Iemmolo M, Vancheri C. Effect of pirfenidone on proliferation, TGF- $\beta$ -induced myofibroblast differentiation and fibrogenic activity of primary human lung fibroblasts. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci*. 16 juill 2014;58:13-9.
49. Liu Y, Lu F, Kang L, Wang Z, Wang Y. Pirfenidone attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by regulating Nrf2/Bach1 equilibrium. *BMC Pulm Med*. 18 2017;17(1):63.
50. Inomata M, Kamio K, Azuma A, Matsuda K, Kokuho N, Miura Y, et al.

Pirfenidone inhibits fibrocyte accumulation in the lungs in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis. *Respir Res.* 8 févr 2014;15:16.

51. Liu Y, Lu F, Kang L, Wang Z, Wang Y. Pirfenidone attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by regulating Nrf2/Bach1 equilibrium. *BMC Pulm Med.* 18 2017;17(1):63.

52. Kolb M, Raghu G, Wells AU, Behr J, Richeldi L, Schinzel B, et al. Nintedanib plus Sildenafil in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med.* 15 sept 2018;

53. Wollin L, Wex E, Pautsch A, Schnapp G, Hostettler KE, Stowasser S, et al. Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J.* mai 2015;45(5):1434-45.

54. Wollin L, Maillet I, Quesniaux V, Holweg A, Ryffel B. Antifibrotic and anti-inflammatory activity of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib in experimental models of lung fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther.* mai 2014;349(2):209-20.

55. Hewlett JC, Kropski JA, Blackwell TS. Idiopathic pulmonary fibrosis: Epithelial-mesenchymal interactions and emerging therapeutic targets. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol.* 2018;71-72:112-27.

56. Scadding JG, Hinson KF. Diffuse fibrosing alveolitis (diffuse interstitial fibrosis of the lungs). Correlation of histology at biopsy with prognosis. *Thorax.* juill 1967;22(4):291-304.

57. Noble PW, Homer RJ. Back to the future: historical perspective on the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* août 2005;33(2):113-20.

58. Froidure A, Joannes A, Mailleux AA, Crestani B. New targets in idiopathic pulmonary fibrosis: from inflammation and immunity to remodeling and repair. *Expert*

Opin Orphan Drugs. 3 mai 2016;4(5):511-20.

59. B Moore B, Lawson WE, Oury TD, Sisson TH, Raghavendran K, Hogaboam

CM. Animal models of fibrotic lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* août

2013;49(2):167-79.

60. Chua F, Gauldie J, Laurent GJ. Pulmonary fibrosis: searching for model

answers. *Am J Respir Cell Mol Biol.* juill 2005;33(1):9-13.

61. Duggan DB, Petroni GR, Johnson JL, Glick JH, Fisher RI, Connors JM, et al.

Randomized comparison of ABVD and MOPP/ABV hybrid for the treatment of

advanced Hodgkin's disease: report of an intergroup trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc*

*Clin Oncol.* 15 févr 2003;21(4):607-14.

62. Froudarakis M, Hatzimichael E, Kyriazopoulou L, Lagos K, Pappas P, Tzakos

AG, et al. Revisiting bleomycin from pathophysiology to safe clinical use. *Crit Rev*

*Oncol Hematol.* juill 2013;87(1):90-100.

63. Schwartz DR, Homanics GE, Hoyt DG, Klein E, Abernethy J, Lazo JS. The

neutral cysteine protease bleomycin hydrolase is essential for epidermal integrity and

bleomycin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 13 avr 1999;96(8):4680-5.

64. Chen J, Stubbe J. Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat Rev Cancer.*

févr 2005;5(2):102-12.

65. Chung MP, Monick MM, Hamzeh NY, Butler NS, Powers LS, Hunninghake

GW. Role of repeated lung injury and genetic background in bleomycin-induced

fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* sept 2003;29(3 Pt 1):375-80.

66. Phan SH, Kunkel SL. Lung cytokine production in bleomycin-induced

pulmonary fibrosis. *Exp Lung Res.* mars 1992;18(1):29-43.

67. Chaudhary NI, Schnapp A, Park JE. Pharmacologic differentiation of

inflammation and fibrosis in the rat bleomycin model. *Am J Respir Crit Care Med.* 1

avr 2006;173(7):769-76.

68. Usuki J, Fukuda Y. Evolution of three patterns of intra-alveolar fibrosis produced by bleomycin in rats. *Pathol Int.* août 1995;45(8):552-64.

69. Polosukhin VV, Stathopoulos GT, Lawson WE, Blackwell TS. Variability of interalveolar septal remodeling after bleomycin treatment in mice. *Ultrastruct Pathol.* févr 2005;29(1):53-64.

70. Decolgne N, Kolb M, Margetts PJ, Menetrier F, Artur Y, Garrido C, et al. TGF-beta1 induces progressive pleural scarring and subpleural fibrosis. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 nov 2007;179(9):6043-51.

71. Sime PJ, Xing Z, Graham FL, Csaky KG, Gauldie J. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J Clin Invest.* 15 août 1997;100(4):768-76.

72. Hastie E, Samulski RJ. Adeno-associated virus at 50: a golden anniversary of discovery, research, and gene therapy success--a personal perspective. *Hum Gene Ther.* mai 2015;26(5):257-65.

73. Handumrongkul C, Ye AL, Chmura SA, Soroceanu L, Mack M, Ice RJ, et al. Durable multitransgene expression in vivo using systemic, nonviral DNA delivery. *Sci Adv.* nov 2019;5(11):eaax0217.

74. Bennett J, Wellman J, Marshall KA, McCague S, Ashtari M, DiStefano-Pappas J, et al. Safety and durability of effect of contralateral-eye administration of AAV2 gene therapy in patients with childhood-onset blindness caused by RPE65 mutations: a follow-on phase 1 trial. *Lancet Lond Engl.* 13 août 2016;388(10045):661-72.

75. Dong B, Nakai H, Xiao W. Characterization of Genome Integrity for Oversized Recombinant AAV Vector. *Mol Ther.* janv 2010;18(1):87-92.

76. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J*

Med. 4 mai 2000;342(18):1334-49.

77. Whitsett JA, Pilot T, Clark JC, Weaver TE. Induction of surfactant protein in fetal lung. Effects of cAMP and dexamethasone on SAP-35 RNA and synthesis. *J Biol Chem.* 15 avr 1987;262(11):5256-61.

78. Mason RJ. Biology of alveolar type II cells. *Respirol Carlton Vic.* janv 2006;11 Suppl:S12-15.

79. Gereke M, Jung S, Buer J, Bruder D. Alveolar type II epithelial cells present antigen to CD4(+) T cells and induce Foxp3(+) regulatory T cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 mars 2009;179(5):344-55.

80. Selman M, King TE, Pardo A, American Thoracic Society, European Respiratory Society, American College of Chest Physicians. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med.* 16 janv 2001;134(2):136-51.

81. Khalil N, O'Connor RN, Unruh HW, Warren PW, Flanders KC, Kemp A, et al. Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* août 1991;5(2):155-62.

82. Khalil N, O'Connor RN, Flanders KC, Unruh H. 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.* févr 1996;14(2):131-8.

83. Antoniadou HN, Bravo MA, Avila RE, Galanopoulos T, Neville-Golden J, Maxwell M, et al. Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest.* oct 1990;86(4):1055-64.

84. Pan LH, Yamauchi K, Uzuki M, Nakanishi T, Takigawa M, Inoue H, et al. Type

II alveolar epithelial cells and interstitial fibroblasts express connective tissue growth factor in IPF. *Eur Respir J.* juin 2001;17(6):1220-7.

85. Scotton CJ, Chambers RC. Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus. *Chest.* oct 2007;132(4):1311-21.

86. Uhal BD, Joshi I, True AL, Mundle S, Raza A, Pardo A, et al. Fibroblasts isolated after fibrotic lung injury induce apoptosis of alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol.* déc 1995;269(6 Pt 1):L819-828.

87. Uhal BD, Joshi I, Hughes WF, Ramos C, Pardo A, Selman M. Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung. *Am J Physiol.* déc 1998;275(6 Pt 1):L1192-1199.

88. Selman M, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respir Res.* 2002;3:3.

89. Minagawa S, Araya J, Numata T, Nojiri S, Hara H, Yumino Y, et al. Accelerated epithelial cell senescence in IPF and the inhibitory role of SIRT6 in TGF- $\beta$ -induced senescence of human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* mars 2011;300(3):L391-401.

90. Bueno M, Lai Y-C, Romero Y, Brands J, St. Croix CM, Kanga C, et al. PINK1 deficiency impairs mitochondrial homeostasis and promotes lung fibrosis. *J Clin Invest.* 2 févr 2015;125(2):521-38.

91. Pardo A, Selman M. Lung Fibroblasts, Aging, and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Ann Am Thorac Soc.* déc 2016;13(Supplement\_5):S417-21.

92. Sueblinvong V, Neujahr DC, Mills ST, Roser-Page S, Ritzenthaler JD, Guidot D, et al. Predisposition for disrepair in the aged lung. *Am J Med Sci.* juill 2012;344(1):41-51.

93. Barbas-Filho JV, Ferreira MA, Sesso A, Kairalla RA, Carvalho CR, Capelozzi

- VL. Evidence of type II pneumocyte apoptosis in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)/usual interstitial pneumonia (UIP). *J Clin Pathol.* févr 2001;54(2):132-8.
94. Kuwano K, Kunitake R, Kawasaki M, Nomoto Y, Hagimoto N, Nakanishi Y, et al. P21Waf1/Cip1/Sdi1 and p53 expression in association with DNA strand breaks in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* août 1996;154(2 Pt 1):477-83.
95. Golan-Gerstl R, Wallach-Dayana SB, Amir G, Breuer R. Epithelial cell apoptosis by fas ligand-positive myofibroblasts in lung fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* mars 2007;36(3):270-5.
96. Kang H-R, Cho SJ, Lee CG, Homer RJ, Elias JA. Transforming growth factor (TGF)-beta1 stimulates pulmonary fibrosis and inflammation via a Bax-dependent, bid-activated pathway that involves matrix metalloproteinase-12. *J Biol Chem.* 9 mars 2007;282(10):7723-32.
97. Smirnova NF, Schamberger AC, Nayakanti S, Hatz R, Behr J, Eickelberg O. Detection and quantification of epithelial progenitor cell populations in human healthy and IPF lungs. *Respir Res.* 16 2016;17(1):83.
98. Xu Y, Mizuno T, Sridharan A, Du Y, Guo M, Tang J, et al. Single-cell RNA sequencing identifies diverse roles of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *JCI Insight.* 08 2016;1(20):e90558.
99. Prasse A, Binder H, Schupp JC, Kayser G, Bargagli E, Jaeger B, et al. BAL Cell Gene Expression Is Indicative of Outcome and Airway Basal Cell Involvement in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 01 2019;199(5):622-30.
100. Burman A, Tanjore H, Blackwell TS. Endoplasmic reticulum stress in pulmonary fibrosis. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol.* 2018;68-69:355-65.

101. Klay D, Hoffman TW, Harmsze AM, Grutters JC, van Moorsel CHM. Systematic review of drug effects in humans and models with surfactant-processing disease. *Eur Respir Rev Off J Eur Respir Soc.* 30 sept 2018;27(149).
102. Korfei M, Ruppert C, Mahavadi P, Henneke I, Markart P, Koch M, et al. Epithelial endoplasmic reticulum stress and apoptosis in sporadic idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 oct 2008;178(8):838-46.
103. Lawson WE, Crossno PF, Polosukhin VV, Roldan J, Cheng D-S, Lane KB, et al. Endoplasmic reticulum stress in alveolar epithelial cells is prominent in IPF: association with altered surfactant protein processing and herpesvirus infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* juin 2008;294(6):L1119-1126.
104. Lawson WE, Cheng D-S, Degryse AL, Tanjore H, Polosukhin VV, Xu XC, et al. Endoplasmic reticulum stress enhances fibrotic remodeling in the lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28 juin 2011;108(26):10562-7.
105. Baek HA, Kim DS, Park HS, Jang KY, Kang MJ, Lee DG, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in myofibroblastic differentiation of lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol.* juin 2012;46(6):731-9.
106. Delbrel E, Soumare A, Naguez A, Label R, Bernard O, Bruhat A, et al. HIF-1 $\alpha$  triggers ER stress and CHOP-mediated apoptosis in alveolar epithelial cells, a key event in pulmonary fibrosis. *Sci Rep.* déc 2018;8(1):17939.
107. Massaro GD, Gail DB, Massaro D. Lung oxygen consumption and mitochondria of alveolar epithelial and endothelial cells. *J Appl Physiol.* avr 1975;38(4):588-92.
108. Mora AL, Bueno M, Rojas M. Mitochondria in the spotlight of aging and idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest.* 1 févr 2017;127(2):405-14.
109. Bratic A, Larsson N-G. The role of mitochondria in aging. *J Clin Invest.* mars

2013;123(3):951-7.

110. Patel AS, Song JW, Chu SG, Mizumura K, Osorio JC, Shi Y, et al. Epithelial cell mitochondrial dysfunction and PINK1 are induced by transforming growth factor-beta1 in pulmonary fibrosis. *PloS One*. 2015;10(3):e0121246.

111. Haynes CM, Titus EA, Cooper AA. Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death. *Mol Cell*. 10 sept 2004;15(5):767-76.

112. Xue X, Piao J-H, Nakajima A, Sakon-Komazawa S, Kojima Y, Mori K, et al. Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) induces the unfolded protein response (UPR) in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion, and the UPR counteracts ROS accumulation by TNFalpha. *J Biol Chem*. 7 oct 2005;280(40):33917-25.

113. Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal*. déc 2007;9(12):2277-93.

114. Santos CXC, Tanaka LY, Wosniak J, Laurindo FRM. Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. *Antioxid Redox Signal*. oct 2009;11(10):2409-27.

115. Kinnula VL, Crapo JD, Raivio KO. Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. *Lab Investig J Tech Methods Pathol*. juill 1995;73(1):3-19.

116. Waghray M, Cui Z, Horowitz JC, Subramanian IM, Martinez FJ, Toews GB, et al. Hydrogen peroxide is a diffusible paracrine signal for the induction of epithelial cell death by activated myofibroblasts. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. mai 2005;19(7):854-6.

117. Psathakis K, Mermigkis D, Papatheodorou G, Loukides S, Panagou P,

- Polychronopoulos V, et al. Exhaled markers of oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur J Clin Invest*. mai 2006;36(5):362-7.
118. Amara N, Goven D, Prost F, Muloway R, Crestani B, Boczkowski J. NOX4/NADPH oxidase expression is increased in pulmonary fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and mediates TGFbeta1-induced fibroblast differentiation into myofibroblasts. *Thorax*. août 2010;65(8):733-8.
119. Kuhn C, McDonald JA. The roles of the myofibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis. Ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis. *Am J Pathol*. mai 1991;138(5):1257-65.
120. Klingberg F, Hinz B, White ES. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *J Pathol*. janv 2013;229(2):298-309.
121. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmoulière A, Varga J, et al. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol*. avr 2012;180(4):1340-55.
122. Hinz B, Gabbiani G, Chaponnier C. The NH2-terminal peptide of alpha-smooth muscle actin inhibits force generation by the myofibroblast in vitro and in vivo. *J Cell Biol*. 13 mai 2002;157(4):657-63.
123. Desmoulière A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc*. févr 2005;13(1):7-12.
124. Hardie WD, Glasser SW, Hagood JS. Emerging concepts in the pathogenesis of lung fibrosis. *Am J Pathol*. juill 2009;175(1):3-16.
125. Bonniaud P, Kolb M, Galt T, Robertson J, Robbins C, Stampfli M, et al. Smad3 null mice develop airspace enlargement and are resistant to TGF-beta-mediated pulmonary fibrosis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 août 2004;173(3):2099-108.

126. Abdollahi A, Li M, Ping G, Plathow C, Domhan S, Kiessling F, et al. Inhibition of platelet-derived growth factor signaling attenuates pulmonary fibrosis. *J Exp Med*. 21 mars 2005;201(6):925-35.
127. Wu H, Yu Y, Huang H, Hu Y, Fu S, Wang Z, et al. Progressive Pulmonary Fibrosis Is Caused by Elevated Mechanical Tension on Alveolar Stem Cells. *Cell*. 16 déc 2019;
128. Zolak JS, Jagirdar R, Surolia R, Karki S, Oliva O, Hock T, et al. Pleural mesothelial cell differentiation and invasion in fibrogenic lung injury. *Am J Pathol*. avr 2013;182(4):1239-47.
129. Karki S, Surolia R, Hock TD, Guroji P, Zolak JS, Duggal R, et al. Wilms' tumor 1 (Wt1) regulates pleural mesothelial cell plasticity and transition into myofibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. mars 2014;28(3):1122-31.
130. Sontake V, Shanmukhappa SK, DiPasquale BA, Reddy GB, Medvedovic M, Hardie WD, et al. Fibrocytes Regulate Wilms Tumor 1-Positive Cell Accumulation in Severe Fibrotic Lung Disease. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 oct 2015;195(8):3978-91.
131. Mubarak KK, Montes-Worboys A, Regev D, Nasreen N, Mohammed KA, Faruqi I, et al. Parenchymal trafficking of pleural mesothelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. janv 2012;39(1):133-40.
132. Rock JR, Barkauskas CE, Cronic MJ, Xue Y, Harris JR, Liang J, et al. Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 27 déc 2011;108(52):E1475-1483.
133. Tanjore H, Xu XC, Polosukhin VV, Degryse AL, Li B, Han W, et al.

Contribution of epithelial-derived fibroblasts to bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 oct 2009;180(7):657-65.

134. Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, et al. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 29 août 2006;103(35):13180-5.

135. Hung C, Linn G, Chow Y-H, Kobayashi A, Mittelsteadt K, Altemeier WA, et al. Role of lung pericytes and resident fibroblasts in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 oct 2013;188(7):820-30.

136. Barron L, Gharib SA, Duffield JS. Lung Pericytes and Resident Fibroblasts: Busy Multitaskers. *Am J Pathol.* 2016;186(10):2519-31.

137. Wilson CL, Stephenson SE, Higuero JP, Feghali-Bostwick C, Hung CF, Schnapp LM. Characterization of human PDGFR- $\beta$ -positive pericytes from IPF and non-IPF lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 01 2018;315(6):L991-1002.

138. Wu J, Chu X, Chen C, Bellusci S. Role of Fibroblast Growth Factor 10 in Mesenchymal Cell Differentiation During Lung Development and Disease. *Front Genet.* 2018;9:545.

139. El Agha E, Moiseenko A, Kheirollahi V, De Langhe S, Crnkovic S, Kwapiszewska G, et al. Two-Way Conversion between Lipogenic and Myogenic Fibroblastic Phenotypes Marks the Progression and Resolution of Lung Fibrosis. *Cell Stem Cell.* 02 2017;20(2):261-273.e3.

140. Kheirollahi V, Wasnick RM, Biasin V, Vazquez-Armendariz AI, Chu X, Moiseenko A, et al. Metformin induces lipogenic differentiation in myofibroblasts to reverse lung fibrosis. *Nat Commun.* déc 2019;10(1):2987.

141. Phillips RJ, Burdick MD, Hong K, Lutz MA, Murray LA, Xue YY, et al.

Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J Clin Invest.* août 2004;114(3):438-46.

142. Borie R, Quesnel C, Phin S, Debray M-P, Marchal-Somme J, Tiev K, et al. Detection of alveolar fibrocytes in idiopathic pulmonary fibrosis and systemic sclerosis. *PLoS One.* 2013;8(1):e53736.

143. Mehrad B, Burdick MD, Zisman DA, Keane MP, Belperio JA, Strieter RM. Circulating peripheral blood fibrocytes in human fibrotic interstitial lung disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2 févr 2007;353(1):104-8.

144. Pilling D, Roife D, Wang M, Ronkainen SD, Crawford JR, Travis EL, et al. Reduction of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis by Serum Amyloid P. *J Immunol.* 15 sept 2007;179(6):4035-44.

145. Ajayi IO, Sisson TH, Higgins PDR, Booth AJ, Sagana RL, Huang SK, et al. X-linked inhibitor of apoptosis regulates lung fibroblast resistance to Fas-mediated apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* juill 2013;49(1):86-95.

146. Sisson TH, Maher TM, Ajayi IO, King JE, Higgins PDR, Booth AJ, et al. Increased survivin expression contributes to apoptosis-resistance in IPF fibroblasts. *Adv Biosci Biotechnol Print.* oct 2012;3(6A):657-64.

147. Clark DA, Coker R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol.* mars 1998;30(3):293-8.

148. Fernandez IE, Eickelberg O. The impact of TGF- $\beta$  on lung fibrosis: from targeting to biomarkers. *Proc Am Thorac Soc.* juill 2012;9(3):111-6.

149. Zhang HY, Phan SH. Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor beta(1). *Am J Respir Cell Mol Biol.* déc 1999;21(6):658-65.

150. Huang SK, White ES, Wettlaufer SH, Grifka H, Hogaboam CM, Thannickal VJ, et al. Prostaglandin E(2) induces fibroblast apoptosis by modulating multiple survival

- pathways. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* déc 2009;23(12):4317-26.
151. Maher TM, Evans IC, Bottoms SE, Mercer PF, Thorley AJ, Nicholson AG, et al. Diminished prostaglandin E2 contributes to the apoptosis paradox in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 juill 2010;182(1):73-82.
152. Kolodsick JE, Peters-Golden M, Larios J, Toews GB, Thannickal VJ, Moore BB. Prostaglandin E2 inhibits fibroblast to myofibroblast transition via E. prostanoid receptor 2 signaling and cyclic adenosine monophosphate elevation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* nov 2003;29(5):537-44.
153. Thomas PE, Peters-Golden M, White ES, Thannickal VJ, Moore BB. PGE(2) inhibition of TGF-beta1-induced myofibroblast differentiation is Smad-independent but involves cell shape and adhesion-dependent signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* août 2007;293(2):L417-428.
154. Li Y-J, Wang X-Q, Sato T, Kanaji N, Nakanishi M, Kim M, et al. Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits human lung fibroblast chemotaxis through disparate actions on different E-prostanoid receptors. *Am J Respir Cell Mol Biol.* janv 2011;44(1):99-107.
155. Wilborn J, Crofford LJ, Burdick MD, Kunkel SL, Strieter RM, Peters-Golden M. Cultured lung fibroblasts isolated from patients with idiopathic pulmonary fibrosis have a diminished capacity to synthesize prostaglandin E2 and to express cyclooxygenase-2. *J Clin Invest.* avr 1995;95(4):1861-8.
156. Araya J, Kojima J, Takasaka N, Ito S, Fujii S, Hara H, et al. Insufficient autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1 janv 2013;304(1):L56-69.
157. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet.* 2009;43:67-93.
158. Nho RS, Hergert P. IPF fibroblasts are desensitized to type I collagen matrix-

induced cell death by suppressing low autophagy via aberrant Akt/mTOR kinases.

PloS One. 2014;9(4):e94616.

159. Patel AS, Lin L, Geyer A, Haspel JA, An CH, Cao J, et al. Autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. PloS One. 2012;7(7):e41394.

160. Ricci A, Cherubini E, Scozzi D, Pietrangeli V, Tabbì L, Raffa S, et al. Decreased expression of autophagic beclin 1 protein in idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts. J Cell Physiol. juill 2013;228(7):1516-24.

161. Marchal-Sommé J, Uzunhan Y, Marchand-Adam S, Valeyre D, Soumelis V, Crestani B, et al. Cutting edge: nonproliferating mature immune cells form a novel type of organized lymphoid structure in idiopathic pulmonary fibrosis. J Immunol Baltim Md 1950. 15 mai 2006;176(10):5735-9.

162. Marchal-Sommé J, Uzunhan Y, Marchand-Adam S, Kambouchner M, Valeyre D, Crestani B, et al. Dendritic cells accumulate in human fibrotic interstitial lung disease. Am J Respir Crit Care Med. 15 nov 2007;176(10):1007-14.

163. Withana NP, Ma X, McGuire HM, Verdoes M, van der Linden WA, Ofori LO, et al. Non-invasive Imaging of Idiopathic Pulmonary Fibrosis Using Cathepsin Protease Probes. Sci Rep. 22 janv 2016;6:19755.

164. Byrne AJ, Mathie SA, Gregory LG, Lloyd CM. Pulmonary macrophages: key players in the innate defence of the airways. Thorax. déc 2015;70(12):1189-96.

165. Bantsimba-Malanda C, Marchal-Sommé J, Goven D, Freynet O, Michel L, Crestani B, et al. A role for dendritic cells in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice? Am J Respir Crit Care Med. 1 août 2010;182(3):385-95.

166. Balestro E, Calabrese F, Turato G, Lunardi F, Bazzan E, Marulli G, et al. Immune Inflammation and Disease Progression in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. PloS One. 2016;11(5):e0154516.

167. Dickson RP, Huffnagle GB, Flaherty KR, White ES, Martinez FJ, Erb-Downward JR, et al. Radiographic Honeycombing and Altered Lung Microbiota in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 16 août 2019;
168. O'Dwyer DN, Ashley SL, Gurczynski SJ, Xia M, Wilke C, Falkowski NR, et al. Lung Microbiota Contribute to Pulmonary Inflammation and Disease Progression in Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 mai 2019;199(9):1127-38.
169. Spagnolo P, Molyneaux PL, Bernardinello N, Cocconcelli E, Biondini D, Fracasso F, et al. The Role of the Lung's Microbiome in the Pathogenesis and Progression of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Int J Mol Sci*. 10 nov 2019;20(22).
170. Zepp JA, Morrisey EE. Cellular crosstalk in the development and regeneration of the respiratory system. *Nat Rev Mol Cell Biol*. sept 2019;20(9):551-66.
171. Zepp JA, Zacharias WJ, Frank DB, Cavanaugh CA, Zhou S, Morley MP, et al. Distinct Mesenchymal Lineages and Niches Promote Epithelial Self-Renewal and Myofibrogenesis in the Lung. *Cell*. 7 sept 2017;170(6):1134-1148.e10.
172. Nabhan AN, Brownfield DG, Harbury PB, Krasnow MA, Desai TJ. Single-cell Wnt signaling niches maintain stemness of alveolar type 2 cells. *Science*. 09 2018;359(6380):1118-23.
173. Zuo W, Zhang T, Wu DZ, Guan SP, Liew A-A, Yamamoto Y, et al. p63(+)Krt5(+) distal airway stem cells are essential for lung regeneration. *Nature*. 29 janv 2015;517(7536):616-20.
174. Ray S, Chiba N, Yao C, Guan X, McConnell AM, Brockway B, et al. Rare SOX2+ Airway Progenitor Cells Generate KRT5+ Cells that Repopulate Damaged Alveolar Parenchyma following Influenza Virus Infection. *Stem Cell Rep*. 08 2016;7(5):817-25.

175. Herriges M, Morrisey EE. Lung development: orchestrating the generation and regeneration of a complex organ. *Development*. 1 févr 2014;141(3):502-13.
176. Volckaert T, De Langhe SP. Wnt and FGF mediated epithelial-mesenchymal crosstalk during lung development. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat*. mars 2015;244(3):342-66.
177. Chanda D, Kurundkar A, Rangarajan S, Locy M, Bernard K, Sharma NS, et al. Developmental Reprogramming in Mesenchymal Stromal Cells of Human Subjects with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Sci Rep*. 21 2016;6:37445.
178. Clark DA, Coker R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol*. mars 1998;30(3):293-8.
179. Aschner Y, Downey GP. Transforming Growth Factor- $\beta$ : Master Regulator of the Respiratory System in Health and Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016;54(5):647-55.
180. Fernandez IE, Eickelberg O. The impact of TGF- $\beta$  on lung fibrosis: from targeting to biomarkers. *Proc Am Thorac Soc*. juill 2012;9(3):111-6.
181. Pongracz JE, Stockley RA. Wnt signalling in lung development and diseases. *Respir Res*. déc 2006;7(1):15.
182. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:781-810.
183. Hashimoto S, Chen H, Que J, Brockway BL, Drake JA, Snyder JC, et al.  $\beta$ -Catenin-SOX2 signaling regulates the fate of developing airway epithelium. *J Cell Sci*. 15 févr 2012;125(Pt 4):932-42.
184. Lehmann M, Baarsma HA, Königshoff M. WNT Signaling in Lung Aging and Disease. *Ann Am Thorac Soc*. 2016;13 Suppl 5:S411-6.
185. Königshoff M, Balsara N, Pfaff E-M, Kramer M, Chrobak I, Seeger W, et al.

Functional Wnt signaling is increased in idiopathic pulmonary fibrosis. *PloS One*. 14 mai 2008;3(5):e2142.

186. Horn A, Palumbo K, Cordazzo C, Dees C, Akhmetshina A, Tomcik M, et al. Hedgehog signaling controls fibroblast activation and tissue fibrosis in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. août 2012;64(8):2724-33.

187. Henderson WR, Chi EY, Ye X, Nguyen C, Tien Y, Zhou B, et al. Inhibition of Wnt/beta-catenin/CREB binding protein (CBP) signaling reverses pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 10 août 2010;107(32):14309-14.

188. Kugler MC, Joyner AL, Loomis CA, Munger JS. Sonic hedgehog signaling in the lung. From development to disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. janv 2015;52(1):1-13.

189. Cigna N, Farrokhi Moshai E, Brayer S, Marchal-Somme J, Wémeau-Stervinou L, Fabre A, et al. The hedgehog system machinery controls transforming growth factor- $\beta$ -dependent myofibroblastic differentiation in humans: involvement in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*. déc 2012;181(6):2126-37.

190. Moshai EF, Wémeau-Stervinou L, Cigna N, Brayer S, Sommé JM, Crestani B, et al. Targeting the hedgehog-glioma-associated oncogene homolog pathway inhibits bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. juill 2014;51(1):11-25.

191. Xu K, Moghal N, Egan SE. Notch Signaling in Lung Development and Disease. In: Reichrath J, Reichrath S, éditeurs. *Notch Signaling in Embryology and Cancer* [Internet]. New York, NY: Springer US; 2012 [cité 14 déc 2019]. p. 89-98. Disponible sur: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-0899-4\\_7](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-0899-4_7)

192. Bray SJ. Notch signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*. nov 2016;17(11):722-35.

193. Tsao P-N, Vasconcelos M, Izvolsky KI, Qian J, Lu J, Cardoso WV. Notch signaling controls the balance of ciliated and secretory cell fates in developing airways. *Dev Camb Engl*. juill 2009;136(13):2297-307.
194. Nosedá M, Fu Y, Niessen K, Wong F, Chang L, McLean G, et al. Smooth Muscle alpha-actin is a direct target of Notch/CSL. *Circ Res*. 23 juin 2006;98(12):1468-70.
195. Zhou Y, Liao S, Zhang Z, Wang B, Wan L. Astragalus injection attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via down-regulating Jagged1/Notch1 in lungs. *J Pharm Pharmacol*. mars 2016;68(3):389-96.
196. Guo X, Wang X-F. Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res*. janv 2009;19(1):71-88.
197. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 13 juin 2003;113(6):685-700.
198. Lam AP, Herazo-Maya JD, Sennello JA, Flozak AS, Russell S, Mutlu GM, et al. Wnt coreceptor Lrp5 is a driver of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 juill 2014;190(2):185-95.
199. Carlson ME, Hsu M, Conboy IM. Imbalance between pSmad3 and Notch induces CDK inhibitors in old muscle stem cells. *Nature*. 24 juill 2008;454(7203):528-32.
200. Liu T, Hu B, Choi YY, Chung M, Ullenbruch M, Yu H, et al. Notch1 signaling in FIZZ1 induction of myofibroblast differentiation. *Am J Pathol*. mai 2009;174(5):1745-55.
201. Zavadil J, Cermak L, Soto-Nieves N, Böttinger EP. Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. *EMBO J*. 10 mars 2004;23(5):1155-65.

202. Bolaños AL, Milla CM, Lira JC, Ramírez R, Checa M, Barrera L, et al. Role of Sonic Hedgehog in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1 déc 2012;303(11):L978-990.
203. Cigna N, Farrokhi Moshai E, Brayer S, Marchal-Somme J, Wémeau-Stervinou L, Fabre A, et al. The hedgehog system machinery controls transforming growth factor- $\beta$ -dependent myofibroblastic differentiation in humans: involvement in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*. déc 2012;181(6):2126-37.
204. McQualter JL, McCarty RC, Van der Velden J, O'Donoghue RJJ, Asselin-Labat M-L, Bozinovski S, et al. TGF- $\beta$  signaling in stromal cells acts upstream of FGF-10 to regulate epithelial stem cell growth in the adult lung. *Stem Cell Res*. nov 2013;11(3):1222-33.
205. Goetz R, Mohammadi M. Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. mars 2013;14(3):166-80.
206. Ornitz DM, Itoh N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. juin 2015;4(3):215-66.
207. Arese M, Chen Y, Florkiewicz RZ, Gualandris A, Shen B, Rifkin DB. Nuclear Activities of Basic Fibroblast Growth Factor: Potentiation of Low-Serum Growth Mediated by Natural or Chimeric Nuclear Localization Signals. *Mol Biol Cell*. mai 1999;10(5):1429-44.
208. Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem*. 21 juin 1996;271(25):15292-7.
209. Ornitz DM, Itoh N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. mai 2015;4(3):215-66.
210. Müller A-K, Meyer M, Werner S. The roles of receptor tyrosine kinases and

- their ligands in the wound repair process. *Semin Cell Dev Biol.* 1 déc 2012;23(9):963-70.
211. Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* 2001;2(3):REVIEWS3005.
212. Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov.* mars 2009;8(3):235-53.
213. Ornitz DM, Leder P. Ligand specificity and heparin dependence of fibroblast growth factor receptors 1 and 3. *J Biol Chem.* 15 août 1992;267(23):16305-11.
214. Ornitz DM, Yayon A, Flanagan JG, Svahn CM, Levi E, Leder P. Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. *Mol Cell Biol.* janv 1992;12(1):240-7.
215. Kuro-O M. The Klotho proteins in health and disease. *Nat Rev Nephrol.* 2019;15(1):27-44.
216. Razzaque MS. The role of Klotho in energy metabolism. *Nat Rev Endocrinol.* oct 2012;8(10):579-87.
217. Dikic I, Giordano S. Negative receptor signalling. *Curr Opin Cell Biol.* avr 2003;15(2):128-35.
218. Fürthauer M, Lin W, Ang S-L, Thisse B, Thisse C. Sef is a feedback-induced antagonist of Ras/MAPK-mediated FGF signalling. *Nat Cell Biol.* févr 2002;4(2):170-4.
219. Francavilla C, Rigbolt KTG, Emdal KB, Carraro G, Vernet E, Bekker-Jensen DB, et al. Functional proteomics defines the molecular switch underlying FGF receptor trafficking and cellular outputs. *Mol Cell.* 26 sept 2013;51(6):707-22.
220. Belleudi F, Leone L, Nobili V, Raffa S, Francescangeli F, Maggio M, et al. Keratinocyte growth factor receptor ligands target the receptor to different

- intracellular pathways. *Traffic Cph Den.* déc 2007;8(12):1854-72.
221. Bellusci S, Grindley J, Emoto H, Itoh N, Hogan BL. Fibroblast growth factor 10 (FGF10) and branching morphogenesis in the embryonic mouse lung. *Dev Camb Engl.* déc 1997;124(23):4867-78.
222. De Moerlooze L, Spencer-Dene B, Revest JM, Hajihosseini M, Rosewell I, Dickson C. An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis. *Dev Camb Engl.* févr 2000;127(3):483-92.
223. Sekine K, Ohuchi H, Fujiwara M, Yamasaki M, Yoshizawa T, Sato T, et al. Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nat Genet.* janv 1999;21(1):138-41.
224. Volckaert T, Campbell A, Dill E, Li C, Minoo P, De Langhe S. Localized Fgf10 expression is not required for lung branching morphogenesis but prevents differentiation of epithelial progenitors. *Dev Camb Engl.* sept 2013;140(18):3731-42.
225. Mailleux AA, Kelly R, Veltmaat JM, De Langhe SP, Zaffran S, Thiery JP, et al. Fgf10 expression identifies parabronchial smooth muscle cell progenitors and is required for their entry into the smooth muscle cell lineage. *Dev Camb Engl.* mai 2005;132(9):2157-66.
226. Ablner LL, Mansour SL, Sun X. Conditional gene inactivation reveals roles for Fgf10 and Fgfr2 in establishing a normal pattern of epithelial branching in the mouse lung. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat.* août 2009;238(8):1999-2013.
227. Finch PW, Cunha GR, Rubin JS, Wong J, Ron D. Pattern of keratinocyte growth factor and keratinocyte growth factor receptor expression during mouse fetal development suggests a role in mediating morphogenetic mesenchymal-epithelial interactions. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat.* juin 1995;203(2):223-40.
228. Tichelaar JW, Lu W, Whitsett JA. Conditional expression of fibroblast growth

- factor-7 in the developing and mature lung. *J Biol Chem.* 21 avr 2000;275(16):11858-64.
229. Usui H, Shibayama M, Ohbayashi N, Konishi M, Takada S, Itoh N. Fgf18 is required for embryonic lung alveolar development. *Biochem Biophys Res Commun.* 24 sept 2004;322(3):887-92.
230. Yu S, Poe B, Schwarz M, Elliot SA, Albertine KH, Fenton S, et al. Fetal and postnatal lung defects reveal a novel and required role for Fgf8 in lung development. *Dev Biol.* 1 nov 2010;347(1):92-108.
231. Weinstein M, Xu X, Ohyama K, Deng CX. FGFR-3 and FGFR-4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung. *Dev Camb Engl.* sept 1998;125(18):3615-23.
232. Cinque L, Forrester A, Bartolomeo R, Svelto M, Venditti R, Montefusco S, et al. FGF signalling regulates bone growth through autophagy. *Nature.* 10 déc 2015;528(7581):272-5.
233. MacKenzie B, Korfei M, Henneke I, Sibinska Z, Tian X, Hezel S, et al. Increased FGF1-FGFRc expression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res.* 3 juill 2015;16:83.
234. Guzy RD, Li L, Smith C, Dorry SJ, Koo HY, Chen L, et al. Pulmonary fibrosis requires cell-autonomous mesenchymal fibroblast growth factor (FGF) signaling. *J Biol Chem.* 23 2017;292(25):10364-78.
235. Dorry SJ, Ansbro BO, Ornitz DM, Mutlu GM, Guzy RD. FGFR2 is Required for AEC2 Homeostasis and Survival Following Bleomycin-Induced Lung Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 20 déc 2019;
236. Ju W, Zhihong Y, Zhiyou Z, Qin H, Dingding W, Li S, et al. Inhibition of  $\alpha$ -SMA by the ectodomain of FGFR2c attenuates lung fibrosis. *Mol Med Camb Mass.* 7 sept

2012;18:992-1002.

237. Shimbori C, Bellaye P-S, Xia J, Gauldie J, Ask K, Ramos C, et al. Fibroblast growth factor-1 attenuates TGF- $\beta$ 1-induced lung fibrosis. *J Pathol.*

2016;240(2):197-210.

238. MacKenzie B, Korfei M, Henneke I, Sibinska Z, Tian X, Hezel S, et al.

Increased FGF1-FGFRc expression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res.*

2015;16:83.

239. Koo HY, El-Baz LM, House S, Cilvik SN, Dorry SJ, Shoukry NM, et al.

Fibroblast growth factor 2 decreases bleomycin-induced pulmonary fibrosis and

inhibits fibroblast collagen production and myofibroblast differentiation. *J Pathol.* sept

2018;246(1):54-66.

240. Guzy RD, Stoilov I, Elton TJ, Mecham RP, Ornitz DM. Fibroblast growth factor

2 is required for epithelial recovery, but not for pulmonary fibrosis, in response to

bleomycin. *Am J Respir Cell Mol Biol.* janv 2015;52(1):116-28.

241. Marchand-Adam S, Plantier L, Bernuau D, Legrand A, Cohen M, Marchal J, et

al. Keratinocyte growth factor expression by fibroblasts in pulmonary fibrosis: poor

response to interleukin-1beta. *Am J Respir Cell Mol Biol.* mai 2005;32(5):470-7.

242. Upadhyay D, Panduri V, Kamp DW. Fibroblast growth factor-10 prevents

asbestos-induced alveolar epithelial cell apoptosis by a mitogen-activated protein

kinase-dependent mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol.* mars 2005;32(3):232-8.

243. Gupte VV, Ramasamy SK, Reddy R, Lee J, Weinreb PH, Violette SM, et al.

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.* 1 sept 2009;180(5):424-36.

244. Zhang S, Yu D, Wang M, Huang T, Wu H, Zhang Y, et al. FGF21 attenuates

pulmonary fibrogenesis through ameliorating oxidative stress in vivo and in vitro.

Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother. juill 2018;103:1516-25.

245. Barnes JW, Duncan D, Helton S, Hutcheson S, Kurundkar D, Logsdon NJ, et al. Role of fibroblast growth factor 23 and klotho cross talk in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1 juill 2019;317(1):L141-54.

246. Miyakawa K, Hatsuzawa K, Kurokawa T, Asada M, Kuroiwa T, Imamura T. A hydrophobic region locating at the center of fibroblast growth factor-9 is crucial for its secretion. *J Biol Chem*. 8 oct 1999;274(41):29352-7.

247. Wu X-L, Gu M-M, Huang L, Liu X-S, Zhang H-X, Ding X-Y, et al. Multiple synostoses syndrome is due to a missense mutation in exon 2 of FGF9 gene. *Am J Hum Genet*. juill 2009;85(1):53-63.

248. Chung C-L, Lu C-W, Cheng Y-S, Lin C-Y, Sun HS, Lin Y-M. Association of aberrant expression of sex-determining gene fibroblast growth factor 9 with Sertoli cell-only syndrome. *Fertil Steril*. déc 2013;100(6):1547-1554.e1-4.

249. Pirvola U, Zhang X, Mantela J, Ornitz DM, Ylikoski J. Fgf9 signaling regulates inner ear morphogenesis through epithelial-mesenchymal interactions. *Dev Biol*. 15 sept 2004;273(2):350-60.

250. White AC, Xu J, Yin Y, Smith C, Schmid G, Ornitz DM. FGF9 and SHH signaling coordinate lung growth and development through regulation of distinct mesenchymal domains. *Dev Camb Engl*. avr 2006;133(8):1507-17.

251. Colvin JS, White AC, Pratt SJ, Ornitz DM. Lung hypoplasia and neonatal death in Fgf9-null mice identify this gene as an essential regulator of lung mesenchyme. *Dev Camb Engl*. juin 2001;128(11):2095-106.

252. Colvin JS, White AC, Pratt SJ, Ornitz DM. Lung hypoplasia and neonatal death in Fgf9-null mice identify this gene as an essential regulator of lung

- mesenchyme. *Dev Camb Engl.* juin 2001;128(11):2095-106.
253. del Moral P-M, De Langhe SP, Sala FG, Veltmaat JM, Tefft D, Wang K, et al. Differential role of FGF9 on epithelium and mesenchyme in mouse embryonic lung. *Dev Biol.* 1 mai 2006;293(1):77-89.
254. Yin Y, Wang F, Ornitz DM. Mesothelial- and epithelial-derived FGF9 have distinct functions in the regulation of lung development. *Dev Camb Engl.* août 2011;138(15):3169-77.
255. White AC, Xu J, Yin Y, Smith C, Schmid G, Ornitz DM. FGF9 and SHH signaling coordinate lung growth and development through regulation of distinct mesenchymal domains. *Dev Camb Engl.* avr 2006;133(8):1507-17.
256. Joannes A, Brayer S, Besnard V, Marchal-Sommé J, Jaillet M, Mordant P, et al. 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.* 1 avr 2016;310(7):L615-629.
257. Coffey E, Newman DR, Sannes PL. Expression of fibroblast growth factor 9 in normal human lung and idiopathic pulmonary fibrosis. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc.* sept 2013;61(9):671-9.
258. Degirolamo C, Sabbà C, Moschetta A. Therapeutic potential of the endocrine fibroblast growth factors FGF19, FGF21 and FGF23. *Nat Rev Drug Discov.* janv 2016;15(1):51-69.
259. Li X. The FGF metabolic axis. *Front Med.* oct 2019;13(5):511-30.
260. Nishimura T, Utsunomiya Y, Hoshikawa M, Ohuchi H, Itoh N. Structure and expression of a novel human FGF, FGF-19, expressed in the fetal brain. *Biochim Biophys Acta.* 18 janv 1999;1444(1):148-51.
261. McWhirter JR, Goulding M, Weiner JA, Chun J, Murre C. A novel fibroblast

growth factor gene expressed in the developing nervous system is a downstream target of the chimeric homeodomain oncoprotein E2A-Pbx1. *Dev Camb Engl.* sept 1997;124(17):3221-32.

262. Fon Tacer K, Bookout AL, Ding X, Kurosu H, John GB, Wang L, et al. Research resource: Comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Mol Endocrinol Baltim Md.* oct 2010;24(10):2050-64.

263. Russell DW. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem.* 2003;72:137-74.

264. Inagaki T, Choi M, Moschetta A, Peng L, Cummins CL, McDonald JG, et al. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab.* oct 2005;2(4):217-25.

265. Tomlinson E, Fu L, John L, Hultgren B, Huang X, Renz M, et al. Transgenic mice expressing human fibroblast growth factor-19 display increased metabolic rate and decreased adiposity. *Endocrinology.* mai 2002;143(5):1741-7.

266. Huang X, Yang C, Jin C, Luo Y, Wang F, McKeenan WL. Resident hepatocyte fibroblast growth factor receptor 4 limits hepatocarcinogenesis. *Mol Carcinog.* juin 2009;48(6):553-62.

267. Fu L, John LM, Adams SH, Yu XX, Tomlinson E, Renz M, et al. Fibroblast growth factor 19 increases metabolic rate and reverses dietary and leptin-deficient diabetes. *Endocrinology.* juin 2004;145(6):2594-603.

268. Markan KR, Potthoff MJ. Metabolic fibroblast growth factors (FGFs): Mediators of energy homeostasis. *Semin Cell Dev Biol.* 2016;53:85-93.

269. Sawey ET, Chanrion M, Cai C, Wu G, Zhang J, Zender L, et al. Identification of a therapeutic strategy targeting amplified FGF19 in liver cancer by Oncogenomic screening. *Cancer Cell.* 8 mars 2011;19(3):347-58.

270. Wu X, Ge H, Lemon B, Weiszmann J, Gupte J, Hawkins N, et al. Selective activation of FGFR4 by an FGF19 variant does not improve glucose metabolism in ob/ob mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25 août 2009;106(34):14379-84.
271. Zhou M, Wang X, Phung V, Lindhout DA, Mondal K, Hsu J-Y, et al. Separating Tumorigenicity from Bile Acid Regulatory Activity for Endocrine Hormone FGF19. *Cancer Res*. 15 juin 2014;74(12):3306-16.
272. Raja A, Park I, Haq F, Ahn S-M. FGF19-FGFR4 Signaling in Hepatocellular Carcinoma. *Cells*. 04 2019;8(6).
273. Nicholes K, Guillet S, Tomlinson E, Hillan K, Wright B, Frantz GD, et al. A mouse model of hepatocellular carcinoma: ectopic expression of fibroblast growth factor 19 in skeletal muscle of transgenic mice. *Am J Pathol*. juin 2002;160(6):2295-307.
274. Desnoyers LR, Pai R, Ferrando RE, Hötzel K, Le T, Ross J, et al. Targeting FGF19 inhibits tumor growth in colon cancer xenograft and FGF19 transgenic hepatocellular carcinoma models. *Oncogene*. 3 janv 2008;27(1):85-97.
275. Matakidou A, El Galta R, Rudd MF, Webb EL, Bridle H, Eisen T, et al. Further observations on the relationship between the FGFR4 Gly388Arg polymorphism and lung cancer prognosis. *Br J Cancer*. 18 juin 2007;96(12):1904-7.
276. Wu X, Ge H, Lemon B, Vonderfecht S, Weiszmann J, Hecht R, et al. FGF19-induced hepatocyte proliferation is mediated through FGFR4 activation. *J Biol Chem*. 19 févr 2010;285(8):5165-70.
277. Zhang X, Kong M, Zhang Z, Xu S, Yan F, Wei L, et al. FGF19 genetic amplification as a potential therapeutic target in lung squamous cell carcinomas: FGF19 amplification as a target in LSCC. *Thorac Cancer*. nov 2017;8(6):655-65.
278. Gao L, Lang L, Zhao X, Shay C, Shull AY, Teng Y. FGF19 amplification

reveals an oncogenic dependency upon autocrine FGF19/FGFR4 signaling in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene*. 2019;38(13):2394-404.

279. Wu X, Ge H, Lemon B, Vonderfecht S, Baribault H, Weiszmann J, et al. Separating mitogenic and metabolic activities of fibroblast growth factor 19 (FGF19). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 10 août 2010;107(32):14158-63.

280. Harrison SA, Rinella ME, Abdelmalek MF, Trotter JF, Paredes AH, Arnold HL, et al. NGM282 for treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Lond Engl*. 24 2018;391(10126):1174-85.

281. Nobili V, Alisi A, Mosca A, Della Corte C, Veraldi S, De Vito R, et al. Hepatic farnesoid X receptor protein level and circulating fibroblast growth factor 19 concentration in children with NAFLD. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. 2018;38(2):342-9.

282. Zhou M, Learned RM, Rossi SJ, DePaoli AM, Tian H, Ling L. Engineered FGF19 eliminates bile acid toxicity and lipotoxicity leading to resolution of steatohepatitis and fibrosis in mice. *Hepatology Commun*. 2017;1(10):1024-42.

283. Schumacher JD, Kong B, Wu J, Rizzolo D, Armstrong LE, Chow MD, et al. Direct and Indirect Effects of Fibroblast Growth Factor (FGF) 15 and FGF19 on Liver Fibrosis Development. *Hepatology Baltim Md*. 17 juin 2019;

284. Yu C, Wang F, Jin C, Wu X, Chan W, McKeenan WL. Increased carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in FGFR4-deficient mice. *Am J Pathol*. déc 2002;161(6):2003-10.

285. Harrison SA, Rinella ME, Abdelmalek MF, Trotter JF, Paredes AH, Arnold HL, et al. NGM282 for treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Lond Engl*. 24

2018;391(10126):1174-85.

286. Burgy O, Bellaye P-S, Causse S, Beltramo G, Wettstein G, Boutanquoi P-M, et al. Pleural inhibition of the caspase-1/IL-1 $\beta$  pathway diminishes profibrotic lung toxicity of bleomycin. *Respir Res.* 29 2016;17(1):162.

287. Zhou Q, Chen T, Bozkanat M, Ibe JCF, Christman JW, Raj JU, et al. Intratracheal instillation of high dose adenoviral vectors is sufficient to induce lung injury and fibrosis in mice. *PloS One.* 2014;9(12):e116142.

288. Batra H, Antony VB. The pleural mesothelium in development and disease. *Front Physiol.* 2014;5:284.

289. Lam D, Harris D, Qin Z. Inflammatory Mediator Profiling Reveals Immune Properties of Chemotactic Gradients and Macrophage Mediator Production Inhibition during Thioglycollate Elicited Peritoneal Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:1-9.

290. Antoine M, Wirz W, Tag CG, Gressner AM, Marvituna M, Wycislo M, et al. Expression and function of fibroblast growth factor (FGF) 9 in hepatic stellate cells and its role in toxic liver injury. *Biochem Biophys Res Commun.* sept 2007;361(2):335-41.

291. Geske MJ, Zhang X, Patel KK, Ornitz DM, Stappenbeck TS. Fgf9 signaling regulates small intestinal elongation and mesenchymal development. *Development.* 1 sept 2008;135(17):2959-68.

292. Karki S, Surolia R, Hock TD, Guroji P, Zolak JS, Duggal R, et al. Wilms' tumor 1 (Wt1) regulates pleural mesothelial cell plasticity and transition into myofibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *FASEB J.* mars 2014;28(3):1122-31.

293. Mubarak KK, Montes-Worboys A, Regev D, Nasreen N, Mohammed KA, Faruqi I, et al. Parenchymal trafficking of pleural mesothelial cells in idiopathic

pulmonary fibrosis. *Eur Respir J.* janv 2012;39(1):133-40.

294. Zhou M, Learned RM, Rossi SJ, DePaoli AM, Tian H, Ling L. Engineered fibroblast growth factor 19 reduces liver injury and resolves sclerosing cholangitis in *Mdr2*-deficient mice. *Hepatology* Baltim Md. mars 2016;63(3):914-29.

295. Tanner Y, Grose RP. Dysregulated FGF signalling in neoplastic disorders. *Semin Cell Dev Biol.* 2016;53:126-35.

296. Srisuma S, Bhattacharya S, Simon DM, Solleti SK, Tyagi S, Starcher B, et al. Fibroblast growth factor receptors control epithelial-mesenchymal interactions necessary for alveolar elastogenesis. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 avr 2010;181(8):838-50.

297. Canestaro WJ, Forrester SH, Raghu G, Ho L, Devine BE. Drug Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Chest.* mars 2016;149(3):756-66.

298. Reyfman PA, Walter JM, Joshi N, Anekalla KR, McQuattie-Pimentel AC, Chiu S, et al. Single-Cell Transcriptomic Analysis of Human Lung Provides Insights into the Pathobiology of Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 juin 2019;199(12):1517-36.

299. Sun K, Tordjman J, Clément K, Scherer PE. Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab.* 1 oct 2013;18(4):470-7.

300. Caër C, Rouault C, Le Roy T, Poitou C, Aron-Wisnewsky J, Torcivia A, et al. Immune cell-derived cytokines contribute to obesity-related inflammation, fibrogenesis and metabolic deregulation in human adipose tissue. *Sci Rep.* 7 juin 2017;7(1):3000.

301. Gui X, Chen H, Cai H, Sun L, Gu L. Leptin promotes pulmonary fibrosis development by inhibiting autophagy via PI3K/Akt/mTOR pathway. *Biochem Biophys*

Res Commun. 06 2018;498(3):660-6.

302. Cao M, Swigris JJ, Wang X, Cao M, Qiu Y, Huang M, et al. Plasma Leptin Is Elevated in Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:6940480.

303. Enomoto N, Oyama Y, Yasui H, Karayama M, Hozumi H, Suzuki Y, et al. Analysis of serum adiponectin and leptin in patients with acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Sci Rep.* déc 2019;9(1):10484.