



Université de Lille
École Graduée Biologie Santé de Lille

Thèse de Doctorat d'Université
pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université de Lille

Spécialité :
Sciences de la Vie et de la Santé

**Gènes précoces impliqués dans le développement des pneumopathies
interstitielles diffuses fibrosantes dans un modèle expérimental de
fibrose pulmonaire**

présentée par
Nathan Hennion

Thèse dirigée par les Docteurs Valérie Gouyer et Jean-Luc Desseyn

Soutenue publiquement le 05 mai 2025 à Lille devant le jury composé de :

Mme. le Professeur Cécile CHENIVESSE	Président
Mme. le Docteur Françoise GOIRAND	Rapporteur
Mme. le Professeur Émilie BONCOEUR	Rapporteur
M. le Professeur Nicolas VOITURON	Examineur
M. le Docteur Jean-Luc DESSEYN	Directeur de thèse

Ce travail a été réalisé au sein de l'Institut de Recherche
Translationnelle sur l'Inflammation (INFINITE)
Unité Inserm U1286 / Université de Lille / CHU de Lille
dirigée par le Docteur Laurent Dubuquoy,
sous la direction scientifique du Docteur Valérie Gouyer
et du Docteur Jean-Luc Desseyn

Infinite U1286, équipe du professeur Frédéric Gottrand
Faculté de Médecine – Pôle Recherche – 5^e étage
1 Place de Verdun
59045 Lille Cedex

Remerciements

Ce travail n'aurait pas pu être mené sans le soutien financier de la **Région Hauts-de-France** et du **Centre Hospitalo-Universitaire de Lille** que je remercie sincèrement.

Je tiens également à remercier pour l'honneur qu'ils me font :

Madame le **Professeur des Universités – Praticien Hospitalier Cécile Chenivresse** d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. Je tiens également à vous remercier pour votre participation et votre aide primordiale dans la rédaction de l'article original. Je suis reconnaissant du temps que vous avez consacré à m'expliquer en détail la classification des pneumopathies interstitielles diffuses et d'avoir toujours accepté de participer à mon CSI.

Madame le **Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier Françoise Goirand** et Madame le **Professeur des Universités Émilie Boncoeur** pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse.

Monsieur le **Professeur des Universités Nicolas Voituron** d'avoir accepté de juger ces travaux de thèse. Un grand merci pour vos conseils et les idées que vous m'avez transmis lors de tous les CSI auxquels vous avez participé.

Je remercie sincèrement :

Monsieur le **Professeur des Universités – Praticien Hospitalier Frédéric Gottrand** de m'avoir intégré au sein de votre équipe de recherche. Un grand merci également à Monsieur le **Docteur Laurent Dubuquoy** de m'avoir accueilli dans l'unité de recherche Infinite U1286.

Madame le **Docteur Valérie Gouyer** d'avoir encadré cette thèse. Merci pour le temps que tu as consacré à me former sur toutes les techniques expérimentales. Je te remercie de la patience dont tu as fait preuve pour me former sur la microdissection d'embryons murins et sur l'élaboration du protocole de dissociation des explants pulmonaires. Je suis convaincu que tes enseignements me seront indispensables dans mes projets à venir. Je suis également très reconnaissant du temps que tu as consacré à corriger mon mémoire de thèse ainsi que tous mes autres écrits. Tes conseils m'ont permis de gagner en maturité dans ma nouvelle vie professionnelle et je t'en remercie.

Monsieur le **Docteur Jean-Luc Desseyn** d'avoir co-encadré ce travail de thèse. Au même titre que Valérie, vous m'avez enseigné l'importance de la rigueur et de la curiosité scientifique. Je suis reconnaissant du professionnalisme que vous avez apporté à tous mes écrits. Vous m'avez accompagné jusqu'à Tours pour assurer ma présentation de poster au congrès J2R et je vous remercie de votre disponibilité. Vous m'avez toujours fourni de très bons conseils en informatique dès mon début au sein du laboratoire, je n'ai jamais manqué de rien et je vous en remercie.

Léonie Vandomber de m'avoir apporté un soutien technique durant mon doctorat. Même si tu es arrivée en milieu de ma thèse, tu m'as été d'une aide primordiale surtout pour les génotypages et les coupes d'explants pulmonaires au microtome et je t'en suis reconnaissant. Je te souhaite tout le meilleur dans ta carrière qui vient tout juste de débuter. Je suis certain que tu as les compétences pour aller loin.

Mylène Magnien de m'avoir épaulé durant mon stage et dans le début de ma thèse. Merci d'avoir pris le temps de me former sur les techniques expérimentales de génotypage et de RT-qPCR. J'espère que ton nouveau poste te plaît et je te souhaite le meilleur pour ta jeune famille.

Monsieur le **Docteur Corentin Bedart** d'avoir apporté son expertise indispensable à l'élaboration de ce projet de thèse. Merci de m'avoir partagé tes compétences en analyses de données bio-informatiques. Je te félicite une nouvelle fois pour ton nouveau poste de Maître de conférence.

Madame le **Docteur Sarah Humez** d'avoir pris le temps d'analyser de nombreuses lames histologiques de nos explants pulmonaires. Votre expertise en tant qu'anatomopathologiste m'a été importante dans mon projet de thèse et je vous en suis reconnaissant.

Madame le **Docteur Lidwine Wémeau-Stervinou** pour votre implication dans l'élaboration de ma première revue scientifique. Je vous remercie également de m'avoir accepté dans votre cours très enrichissant sur les pneumopathies interstitielles diffuses.

L'ensemble du **personnel de l'animalerie EOPS1** pour l'élevage des lignées.

La plateforme **BioImaging Center Lille (BiCeL)** et plus particulièrement :

Marie-Hélène Geveart pour les centaines de coupes d'explants pulmonaires que tu as fait durant tout le long de ma thèse. Je suis fasciné par la patience dont tu as fait preuve dans ce projet et surtout pour la qualité de ton travail. J'espère que tu profites de ta retraite qui est bien méritée.

Antonino Bongiovanni d'avoir toujours été disponible et de m'avoir formé sur l'utilisation du microscope confocal.

Je tiens à remercier aussi :

L'ensemble du personnel que j'ai eu la chance de côtoyer, en premier lieu **Laure Dubernat** avec laquelle j'ai partagé mon bureau pendant mes 2 dernières années. Nous avons partagé de bons moments d'amusement ensemble et je te souhaite bon courage pour ta dernière année de thèse que tu maîtriseras haut la main, je n'en ai aucun doute. Merci au doctorant précédent, **Guillaume Lacroix** alias Fatguiguidu59 de m'avoir partagé ton expérience au sein du laboratoire et je te félicite encore, à toi et Léna, pour la naissance de vos jumeaux. Merci à **Léa Tran** et **Lucie Maroussez** pour leurs joies de vivre apportées dans le laboratoire. Merci à **Maria Beatriz De Sousa Figueiredo** d'avoir partagé d'excellentes parties de squash avec moi. Merci également à l'ancien stagiaire du laboratoire, **Victor Lannoy**, pour ton aide dans tous nos travaux liés à l'expérimentation des PCLS. J'espère que ta nouvelle vie en Australie te plaît. Je tiens à remercier les premières personnes que j'ai pu côtoyer dès mon arrivée au laboratoire à savoir les membres du QG : **Constant Leseigneur**, **Paul-Antoine Badon** et **Frank Mazars**. Nous avons passé d'excellents moments ensemble.

Merci à **Jean Lesage**, **Delphine Ley**, **Emmanuel Hermann**, **Laurent Béguin**, **Jules Morcel**, **David Seguy**, **Jinghang Li**, **Ségolène Plet**, **Edwina Micours**, **Hélène Kemp**, **Eugénie Bitoumbou**, **Nawal Benzekri**, **Augustin Lefevre**, **Juliette Caron**, **Noémie Gelée** que j'ai eu la chance de côtoyer.

Enfin, j'ai une pensée particulière pour toute ma famille. Je ne remercierai jamais assez mes parents, **Nathalie** et **Fabrice Hennion**, d'avoir toujours été là pour moi que ce soit avant et pendant la thèse. Je suis très heureux d'avoir des parents comme vous et j'espère que vous êtes fiers du parcours que j'ai accompli. J'ai également une petite pensée pour ma petite sœur, **Stéphanie Hennion**. Je suis convaincu que tu réussiras tes études en Allemagne.

Communications scientifiques

Publications dans des journaux à comités de lecture

2025 Identification of early genes in the pathophysiology of fibrotic interstitial lung disease in a new model of pulmonary fibrosis

Hennion N, Bedart C, Vandomber L, Gottrand F, Humez S, Chenivesse C, Desseyn JL, Gouyer V

Cellular and Molecular Life Sciences

DOI : [10.1007/s00018-025-05620-0](https://doi.org/10.1007/s00018-025-05620-0)

2024 Fibrose pulmonaire idiopathique : recherche modèle désespérément.

Hennion N, Chenivesse C, Humez S, Gottrand F, Desseyn JL, Gouyer V

Revue des Maladies Respiratoires

DOI : [10.1051/medsci/2022084](https://doi.org/10.1051/medsci/2022084)

2024 Développement et caractérisation d'un modèle de fibrose pulmonaire idiopathique et recherche de nouvelles cibles thérapeutiques.

Hennion N, Humez S, Gottrand F, Desseyn JL, Gouyer V

Revue des Maladies Respiratoires

DOI : [10.1016/j.rmr.2024.01.073](https://doi.org/10.1016/j.rmr.2024.01.073)

2022 La fibrose pulmonaire idiopathique.

Hennion N, Desseyn JL, Gottrand F, Wémeau-Stervinou L, Gouyer V

Médecine/Sciences (Paris)

DOI : [10.1051/medsci/2022084](https://doi.org/10.1051/medsci/2022084)

Communication affichée

2023 Development and characterization of an idiopathic pulmonary fibrosis model and search for early overexpressed genes

Hennion N, Humez S, Gottrand F, Desseyn JL, Gouyer V

Journées de Recherche Respiratoire, Tours (France), 13-14 octobre

Prix

- 2024** Meilleur résumé en anglais
Selon un jury interne à INFINITE
- 2023** Meilleur poster dans la session interstitium
Journée de Recherche Respiratoire, Tours (France), 13-14 octobre
- 2023** Meilleur résumé en anglais
Selon un jury interne à INFINITE
- 2021** Allocation de recherche
Concours de l'École Doctorale Biologie-Santé de Lille

Résumé

La famille des pneumopathies interstitielles diffuses (PID) est caractérisée par des troubles qui affectent l'interstitium interalvéolaire. Dans les stades précoces de certaines PID, des cellules immunitaires s'accumulent dans l'interstitium interalvéolaire déclenchant une inflammation. Si cette inflammation persiste, une cicatrisation aberrante des lésions peut remplacer le parenchyme pulmonaire induisant une fibrose pulmonaire (FP) qui entraîne une perte irréversible des fonctions respiratoires. Les PID fibrosantes sont diagnostiquées trop tardivement et les mécanismes liés au développement précoce de la fibrose sont donc peu connus. La plupart des molécules anti-fibrosantes qui montrent une efficacité dans les études pré-cliniques échouent dans les études de phases cliniques. Une des raisons est le manque de modèle expérimental capable de mimer les mécanismes physiopathologiques de FP humaine.

Nous avons mis en place deux modèles de FP : un modèle qui utilise la culture embryonnaire d'explants pulmonaires murins en interface air/liquide et un modèle de culture en tranches épaisses de poumons adultes murins. Une fibrose a été induite par administration d'un cocktail fibrosant.

La fibrose induite se caractérise dans le modèle d'explant par une accumulation sous-pleurale et basale des cellules fusiformes interstitielles qui forment des foyers fibroblastiques à l'origine de la production excessive de matrice extracellulaire. Ces caractéristiques histopathologiques sont similaires à celles d'un pattern de pneumopathie interstitielle commune identifié chez certains patients avec une PID fibrosante. L'administration répétée du cocktail fibrosant s'accompagne d'une FP progressive marquée par une surexpression et une accumulation sous-pleurale progressive d' α -Sma et de cellules mésenchymateuses. L'analyse transcriptomique par single-cell RNA-sequencing 3' d'explants pulmonaires après traitement par le cocktail fibrotique, mais avant toute apparition de signes histopathologiques de fibrose, met en évidence une prolifération importante de myofibroblastes et de cellules musculaires lisses. La signature transcriptomique révèle 25 gènes sous-exprimés et 112 gènes surexprimés dans la condition avec fibrose pulmonaire induite. La majorité des gènes surexprimés sont connus pour être impliqués dans l'inflammation, la fibrose et la ferroptose. Les gènes *Saa3*, *Lcn2* et *Serpina3g*, tous surexprimés dans la condition avec fibrose induite, ont été inhibés à l'aide d'oligonucléotides antisens. Même si nos résultats n'ont pas montré un ralentissement significatif de la progression de la fibrose induite,

l'analyse par single-cell RNA-sequencing 3' permet de proposer des gènes qui pourraient être des cibles thérapeutiques potentielles.

L'induction d'une fibrose sur des tranches épaisses de poumons en culture met en évidence une FP modérée caractérisée par une accumulation périfonchique d' α -Sma associée à une déstructuration des alvéoles pulmonaires marquée par la présence de dépôts périphériques d' α -Sma et de collagène.

Mots clés : fibrose pulmonaire ; pneumopathie interstitielle commune ; explant pulmonaire embryonnaire murin ; culture de tranche épaisse de poumon ; single-cell RNA-sequencing 3' ; oligonucléotide anti-sens

Abstract

Interstitial lung diseases (ILD) family is characterized by disorders affecting the interalveolar interstitium. In the early stage of some ILD, immune cells accumulate in the interalveolar interstitium triggering inflammation. If this inflammation persists, aberrant scarring of the lesions can replace the lung parenchyma leading to pulmonary fibrosis (PF) inducing irreversible loss of respiratory function. Fibrotic ILD are diagnosed too late and little is known about the mechanisms involved in the early development of fibrosis. Most anti-fibrotic molecules that show efficacy in preclinical studies fail in clinical phase studies. One of the reason is the lack of experimental models capable of mimicking the pathophysiological mechanisms of human PF.

We have set up two PF models: one using embryonic culture of mouse lung explants in an air/liquid interface and one using thick slice culture of adult mouse lungs. Fibrosis was induced by an administration of a fibrotic cocktail.

Induced fibrosis is characterized in the explant model by a subpleural and basal accumulation of interstitial spindle cells that form fibroblastic foci responsible for excessive extracellular matrix production. These histopathological features are similar to those of an usual interstitial pneumonia pattern identified in some patients with fibrotic ILD. Repeated administration of the fibrotic cocktail is accompanied by progressive PF marked by overexpression and progressive subpleural accumulation of α -Sma and mesenchymal cells. Transcriptomic analysis by scRNAseq3' of lung explants after treatment with fibrotic cocktail, but before any histopathological signs of fibrosis, revealed significant proliferation of myofibroblasts and smooth muscle cells. The transcriptomic signature reveals 25 genes underexpressed and 112 genes overexpressed in the pulmonary fibrosis condition. The majority of overexpressed genes are known to be involved in inflammation, fibrosis and ferroptosis. *Saa3*, *Lcn2* and *Serpina3g* genes, all overexpressed in the condition with induced fibrosis, were inhibited using antisense oligonucleotides. Although our results did not show a significant decrease in the progression of induced fibrosis, the scRNAseq3' analysis suggests genes that could be potential therapeutic targets.

Induction of fibrosis in thick slices of lungs in culture reveals moderate PF characterized by peribronchial accumulation of α -Sma associated with destructuring of pulmonary alveoli and the presence of peripheral deposits of α -Sma and collagen.

Keywords: pulmonary fibrosis; usual interstitial pneumonia; mouse embryonic lung explant; lung thick slice culture; single-cell RNA-sequencing 3'; antisens oligonucleotide

Sommaire

Remerciements.....	5
Communications scientifiques.....	8
Publications dans des journaux à comités de lecture.....	8
Communication affichée.....	8
Prix.....	9
Résumé.....	10
Abstract.....	12
Liste des abréviations.....	17
Liste des figures.....	19
Avant-propos.....	22
1. INTRODUCTION.....	24
1.1. L'appareil respiratoire.....	24
1.1.1. Structure.....	24
1.1.1.1. Anatomique.....	24
1.1.1.2. Histologique.....	26
1.2. La fibrose.....	27
1.2.1. Généralités.....	27
1.2.2. Mécanismes.....	27
1.3. La fibrose pulmonaire.....	30
1.3.1. Définition.....	30
1.3.2. Acteurs de la fibrose pulmonaire.....	30
1.3.2.1. Types cellulaires.....	30
1.3.2.1.1. Pneumocytes.....	30
1.3.2.1.2. Cellules immunitaires.....	33
1.3.2.1.3. Fibroblastes/myofibroblastes.....	35
1.3.2.2. Médiateurs pro-fibrosants.....	37
1.3.2.2.1. Cytokines et chimiokines.....	37
1.3.2.2.2. La matrice extracellulaire.....	41
1.3.3. Les pneumopathies interstitielles diffuses.....	44
1.3.3.1. Classification.....	44
1.3.3.2. Épidémiologie.....	44
1.3.3.3. Étiologies.....	46
1.3.3.3.1. Facteurs environnementaux.....	46
1.3.3.3.2. Facteurs génétiques.....	47
1.3.3.4. Interventions cliniques.....	48
1.3.3.4.1. Diagnostic.....	48
1.3.3.4.2. Traitements.....	54
1.4. Les modèles de fibrose pulmonaire.....	55
1.4.1. Généralités.....	55
1.4.2. L'appareil respiratoire murin.....	56
1.4.2.1. Morphogenèse pulmonaire.....	56
1.4.2.2. Comparaison des poumons murins embryonnaires et adultes.....	58
1.4.2.3. Comparaison entre l'appareil respiratoire humain et murin adulte.....	58
1.4.3. Induction expérimentale d'une fibrose pulmonaire.....	59
1.4.3.1. Bléomycine.....	59
1.4.3.2. Vecteurs viraux.....	63
1.4.4. Modèles expérimentaux intégrés.....	64
1.4.4.1. Modèle de souris génétiquement modifiées.....	64

1.4.4.2. Modèle de FP liée au vieillissement.....	68
1.4.4.3. Modèle de souris humanisées.....	69
1.4.5. Modèles expérimentaux non intégrés.....	69
1.4.5.1. <i>Ex vivo</i>	69
1.4.5.2. <i>In vitro</i>	71
1.4.5.2.1. Culture cellulaire sur plaque.....	71
1.4.5.2.2. Système Transwell.....	72
1.4.5.2.3. Culture sur matrigel.....	73
1.4.5.2.4. Système d'hydrogel.....	74
1.4.5.2.5. Poumon décellularisé.....	75
1.4.5.2.6. Sphéroïde et organoïde pulmonaire.....	76
1.4.5.2.7. Poumon sur puce.....	77
2. STRATÉGIE D'ÉTUDE ET INTÉRÊT DU TRAVAIL.....	82
3. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	84
3.1. Souris.....	84
3.2. Culture organotypique des explants pulmonaires embryonnaires murins.....	84
3.3. Protocole expérimental d'induction de fibrose pulmonaire à l'aide de cocktails fibrosants sur le modèle d'explant pulmonaire embryonnaire murin.....	85
3.4. Analyses histologiques et immunofluorescence.....	86
3.4.1. Histologie.....	86
3.4.2. Évaluation histopathologique de la fibrose pulmonaire.....	86
3.4.3. Immunofluorescence.....	88
3.5. Expression des gènes par RT-qPCR.....	88
3.6. Single-cell RNA-sequencing 3'.....	90
3.6.1. Préparation des échantillons.....	90
3.6.2. Analyses bio-informatiques des échantillons.....	92
3.7. Inhibition du développement de la fibrose pulmonaire à l'aide d'oligonucléotides antisens.....	93
3.7.1. Mise au point.....	93
3.7.2. Inhibition de marqueurs génétiques impliqués dans le développement précoce de la fibrose pulmonaire.....	95
3.8. Préparation et culture organotypique de coupes de poumons murins adultes.....	95
3.9. Analyses statistiques.....	97
4. RÉSULTATS.....	98
4.1. Induction expérimentale d'une fibrose pulmonaire sur le modèle d'explant pulmonaire embryonnaire murin.....	98
4.1.1. Sélection du cocktail fibrosant.....	98
4.1.2. Suivi en culture.....	101
4.1.3. Caractérisation de la fibrose induite.....	101
4.2. Identification de marqueurs précoces de fibrose pulmonaire.....	110
4.2.1. Types cellulaires impliqués dans le développement précoce de la fibrose pulmonaire.....	110
4.2.2. Nature des gènes différenciellement exprimés.....	113
4.3. Inhibition des marqueurs génétiques impliqués dans le développement précoce de la fibrose pulmonaire.....	119
4.3.1. Identification d'une concentration optimale d'inhibition.....	122
4.3.2. Administrations répétées d'oligonucléotides antisens sur le modèle de souris rapporteur Muc5b-Gfp.....	124
4.3.3. Inhibition des gènes précocement surexprimés dans la fibrose pulmonaire à l'aide d'oligonucléotides antisens.....	124
4.4. Le modèle de coupes de poumons murins adultes.....	127
4.4.1. Induction expérimentale d'une fibrose pulmonaire sur le modèle de PCLS.....	127

4.4.2. Inhibition de <i>Muc5b</i> sur le modèle de PCLS par oligonucléotides antisens.....	129
5. DISCUSSION.....	134
5.1. Le modèle d'explant pulmonaire embryonnaire murin.....	134
5.2. Le cocktail fibrosant.....	136
5.3. Modèle de pneumopathie interstitielle commune.....	136
5.4. Données transcriptomiques.....	138
5.4.1. Types cellulaires.....	138
5.4.2. Expression génique.....	138
5.4.2.1. Gènes de l'inflammation.....	139
5.4.2.2. Gènes de fibrose.....	140
5.4.2.3. Gènes du métabolisme du fer.....	141
5.4.2.4. Nouveaux gènes liés à la FP.....	141
5.5. Le modèle de coupes de poumons murins adultes.....	142
5.6. Inhibition génique par oligonucléotides anti-sens.....	143
6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	145
Références.....	148
Annexes.....	203

Liste des abréviations

12,5E	12,5 ^e jour embryonnaire
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ALI	<i>Air liquid-interface</i>
ARN	Acide ribonucéique
ARNm	Acide ribonucéique messenger
BLM	Bléomycine
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CF	Cocktail fibrosant
CVF	Capacité vitale forcée
DMEM	<i>Dulbecco modified eagle medium</i>
dNTP	Désoxyribonucléoside triphosphate
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EPEM	Explant pulmonaire embryonnaire murin
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FP	Fibrose pulmonaire
FPF	Fibrose pulmonaire familiale
FPI	Fibrose pulmonaire idiopathique
FPP	Fibrose pulmonaire progressive
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
HE	Hématoxyline/Éosine
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
LPA	<i>Lysophosphatidic acid</i>
M-MuLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MEC	Matrice extracellulaire
NOD/SCID	<i>Non obese diabetic/Severe combined immunodeficiency</i>
OAS	Oligonucléotide antisens
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PCLS	<i>Precision cut lung slice</i>
PIC	Pneumopathie interstitielle commune
PID	Pneumopathie interstitielle diffuse

PII	Pneumopathie interstitielle idiopathique
RFP	<i>Red fluorescent protein</i>
RS	Rouge picrosirius
RT-qPCR	<i>Reverse transcriptase – quantitative polymerase chain reaction</i>
scRNAseq3'	<i>Single-cell RNA-sequencing 3'</i>
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TM	Trichrome Masson
UMAP	<i>Uniform Manifold Approximation and Projection</i>
WT	Souris sauvage

Liste des figures

Figure 1. Structures anatomiques et histologiques.....	25
Figure 2. Mécanismes de cicatrisation et de fibrose.....	28
Figure 3. Rôle des pneumocytes de type II dans la fibrose pulmonaire.....	31
Figure 4. Progéniteurs et rôle des myofibroblastes dans la fibrose pulmonaire.....	36
Figure 5. Comparaison de la matrice extracellulaire pulmonaire sans (saine) et avec fibrose pulmonaire.....	42
Figure 6. Classification étiologique des différentes pneumopathies interstitielles diffuses (PID).....	45
Figure 7. Morphogenèse pulmonaire murine et humaine et comparaison histologique entre le poumon embryonnaire et le poumon adulte murin.....	57
Figure 8. Comparaison anatomique et histologique entre l'appareil respiratoire murin et humain...	60
Figure 9. Schéma des différents modèles expérimentaux utilisés dans l'étude de la FP.....	79
Figure 10. Étapes pour l'obtention des tranches épaisses de poumons murins adultes.....	96
Figure 11. Caractérisation de la fibrose induite sur les explants pulmonaires embryonnaires murins selon les cocktails fibrosants administrés.....	100
Figure 12. Le cocktail fibrosant stimule l'expression d' <i>Acta2-Rfp</i> des explants pulmonaires embryonnaires murins.....	102
Figure 13. Comparaison de la surface, de la hauteur, de la longueur et de la circularité des explants pulmonaires embryonnaires murins (EPEMs) témoins ou traités par le cocktail fibrosant.....	103
Figure 14. Fibrose pulmonaire progressive mimant un pattern de pneumopathie interstitielle commune sur le modèle d'explant pulmonaire embryonnaire murin.....	104
Figure 15. Coupes histologiques d'explants pulmonaires embryonnaires murins (EPEMs) colorées au Trichrome Masson.....	105
Figure 16. L'administration répétée du cocktail fibrosant (CF) induit une fibrose pulmonaire progressive bouleversant le développement des explants pulmonaires embryonnaires murins (EPEM).....	107
Figure 17. Expressions géniques relatives des explants pulmonaires embryonnaires. (A) <i>Tgf-β1</i> , (B) <i>Colla1</i> et (C) <i>Acta2</i>	108
Figure 18. Localisation de la vimentine et de l' α -Sma.....	109
Figure 19. Caractérisation des types cellulaires après scRNAseq3' des explants pulmonaires embryonnaires murins 18 heures après traitement.....	111
Figure 20. Analyse par single-cell RNA sequencing 3' d'explants pulmonaires embryonnaires murins (EPEMs) traités par le PBS ou le cocktail fibrosant (CF) pendant 18 heures.....	112

Figure 21. Le cocktail fibrosant induit la surexpression de gènes de l'inflammation et de la fibrose 18 heures après la fibrose induite.....	114
Figure 22. Gènes associés à l'inflammation surexprimés par les différents types cellulaires des explants pulmonaires embryonnaires murins après le traitement par le cocktail fibrosant et interactions protéiques.....	120
Figure 23. Gènes associés à la fibrose et à l'homéostasie des ions métalliques surexprimés par les différents types cellulaires des explants pulmonaires embryonnaires murins après le traitement par le cocktail fibrosant.....	121
Figure 24. L'administration d'oligonucléotides antisens induit une inhibition dose-dépendante et spécifique de l'activité du gène cible.....	123
Figure 25. L'administration répétée d'oligonucléotide antisens <i>Muc5b</i> ralentit la production de <i>Muc5b</i>	125
Figure 26. Inhibition des gènes <i>Saa3</i> , <i>Lcn2</i> et <i>Serpina3g</i> par des oligonucléotides anti-sens sur le modèle d'explant pulmonaire embryonnaire murin.....	126
Figure 27. L'administration du cocktail fibrosant favorise l'accumulation péribronchique d'Acta2-Rfp sur le modèle de tranches épaisses de poumons murins adultes.....	128
Figure 28. Le cocktail fibrosant induit une fibrose pulmonaire périphérique modérée sur le modèle de tranches épaisses de poumons de souris adultes.....	130
Figure 29. Gamme de concentration d'oligonucléotides antisens ciblant <i>Muc5b</i> sur le modèle de tranches épaisses de poumons de souris <i>Muc5b-Gfp</i>	131
Figure 30. Inhibition de <i>Muc5b</i> par un oligonucléotide antisens sur le modèle de tranches épaisses de poumons.....	133
Figure 31. Représentation schématique de l'étude sur explants embryonnaires.....	146
Figure 32. Représentation schématique de la préparation des tranches épaisses.....	147

Liste des tableaux

Tableau I. Médiateurs impliqués dans la physiopathologie de la fibrose pulmonaire.....	39
Tableau II. Variants génétiques communs en lien avec le risque de développer une pneumopathie interstitielle diffuse.....	49
Tableau III. Variants génétiques rares en lien avec le risque de développer une pneumopathie interstitielle diffuse.....	51
Tableau IV. Caractéristiques radiologiques et histologiques de patterns en lien avec les pneumopathies interstitielles idiopathiques.....	52
Tableau V. Avantages et inconvénients des modèles d'induction expérimentale de fibrose pulmonaire.....	65
Tableau VI. Liste des différents modèles utilisés dans l'étude de la fibrose pulmonaire.....	80
Tableau VII. Caractéristiques du score de fibrose défini selon la somme du score d'Ashcroft et du score de la fibrose pulmonaire périphérique.....	87
Tableau VIII. Liste des anticorps utilisés pour l'immunofluorescence.....	89
Tableau IX. Détails des amorces et des sondes utilisées pour la PCR quantitative en temps réel.....	91
Tableau X. Séquences des oligonucléotides antisens utilisés.....	94
Tableau XI. Caractéristiques des différents cocktails pro-fibrosants utilisés.....	99
Tableau XII. Liste des gènes sous-exprimés par les explants pulmonaires embryonnaires murins traités par le cocktail fibrosant.....	115
Tableau XIII. Liste des gènes surexprimés par les explants pulmonaires embryonnaires murins traités par le cocktail fibrosant.....	116
Tableau XIV. Liste des avantages et des inconvénients du modèle d'explant pulmonaire embryonnaire murin dans l'étude de la fibrose pulmonaire.....	135

Avant-propos

Les pneumopathies interstitielles diffuses regroupent un ensemble de pathologies hétérogènes et complexes. Le diagnostic est difficile à établir et la classification ne cesse d'évoluer depuis des décennies. Entre 1968 et 1969, Liebow et Carrington ont mis en place la première classification pathologique des pneumopathies interstitielles diffuses chroniques. Ils ont introduit le terme de pneumopathie interstitielle commune qualifié de « commun », étant donné qu'il est le pattern le plus communément identifié parmi les autres patterns des pneumopathies interstitielles diffuses (Guler & Corte, 2021). Avec l'amélioration des progrès technologiques liés aux diagnostics cliniques dans les années 1990, l'utilisation de scanner thoracique par tomographie assistée par ordinateur haute résolution a permis de distinguer plus finement la fibrose pulmonaire idiopathique des autres pneumopathies interstitielles idiopathiques. En 1997, Müller et Coiby ont publié la première classification radiologique/histologique des pneumopathies interstitielles idiopathiques et ont proposé des critères radiologiques de différents patterns dont le pattern de pneumopathie interstitielle commune (Müller & Coiby, 1997). En 2018, les sociétés médicales liées à la santé respiratoire ont établis un consensus catégorisant le pattern radiologique de pneumopathie interstitielle commune en pneumopathie interstitielle commune, pneumopathie interstitielle commune probable, pneumopathie interstitielle commune indéterminée et diagnostic alternatif (Raghu et al., 2018).

Actuellement, la compréhension des mécanismes des pneumopathies interstitielles diffuses n'est toujours pas optimale et des études sont encore nécessaires notamment pour les pneumopathies interstitielles diffuses avec une fibrose pulmonaire progressive qui sont incurables et de mauvais pronostics. Si les pneumopathies interstitielles diffuses fibrosantes sont incurables, c'est en grande partie parce qu'il n'existe pas de modèles expérimentaux suffisamment intégrés capables de mimer en tout point la fibrose pulmonaire humaine (Sgalla et al., 2016). La majeure partie des molécules ayant une activité anti-fibrosante dans les modèles pré-cliniques est inefficace dans les études cliniques. Cette problématique, qui a fait l'objet de deux revues en français dans *Médecine/Sciences* et dans la *Revue des Maladies Respiratoires* en se focalisant sur la fibrose pulmonaire idiopathique ((Hennion et al., 2022, 2024), [Annexes 1,2](#)), est la raison pour laquelle nous avons développé et caractérisé un nouveau modèle expérimental de fibrose pulmonaire mimant une pneumopathie interstitielle commune. Par ailleurs, le diagnostic des pneumopathies interstitielles diffuses fibrosantes est complexe. Les mécanismes précoces sont peu connus, les symptômes sont non-spécifiques et de nombreuses pneumopathies interstitielles diffuses ont des

patterns radiologiques et histologiques similaires. Toutes ces difficultés retardent de plusieurs mois, voire de plusieurs années, le diagnostic laissant le temps à des pneumopathies interstitielles diffuses avec fibrose pulmonaire progressive d'évoluer à un point de non-retour (Hoyer et al., 2019). Pour pallier cette difficulté, nous proposons d'identifier dans ce travail de thèse par une approche sans a priori les gènes impliqués dans le développement précoce de la fibrose pulmonaire, à savoir avant toute observation histologique de signes de fibrose. Cette analyse a été faite par single-cell RNA-sequencing 3' sur notre nouveau modèle expérimental de fibrose pulmonaire induite. Les gènes surexprimés précocement sont identifiés comme marqueurs précoces possibles de fibrose pulmonaire ([Annexe 3](#)). Ceci fait l'objet de la première partie de ce mémoire de thèse.

Parmi les gènes surexprimés, nous en avons choisi quelques-uns et testé leur inhibition dans l'optique de freiner la progression de la fibrose pulmonaire induite par une stratégie « oligonucléotides anti-sens ». Ceci a été réalisé en exploitant le modèle du laboratoire de souris transgénique rapporteur pour *Muc5b* qui a facilité la mise au point des conditions expérimentales d'inhibition de gènes en ciblant *Muc5b*. Ceci fait l'objet de la seconde partie du mémoire.

Enfin, nous discutons dans la dernière partie de ce mémoire de l'intérêt de ce nouveau modèle expérimental et des gènes précocement surexprimés identifiés.

1. INTRODUCTION

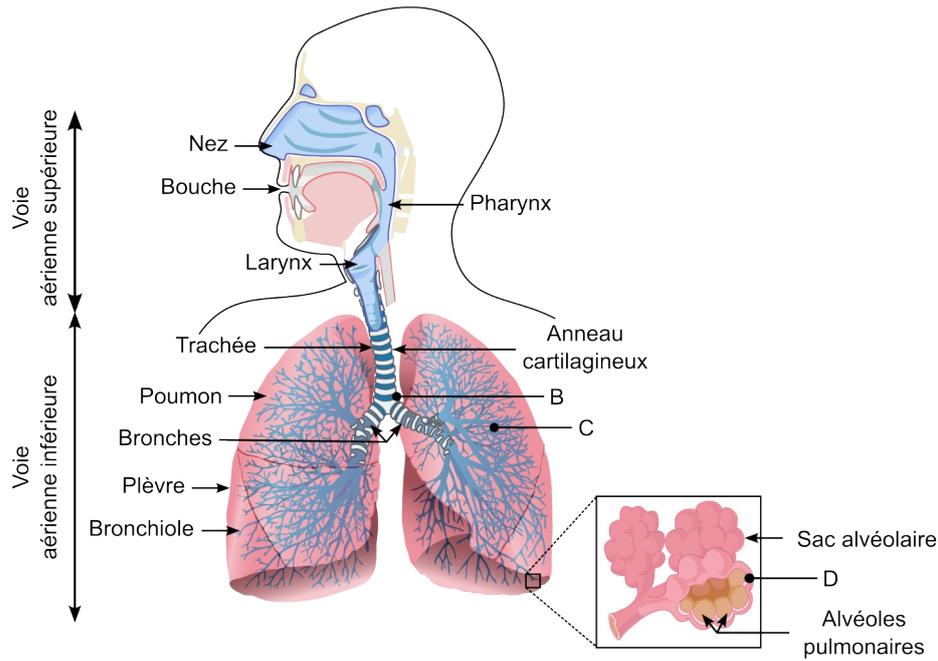
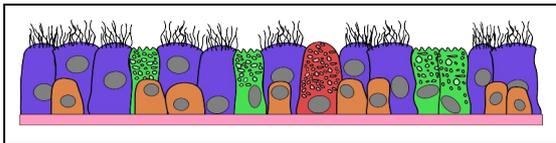
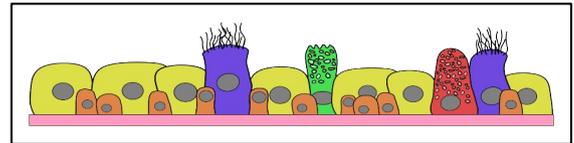
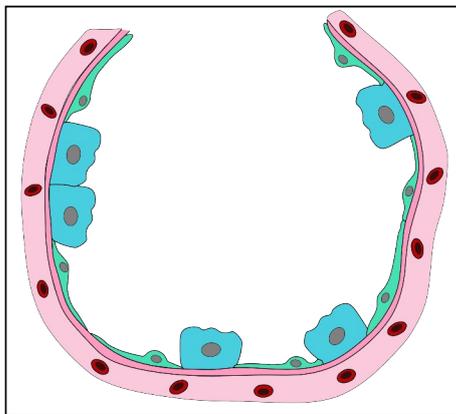
1.1. L'appareil respiratoire

1.1.1. Structure

1.1.1.1. Anatomique

Le système respiratoire est composé des voies aériennes supérieures et inférieures. Les voies aériennes supérieures comprennent la bouche, le nez, le pharynx et le larynx (Fig. 1A). Elles permettent de réchauffer, purifier et humidifier l'air inspiré. Les narines sont constituées de vibrisses filtrant l'air inspiré empêchant les grosses particules de poussière d'entrer dans les voies respiratoires. La circulation sanguine dans les capillaires de la cavité nasale réchauffe l'air entrant. Le mucus produit à la surface de la muqueuse nasale humidifie l'air et piège également les particules respirées. Le pharynx et le larynx assurent le passage de l'air de la cavité nasale jusqu'à la trachée.

Les voies aériennes inférieures sont constituées de la trachée, des bronches, des bronchioles et des alvéoles pulmonaires dans les poumons (Fig. 1A). La trachée permet de diriger l'air extérieur jusqu'aux poumons et inversement. Les anneaux cartilagineux autour de la trachée empêchent cette dernière de s'affaisser durant chaque cycle respiratoire. Dans la partie inférieure, la trachée se divise en deux bronches principales du poumon gauche et du poumon droit. Celles-ci se ramifient en bronches lobaires puis en bronches segmentaires. Après plusieurs segmentations, ces bronches se terminent par les bronchioles. L'ensemble de toutes ces bronches constitue l'arbre bronchique. Les bronchioles dirigent l'air vers les alvéoles pulmonaires, organisées en sacs alvéolaires, afin d'assurer les échanges gazeux avec le sang. Il y a environ 480 millions d'alvéoles pulmonaires chez l'Homme (Ochs et al., 2004). Les poumons sont composés de plusieurs lobes. Chez l'Homme, le poumon droit est constitué de 3 lobes et de 2 lobes pour le poumon gauche. Les poumons sont entourés par deux fines membranes protectrices : les feuillets pariétal et viscéral formant la plèvre. Le liquide pleural entre ces deux feuillets facilite leur glissement durant la respiration. La plèvre permet également de maintenir une pression négative dans les poumons, afin de maintenir les alvéoles et bronches ouvertes, et participe à la défense des poumons contre l'inflammation et les infections.

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

Cellules :

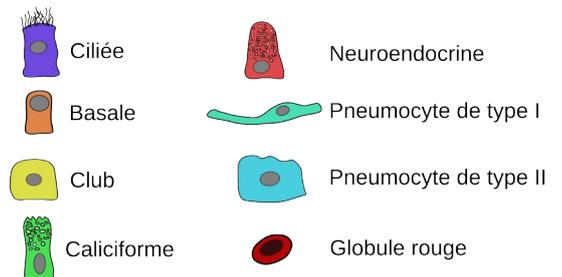


Figure 1. : Structures anatomiques et histologiques.

Les structures anatomiques sont désignées par des flèches et les structures histologiques sont représentées par des disques pleins. **(A)**, Anatomie de l'appareil respiratoire humain. **(B)**, Structure histologique de la trachée et des bronches. Cellules ciliées, violet ; cellules à mucus, vert ; cellule neuroendocrine, rouge ; cellules basales, orange. **(C)**, Structure histologique des bronchioles. Cellules Club, jaune ; cellules ciliées, violet ; cellule à mucus, vert ; cellule neuroendocrine, rouge. **(D)**, structure histologique des alvéoles pulmonaires. Pneumocytes de type I, vert ; pneumocytes de type II, bleu ; globules rouges, rouge. Toutes ces cellules adhèrent à la lame basale (rose). Adapté d'Alexandre (Alexandre, 2014).

1.1.1.2. Histologique

Le système respiratoire est composé de 4 couches histologiques principales : l'épithélium et la *lamina propria* formant la muqueuse respiratoire, la sous-muqueuse, le tissu cartilagineux et/ou musculaire et l'adventice. L'appareil respiratoire est composé de la zone de conduction de l'air et de la zone respiratoire.

La zone de conduction inclut la cavité nasale, la trachée, les bronches et les bronchioles. Elle a pour rôle de conduire l'air inspiré vers les alvéoles pulmonaires. Toutes ces parties sont composées d'un épithélium cylindrique pseudostratifié cilié, constitué de plusieurs types cellulaires en contact avec la lame basale et disposés en une seule couche mais avec les noyaux répartis à différents niveaux (Fig. 1B). Cet épithélium est constitué de cellules caliciformes, c'est-à-dire des cellules qui synthétisent les mucines gélifiantes. Ces cellules secrètent leurs mucines dans la lumière qui forment un mucus au contact de l'eau. Ce mucus joue le rôle de première ligne de défense face aux pathogènes environnementaux. Les cellules ciliées dirigent, grâce aux cils localisés à leur apex, la couche de mucus vers le pharynx pour l'éliminer des voies respiratoires, par déglutition ou vers l'extérieur par rhinorrhée, éternuement... Chaque cellule ciliée possède entre 200 et 300 cils et constitue plus de la moitié de l'ensemble des cellules épithéliales de la zone de conduction des voies respiratoires. L'activité combinée des « cellules à mucus » et des cellules ciliées forment la clairance-mucociliaire. L'épithélium contient également des cellules basales dans la partie la plus profonde et des cellules neuroendocrines. Ces cellules neuroendocrines stimulent le système nerveux central et influencent l'activité des cellules épithéliales, la fonction immunitaire, la circulation de l'air et du sang (Rock & Hogan, 2011). Au fur et à mesure des ramifications des bronches, les cellules épithéliales changent progressivement de forme et deviennent cuboïdes simples. Il s'agit des cellules Club qui sont les cellules épithéliales prédominantes des bronchioles (Fig. 1C). Elles ont un rôle de détoxification, anti-inflammatoire et antioxydant.

La zone respiratoire assure les échanges gazeux avec le sang (Fig. 1D). C'est pour cette raison que l'épithélium alvéolaire est un épithélium squameux simple. Les cellules sont très minces et plates, ce qui favorise la diffusion des gaz, et sont appelées les pneumocytes de type I. L'épithélium alvéolaire est également constitué de cellules cuboïdes sécrétrices de surfactants. Ce sont les pneumocytes de type II. Les surfactants produits ont un rôle indispensable puisqu'ils

empêchent les alvéoles pulmonaires de s'affaisser pendant l'expiration. Les pneumocytes de type II sont les cellules progénitrices des pneumocytes de type I (Kia'i & Bajaj, 2024).

1.2. La fibrose

1.2.1. Généralités

Les pathologies fibrosantes se définissent par une surproduction et une accumulation excessive des composants formant la matrice extracellulaire (MEC) dans le parenchyme en réponse à un élément déclencheur ou à une lésion. Cette accumulation de MEC bouleverse l'architecture physiologique des tissus et induit un dysfonctionnement de l'organe atteint. La fibrose peut toucher pratiquement tous les systèmes de l'organisme (Dees et al., 2021). Les pathologies d'origine fibrosante contribuent grandement à la morbidité générale et sont responsables d'environ 45 % des décès dans les pays développés (Wynn, 2008). La fibrose résulte d'une inflammation chronique caractérisée par une réponse immunitaire qui persiste de nombreux mois. En effet, cette pathologie est définie par une cicatrisation aberrante due à des lésions chroniques ou répétées. Les stimuli à l'origine du développement de la fibrose peuvent être de nature infectieuse, auto-immune, dûs à l'exposition à des radiations ou de nature mécanique. Malgré des manifestations étiologiques et cliniques différentes, de nombreuses pathologies fibrosantes chroniques ont en commun un irritant persistant qui stimule la production de nombreux médiateurs pro-fibrosants tels que des facteurs de croissance, des enzymes protéolytiques, des facteurs angiogéniques et des cytokines pro-fibrosantes. Tous ces éléments stimulent la synthèse de MEC induisant progressivement un remodelage et une destruction de l'architecture tissulaire sain (Wynn, 2007).

1.2.2. Mécanismes

La cicatrisation, quel que soit l'organe lésé, est constituée de 3 phases majeures qui se chevauchent dans le temps mais qui se distinguent sur le plan fonctionnel (Fig. 2). Immédiatement après la blessure, l'hémostase se met en place par l'accumulation de plaquettes formant un caillot plaquettaire et la formation d'une matrice provisoire constituée de fibrine. La dégranulation plaquettaire induit une vasodilatation et augmente la perméabilité vasculaire. En parallèle, les cellules épithéliales, endothéliales et les myofibroblastes sur le site de lésion produisent des métalloprotéases matricielles perturbant la membrane basale. De plus, les cellules épithéliales et endothéliales secrètent des cytokines, chimiokines et facteurs de croissance. Ces mécanismes combinés favorisent la prolifération et le recrutement de cellules immunitaires sur le site de blessure

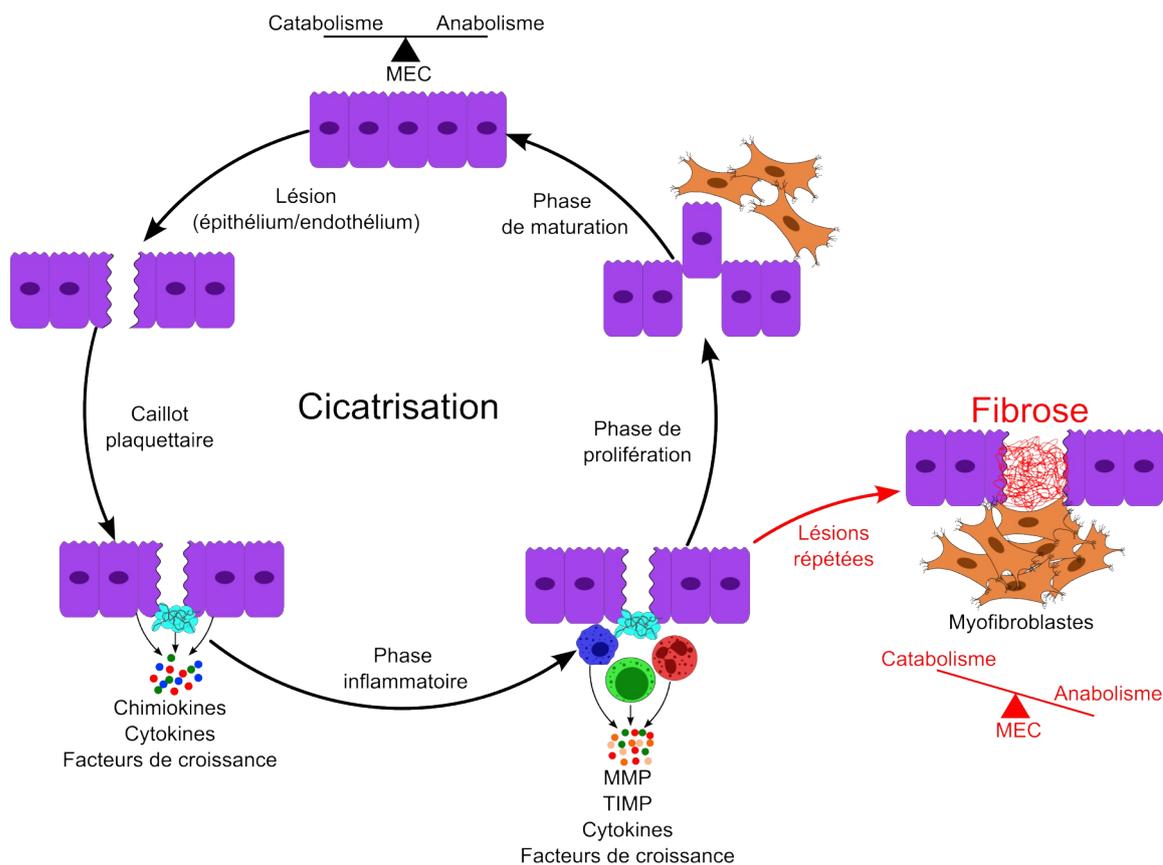


Figure 2. Mécanismes de cicatrisation et de fibrose

Suite à une blessure de l'épithélium ou de l'endothélium (violet), les plaquettes s'accumulent au niveau de la lésion pour former un caillot plaquettaire et une matrice provisoire constituée de fibrine se forme. Les plaquettes et cellules épithéliales/endothéliales voisines à la lésion libèrent des médiateurs qui favorisent le recrutement des cellules immunitaires. Lors de la phase inflammatoire, les cellules immunitaires (neutrophiles, macrophages, lymphocytes...) synthétisent des cytokines pro-inflammatoires, des facteurs de croissance et des métalloprotéases de la matrice (MMP) et leurs inhibiteurs (TIMP). Tous ces mécanismes, s'ils sont bien régulés, tendent à mettre en place la phase de prolifération. Durant cette phase, les myofibroblastes recrutés sur le site de lésions produisent de la matrice extracellulaire (MEC) qui maintient l'intégrité du tissu lésé et favorise la réparation du parenchyme. Durant la phase de maturation, les fibres de collagènes sont plus organisées et le tissu cicatriciel est éliminé. Les cellules épithéliales/endothéliales migrent vers le site de lésion afin de régénérer le tissu à l'état physiologique. Cependant, lors de lésions trop répétitives, les étapes de cicatrisation sont bouleversées. Une inflammation persistante, une nécrose tissulaire ou une infection induisent une activation chronique des myofibroblastes qui produisent une quantité massive de MEC. L'homéostasie entre la synthèse et la destruction de la MEC est bouleversée entraînant la formation d'une cicatrice fibreuse permanente. Adapté de Wynn (Wynn, 2007).

initiant la première étape de la cicatrisation qui est la phase inflammatoire. Durant cette phase, les neutrophiles et macrophages recrutés éliminent les tissus, débris cellulaires et potentiels pathogènes. Ces cellules immunitaires produisent également des cytokines et chimiokines qui amplifient le mécanisme de cicatrisation (Wynn, 2003). Les cellules en apoptose et autres cellules immunitaires recrutées stimulent la formation d'un nouveau tissu en produisant des médiateurs pro-inflammatoires, vasoactifs et pro-fibrosants tels que le *Transforming Growth Factor beta 1* (TGF- β 1), *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF- α), *Interleukine* (IL) -6. La deuxième étape est la phase de prolifération. Durant cette phase, les myofibroblastes recrutés ont un rôle majeur puisqu'ils produisent une quantité importante de MEC afin de maintenir l'intégrité du tissu lésé durant la réparation et stimule la régénération du parenchyme. Dans la dernière phase de maturation, la MEC provisoire se dégrade et est remodelée afin de former l'architecture physiologique du tissu anciennement lésé (Jun & Lau, 2018; Wynn, 2007).

Cependant, quand des lésions se répètent un trop grand nombre de fois, l'inflammation chronique stimule continuellement le recrutement de myofibroblastes. L'accumulation excessive de fibroblastes/myofibroblastes sur les sites de lésions durant la phase de maturation entraîne une surproduction des composants de la MEC qui induit la formation d'une cicatrice fibreuse permanente (Fig. 2). La quantité produite de collagène et d'autres protéines de la MEC par les fibroblastes/myofibroblastes est régulée par un équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme. Cette balance est contrôlée par des métalloprotéases de la matrice (MMP) et leurs inhibiteurs (TIMP) produit par les granulocytes, macrophages et myofibroblastes. Les MMP clivent et dégradent les protéines de la MEC, tandis que les TIMP bloquent l'activité enzymatique des MMP. Cependant, certains membres de la famille des MMP peuvent favoriser une fibrose par leurs fonctions qui ne sont pas liées à la dégradation directe des protéines la MEC (Giannandrea & Parks, 2014).

L'inflammation n'est pas nécessairement toujours à l'origine du développement de la fibrose, suggérant que les mécanismes qui régulent la fibrogenèse peuvent être distincts de ceux qui régulent l'inflammation (Wynn, 2004). Dans un modèle murin avec fibrose intestinale, il a été montré que la sévérité de l'inflammation locale n'impacte pas le développement de la fibrose (Hünerwadel et al., 2018). Des lésions épithéliales en absence d'inflammation sont suffisantes pour stimuler le développement de la fibrose. Les mesures cliniques de l'inflammation ne sont pas

corrélées avec le stade de la fibrose et les traitements anti-inflammatoires sont inefficaces (Selman et al., 2001). Toutes ces informations montrent que la fibrose est un mécanisme complexe faisant intervenir de nombreux médiateurs.

1.3. La fibrose pulmonaire

1.3.1. Définition

La fibrose pulmonaire (FP) est une pathologie chronique et souvent progressive caractérisée par une accumulation excessive et anormale de MEC dans l'espace inter-alvéolaire du tissu pulmonaire. Le concept actuel de la pathogenèse de la FP est basé sur un processus de cicatrisation aberrante irréversible entraînant un remodelage du poumon. De nombreux éléments sont à l'origine du développement de la FP, comme des lésions toxiques, auto-immunes, induites par des traitements, infectieuses ou traumatiques (Thannickal et al., 2004). Ces divers déclencheurs de la maladie induisent des réponses inflammatoires et fibrosantes excessives. Une sur-activation répétée de réponses inflammatoires entraîne progressivement l'accumulation de manifestations fibrosantes, si bien qu'à un stade tardif la fibrose se développe seule. En effet, le recrutement de myofibroblastes au site d'inflammation de l'épithélium alvéolaire induit une production excessive de MEC qui entraîne un remodelage pulmonaire. Ce remodelage rigidifie le tissu et provoque une hypoxie qui stimule la synthèse de cytokines pro-fibrosantes et l'activation des myofibroblastes entraînant un cercle vicieux aggravant la fibrose (Wijsenbeek & Cottin, 2020). L'accumulation de MEC dans l'interstitium pulmonaire bouleverse les échanges gazeux au niveau de la membrane alvéolo-capillaire. Cette anomalie entraîne la sensation d'une respiration difficile et inconfortable (dyspnée) et altère la qualité de vie. Dans les cas les plus graves, la FP induit une insuffisance respiratoire entraînant une mort par asphyxie (Koudstaal et al., 2023).

1.3.2. Acteurs de la fibrose pulmonaire

1.3.2.1. Types cellulaires

1.3.2.1.1. Pneumocytes

Ce sont principalement les pneumocytes de type II qui sont dysfonctionnels et impliqués dans la progression de la FP. De multiples facteurs peuvent être à l'origine de lésions de l'épithélium alvéolaire et initier une FP (Fig. 3). Une production précoce de dérivés réactifs de l'oxygène, induisant un stress oxydatif ainsi qu'une perturbation de l'homéostasie des protéines

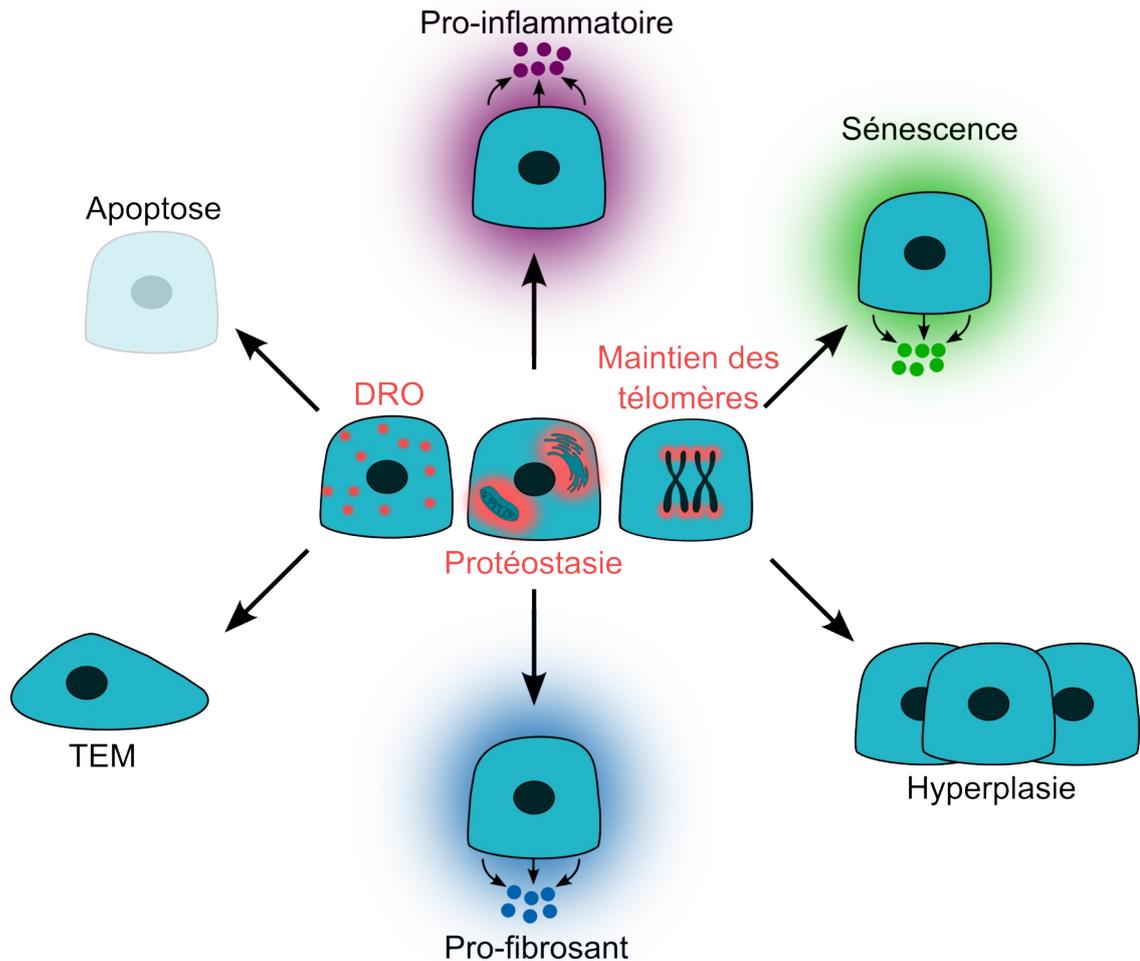


Figure 3. Rôle des pneumocytes de type II dans la fibrose pulmonaire.

Certains facteurs comme la production de dérivés réactifs à l’oxygène (DRO), une anomalie de l’homéostasie des protéines (protéostasie) ou une instabilité dans le maintien des télomères, entraînent un stress cellulaire des pneumocytes de type II. En réponse à ces perturbations, ces pneumocytes libèrent des médiateurs pro-inflammatoires et pro-fibrosants qui stimulent le recrutement et la prolifération des myofibroblastes entraînant un remodelage de la matrice extracellulaire (MEC). Ces médiateurs stimulent l’apoptose des pneumocytes de type II altérant la reconstitution des cellules épithéliales. Le stress cellulaire entraîne progressivement des modifications phénotypiques des pneumocytes de type II qui adoptent un profil de cellules mésenchymateuses, tels que des myofibroblastes. Cette modification est considérée comme une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). L’agression des pneumocytes de type II induit un arrêt de la plasticité de ces cellules et bloque la division cellulaire formant des cellules sénescents. Ces cellules adoptent un phénotype sécrétoire associé à la sénescence. Les médiateurs issus des cellules sénescents favorisent l’activité des cellules mésenchymateuses et participent au remodelage de la MEC. Une anomalie dans le maintien de l’intégrité des pneumocytes de type II entraîne une déstabilisation dans la prolifération et la différenciation cellulaire induisant une hyperplasie des pneumocytes de type II. Adapté de Katzen et Beers (Katzen & Beers, 2020).

(protéostasie) due à un stress du réticulum endoplasmique et à une dysfonction mitochondriale, sont susceptibles de perturber les fonctions des pneumocytes de type II, d'induire leur apoptose et de déclencher une FP (Antoniou et al., 2007). Une instabilité dans le maintien de la taille des télomères est également un facteur aggravant la FP (Alder et al., 2015).

En réponse à ces perturbations, les pneumocytes produisent des médiateurs pro-inflammatoires et pro-fibrosants impliqués dans la migration des fibroblastes, la prolifération et la différenciation en myofibroblastes qui induisent une accumulation et un remodelage de la MEC. Parmi ces médiateurs on retrouve le TGF- β 1, l'endothéline-1, le PDGF, le TNF- α et l'IL-1 β (Kasai et al., 2005; Kim & Chapman, 2007; Liu, 2008; Selman et al., 2001).

Les pneumocytes de type II ont une grande plasticité et sont considérés comme des cellules multipotentes. Ce sont des progéniteurs de l'épithélium alvéolaire capables de s'auto-renouveler et de se transdifférencier en pneumocytes de type I. Suite à des perturbations de l'épithélium alvéolaire, une réponse qui stimule la prolifération des pneumocytes de type II se met en place afin de reconstituer la barrière épithéliale. Cependant, ce processus induit une augmentation de la surface d'échange gazeux. Le retour à un épithélium alvéolaire physiologique est possible par une apoptose d'une partie des pneumocytes de type II en excès. L'autre partie de pneumocytes de type II se différencie en pneumocytes de type I, restaurant l'architecture tissulaire. L'équilibre entre apoptose/re-épithélialisation est possible grâce à la production de médiateurs dont le TGF- β 1. Parmi toutes ses fonctions, le TGF- β 1 favorise l'apoptose cellulaire des pneumocytes de type II. Or, cette cytokine est surexprimée dans la FP. Cela bouleverse l'homéostasie en stimulant constamment l'apoptose des pneumocytes de type II, ce qui altère la reconstitution de l'épithélium alvéolaire (Corvol et al., 2009). De plus, les cellules en apoptose secrètent également le TGF- β 1 entraînant un cercle vicieux aggravant la FP. La dénudation prolongée de la membrane basale de l'épithélium alvéolaire compromet les interactions entre les pneumocytes et les cellules mésenchymateuses du tissu conjonctif. Cela induit des modifications majeures des fonctions cellulaires associées à une production excessive de cytokines, facteurs de croissance, d'oxydants et de protéases stimulant la fibrogenèse (Kuwano, 2008).

Les cellules mésenchymateuses présentes en très grand nombre dans les poumons de patients souffrant de FP peuvent être issues de la différenciation des pneumocytes de type II par un

mécanisme de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Durant ce processus, les pneumocytes de type II perdent leur polarité et leurs marqueurs spécifiques de cellules épithéliales. La TEM induit des modifications moléculaires telles que la perte des jonctions serrées, la réorganisation du cytosquelette d'actine et la stimulation de l'expression de gènes de myofibroblaste comme *ACTA2*, *COL1A1* et *VIM* qui codent respectivement les protéines α -SMA, le collagène de type I et la vimentine. Ce sont les médiateurs pro-inflammatoires comme le TGF- β 1 qui sont responsables de la stimulation de la TEM (Corvol et al., 2009).

Des marqueurs de senescence cellulaire, tels que P16, P21 ou P53, ont également été identifiés dans les pneumocytes de type II de patients souffrant d'une FP. Cette senescence est caractérisée par un arrêt de la division cellulaire et une lente dégradation des fonctions cellulaires, ce qui entraîne une perte des capacités régénératives des pneumocytes de type II. Les cellules sénescents secrètent de nombreuses chimiokines et cytokines, impliquées dans la stimulation des cellules immunitaires, et des cellules mésenchymateuses qui favorisent un remodelage de la MEC (Katzen & Beers, 2020). La senescence seule des pneumocytes de type II, dans un modèle murin transgénique, semble suffisante pour déclencher une FP spontanée (Yao et al., 2021).

Les jonctions serrées, composées de protéines membranaires telles que les claudines et les occludines, sont indispensables pour maintenir l'intégrité structurale de l'épithélium alvéolaire et jouent un rôle majeur dans la prolifération et la différenciation cellulaire. Chez les patients atteints de FP, l'expression de certaines claudines par les pneumocytes est parfois diminuée, dans les régions de fibrose par rapport aux témoins sains. De même, une dysfonction de la barrière alvéolaire est observée chez le modèle de souris transgénique déficiente pour la claudine 18. Ces études montrent qu'une diminution d'expression de protéines des jonctions serrées par les pneumocytes de type II entraîne une réparation et une différenciation incomplète à l'origine d'une hyperplasie de pneumocytes de type II observée dans la FP (Kulkarni et al., 2016; LaFemina et al., 2014; Lappi-Blanco et al., 2013).

1.3.2.1.2. Cellules immunitaires

Parmi les cellules immunitaires innées, les macrophages alvéolaires secrètent de nombreux médiateurs pro-fibrosants tels que des cytokines, des chimiokines et des protéases (Barron & Wynn,

2011). Le rôle majeur des macrophages dans la FP est axé sur le recrutement et l'activation des fibroblastes à travers la sécrétion de cytokines telles que le TGF- β 1 et le PDGF. Les macrophages sont également capables de produire des TIMP qui inhibent la dégradation de la MEC (Murray & Wynn, 2011). En effet, il a été montré que la déplétion de macrophages/monocytes dans un modèle animal de FP diminue la production de MEC. À l'inverse, un transfert de macrophages stimule la progression de la fibrose, ce qui suggère un rôle majeur des macrophages dans la fibrogenèse pulmonaire (Gibbons et al., 2011). Le complexe *chemokine (C-C motif) ligand (CCL) 2/ chemokine (C-C motif) receptor (CCR) 2* joue également un rôle central dans l'activité pro-fibrosante des macrophages en stimulant leur infiltration et leur production de métalloprotéases (Okuma et al., 2004). Cependant, à côté de ces effets pro-fibrosants, les macrophages peuvent également avoir des fonctions anti-fibrosantes en fonction de leur polarité, du micro-milieu et du stade de la fibrose (Wynn, 2011). Les macrophages M1 ont un rôle pro-fibrosant, tandis que la sous-population de macrophage M2 ont à la fois un rôle pro-fibrosant, en produisant de nombreuses chimiokines telles que CCL17 et CCL18, et un rôle anti-fibrosant par la production de MMP-10 qui dégrade la MEC (Pechkovsky et al., 2010; Rohani et al., 2015; Tarique et al., 2015).

Les neutrophiles jouent également un rôle majeur dans la FP. Ces granulocytes retrouvés abondamment dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) de patients sont associés à un risque de mortalité précoce (Kinder et al., 2008). Les neutrophiles produisent des oxydants, des cytokines et chimiokines qui favorisent le développement et la progression de la FP. Ils secrètent également des protéases dont l'élastase, protéase majeure des neutrophiles, surexprimée dans le parenchyme pulmonaire, le LBA et le sérum de patients. L'élastase stimule la prolifération et la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (Gregory et al., 2015). De nombreuses études, basées sur des modèles expérimentaux de souris déficientes ou avec inhibition de l'élastase des neutrophiles, montrent un ralentissement de la progression de la FP (Chua et al., 2007; Takemasa et al., 2012). Les neutrophiles secrètent également de nombreuses métalloprotéases telles que la MMP-2, MMP-8 et MMP-9, toutes impliquées dans la FP (Corbel et al., 2001; Henry et al., 2002).

Les cellules immunitaires adaptatives interviennent également dans le développement de la FP, et notamment les lymphocytes T puisqu'une déplétion des lymphocytes T par utilisation d'anticorps monoclonal anti-CD3 réduit l'accumulation de MEC et la fibrose dans un modèle murin de FP induite expérimentalement (Sharma et al., 1996). Les lymphocytes Th1 et Th2 ont des rôles

opposés dans la progression de la FP. Les lymphocytes Th1 ont un rôle protecteur contrairement aux lymphocytes Th2 qui accentuent la fibrose (Wynn, 2004). De nombreux types de lymphocytes ont montré des rôles dans le développement de la fibrose, certains ont à la fois un rôle pro-fibrosant ou protecteur suivant le stade de la FP (Arras et al., 2001; Boveda-Ruiz et al., 2013; Chen et al., 2014; Mi et al., 2011; Pociask et al., 2011; Simonian et al., 2009, 2010; van den Brûle et al., 2007).

1.3.2.1.3. Fibroblastes/myofibroblastes

Les fibroblastes jouent un rôle majeur dans la FP puisqu'ils sont responsables de la production et de l'homéostasie de la MEC. L'activité de ces cellules est régulée par différentes molécules telles que les composants de la MEC, les cytokines, chimiokines et facteurs de croissance. Les fibroblastes se différencient en myofibroblastes en cas de stress cellulaire et sont une des sources majeures de myofibroblastes dans des conditions pathologiques.

Le myofibroblaste est le type cellulaire principal impliqué dans le développement de la FP. Il est caractérisé par l'expression du gène *ACTA2* codant l' α -actine musculaire lisse (α -SMA). L' α -SMA est une protéine localisée dans les fibres musculaires à l'origine de la forte activité contractile des myofibroblastes (Tomasek et al., 2002). Le myofibroblaste synthétise de nombreux composants de la MEC (Fig. 4) comme le collagène (Type I, III, IV, V et VI), la fibronectine (ED-A fibronectin, ED-B fibronectin), l'élastine, les protéoglycanes (Klingberg et al., 2013). En dehors des fibroblastes, d'autres progéniteurs tels que les cellules résidentes comme les proto-myofibroblastes, les cellules musculaires lisses mésenchymateuses, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et les fibrocytes circulants peuvent également se différencier en myofibroblastes (Fig. 4) (Hinz et al., 2007). Un nombre important de cytokines est impliqué dans l'activation et la prolifération des myofibroblastes comme l'IL-1, le TNF- α , le PDGF, l'aldostérone, la thrombine ou encore l'endothéline. Parmi tous ces médiateurs pro-fibrosants, le TGF- β est la cytokine majeure impliquée dans la stimulation des myofibroblastes et la production de collagène. L'activation des myofibroblastes nécessite également la présence de composants de la MEC et spécifiquement du domaine ED-A de la fibronectine (Powell et al., 1999) (Fig. 4). Les myofibroblastes sont résistants à l'apoptose cellulaire en condition de FP, ce qui contribue à une production continue de MEC (Virk et al., 2021). Ils ont donc un rôle majeur dans la destruction de l'architecture des alvéoles pulmonaires (Specks et al., 1995; Zhang et al., 1994). En plus de leurs propriétés fibrosantes, les myofibroblastes sont capables de synthétiser des médiateurs pro-inflammatoires comme de

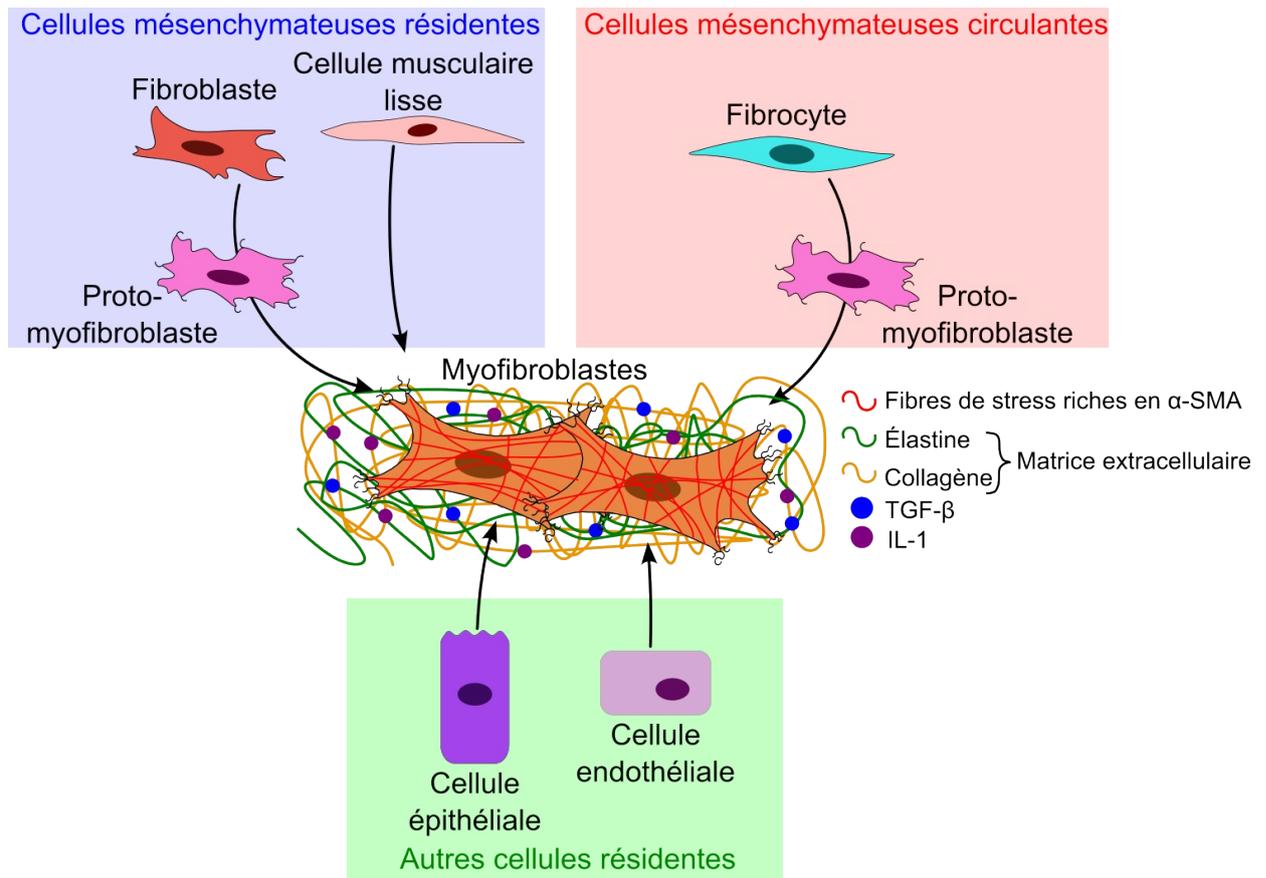


Figure 4. Progéniteurs et rôle des myofibroblastes dans la fibrose pulmonaire.

De nombreuses cellules peuvent se différencier en myofibroblastes. Parmi les cellules mésenchymateuses résidentes, les fibroblastes sont les progéniteurs majeurs des myofibroblastes. Lors de la différenciation des fibroblastes, les proto-myofibroblastes, cellules intermédiaires, se forment. Les cellules musculaires lisses se différencient pour former des myofibroblastes. Les fibrocytes sont des cellules mésenchymateuses circulantes capables de se différencier en myofibroblastes. Des cellules épithéliales ou endothéliales résidentes peuvent se différencier par un mécanisme de transition épithélio-mésenchymateuse ou endothélio-mésenchymateuse en myofibroblastes. Les myofibroblastes sont composés de fibres de stress riches en α -SMA, responsable de leur contractilité et synthétisent abondamment de la matrice extracellulaire à l'origine de la fibrose. Les cytokines stimulent l'activité pro-fibrosante des myofibroblastes. Adapté de Hinz (Hinz et al., 2007).

nombreuses cytokines dont le TGF- β 1 et des chimiokines. En sécrétant ces médiateurs, les myofibroblastes participent au recrutement de cellules inflammatoires. Les myofibroblastes secrètent la chimiokine CCL2 qui favorise la migration des macrophages alvéolaires dans les sites de fibrose (Walsh et al., 2018). En raison de leur double rôle de production active de MEC et de médiateurs inflammatoires, les myofibroblastes sont des cellules clefs dans la physiopathologie de la FP.

Les myofibroblastes sont caractérisés par une contractilité importante, ce qui contribue à l'altération irréversible des propriétés mécaniques des poumons. La contractilité des gels riches en collagène est positivement corrélée avec l'expression d' α -SMA et est impliquée dans la modification de la compliance pulmonaire (Grinnell & Petroll, 2010; Hinz, 2012).

1.3.2.2. Médiateurs pro-fibrosants

1.3.2.2.1. Cytokines et chimiokines

Les différents types cellulaires impliqués dans la FP sont stimulés par de nombreuses cytokines parmi lesquelles le TGF- β s'impose comme la cytokine majeure dans la physiopathologie de la fibrose. Durant la fibrogenèse, beaucoup de cellules différentes synthétisent le TGF- β telles que des cellules résidentes comme les fibroblastes, les cellules épithéliales et les macrophages des alvéoles pulmonaires ou des cellules circulantes comme les mastocytes ou les éosinophiles. Parmi les 3 isoformes du TGF- β , TGF- β 1, 2 et 3, le TGF- β 1 est la cytokine la plus impliquée dans la FP (Ask et al., 2008; Bartram & Speer, 2004; Fernandez & Eickelberg, 2012). Ce facteur de croissance/cytokine possède de nombreux rôles pro-fibrosants. Il favorise la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et la TEM des pneumocytes, stimule l'expression du marqueur de fibrose α -SMA et la production de MEC dont le collagène, la fibronectine, les glycosaminoglycanes et les protéoglycanes (Bartram & Speer, 2004; Gauldie et al., 1999; Willis & Borok, 2007). Chez les patients atteints de FP, le TGF- β 1 stimule la prolifération des fibroblastes (Agassandian et al., 2015).

Le PDGF est un facteur de croissance qui favorise la multiplication et le recrutement des fibroblastes et myofibroblastes dans les sites de lésions des poumons. *In vivo*, la surexpression du PDGF par les cellules épithéliales et les macrophages pulmonaires induit une FP sévère via la

stimulation de la production de collagène (Bonner, 2004; Yoshida et al., 1995). Dans un modèle de FP induite, il a été montré que les lymphocytes Treg stimulent l'activité des fibroblastes à travers l'expression de PDGF (Antoniades et al., 1990; Lo Re et al., 2011).

L'IL-1 β est majoritairement produite par les macrophages, les neutrophiles et les cellules épithéliales. Cette cytokine contribue à la progression de la FP. Dans un modèle expérimental de FP, la surexpression d'IL-1 β stimule les fibroblastes et myofibroblastes via la surproduction d' α -SMA et de MEC (Cavarra et al., 2004; Kolb et al., 2001).

L'IL-13 favorise la différenciation de fibroblastes pulmonaires humains en myofibroblastes et stimule la production d' α -SMA et de collagène de type I (Hashimoto et al., 2001; Kolodsick et al., 2004). Cette cytokine est exprimée par les lymphocytes Th2. L'IL-13 est retrouvée à des taux élevés dans le LBA de patients atteints de FP et est positivement corrélée à la sévérité de la pathologie (Park et al., 2009). Dans différents modèles expérimentaux, la surexpression d'IL-13 semble stimuler la FP, alors que l'inactivation du gène *IL-13* ou l'inhibition de cette cytokine ralentit considérablement la progression de la fibrose induite (Han et al., 2011; Kolodsick et al., 2004; Yang et al., 2004).

En dehors des cytokines, des chimiokines sont également impliquées dans la progression de la FP. CCL2 est produit par les monocytes/macrophages, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses, les cellules épithéliales et endothéliales (Moore et al., 2001). Cette chimiokine, associée à son récepteur CCR2 exprimé par les fibrocytes, favorise le recrutement de fibrocytes circulants dans l'espace alvéolaire et stimule leur différenciation en fibroblastes, ce qui induit une production excessive de collagène (Moore et al., 2005). CCL2 est retrouvée en quantité importante dans les LBA et sérums de patients atteints de FP (Suga et al., 1999). La production de MEC est atténuée dans un modèle de souris déficiente pour *Ccr2* avec FP expérimentale. Cet effet est lié à la diminution de l'infiltration de macrophages dans les sites de lésions pulmonaires, ce qui entraîne une réduction de production de métalloprotéases pro-fibrosantes (Moore et al., 2001; Okuma et al., 2004). D'autres chimiokines, impliquées dans le recrutement de cellules favorisant la progression de la fibrose, sont surexprimées chez les patients atteints de FP, comme CCL17, CCL18 ou *chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)12* (Kolahian et al., 2016). D'autres médiateurs impliqués dans le développement de la FP sont listés dans le [tableau I](#).

Tableau I. Médiateurs impliqués dans la physiopathologie de la fibrose pulmonaire.

Médiateurs	Fonctions	Référence
Acide lysophosphatidique	<ul style="list-style-type: none">– Induit l'apoptose de cellules épithéliales alvéolaires– Stimule la prolifération et la migration des fibroblastes pulmonaires– Induit une résistance à l'apoptose des fibroblastes– Stimule la contraction des myofibroblastes	(Magkrioti & Aidinis, 2013)
CCL17	<ul style="list-style-type: none">– Favorise le recrutement de lymphocytes Th2 et de macrophages alvéolaires	(Belperio et al., 2004) (Pignatti et al., 2006)
CCL18	<ul style="list-style-type: none">– Contribue à la production de MEC^a	(Atamas et al., 2003) (Luzina et al., 2006)
CCL2	<ul style="list-style-type: none">– Favorise le recrutement et la différenciation des fibrocytes en fibroblastes	(Moore et al., 2005)
CTGF	<ul style="list-style-type: none">– Induit la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes– Stimule la TEM^b– Contribue à la production de MEC– Stimule la production de cytokines dont le TGF-β	(Yanagihara et al., 2022)
CXCL12	<ul style="list-style-type: none">– Favorise le recrutement des fibrocytes	(Kolahian et al., 2016)
Endothéline-1	<ul style="list-style-type: none">– Stimule la synthèse de CTGF– Induit la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes	(Ross et al., 2010)

IGF-1	<ul style="list-style-type: none"> – Induit la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes – Contribue à la production de MEC 	(Hung et al., 2013)
IL-1 β	<ul style="list-style-type: none"> – Stimule la production d'α-SMA – Contribue à la production de MEC 	(Kolb et al., 2001) (Cavarra et al., 2004)
IL-13	<ul style="list-style-type: none"> – Induit la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes – Stimule la production d'α-SMA – Contribue à la production de MEC 	(Hashimoto et al., 2001) (Kolodsick et al., 2004)
IL-6	<ul style="list-style-type: none"> – Induit la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes – Contribue à la production de MEC – Stimule la TEM 	(Li et al., 2022)
IL-8	<ul style="list-style-type: none"> – Prolifération et chimioattraction des neutrophiles – Stimule la TEM 	(Yang et al., 2018)
PDGF	<ul style="list-style-type: none"> – Stimule la prolifération et la migration des fibroblastes pulmonaires – Contribue à la production de MEC 	(Bonner, 2004) (Yoshida et al., 1995)
TGF- β 1	<ul style="list-style-type: none"> – Induit la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes – Stimule la TEM – Stimule la production d'α-SMA – Contribue à la production de MEC 	(Gauldie et al., 1999) (Willis & Borok, 2007) (Bartram & Speer, 2004)
TNF- α	<ul style="list-style-type: none"> – Stimule la TEM – Favorise la synthèse de TGF-β1 par les fibroblastes pulmonaires – Induit la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en myofibroblastes 	(Hou et al., 2018)

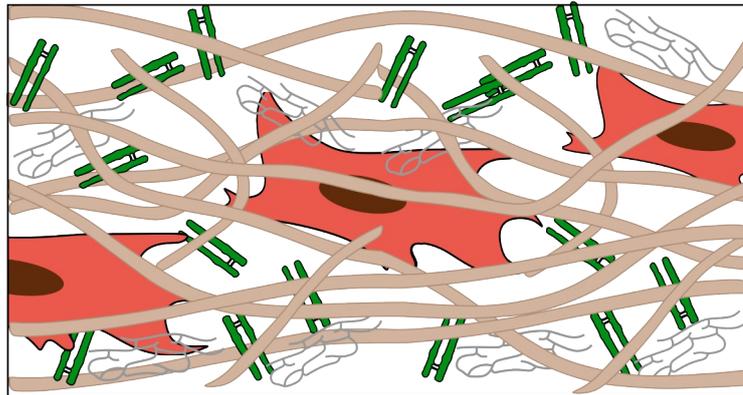
^a : Matrice ExtraCellulaire ; ^b : Transition Épithélio-Mésenchymateuse.

1.3.2.2.2. La matrice extracellulaire

La MEC est composée d'une variété de composants dont majoritairement le collagène, l'élastine, des glycoprotéines (fibronectine, ténascine, thrombospondine) et des protéoglycanes. En plus de maintenir la structure du tissu pulmonaire, la MEC assure la stabilité mécanique et élastique indispensable aux fonctions pulmonaires (Burgstaller et al., 2017; Schiller et al., 2015). Les fibres de collagènes assurent une grande résistance à la traction et contribuent à l'architecture générale du poumon. L'élastine assure la compliance et le recul élastique des poumons. Les protéoglycanes sont hydrophiles et sont composés de nombreux résidus de polysaccharides qui contribuent à la propriété viscoélastique du poumon. La fibronectine et les glycosaminoglycanes maintiennent la polarité et la survie des cellules pulmonaires (Deng et al., 2020).

Dans la FP, les composants de la MEC sont surexprimés (Booth et al., 2012; Decaris et al., 2014; Rosmark et al., 2018) (Fig. 5). De nombreuses études montrent que la modification structurelle de la MEC n'est pas seulement une conséquence de la fibrose, mais également un facteur clef dans la progression de la fibrogenèse. Le collagène de type VI stimule la production d' α -SMA par les fibroblastes, ce qui favorise leur différenciation en myofibroblastes. La concentration de néoépitopes issus de la dégradation du collagène est retrouvée à un taux plus élevé dans le sérum de patients atteints de FP comparé aux témoins sains, et induit une stimulation massive du système immunitaire. Plus la concentration sérique en néoépitopes est importante, plus la FP est agressive (Jenkins et al., 2015; Naugle et al., 2006; Organ et al., 2019). L'élastine est fortement produite dans les zones de fibrose des poumons de patients atteints de FP. Cette surexpression est retrouvée dans un modèle murin de FP expérimentale. De plus, la production d' α -SMA par des fibroblastes pulmonaires humains cultivés sur des supports recouverts d'élastine est plus importante comparée à celle de fibroblastes cultivés sur des supports recouverts de collagène. Ces résultats suggèrent que l'élastine stimule la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (Blaauboer et al., 2014; Rozin et al., 2005). Le modèle de souris transgénique déficiente pour le domaine A de la fibronectine ne développe pas de FP significative, ce qui indique un rôle essentiel de la fibronectine dans la fibrogenèse (Muro et al., 2008). La périostine, glycoprotéine de la MEC, stimule la prolifération des fibroblastes de patients atteints de FP. Dans un modèle murin de FP, la périostine stimule la production de MEC et la prolifération de cellules mésenchymateuses. Inversement, les souris transgéniques déficientes pour la périostine sont protégées de la FP induite expérimentalement (Naik et al., 2012; Uchida et al., 2012; Yoshihara et al., 2020).

Matrice extracellulaire saine



Matrice extracellulaire avec fibrose pulmonaire

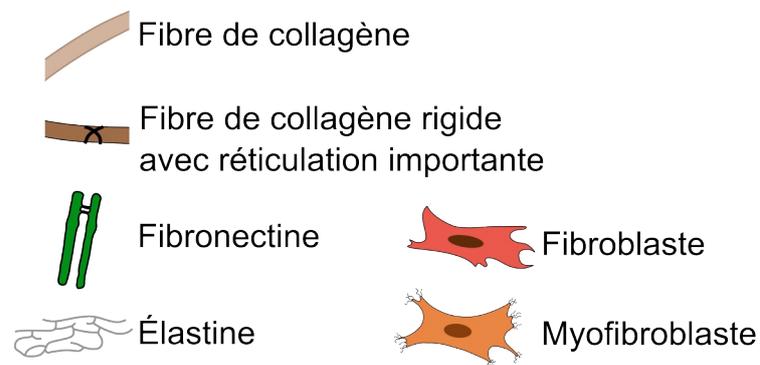
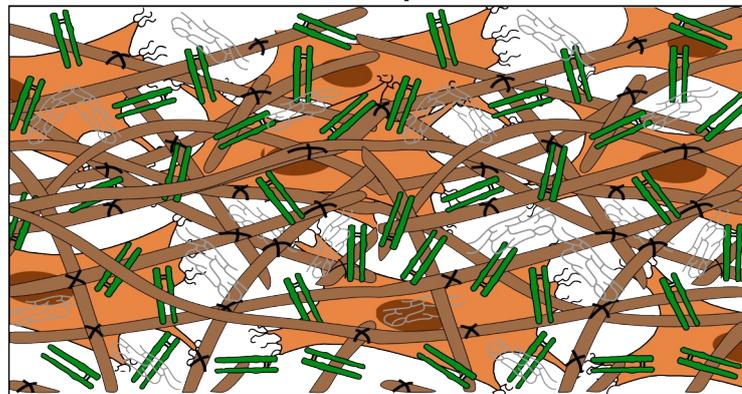


Figure 5. Comparaison de la matrice extracellulaire pulmonaire sans (saine) et avec fibrose pulmonaire.

Chez le sujet sain, l'homéostasie de la matrice extracellulaire (MEC) est maintenue par l'activité des fibroblastes résidents. La MEC se compose d'un réseau lâche de collagène, d'élastine et de fibronectine. Chez le sujet avec fibrose pulmonaire, les fibroblastes se différencient en myofibroblastes. Ces derniers ont des propriétés contractiles élevées et secrètent abondamment de la MEC constituée notamment de fibres de collagène ayant une réticulation importante, ce qui rigidifie le parenchyme pulmonaire. Adapté de Burgstaller (Burgstaller et al., 2017).

D'autres composants de la MEC, comme la fibuline 1, l'ostéopontine et la ténascine C ont été montrés surexprimés dans la FP et impliqués dans la fibrogenèse (Blaauboer et al., 2014; Liu et al., 2019; Pardo et al., 2005).

L'augmentation de la production de MEC densifie les poumons. En effet, les tissus pulmonaires de patients atteints de PF sont plus rigides comparés à ceux de donneurs sains. Dans un modèle murin avec FP expérimentale, la densité de la MEC est aussi plus importante dans les zones de fibrose comparée à celle des souris contrôles (Brown et al., 2013; Elowsson Rendin et al., 2019). Les myofibroblastes des poumons de patients atteints de FP ont une contractilité importante de par la production d' α -SMA et produisent de façon plus conséquente du collagène, contrairement aux fibroblastes témoins. Après décellularisation du tissu pulmonaire, la rigidité de la MEC de patients atteints de FP diminue. Ces résultats suggèrent que la rigidité propre aux myofibroblastes chez les patients atteints de FP contribue à l'augmentation de la rigidité de l'ensemble du tissu pulmonaire et à la progression de la pathologie (Booth et al., 2012; Jaffar et al., 2018). Des modifications des propriétés mécaniques de la MEC dans les poumons sont aussi responsables de la progression de la FP. En effet, une rigidité importante de la MEC stimule la synthèse de TGF- β 1 par les fibroblastes. En réponse à la rigidité de la MEC, les myofibroblastes de patients atteints de FP migrent plus rapidement et produisent fortement l' α -SMA, contrairement aux fibroblastes issus d'une MEC physiologique. De plus, une MEC issue d'un patient atteint de FP semble avoir un impact pro-fibrosant plus important sur des fibroblastes en culture comparée à l'activité des myofibroblastes isolés issus de ces mêmes patients (Asano et al., 2017; Parker et al., 2014; Wipff et al., 2007). Ces résultats montrent une boucle rétroactive pro-fibrosante où la MEC, de par sa composition et sa rigidité, stimule la prolifération des fibroblastes et favorise leur différenciation en myofibroblastes qui eux-mêmes produisent abondamment de la MEC.

La rigidité de la MEC affecte l'activité des fibroblastes mais également celle des pneumocytes. Une augmentation de la densité de la MEC, comme observée dans la FP, entraîne une TEM des pneumocytes. En réponse à une matrice rigide, les pneumocytes de type II n'expriment plus de marqueurs épithéliaux et expriment, à l'inverse, des marqueurs semblables à ceux produits par les cellules du mésenchyme. Enfin, la fibrine et fibronectine de la MEC stimulent la TEM (Brown et al., 2013; Kim et al., 2006).

1.3.3. Les pneumopathies interstitielles diffuses

1.3.3.1. Classification

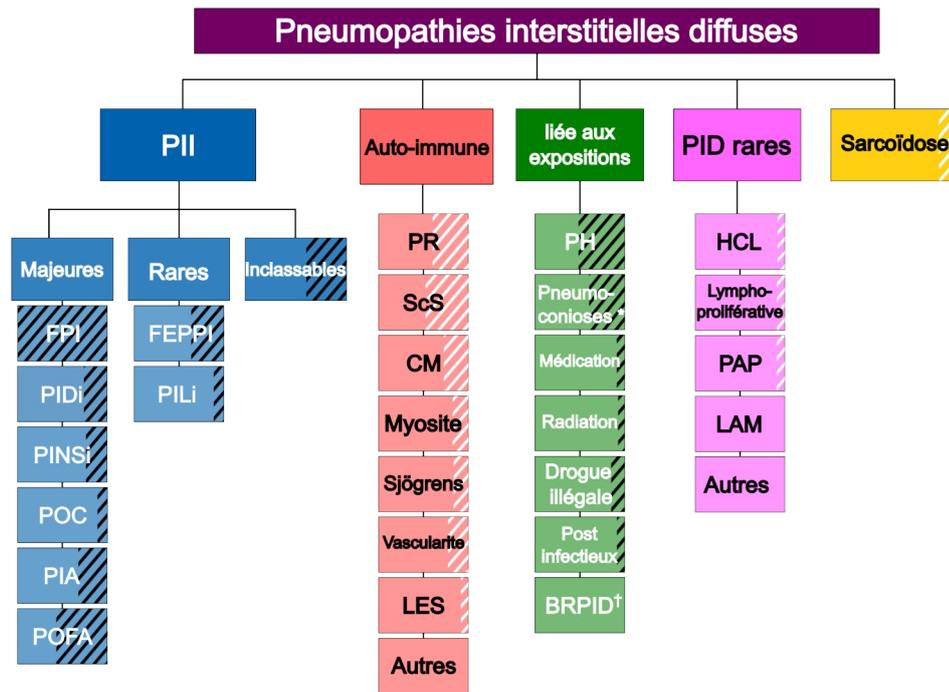
Les pneumopathies interstitielles diffuses (PID) sont considérées comme des pathologies ciblant l'interstitium pulmonaire et sont classifiées en 5 groupes : idiopathique, auto-immune, dû à des expositions, groupe de maladies rares et la sarcoïdose (Fig. 6A). Les pronostics de chaque PID peuvent être divers. Certains sont complètement réversibles, comme les cas des PID inflammatoires. Les PID fibrosantes sont irréversibles et sont caractérisés par une FP. Dans certains cas, la FP peut-être progressive et s'accompagne d'une détérioration rapide des poumons. On parle alors de FP progressive (FPP). La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est toujours progressive (Koudstaal et al., 2023). D'autres PID peuvent être amenées à développer une FPP (Fig. 6A). Les PID de nature idiopathique regroupent les pathologies avec une FP dont l'étiologie est inconnue. Ce sont les pneumopathies interstitielles idiopathiques (PII). Les PII ont un spectre de réponses inflammatoires et fibrosantes divers (Fig. 6B).

L'identification de la nature de la PID est indispensable afin de proposer des traitements adaptés à la pathologie en question. Dans les cas de PID marquées par une infiltration diffuse de cellules inflammatoires, les traitements immunosuppresseurs et anti-inflammatoires sont des traitements de première intention. Pour les PID caractérisées par une fibrose massive avec une inflammation minime comme la FPI, les traitements immunomodulateurs sont peu efficaces et il est conseillé de prescrire des agents anti-fibrosants, même si leurs impacts thérapeutiques sont peu satisfaisants (Horowitz & Thannickal, 2006; Wijsenbeek & Cottin, 2020).

1.3.3.2. Épidémiologie

Il existe une très grande variabilité dans la prévalence et, dans le monde, l'incidence des PID due à des différences d'expositions environnementales et à des inégalités de ressources aux soins responsables d'un sous-diagnostic. La prévalence globale des PID est estimée à 76 cas pour 100 000 personnes en Europe et 74.3 cas pour 100 000 individus aux États-Unis (Wijsenbeek & Cottin, 2020). En France, parmi toutes les PID, la sarcoïdose est la pathologie la plus diagnostiquée avec une prévalence de 42 %. Parmi tous les patients avec une PID autre que la FPI, 18 à 32 % ont un phénotype de FP progressive (Wijsenbeek et al., 2019). Des différences entre le sexe et l'âge des patients sont observées en fonction de la nature de la PID diagnostiquée. La sarcoïdose touche autant les hommes que les femmes avec une moyenne d'âge entre 35 et 54 ans. Chez les personnes

A



B



Figure 6. Classification étiologique des différentes pneumopathies interstitielles diffuses (PID).

(A) Les zones rayées en blanc ou en noir représentent la proportion de fibrose pulmonaire progressive identifiée dans la pathologie correspondante. PII, Pneumopathie Interstitielle Idiopathique ; FPI, Fibrose Pulmonaire Idiopathique ; PIDi, Pneumopathie Interstitielle Desquamative idiopathique ; PINS, Pneumopathie Interstitielle Non Spécifique idiopathique ; POC, Pneumopathie Organisée Cryptogénique ; PIA, Pneumopathie Interstitielle Aiguë ; POFA, Pneumopathie Organisée Fibrineuse Aiguë ; FEPPi, FibroElastose PleuroParenchymateuse Idiopathique ; PILi, Pneumopathie Interstitielle Lymphocytaire idiopathique ; PR, Polyarthrite Rhumatoïde ; ScS, Sclérodemie Systémique ; CM, Connectivite Mixte ; LES, Lupus Érythémateux Systémique ; PH, Pneumopathie d’Hypersensibilité ; BRPID, Bronchiolite Respiratoire avec Pneumopathie Interstitielle Diffuse ; HCL, Histiocytose à Cellules de Langerhans ; PAP, Protéinose Alvéolaire Pulmonaire ; LAM, LymphAngioléioMyomatose. *, Les pneumoconioses regroupent toutes les pathologies liées à des expositions environnementales d’irritants dans le cadre professionnel telles que l’asbestose, la silicose, la pneumoconiose des mineurs de charbon, la bérylliose... (DeLight, 2023). † La BRPID est reconnue comme une conséquence au tabagisme chez la quasi-totalité des patients. Dans de rares cas, cette pathologie peut être diagnostiquée chez des individus sans cause connue. Par conséquent, une forme de BRPID de nature idiopathique existe classant cette dernière dans les PII. Adapté de Raghu, 2022 (Raghu, 2022). (B) Degrés d’inflammation et de fibrose selon la nature de la PII. Adapté de Horowitz (Horowitz & Thannickal, 2006).

plus âgées entre 65 et 84 ans, les femmes sont plus susceptibles de développer une connectivite/collagénose qui est une maladie auto-immune avec manifestations systémiques. Les hommes sont plus à risque de développer une FPI (Duchemann et al., 2017)

1.3.3.3. Étiologies

1.3.3.3.1. Facteurs environnementaux

Les irritants environnementaux ont été rapportés comme des facteurs responsables des FP liées à leurs expositions. Parmi ces PID, la pneumoconiose est causée par l'inhalation répétée de poussières et de fibres organiques ou non organiques en suspension dans l'air. Les types de pneumoconioses les plus fréquemment rencontrés sont l'asbestose suite à l'inhalation de poussières d'amiante, la silicose due à l'exposition avec des particules de silice et la pneumoconiose des mineurs de charbon. Ce sont des maladies professionnelles puisque les patients sont au contact de ces substances généralement sur leur lieu de travail. Dans l'ensemble, l'exposition à des irritants environnementaux sur les lieux de travail augmente le risque de développer d'autres PID comme la pneumopathie d'hypersensibilité, la sarcoïdose et la protéinose pulmonaire alvéolaire. Pour les PII comme la FPI par exemple, une exposition à des agents irritants augmente le risque de FP, même si les causes exactes à l'origine de leur développement restent inconnues (Blanc et al., 2019).

Des expositions à des irritants domestiques sont également impliquées dans le risque de développer une FP. La pneumopathie d'hypersensibilité se développe suite à la sensibilisation du système immunitaire par l'inhalation d'antigènes protéiques ou organiques. La plupart de ces antigènes sont d'origine aviaire (Tsutsui et al., 2015). Les autres antigènes peuvent être d'origine microbienne (champignons, bactéries) (Moran-Mendoza et al., 2021). Des composés organiques comme l'isocyanate sont également impliqués dans le risque de développer une pneumopathie d'hypersensibilité. De nombreux autres antigènes restent non-identifiés malgré une évaluation approfondie (Salisbury et al., 2017). Le tabagisme augmente le risque de développer une FPI, une pneumopathie interstitielle desquamative, une bronchiolite respiratoire avec pneumopathie interstitielle diffuse et une histiocytose à cellules de langerhans (Ryu et al., 2001). L'exposition chronique au dioxyde d'azote, à l'origine de la pollution de l'air due au trafic routier, augmente le taux d'incidence de FPI. Associé à l'ozone, le dioxyde d'azote peut entraîner une détérioration rapide avec aggravation brutale de la FPI (Conti et al., 2018; Johansson et al., 2014).

1.3.3.3.2. Facteurs génétiques

En dehors des formes sporadiques, des formes familiales de FP ont été identifiées. En Finlande, entre 3,3 et 3,7 % des cas de FPI sont de formes familiales (Hodgson et al., 2002). Le tableau clinique des formes familiales de FP ne peut pas être distingué des FP sporadiques, à l'exception de l'âge d'apparition de la pathologie qui tend à être plus précoce dans les formes familiales (Marshall et al., 2000). La FP familiale est définie par la présence d'une PID chez au moins 2 personnes apparentées dont au moins un membre de la famille est atteint d'une PII. Ces informations indiquent que des facteurs génétiques sont associés au risque de développer une FP.

Parmi les variants associés au risque de développer une PID, le polymorphisme rs35705950 localisé dans le promoteur du gène *MUC5B* est le plus commun. Ce gène code la mucine MUC5B, composant macromoléculaire glycosylé du mucus et produit par les « cellules à mucus » de l'épithélium bronchique. Les sujets hétérozygotes ou homozygotes pour ce polymorphisme ont un « odds ratio » de 6,8 et 20,8 respectivement, pour la FP familiale. Pour la FPI, il est de 9 pour les sujets hétérozygotes et 21,8 pour les sujets homozygotes. L'expression de cette mucine est 14,1 fois plus importante chez les individus ayant une FPI que chez les sujets sains et la protéine MUC5B est localisée dans les lésions de la FPI (Seibold et al., 2011). Le polymorphisme du promoteur de *MUC5B* est fortement lié au développement de la FPI, mais il peut également être associé au risque de pneumopathie d'hypersensibilité, de polyarthrite rhumatoïde et de PII plus généralement (Fingerlin et al., 2013; Juge et al., 2018; Ley et al., 2017). Le variant rs35705950 du promoteur de *MUC5B* est majoritairement un facteur de risque de PID pour les caucasiens. Les populations hispaniques et asiatiques sont également touchées, même si cette mutation est faiblement identifiée chez les asiatiques (Peljto et al., 2015; Wang et al., 2014).

Plus rarement, d'autres variants génétiques sont associés au risque de développer une PID. La protéine C du surfactant (SFTPC) codée par le gène *SFTPC* est un des quatre surfactants exprimés par les pneumocytes de type II. Il s'agit d'un agent tensioactif modifiant la tension de surface des alvéoles afin d'éviter le collapsus alvéolaire. Des études ont montré que des mutations génétiques hétérozygotes de *SFTPC* sont associées au risque de forme familiale de FP comme aux formes sporadiques de FPI et de pneumopathie interstitielle non spécifique (Lawson et al., 2004; Nogee et al., 2001; Thomas et al., 2002). Une étude *in vitro* a montré qu'une modification du SFTPC à l'origine des FP identifiée chez les patients induisait un stress du réticulum endoplasmique

responsable de l'apoptose des pneumocytes de type II (Mulugeta et al., 2007). La *telomerase reverse transcriptase* (TERT) et la *telomerase RNA component* (TERC) assurent le maintien de l'intégrité des télomères lors de chaque division cellulaire. Des mutations hétérozygotes dans les gènes codant TERT et TERC s'accompagnent d'un raccourcissement des télomères et sont associées à des formes sporadiques et à des FP familiales de FPI (Armanios et al., 2007; Tsakiri et al., 2007). Des variants génétiques de *TERT* et *TERC* sont également impliqués dans d'autres maladies interstitielles (Adegunsoye et al., 2019). Les autres variants génétiques communs et rares impliqués dans le risque de développer un PID sont listés dans les [tableaux II et III](#).

1.3.3.4. Interventions cliniques

1.3.3.4.1. Diagnostic

La nature de la PID est diagnostiquée à partir d'analyses cliniques, radiologiques et histologiques si possible. Les symptômes sont non-spécifiques et se caractérisent par une dyspnée et une toux. Le diagnostic débute par une communication de l'ensemble des antécédents médicaux et historique du patient au médecin. La médication, le tabagisme, les conditions environnementales et les antécédents familiaux sont des informations demandées au patient afin de définir des causes étiologiques possibles de la pathologie. Des tests pulmonaires fonctionnels réalisés à l'aide d'un spiromètre sont utilisés afin de déterminer la sévérité de la FP. Ce type de pathologie se caractérise par un déficit restrictif de la ventilation, c'est-à-dire à une diminution des volumes pulmonaires mobilisables, définie grâce à la valeur de la capacité vitale forcée (CVF). La CVF désigne le volume d'air maximal expiré le plus rapidement après une inspiration maximale. Des examens sérologiques sont réalisés afin d'identifier des auto-anticorps qui pourraient être signes d'une pathologie systémique (Yamada, 2011) ou des anticorps IgG spécifiques dirigés contre des antigènes caractéristiques d'une pneumopathie d'hypersensibilité (Raghu et al., 2020).

L'analyse par imagerie radiologique effectuée par tomodensitométrie thoracique haute résolution permet d'identifier des patterns caractéristiques de PID essentiels au diagnostic. Les patterns caractéristiques de PII sont listés dans le [tableau IV](#). Le diagnostic est toutefois complexe à établir. Certains patterns peuvent être observés dans plusieurs classes de PID. Les patterns de PII peuvent être identifiés dans des maladies auto-immunes comme la sclérodermie systémique ou la polyarthrite rhumatoïde (Konopka & Myers, 2021; Lee et al., 2005; Tanaka et al., 2004) ([Tableau IV](#)).

Tableau II. Variants génétiques communs en lien avec le risque de développer une pneumopathie interstitielle diffuse.

Variants génétiques communs	SNP ^a	PID ^b	Référence
<i>AKAP13</i>	rs62025270	FPI ^c	(Allen et al., 2017)
<i>ATP11A</i>	rs1278769	PII ^d	(Fingerlin et al., 2013)
<i>CDKN1A</i>	rs2395655	FPI	(Kropski et al., 2015)
<i>DEPTOR</i>	rs28513081	FPI	(Allen et al., 2020)
<i>DPP9</i>	rs2109069	PII	(Fingerlin et al., 2013)
<i>DSP</i>	rs2076295	PII	(Fingerlin et al., 2013)
<i>ELMOD2</i>	Inconnu	FPI	(Pulkkinen et al., 2010)
<i>FAM13A</i>	rs2609255	PII	(Fingerlin et al., 2013)
<i>HLA-DRB1</i>	rs2395655	PII PH ^d Connectivite	(Fingerlin et al., 2016) (Falfán-Valencia et al., 2014) (Furukawa et al., 2012)
<i>IL1RN</i>	rs2637988, rs408392 rs419598	FPI	(Barlo et al., 2011) (Korthagen et al., 2012)
<i>IL8</i>	rs4073, rs2227307	FPI	(Ahn et al., 2011)
<i>KIF15</i>	rs78238620	FPI	(Allen et al., 2020)
<i>MAD1L1</i>	rs12699415	FPI	(Allen et al., 2020)

<i>MAPT</i>	rs1981997	PII	(Fingerlin et al., 2013)
<i>MDGA2</i>	rs7144383	FPI	(Noth et al., 2013)
<i>MMP7</i>	rs11568818, rs11568819	FPI	(Richards et al., 2012)
<i>OBFC1</i>	rs11191865	PII	(Fingerlin et al., 2013)
<i>SPPL2C</i>	rs17690703	FPI	(Noth et al., 2013)
<i>TLR3</i>	rs3775291	FPI	(O'Dwyer et al., 2013)
<i>TOLLIP</i>	rs111521887, rs5743894, rs5743890 rs5743899	FPI PH	(Noth et al., 2013) (Katayanagi et al., 2022)
<i>TP53</i>	rs12951053, rs12602273	FPI	(Kropski et al., 2015)

^a : Single Nucleotid Polymorphism ; ^b : Pneumopathie Interstitielle Diffuse ; ^c : Fibrose Pulmonaire Idiopathique ; ^d : Pneumopathie Interstitielle Idiopathique.

Tableau III. Variants génétiques rares en lien avec le risque de développer une pneumopathie interstitielle diffuse.

Variants génétiques rares	PID^a	Référence
<i>ABCA3</i>	POC ^b FPI ^c	(Borie et al., 2017) (Kropski et al., 2015)
<i>DKC1</i>	FPF ^d	(Kropski et al., 2014)
<i>SFTPA2</i>	FPI PII ^e	(Wang et al., 2009) (van Moorsel et al., 2015)
<i>TINF2</i>	FPF	(Kropski et al., 2015)
<i>RTEL1</i>	FPI PH ^f FEPPI ^g	(Petrovski et al., 2017) (Newton et al., 2016)
<i>PARN</i>	PINS ^h FPI PH	(Petrovski et al., 2017) (Newton et al., 2016)

^a : Pneumopathie Interstitielle Diffuse ; ^b : Pneumopathie Organisée Cryptogénique ; ^c : Fibrose Pulmonaire Idiopathique ; ^d : Fibrose Pulmonaire Familiale ; ^e : Pneumopathie Intersitielle Idiopathique ; ^f : Pneumopathie d'Hypersensibilité ; ^g : FibroElastose PleuroParenchymateuse Idiopathique ; ^h : Pneumopathie Interstitielle Non Spécifique.

Tableau IV. Caractéristiques radiologiques et histologiques de patterns en lien avec les pneumopathies interstitielles idiopathiques.

Pattern	Caractéristique radiologique	Caractéristique histologique	Diagnostic clinique	Diagnostic différentiel
PIC ^a	Rayon de miel et réticulations basale et sous-pleurale Bronchectasie de traction	Fibrose sous pleurale et périphérique Hétérogénéité temporelle et spatiale de fibrose Foyers fibroblastiques et de rayons de miel	FPI ^b	Asbestose Vascularite PH ^c Sarcoïdose
PINS ^d	Opacités en verre dépoli bilatérales Réticulation et bronchectasie de traction Prédominance basale habituellement	Atteinte interstitielle uniforme par des degrés variables de fibrose et d'inflammation	PINS	PH
PO ^e	Consolidation de l'espace aérien avec une distribution principalement basale/périphérique ou péri-bronchovasculaire	Bouchons de tissus conjonctif à l'intérieur des petites voies aériennes et des espaces aérien (corps de Masson)	POC ^f	Infection Vascularite Sarcoïdose PINS
PID ^g	Opacités en verre dépoli Distributions basales et périphériques fréquentes	Accumulation importante de macrophages dans les espaces aériens distaux Légère atteinte interstitielle	PID	BRPID ^h PH Sarcoïdose
PIL ⁱ	Verre dépoli Présence fréquente de kyste à parois minces Nodules pulmonaires et épaissement septal peuvent être observés	Hyperplasie du tissu lymphoïde bronchiolocentrique	PIL	Sarcoïdose HCL ^j

BR ^k	Nodules centrolobulaires Opacités en verre dépoli Distribution diffuse ou dans la partie supérieure des poumons	Accumulation de macrophages bronchiolocentriques Légère fibrose bronchiolaire	BRPID
DAD ^l	Phase aiguë : opacités diffuses en verre dépoli et consolidation Phase d'organisation : réticulation, bronchectasies de traction et distorsion architecturale	Phase aiguë : membranes hyalines, œdème Phase d'organisation : organisation de l'espace aérien et interstitiel	PIA ^m

^a : Pneumopathie Interstitielle Commune ; ^b : Fibrose Pulmonaire Idiopathique ; ^c : Pneumopathie d'Hypersensibilité ; ^d : Pneumopathie Interstitielle Non Spécifique ; ^e : Pneumopathie Organisée ; ^f : Pneumopathie Organisée Cryptogénique ; ^g : Pneumopathie Interstitielle Desquamative ; ^h : Bronchiolite Respiratoire associée à une Pneumopathie Interstitielle Diffuse ; ⁱ : Pneumopathie Interstitielle Lymphocytaire ; ^j : Histiocytose à Cellules de Langerhans ; ^k : Bronchiolite Respiratoire ; ^l : Dommage Alvéolaire Diffus ; ^m : Pneumonie Interstitielle aiguë. Adapté de de Lauretis (Am J Respir Crit Care Med, 2002; de Lauretis et al., 2011)

Des examens complémentaires comme le LBA ou la cryobiopsie transbronchique pour effectuer des analyses histologiques peuvent être nécessaires afin d'établir le diagnostic ([Tableau IV](#)).

L'approche diagnostique précédemment citée est la méthode standard afin d'identifier la nature des PID. Cependant, cette méthode présente de nombreuses limites. Chez 10 à 20 % des patients, cette approche ne permet pas d'établir un diagnostic définitif et ces patients sont considérés comme ayant une PID inclassable (Ryerson et al., 2021). Ce protocole est long à mettre en place et le diagnostic est souvent retardé de plusieurs mois, voire plusieurs années. À titre d'illustration, le diagnostic de la FPI est retardé de 2,1 ans après l'apparition des premiers symptômes (Hoyer et al., 2019). De nouvelles méthodes d'approches diagnostiques sont essentielles afin de pouvoir identifier la nature de la PID plus rapidement et avec certitude. De nombreuses études s'intéressent de plus en plus aux biomarqueurs sanguins qui seraient les témoins du développement de la physiopathologie de la FP. Les biomarqueurs utilisés sont Krebs von den Lungen-6, SFTPA et SFTPB pour les lésions des pneumocytes, IL-6, CCL18 et CCL2 pour l'inflammation et MMP1, MMP7 et la Lipoxigénase2 pour le remodelage de la MEC (De Lauretis & Renzoni, 2014; Inoue et al., 2020; Nathan et al., 2015).

1.3.3.4.2. Traitements

L'identification de la nature de la PID chez un patient est indispensable afin de prescrire les traitements adaptés à la pathologie de la FP. Les traitements anti-fibrosants, tels que la pirfenidone et le nintedanib, sont les traitements de choix pour les patients atteints de FPI. La pirféridone a des effets pléiotropes. Dans les modèles expérimentaux, ce traitement limite la progression de la fibrose en inhibant la prolifération des fibroblastes et leur différenciation en myofibroblastes. La pirféridone induit également une réduction de la synthèse des composants de la MEC dont le collagène, la fibronectine et la ténascine C (Conte et al., 2014; Molina-Molina et al., 2018). Ce traitement a des effets anti-inflammatoires en limitant la production de cytokines et l'accumulation de cellules immunitaires dans les voies respiratoires et a des effets antioxydants (Hirano et al., 2006; Pourgholamhossein et al., 2018). Les essais cliniques CAPACITY et ASCEND ont montré une diminution du déclin de la CVF et un meilleur taux de survie chez les patients atteints de FPI traités par la pirféridone comparés aux patients témoins traités avec un placebo (King et al., 2014; Noble et al., 2011).

Le nintedanib est un inhibiteur de récepteurs intracellulaires à tyrosine kinase. Il cible les récepteurs VEGFR, FGFR et PDGFR impliqués dans la physiopathologie de la FPI et dont les gènes sont exprimés par les fibroblastes (Hilberg et al., 2008; Hostettler et al., 2014). Dans le modèle murin avec induction de FP expérimentale, le nintedanib stimule la production d'antioxydants et diminue l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation et la fibrose (Kaur et al., 2024; Pan et al., 2023). Les essais cliniques TOMORROW et INPULSIS-2 ont montré une diminution du déclin de la CVF chez les patients atteints de FPI traités au nintedanib (Richeldi et al., 2011, 2014). Ce traitement a d'ailleurs montré une efficacité chez les patients avec une FP progressive en limitant le déclin de la CVF (Flaherty et al., 2019).

Pour les autres PID, des traitements à base de glucocorticoïdes et/ou une thérapie immunosuppressive sont indiqués et généralement utilisés comme traitements de première intention dans les cas de PID inflammatoires. Cependant, ce type de thérapie s'avère peu efficace.

La transplantation pulmonaire, traitement ultime et lourd, prolonge la survie et améliore la qualité de vie des patients (Singer et al., 2017). Cependant, seulement 56 % des receveurs survivent plus de 5 ans après la transplantation. Les complications majeures sont une dysfonction ou un rejet du greffon et des infections (Valapour et al., 2018).

1.4. Les modèles de fibrose pulmonaire

1.4.1. Généralités

La connaissance incomplète de la physiopathologie des PII, des PID avec des mécanismes pathologiques similaires et les biais dus à de grandes hétérogénéités de patients dans les études cliniques sont des freins pour la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques dans la FP. Le manque de modèles expérimentaux optimaux en fait également partie. En effet, la très grande majorité des traitements identifiés pour ralentir la progression de la FP efficaces dans les modèles pré-cliniques se révèlent inefficaces dans les études cliniques. Une des raisons à cette différence est le manque de modèles capables de mimer les mécanismes physiopathologiques similaires à la FP chez l'Homme (Sgalla et al., 2016). Différentes approches sont utilisées afin d'induire expérimentalement une FP. Il existe des méthodes biologiques, telles que l'administration de peptide dans des modèles expérimentaux ou l'utilisation de souris génétiquement modifiées. L'utilisation d'éléments

chimiques ou physiques peut également induire une FP. Les différents modèles expérimentaux *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro* employés afin de comprendre les mécanismes physiopathologiques de la FP ont tous des avantages et des inconvénients. Il est essentiel de les connaître afin d'éviter tout biais dans les interprétations des résultats expérimentaux.

1.4.2. L'appareil respiratoire murin

En raison de la connaissance approfondie du génome murin et de la facilité à le modifier à façon, la souris est à ce jour le modèle animal de référence pour l'étude de la FP.

1.4.2.1. Morphogenèse pulmonaire

L'organogenèse pulmonaire débute par la phase pseudoglandulaire entre les jours embryonnaires 9,5 et 16,5 chez la souris (entre la 4^e et 17^e semaine chez l'Homme) (Domyan & Sun, 2011; Morrisey & Hogan, 2010). Au cours de cette phase, les poumons adoptent une morphogenèse ramifiée générant une structure tubulaire arborescente constituée de cellules épithéliales entourées de tissus mésenchymateux (Metzger et al., 2008). Au même moment, les cellules épithéliales progénitrices se différencient en cellules matures, telles que des cellules ciliées ou sécrétrices, au même titre que les cellules mésenchymateuses qui se différencient en cellules musculaires lisses ou endothéliales (Fig. 7A). La phase canaliculaire est la deuxième étape du développement embryonnaire pulmonaire. Elle se déroule entre les jours embryonnaires 16,5 et 17,5 chez la souris (entre la 17^e et 26^e semaine chez l'Homme). Durant cette période, un réseau capillaire se forme et les cellules progénitrices épithéliales distales se différencient en pneumocytes de type I ou II (Treutlein et al., 2014). La phase sacculaire des poumons se déroule ensuite entre le jour embryonnaire 17,5 et 5 jours après la naissance (20–21 + 5 jours) (entre la 26^e et 36^e semaine chez l'Homme). Durant cette étape, l'épithélium alvéolaire adopte une structure en forme de sac, du surfactant est produit et le réseau capillaire s'agrandit. La dernière étape de la maturation pulmonaire est la phase alvéolaire entre le 5^e et 30^e jour post-natal chez la souris (à partir de la 36^e semaine de gestation chez le fœtus humain jusqu'à la 8^e année de vie de l'enfant). Durant ce stade, la surface alvéolaire augmente par subdivision des sacs alvéolaires afin d'améliorer les échanges gazeux avec le sang. Le souriceau né durant la phase de sacculation (le nouveau-né pendant la phase alvéolaire) (Chao et al., 2016).

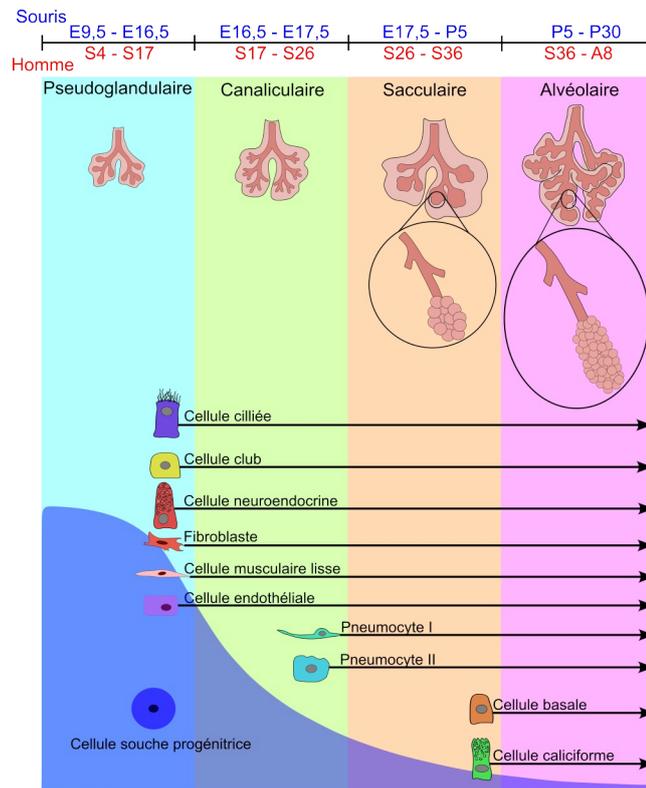
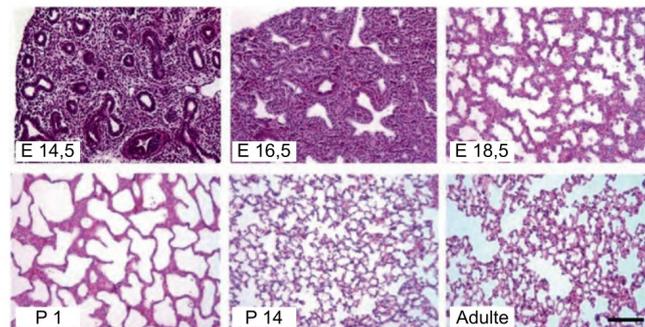
A**B**

Figure 7. Morphogénèse pulmonaire murine et humaine et comparaison histologique entre le poumon embryonnaire et le poumon adulte murin.

(A) Schéma de la morphogénèse pulmonaire de la souris. Le développement embryonnaire des poumons se déroule en quatre phases : pseudoglandulaire (E9,5-E16,5), canaliculaire (E16,5-E17,5), sacculaire (E17,5 et P5) et alvéolaire (P5-P30). Durant la croissance pulmonaire, les cellules souches progénitrices se différencient progressivement en cellules pulmonaires matures fonctionnelles. Dans la phase sacculaire, l'épithélium alvéolaire adopte une structure en forme de sac. Pendant la phase alvéolaire, ces sacs se subdivisent et forment des alvéoles pulmonaires plus petits mais plus nombreux afin d'améliorer les échanges gazeux avec le sang. E : jour embryonnaire ; P : jour post-natal ; S : semaine ; A : année. Adapté de Rackley et Stripp (Rackley & Stripp, 2012). (B) Durant ces phases, les cellules immatures se différencient progressivement afin d'assurer la fonctionnalité des poumons. Avant la phase sacculaire, les saccules épaisses constituées de cellules épithéliales cubiques se différencient progressivement afin de former les pneumocytes de type I et II plus fins et fonctionnels. L'activité des cellules mésenchymateuses décroît au cours du développement embryonnaire réduisant le compartiment interstitiel. Cela permet de faciliter les échanges gazeux alvéolo-capillaire. E : Jour embryonnaire ; P : Jour post-natal ; Échelle : 100 μ m. Adapté de Warburton (Warburton et al., 2010).

1.4.2.2. Comparaison des poumons murins embryonnaires et adultes

Des différences structurelles et fonctionnelles sont observées entre les poumons embryonnaires et adultes de la souris. La fonction respiratoire est inexistante dans le poumon embryonnaire et fonctionnelle dans le poumon adulte. La structure alvéolaire du poumon embryonnaire forme une saccule épaisse contrairement à celle du poumon adulte où les alvéoles sont minces avec une paroi fine. Ceci s'explique par la différence de composition cellulaire de l'épithélium alvéolaire entre ces deux stades. Chez l'embryon avant la phase sacculaire, les cellules épithéliales alvéolaires sont de forme cubique, immatures et non fonctionnelles. Il y a peu d'échange gazeux avec le sang et peu de production de surfactant. Chez l'adulte, les pneumocytes de type I et II sont matures, fonctionnels et plus petits. L'activité et la prolifération des cellules mésenchymateuses sont plus importantes dans le poumon embryonnaire comparé au poumon adulte où ces cellules sont peu présentes sauf en cas de régénération ou de pathologie comme la fibrose (Fig. 7B). L'organisation des capillaires sanguins est également différente entre ces deux stades. Dans le poumon embryonnaire, les cellules endothéliales forment des capillaires sanguins uniques avant la phase sacculaire. Au cours de la morphogenèse pulmonaire, les capillaires sanguins se développent progressivement et fusionnent entre eux si bien que dans le poumon adulte, les capillaires sanguins forment un réseau complexe favorisant les échanges gazeux avec l'épithélium alvéolaire (Warburton et al., 2010).

1.4.2.3. Comparaison entre l'appareil respiratoire humain et murin adulte

Même si les poumons murins et humains se ressemblent, il existe des différences, notamment anatomiques, qui peuvent être d'importance pour l'interprétation de résultats scientifiques. Un poumon de souris contient 2,3 millions d'alvéoles pulmonaires contre 480 millions chez l'Homme. La surface alvéolaire est de 82 cm² chez la souris et 75 m² chez l'Homme (Knust et al., 2009; Ochs et al., 2004). Le nombre de lobes pulmonaires et de ramifications bronchiques est également différent entre la souris et l'Homme, à savoir 4 lobes pulmonaires droits et 1 lobe pulmonaire gauche chez la souris, contre 3 lobes pulmonaires droits et 2 lobes pulmonaires gauches dans l'espèce humaine. L'arbre bronchique de la souris est composé de 12 générations de bronches comparé aux 23 générations chez l'Homme (Chao et al., 2016). Concernant la structure des voies aériennes, le diamètre interne de la trachée de souris est de 1,5 mm contre 12 mm chez l'Homme. Les anneaux cartilagineux ne sont présents que dans les voies aériennes extrapulmonaires chez la souris, alors que le cartilage s'étend jusqu'aux bronchioles terminales chez l'Homme. Les glandes sous-muqueuses produisant le mucus sont présentes uniquement dans

la trachée de souris, mais sont localisées jusqu'aux bronches chez l'Homme (Fig. 8). Les bronchioles terminales se ramifient en bronchioles respiratoires constituées de plusieurs sacs alvéolaires chez l'Homme alors que, chez la souris, une bronchiole terminale se ramifie en un seul sac alvéolaire (Fig. 8).

Dans les deux espèces, la trachée est constituée d'un épithélium pseudostratifié composé de cellules basales, ciliées, sécrétrices et neuroendocrines. Cependant, la proportion de chaque type cellulaire varie d'une espèce à l'autre. Les cellules à mucus sont plus abondantes et les cellules basales sont localisées jusqu'aux bronchioles terminales chez l'Homme. Chez la souris, l'épithélium pseudostratifié est uniquement présent dans la trachée et les bronches principales ne contiennent pas de cellules basales (Fig. 8) (Rock et al., 2010).

1.4.3. Induction expérimentale d'une fibrose pulmonaire

Il existe différentes méthodes biologiques, chimiques (silice, amiante, FITC, paraquat) et physiques (radiation) afin d'induire une FP expérimentale. Seules les principales méthodes biologiques sont présentées en détail ici. Les méthodes non biologiques ont fait l'objet de plusieurs revues (Moore & Hogaboam, 2008; Moore et al., 2013; Yanagihara et al., 2020).

1.4.3.1. Bléomycine

La bléomycine (BLM) est un peptide initialement isolé d'une souche d'actinomycète, *Streptomyces verticillus* (Azambuja et al., 2005). Il s'agit d'un agent antibiotique antitumoral prescrit dans divers cancers comme le cancer de la peau ou les lymphomes. La BLM induit la production de dérivés réactifs à l'oxygène et provoque des cassures double-brin de l'ADN, d'où ses propriétés antitumorales. Cependant, ce traitement entraîne une cytotoxicité et une inflammation pulmonaire étant donné que les poumons ne produisent pas la bléomycine hydrolase, enzyme d'inactivation de la BLM. Ainsi, 3 à 5 % des patients traités par la BLM ont des complications pulmonaires semblables à une FP (Walters & Kleeberger, 2008). Cet effet indésirable a permis de développer le modèle expérimental de FP induite chez des animaux par l'administration de BLM. Il s'agit de la méthode la plus utilisée et la plus caractérisée à ce jour de tous les modèles intégrés (Moeller et al., 2008). La BLM entraîne une FP chez de nombreux modèles animaux comme la

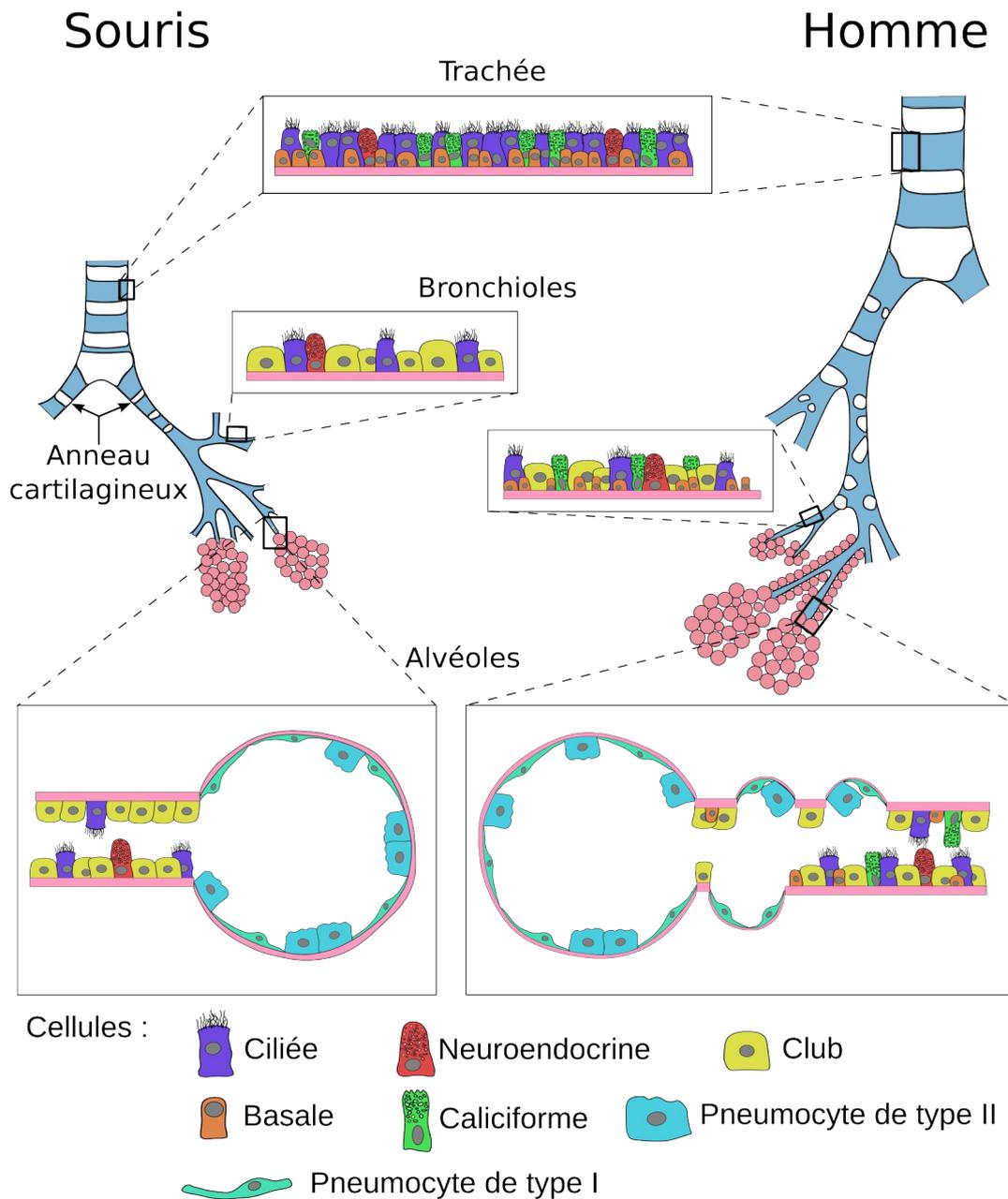


Figure 8. Comparaison anatomique et histologique entre l'appareil respiratoire murin et humain.

Il existe des différences anatomiques entre l'appareil respiratoire humain et murin. Chez l'Homme, les anneaux cartilagineux s'étendent jusqu'aux bronchioles contrairement à la souris où ces anneaux sont trouvés dans trachée et les grandes bronches. Les glandes sous-muqueuses sont localisées uniquement dans la partie haute de la trachée chez la souris, alors que ces mêmes glandes sont retrouvées dans toute la trachée humaine et les grandes bronches. Les bronchioles humaines sont composées de plusieurs sacs alvéolaires contrairement à celles de la souris. Chez la souris, les bronchioles ne contiennent pas de cellules basales ni de cellules à mucus contrairement à l'Homme. Histologiquement, les voies aériennes supérieures sont identiques entre l'Homme et la souris. Chez les deux espèces, la trachée est principalement composée de cellules ciliées, cellules à mucus, cellules basales et cellules neuroendocrines. Adapté de Xu (Xu et al., 2023).

souris, le hamster, le rat, le furet, le chien ou le mouton, même si le modèle murin est le plus utilisé (Moeller et al., 2008; Organ et al., 2015; Peabody Lever et al., 2024). La BLM peut être administrée par voie intratrachéale, intrapéritonéale, sous-cutanée ou intraveineuse, l'administration intratrachéale étant la plus utilisée (Degryse & Lawson, 2011). Le développement de la FP par administration intratrachéale de BLM se déroule en 3 phases. Dans un premier temps, l'administration de BLM entraîne une phase inflammatoire caractérisée par des lésions de l'épithélium alvéolaire induisant une apoptose de pneumocytes de type I et une hyperplasie des pneumocytes de types II qui perturbent la réparation de l'épithélium (Kumar et al., 1985). Ces bouleversements entraînent la sécrétion abondante de nombreux médiateurs inflammatoires tels que le $TNF-\alpha$, $TGF-\beta_1$, IL-13 et IL-1 β (Aumiller et al., 2013; Cavarra et al., 2004). La phase inflammatoire entraîne le recrutement de cellules immunitaires sur les sites de lésion dans l'épithélium alvéolaire dont les neutrophiles, les macrophages, les éosinophiles et les lymphocytes (Izbicki et al., 2002; Sakanashi et al., 1994; Thrall et al., 1979). La phase transitionnelle de l'inflammation pulmonaire à la FP est observée la deuxième semaine après l'administration de BLM. Cette phase se caractérise par une diminution des réponses inflammatoires suivie d'une augmentation progressive de la fibroprolifération, de la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et de l'augmentation de l'expression de gènes liés à la fibrose. Entre le 9^e et le 14^e jour après l'administration de la BLM, l'expression de *Tgf- β 1* diminue inversement à la production du procollagène I qui augmente (Chaudhary et al., 2006). Trois semaines après le traitement à la BLM, une fibrose intra- et inter-alvéolaire massive apparaît. Cette phase est caractérisée par une prolifération des myofibroblastes et une surexpression d' α Sma associée à une surproduction de collagène (Shahzeidi et al., 1993; Zhang et al., 1996).

De nombreux facteurs doivent être pris en compte dans l'étude de la FP par administration de BLM. La voie d'administration de la BLM utilisée peut entraîner des développements physiopathologiques différents. L'administration intraveineuse de BLM entraîne des lésions de l'endothélium pulmonaire qui favorisent le transfert de la BLM vers l'interstitium pulmonaire, à l'origine des lésions de l'épithélium alvéolaire. L'administration intratrachéale de la BLM induit directement des lésions des pneumocytes (Moore & Hogaboam, 2008). La fréquence d'administration de la BLM a aussi un impact dans le développement de la FP. En effet, une administration répétée de BLM induit une FP diffuse avec un développement lent, représentatif d'une FP chez l'Homme (Degryse et al., 2010). La susceptibilité à la BLM chez la souris est souche dépendante. Les souris de fond génétique C57BL/6J sont plus sensibles à la BLM comparées aux

souris BALB/c. Cette différence s'explique par des profils distincts d'expression de cytokines entre ces deux souches (Ortiz et al., 1998; Schrier et al., 1983). Étant donné que l'administration de BLM entraîne 3 phases physiopathologiques distinctes, le choix de l'analyse temporelle du modèle dépend de la nature du protocole expérimental. Pour étudier l'inflammation, le modèle est analysé la première semaine après administration de BLM. Les études de la prolifération de cellules mésenchymateuses sont effectuées 2 semaines après l'administration du traitement. Pour la fibrose, des analyses sont effectuées entre la 3^e et 4^e semaine après injection de la BLM (Liu et al., 2017). Il est important de prendre en considération ces différences de phases dans les études d'identification de traitements anti-inflammatoires ou anti-fibrosants potentiels de la FP (Choi et al., 2009; Koh et al., 2015).

Parmi les avantages, le modèle d'induction expérimentale de FP par administration de BLM induit certaines signatures moléculaires similaires à celles retrouvées dans la FP chez l'Homme, comme la surexpression de la lipocaline 2 (*LCN2*) ou *MMP7* dans les cellules pulmonaires par exemple (Bauer et al., 2015). Le rôle anti-fibrosant de la pirféridone et du nintedanib est identifié dans les modèles pré-cliniques animaux avec administration de BLM, ce qui suggère quelques similitudes avec la physiopathologie de la FPI (Iyer et al., 1998; Wollin et al., 2014). Les autres avantages de la BLM sont la facilité d'induction d'une FP, la bonne reproductibilité des résultats et son faible coût (Chua et al., 2005; Liu et al., 2017).

Le modèle BLM montre certaines limites. Les patterns histopathologiques de FP induit par la BLM ne sont pas totalement similaires avec les patterns identifiés chez les patients souffrants de FP (Moore et al., 2013). Une auto-résolution spontanée de la FP peut-être observée 120 jours après l'administration intratrachéale de BLM avec des fonctions pulmonaires normales chez le rat. Une autre étude a montré que, 6 semaines après l'administration intratrachéale de BLM chez la souris, la quantité de collagène revient à la normale et l'épithélium alvéolaire est régénéré (Borzone et al., 2001; Lawson et al., 2005). Or, dans de nombreuses PID fibrosantes, la fibrose est chronique et progressive. De plus, l'installation de la FP est longue. Une fibrose maximale est observée 28 jours après l'administration unique de BLM et peut être identifiée encore plus tardivement dans le cas d'administrations répétées. Un autre désavantage du modèle est le rôle de l'inflammation dans le développement de la FP. Après traitement à la BLM, une inflammation chronique s'installe ce qui est primordiale dans le développement de la FP. Ce qui n'est pas le cas dans de nombreuses PID

fibrosantes où la fibrose progresse indépendamment du niveau d'inflammation (Liu et al., 2017). Ces informations montrent que ce modèle ne mime pas en tout point l'ensemble des mécanismes physiopathologiques d'une FP.

1.4.3.2. Vecteurs viraux

Des vecteurs viraux constitués de gènes codants des cytokines impliquées dans la FP sont injectés dans des modèles de souris ou de rats. Le but ici est de surexprimer ces cytokines dans l'organisme de l'hôte. Les adénovirus peuvent être utilisés comme vecteurs afin de surexprimer, par exemple, *TGF β* . Chez le rat, l'instillation intratrachéale de ces vecteurs viraux entraîne la surexpression de *TGF β 1* dans les poumons dès le premier jour. Cette surexpression s'accompagne d'une infiltration de cellules mononucléaires entre le 3^e et 7^e jour. Après 14 jours, une FP caractérisée par une prolifération importante de myofibroblastes, produisant en excès du collagène, de l'élastine et de la fibronectine est observée ainsi qu'une cicatrisation persistante semblable à celle identifiée dans les FP progressives (Sime et al., 1997). Ce modèle est souche-dépendant chez la souris, puisque les souris C57BL/6J sont plus sensibles que les souris BALB/c (Kolb et al., 2002).

Des vecteurs adénoviraux surexprimant d'autres cytokines impliquées dans la FP, comme l'*IL-1 β* , le *TNF- α* ou l'*IL-13*, ont été instillés dans des modèles de rat ou de souris. Une semaine après l'administration de ces vecteurs, les taux de neutrophiles, macrophages et lymphocytes augmentent dans le LBA et des macrophages et neutrophiles sont identifiés dans la lumière des alvéoles pulmonaires à l'origine d'une inflammation. Deux semaines après l'administration, des myofibroblastes qui secrètent une quantité excessive de MEC sont localisés dans le parenchyme pulmonaire. Le taux d'hydroxyproline, qui reflète la quantité de collagène, ne cesse d'augmenter, même 60 jours après l'instillation des vecteurs viraux surexprimant l'*IL-1 β* . La surexpression d'*IL-1 β* ou de *TNF- α* stimule l'expression d'autres marqueurs de l'inflammation impliqués dans la FP comme le *TGF- β* ou le *PDGF* (Bonniaud et al., 2005; Kolb et al., 2001; Sime et al., 1998; Strobel et al., 2015).

Malgré des effets pro-inflammatoires et pro-fibrosants démontrés, ce modèle a de nombreuses limites. L'utilisation de vecteurs viraux ne permet pas de récapituler complètement la

complexité de la FP chez l'Homme. De plus, ces modèles ciblent des voies de signalisation très spécifiques alors que la FP se caractérise par l'activation de différentes voies de signalisation profibrosantes. Les adénovirus induisent aussi une forte réponse immunitaire qui ne permet pas d'effectuer des administrations répétées. Ces types de vecteurs viraux ont un tropisme élevé pour les cellules épithéliales mais infectent faiblement d'autres types cellulaires pulmonaires qui sont pourtant impliqués dans la FP. C'est d'ailleurs pour cette raison que des lentivirus sont également utilisés comme vecteur viraux puisque ces virus peuvent infecter une plus grande variété de cellules (Moore & Hogaboam, 2008; Silvertown et al., 2006).

Les avantages et désavantages des différents modèles de fibrose expérimentale sont résumés dans le [tableau V](#).

1.4.4. Modèles expérimentaux intégrés

1.4.4.1. Modèle de souris génétiquement modifiées

Des modèles de souris génétiquement modifiées basés sur les mutations à l'origine des fibroses pulmonaires familiales (FPF) ont été créés. Des variants génétiques codant les surfactants *Sftpc* et *Sftpa* sont impliqués dans certaines formes de FPF. Une délétion de *Sftpc* dans un modèle murin entraîne, après administration de BLM, une prolifération plus importante de fibroblastes associée à une surproduction de collagène dans les poumons. La souris transgénique exprimant la protéine de surfactant C mutée L188Q à l'origine de certaines FPF montre un stress du réticulum endoplasmique dans les pneumocytes de type II. La FP induite par administration de BLM est encore plus massive dans ce modèle. Un autre variant de *Sftpc* à l'origine de FPF (I73T) induit une FP spontanée caractérisée par une surproduction de collagène, une hyperplasie de pneumocytes de type II et une prolifération de myofibroblastes exprimant α -Sma et similaire à une FPI chez l'Homme (Lawson et al., 2005, 2011; Nureki et al., 2018). Les mutations spécifiques de *Sftpa* liées à des FPF n'ont pas encore été caractérisées *in vivo*. Cependant, dans un modèle de souris déficiente pour le gène *Sftpa*, une apoptose cellulaire et une inflammation pulmonaire plus importantes sont observées (Goto et al., 2010).

Des mutations génétiques des télomérases *Tert* et *Terc* sont également impliquées dans certaines FPF. Le modèle de souris transgénique avec délétion de *Tert* développe une FP

Tableau V. Avantages et inconvénients des modèles d'induction expérimentale de fibrose pulmonaire.

Modèle	Avantages	Inconvénients
Méthodes biologiques Bléomycine	<ul style="list-style-type: none"> • Bien caractérisé • Facile d'utilisation • Différentes voies d'administration • Bonne reproductibilité • Certains mécanismes moléculaires de FP^a similaires à l'Homme 	<ul style="list-style-type: none"> • Souche-dépendant • Développement long de la FP • Rôle indispensable de l'inflammation • Patterns histopathologiques différents d'une FP humaine • Auto-résolution spontanée de la FP
Vecteurs viraux	<ul style="list-style-type: none"> • Permet de surexprimer des médiateurs spécifiques de l'inflammation • Cicatrisation persistante semblable à une FP progressive • Les lentivirus peuvent infecter différents types cellulaires 	<ul style="list-style-type: none"> • Souche-dépendant • Ne récapitule pas complètement la complexité de la FP • Forte réponse immunitaire induite par les adénovirus • Les adénovirus n'infectent quasiment que les cellules épithéliales
Méthodes chimiques Silice	<ul style="list-style-type: none"> • Stimulations fibrotiques persistantes • Nodules pulmonaires similaires à ceux identifiés chez l'Homme 	<ul style="list-style-type: none"> • Souche-dépendant • Nécessité d'avoir un équipement spécifique pour l'aérosolisation
Amiante	<ul style="list-style-type: none"> • FP persistante et progressive • Localisation facile sur coupe histologique 	<ul style="list-style-type: none"> • Répartition inégale des fibres d'amiante dans les lobes pulmonaires • FP centrale • Chambres spéciales nécessaires (inhalation) • Développement long de la FP
FITC ^b	<ul style="list-style-type: none"> • Souris C57BL/6J et BALB/c sensibles • Possibilité de voir la FP grâce à la fluorescence émise par le FITC • Fibrose persistante 	<ul style="list-style-type: none"> • Pas pertinent cliniquement • Pas reproductible
Paraquat	<ul style="list-style-type: none"> • Physiopathologie du développement de la fibrose similaire à une FP chez l'Homme • Fibrose persistante 	<ul style="list-style-type: none"> • Faiblement absorbé par inhalation • Développement long de la FP

Méthode physique

Irradiation

• Cliniquement pertinent

- Certaines souches sont résistantes à la FP induite
- Nécessité de protéger les autres tissus que les poumons
- Développement long de la fibrose (24 semaines)

^a : Fibrose Pulmonaire ; ^b : Fluorescein IsoThioCyanate.

caractérisée par une prolifération de myofibroblastes et une surproduction de collagène après une faible dose de BLM qui n'induit pas de fibrogenèse pulmonaire chez la souris sauvage (Povedano et al., 2015). Dans les pneumocytes de type II, la délétion de *Trf1*, gène codant une protéine formant un complexe avec les télomérases, induit une FP spontanée au bout de 9 mois. Cette fibrose est caractérisée par une hyperplasie des pneumocytes de type II sénescents et une prolifération de myofibroblastes produisant une quantité massive de collagène (Naikawadi et al., 2016). Ces études montrent qu'une dysfonction de l'activité des télomérases dans les pneumocytes de type II est suffisante pour induire une FP dans les modèles expérimentaux.

En dehors des FPF, d'autres modèles de souris transgéniques mimant une FP ont été créés. Une souris transgénique surexprimant *Muc5b* sous le contrôle du promoteur *SFTPC* dans les pneumocytes de type II a été générée. Bien qu'aucune fibrose spontanée ne se développe, l'administration de BLM entraîne une FP plus massive dans ce modèle (Hancock et al., 2018). Une souris transgénique exprimant le récepteur à la toxine diphtérique sous le contrôle du promoteur murin *Sftpc* a été créée. L'administration de la toxine diphtérique entraîne une accumulation pulmonaire excessive de collagène après 21 jours de traitement (Sisson et al., 2010).

Des souris transgéniques exprimant dans les cellules Club des cytokines impliquées dans la FP ont été créées. Il s'agit des modèles de souris exprimant *TGF-β1* ou *l'Il-13*. Le modèle exprimant *TGF-β1* montre une inflammation et une FP. Le modèle de souris transgénique exprimant *l'Il-13* présente une inflammation pulmonaire caractérisée par une accumulation de macrophages dans le parenchyme pulmonaire et une surproduction de collagène dans les voies respiratoires (Lee et al., 2004; Zhu et al., 1999).

Différents modèles de souris rapporteurs ont été conçus. Des gènes codants des protéines fluorescentes ou biochimiques sous le contrôle de promoteurs spécifiques sont intégrés dans le génome murin dans le but de tracer facilement l'expression d'un gène d'intérêt. Des modèles de souris rapporteurs pour α -Sma et *Colla1* tagués avec la molécule fluorescente GFP ont permis de mettre en évidence le rôle pro-fibrosant du facteur de transcription TBX4 (Xie et al., 2016). Une souris transgénique dont l'expression du gène de la luciférase est sous le contrôle du promoteur de *Colla2* a permis de montrer le rôle de l'intégrine $\alpha\beta6$ dans la stimulation de l'activité de TGF- $\beta1$ (Horan et al., 2008).

Ces modèles de souris transgéniques nous fournissent des informations majeures dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la FP. Cependant, ces résultats sont à prendre avec précaution. Il existe une possibilité de compensation génétique pour le gène inactivé chez les souris *knockout* ce qui peut induire des biais dans l'interprétation des résultats. Les bouleversements biologiques identifiés chez les souris transgéniques peuvent être dus à des effets *Off-target* liés à la perturbation d'un autre gène endogène résultant de l'intégration aléatoire du transgène plutôt qu'à l'activité du gène intégré en question (El-Brolosy & Stainier, 2017). La doxycycline peut avoir des effets indirects sur le développement pulmonaire et la Cre-recombinase utilisée pour les modèles génétiques d'inactivation conditionnelle est potentiellement cytotoxique dans le cas d'expositions prolongées (Loonstra et al., 2001; Sisson et al., 2006).

1.4.4.2. Modèle de FP liée au vieillissement

Certaines maladies interstitielles pulmonaires sont diagnostiquées à des âges avancés. Des modèles de souris vieillissantes ont donc été étudiés. Une augmentation du nombre de macrophages, lymphocytes, neutrophiles et du taux de cytokines Il-17a, Cxcl1 et Cxcl2 impliquées dans la FP est observée dans le LBA de souris âgées (12 mois) traités à la BLM comparé aux jeunes souris (2 mois). Des souris âgées (24 mois) présentent une FP induite par la BLM plus sévère comparée aux souris plus jeunes (3 mois). Les taux de collagène, de MMP-9 et de l'extra-domaine A de la fibronectine sont augmentés dans les poumons des souris âgées uniquement (Redente et al., 2011; Sueblinvong et al., 2012). Les souris prédisposées à la sénescence développent une FP plus sévère contrairement aux souris résistantes à la sénescence cellulaire (Xu et al., 2009). L'infection de souris âgées avec une administration intranasale de γ -herpesvirus-68 entraîne une FP associée à une apoptose des pneumocytes de type II et une surproduction de marqueurs pro-fibrosants par les fibroblastes. Ces manifestations fibrosantes ne sont pas observées chez les jeunes souris (Naik et al., 2012; Torres-González et al., 2012).

Malgré des mécanismes physiopathologiques similaires avec ceux retrouvés chez l'Homme, l'utilisation de souris vieillissantes dans l'étude de la FP a quelques limites telles que le coût de l'hébergement et l'âge d'étude des souris (Redente et al., 2011; Sueblinvong et al., 2012).

1.4.4.3. Modèle de souris humanisées

Un modèle humanisé de souris a été développé par instillation de fibroblastes pulmonaires de patients atteints de FP par voie intraveineuse chez une souris immunodéficiente NOD/SCID. Les fibroblastes issus de ces patients sont persistants et induisent un remodelage pulmonaire chronique dans le modèle murin (Habieli et al., 2018). Ce modèle a permis de montrer les rôles pro-fibrosants de CCL21 et de CCR7 dans la FP. L'injection d'anticorps monoclonaux ciblant CCL21 et CCR7 induit une diminution du taux d'hydroxyproline, de CCL21, de MMP-2 et de MMP-19 dans le modèle de souris humanisées (Pierce et al., 2007). Ce modèle permet d'identifier les biomarqueurs uniques de fibroblastes directement liés à la pathogenèse de la FP. L'injection de fibroblastes exprimant TLR9 issus de patients atteints de FPI dans le modèle de souris NOD/SCID accélère la fibrogenèse pulmonaire (Geng et al., 2019; Trujillo et al., 2010).

Dans ce modèle, la FP induite persiste pendant plusieurs mois. Ce modèle offre l'opportunité d'étudier des fibroblastes issus de multiples patients ce qui permet d'étudier l'hétérogénéité des PID grâce aux différents phénotypes des fibroblastes. L'utilisation de ce modèle permet de tester des agents anti-fibrosants spécifiques à l'Homme (Moore et al., 2013; Yanagihara et al., 2020). Cependant, ce modèle a un coût élevé, est complexe à développer et nécessite du matériel spécifique. Les cellules murines affectent négativement les cellules humaines greffées et il y a une mauvaise reproductibilité des résultats lorsque les donneurs sont différents pour chaque "lot" de souris (Chen et al., 2022).

1.4.5. Modèles expérimentaux non intégrés

1.4.5.1. *Ex vivo*

Le modèle *ex vivo* le plus utilisé dans l'étude de la FP reste le modèle de culture de tranches épaisses de poumons (PCLS) issues de tissus pulmonaires frais. Ce modèle est principalement utilisé dans le criblage et l'identification de nouvelles molécules thérapeutiques. Des modèles de PCLS issues d'animaux avec FP expérimentalement induite sont étudiés. Un inhibiteur du récepteur de TGF- β 1 a été administré dans le milieu de culture de PCLS issues de souris préalablement traitées à la BLM, ce qui induit une diminution dose-dépendante de l'expression d'*Acta2*, de *Coll1a1* et de *Fnl* (fibronectine). L'administration d'un agent sénolytique dans le milieu de culture des PCLS induit une diminution de l'accumulation de fibroblastes dans le parenchyme. Certains traitements utilisés dans des pathologies autres que celles liées à la FP ont montré des propriétés

anti-fibrosantes. C'est le cas du sorafenib, traitement anticancéreux, qui diminue la production de collagène et d' α -Sma dans un modèle de PCLS de rats traités par du TGF- β 1 directement dans le milieu de culture (Cedilak et al., 2019; Huang et al., 2019; Lee et al., 2024).

Les PCLS peuvent être obtenues à partir de biopsies pulmonaires de patients atteints de PID. L'utilisation de PCLS issues de patients atteints de FPI a permis de montrer que l'administration d'un inhibiteur de la voie de signalisation PI3K/mTOR induit une diminution de la production du collagène. Parallèlement, l'inhibition de la voie de signalisation de Notch1 favorise la différenciation des pneumocytes de type II et réduit la production de collagène (Mercer et al., 2016; Wasnick et al., 2023). L'administration d'un peptide dérivé de la cavéoline-1 améliore la survie et stimule la prolifération des pneumocytes de type II de PCLS de patients atteints de FPI tardive et de pneumopathie interstitielle non-spécifique. La metformine, traitement habituellement utilisé dans le diabète, induit une diminution de la production de collagène dans ce type de modèle (Kheirollahi et al., 2019; MacKenzie et al., 2019).

En dehors de l'identification de molécules thérapeutiques, une FP expérimentale peut être induite sur le modèle de PCLS. Des PCLS de donneurs sains sont traitées à l'aide d'un cocktail profibrosant constitué de cytokines impliquées dans la FP telles que TGF- β , PDGF-AB, TNF- α et l'acide lysophosphatidique. L'administration de ce cocktail entraîne la surproduction de la fibronectine, de collagène, d' α -SMA et induit une apoptose de pneumocytes de type II. Ce modèle expérimental a été utilisé afin de déterminer les mécanismes d'actions de la pifrénidone et du nintedanib. Cette étude montre que ces deux traitements réduisent l'expression des gènes codant le collagène et la fibronectine et que seul le nintedanib améliore les fonctions cellulaires des pneumocytes de type II (Alsafadi et al., 2017; Lehmann et al., 2018).

Les PCLS ont l'avantage de conserver l'architecture et les fonctions du tissu pulmonaire. Elles sont constituées de l'ensemble des cellules et des composants de la MEC natifs des poumons qui interagissent tous entre eux. Le principal avantage du modèle de PCLS est la possibilité de tester des traitements directement sur le tissu pulmonaire. Les poumons d'une seule souris peuvent fournir plusieurs dizaines de PCLS exploitables réduisant le nombre de souris utilisées dans les procédures expérimentales. Cependant, les PCLS doivent être obtenues à partir de tissus frais. De plus, la durée de viabilité des PCLS ne dépasse pas une semaine ce qui limite les études sur le long

terme et la standardisation de la culture est complexe à mettre en place. Les PCLS sont statiques. Il n'est donc pas possible d'évaluer le trafic cellulaire du sang vers les poumons et inversement (Kolanko et al., 2024; Yanagihara et al., 2020). Enfin, les PCLS représentent une partie du poumon et jamais le poumon dans son ensemble.

1.4.5.2. *In vitro*

1.4.5.2.1. Culture cellulaire sur plaque

Parmi tous les modèles *in vitro* dans l'étude de la FP, la culture cellulaire sur plaque est la plus utilisée. L'intérêt de ce modèle est de tester en culture les effets de molécules sur l'activité de cellules uniques impliquées dans la FP. Des cultures primaires de cellules pulmonaires telles que des fibroblastes, des pneumocytes de type II et des cellules bronchiques issues de donneurs sains ou atteints de FP sont étudiées tout comme des lignées cellulaires immortalisées. Ces cellules pulmonaires issues de modèles animaux sont également analysées. Les cellules sont directement cultivées dans des puits en plastiques ou en verre.

De nombreuses études *in vitro* ont pour objectif d'analyser les effets de médiateurs sur l'activité des fibroblastes en culture. Certains médiateurs ont des effets pro-fibrosants. L'IL-6 inhibe l'apoptose de fibroblastes primaires issus de patients atteints de FPI. Le facteur de croissance FGF9 induit une résistance à l'apoptose des fibroblastes primaires et stimule leur capacité migratoire (Joannes et al., 2016; Moodley et al., 2003). D'autres médiateurs ont des effets anti-fibrosants comme la prostaglandine PGE2 et les inhibiteurs de phosphodiesterase (Dunkern et al., 2007; Kohyama et al., 2002). Un phénotype pro-fibrosant peut être induit par administration de BLM sur des fibroblastes en culture avec activation de la voie de signalisation PI3K/Akt (Lu et al., 2010). Ce modèle permet également de mettre en évidence les effets anti-fibrosants de traitements (Xu et al., 2007).

Des cultures 2D de pneumocytes sont utilisées. L'administration de TGF- β 1 sur une culture de pneumocytes primaires de rat et une lignée cellulaire de pneumocytes humains induit une TEM caractérisée par une diminution des marqueurs épithéliaux, la modification des cellules vers une morphologie cellulaire similaire à celle des fibroblastes et la surproduction d' α -SMA, de collagène et de vimentine. L'administration de résolvine-D1, molécule anti-inflammatoire, limite la TEM dans

un modèle de culture primaire de pneumocytes de type II humain traités au TGF- β 1 (Kasai et al., 2005; Willis et al., 2005; Zheng et al., 2018).

Les boîtes de culture en plastique utilisées sont plus rigides que le parenchyme pulmonaire, ce qui induit une fibro-prolifération et une surproduction de collagène spontanées et peut être un biais dans l'interprétation des résultats (Liu et al., 2010). Afin de limiter ce problème, les cellules peuvent être cultivées sur une couche de substrat dont les propriétés mécaniques sont modulables. Elles peuvent mimer la rigidité d'une MEC d'un parenchyme pulmonaire sain (1-5 kPa) ou d'une MEC plus rigide de FP (20-100 kPa) (Hinz, 2012). L'hydrogel à base de polyacrylamide est le type de substrat le plus fréquemment utilisé pour modéliser les propriétés mécaniques de la MEC pulmonaire. Des substrats à base de collagène de type I qui favorisent les liaisons MEC/cellules ou à base de polydiméthylsiloxane sont possibles. Des cultures de fibroblastes sur une matrice d'hydrogel à base de polydiméthylsiloxane à rigidité croissante entre 5–100 kPa ont été réalisées. Plus la rigidité de l'hydrogel est importante et plus les fibroblastes prolifèrent et se différencient en myofibroblastes marqués par une surproduction d' α -Sma. Ce type de culture a montré qu'une rigidité importante d'hydrogel stimule favorablement l'activité de TGF- β 1 (Balestrini et al., 2012; Wipff et al., 2007).

La culture de cellules sur plaque est utile dans l'étude de l'implication de types cellulaires spécifiques dans la physiopathologie de la FP. Ce modèle est peu onéreux et permet une croissance rapide des cellules. Cependant, ce modèle n'est pas capable de mimer les interactions tridimensionnelles d'un tissu pulmonaire et ne permet pas d'étudier les interactions cellules/cellules et cellules/matrice (Kolanko et al., 2024; Yanagihara et al., 2020).

1.4.5.2.2. Système Transwell

Le système de culture Transwell permet de réaliser une co-culture en interface air-liquide (ALI) de cellules pulmonaires. Dans ce modèle, les cellules épithéliales pulmonaires, en contact de l'air, sont cultivées sur une membrane poreuse. Sous cette membrane, des fibroblastes pulmonaires sont cultivés dans un milieu de culture. La porosité de la membrane favorise les interactions paracrines entre les cellules épithéliales et les fibroblastes.

Des fibroblastes pulmonaires issus d'un donneur atteint de FPI sont cultivés avec une lignée cellulaire de pneumocytes. La lésion mécanique de l'épithélium alvéolaire stimule la production des facteurs de croissance pro-fibrosants FGF et PDGF-AA par les fibroblastes et induit une TEM des pneumocytes. Une autre étude a montré que les cellules épithéliales des voies aériennes inhibent la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes via la production de prostaglandine E2. La production de peroxyde d'hydrogène par les fibroblastes issus de donneur atteints de FPI stimulés par du TGF- β 1 entraîne une apoptose et une nécrose des cellules épithéliales des voies aériennes (Epa et al., 2015; Prasad et al., 2014; Waghray et al., 2005).

Le système Transwell est un modèle efficace dans les études de criblages à haut débit, dans le suivi de la migration cellulaire et pour la facilité d'analyse de l'expression des cellules. Cependant, La rigidité mécanique de ce modèle ne peut pas être étudiée.

1.4.5.2.3. Culture sur matrigel

In vivo, les cellules épithéliales des voies aériennes forment des structures polarisées sur une membrane basale. Le matrigel est une membrane basale soluble riche en laminine, facteurs de croissance, collagène de type IV et protéoglycane. En se solidifiant, le matrigel forme une structure similaire à celle d'une membrane basale (Kibbey, 1994). Des pneumocytes de type II sur du matrigel ont été cultivés. Dans ce modèle, les pneumocytes de type II forment des structures polarisées de sphéroïdes creux avec production de surfactants. Un système similaire par ensemencement de cellules épithéliales bronchiques formant des acini glandulaires qui expriment *Muc5b* sur la couche de matrigel a été développé (Wu et al., 2011; Yu et al., 2007).

Des modèles de culture de cellules endothéliales formant des structures tubulaires sur matrigel ont également été établis. Ce modèle est utilisé pour étudier les effets des agents pro-fibrosants ou anti-fibrosants dans l'angiogenèse. Le TGF- β 1 stimule la viabilité et la migration de cellules progénitrices endothéliales en culture sur matrigel. La kallistatine, molécule anti-angiogénique, réduit la quantité de tubules formés par les cellules endothéliales et la production de VEGF (Evrard et al., 2012; Huang et al., 2017).

1.4.5.2.4. Système d'hydrogel

Les modèles d'hydrogels sont composés de réseaux réticulés de polymères gonflés par l'eau. Les cellules sont directementensemencées ou encapsulées dans la matrice d'hydrogel qui mime une MEC physiologique ou de FP en interaction avec les fibroblastes ou les pneumocytes. La structure des hydrogels peut être modifiée en fonction de la nature des polymères et du mécanisme de réticulation. Les hydrogels peuvent être composés de fibres naturelles ou synthétiques (Phogat et al., 2023). Les hydrogels à base de polymères naturels ont des caractéristiques bioactives majeures qui leur permettent d'interagir favorablement avec les cellules (Catoira et al., 2019). Le collagène de type I est la protéine structurelle principale de la MEC la plus utilisée dans la conception d'hydrogel (Kular et al., 2014). Les hydrogels à base de polymères synthétiques composés de polyéthylène glycol ou de polyacrylamide sont les plus utilisés (Caliari & Burdick, 2016). Afin de mimer la complexité des interactions entre la matrice et les cellules, des hydrogels composés de mélange de polymères comme le mélange collagène-polyacrylamide sont développés (Chaudhuri et al., 2010).

Les hydrogels ont des propriétés mécaniques modifiables permettant d'étudier l'impact de la rigidité de la MEC sur l'activité des fibroblastes. Une lignée cellulaire de fibroblastes humains a étéensemencée dans des matrices d'hydrogel en polyacrylamide avec une rigidité variant entre 0,3 à 20 kPa. Les résultats ont montré que plus la rigidité de l'hydrogel est importante, plus la force de traction cellulaire est élevée. L'administration de TGF- β 1 induit une augmentation de la force de traction et de la production d' α -SMA favorisant la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes uniquement dans les conditions où la matrice d'hydrogel est rigide (Marinković et al., 2012). La rigidité importante des matrices d'hydrogel mimant les lésions fibrosantes entraîne la TEM (Brown et al., 2013). Ces résultats montrent que la rigidité importante de la MEC, mimée par la matrice d'hydrogel, favorise la FP.

Les modèles de matrice d'hydrogel à base de polymères naturels ou synthétiques ont des avantages et des inconvénients opposés. L'utilisation de polymères naturels permet de concevoir un hydrogel qui possède des propriétés bio-actives et bio-compatibles avec les cellules mais avec une faible force mécanique et une faible stabilité (Cao et al., 2021; Phogat et al., 2023). À l'inverse, les hydrogels à base de polymères synthétiques ont de meilleures propriétés mécaniques, mais n'ont pas d'activités bio-actives (Catoira et al., 2019; Tsou et al., 2016).

1.4.5.2.5. Poumon décellularisé

La décellularisation est une méthode permettant d'éliminer les cellules d'un tissu ou d'un organe à l'aide de détergents dans le but d'obtenir une MEC dont la structure et la fonctionnalité des protéines sont similaires à une MEC native. Des tissus pulmonaires humains ou d'animaux traités ou non à la BLM peuvent être utilisés afin de générer des matrices acellulaires (Southern et al., 2016; Sun et al., 2014). Le choix de la nature du détergent est déterminant afin de limiter la perte des protéines de la MEC et de maintenir la structure native de la matrice. La méthode d'administration et la durée d'exposition du tissu pulmonaire avec le détergent sont des facteurs à prendre en compte (Crapo et al., 2011; Price et al., 2010; Wallis et al., 2012).

Le modèle de poumon décellularisé est un modèle *in vitro* intéressant puisqu'il imite la composition, la structure et la rigidité de la MEC native. Des poumons issus de donneurs sains ou atteints de FPI ont été décellularisés par perfusion de TritonX-100 et de désoxycholate de sodium puis coupés. Les analyses histologiques et par microscopie électronique ont permis d'identifier une membrane basale et une MEC désorganisées uniquement dans la matrice de donneurs atteints de FPI. Des différences dans la composition protéique entre les poumons décellularisés sains et atteints de FP sont observées (Booth et al., 2012).

Ce modèle a pour avantage de faciliter les interactions cellules/matrices en permettant de conserver la composition et les propriétés mécaniques natives de la MEC. Cependant, les détergents utilisés pour la décellularisation dégradent certaines protéines de la MEC. De plus, ce modèle ne permet pas de modéliser les interactions cellules/cellules (Hoshiba et al., 2010; Sundarakrishnan et al., 2018).

Une MEC décellularisée peut être obtenue à partir de fibroblastes humains issus de poumons sains ou avec FP cultivés sur des substrats recouverts d'une matrice. Ces cellules sont ensuite éliminées par du détergent pour obtenir une MEC acellulaire naturelle. Ce modèle alternatif est rapide et peu onéreux à développer. Néanmoins, la composition précise de la MEC issue de fibroblastes en culture est inconnue et la rigidité de la MEC n'est pas représentative d'une rigidité de FP (Sundarakrishnan et al., 2018).

1.4.5.2.6. Sphéroïde et organoïde pulmonaire

Les sphéroïdes et organoïdes pulmonaires se distinguent de par leurs structures et leurs compositions cellulaires. Les sphéroïdes ont une forme simple et arrondie tandis que les organoïdes ont une forme complexe. De plus, les sphéroïdes ont une diversité cellulaire faible contrairement aux organoïdes constitués de différents types cellulaires « mimant un organe ». En fonction de la nature des cellules progénitrices isolées des biopsies pulmonaires, les organoïdes forment des structures en bronchosphère ou alvéolosphère.

Les sphéroïdes sont utilisés afin d'évaluer la toxicité d'un élément. Une étude récente a analysé l'activité pro-fibrosante de nanotubes de carbones sur des sphéroïdes pulmonaires constitués de fibroblastes pulmonaires, de cellules épithéliales bronchiques et de macrophages humains. L'exposition des sphéroïdes à ce nanomatériau stimule l'expression de gènes liés à l'inflammation et de gènes de fibrose (Kabadi et al., 2019). Les sphéroïdes sont aussi utilisés pour évaluer l'efficacité d'un traitement. Une culture de pulmosphères a été développée. Les pulmosphères sont des structures tridimensionnelles issues d'une biopsie de patient et composées de différents types cellulaires pulmonaires comme les pneumocytes de type II, de cellules endothéliales, de cellules musculaires lisses, de myofibroblastes et de macrophages. L'étude montre que des pulmosphères issus de patients atteints de PID ont un degré d'invasivité élevé qui est corrélé au déclin de la capacité vitale forcée. L'administration de nintedanib réduit l'invasivité des pulmosphères (Dsouza et al., 2023). Une autre étude a montré que l'injection de sphéroïdes pulmonaires humains dans un modèle de souris traité à la BLM diminue la fibrose induite, suggérant un rôle thérapeutique des sphéroïdes pulmonaires (Henry et al., 2015).

Les organoïdes pulmonaires peuvent être utilisés comme modèle d'étude de la FP. L'administration de BLM sur des organoïdes constitués de pneumocytes et de fibroblastes humains entraîne la senescence des pneumocytes de type II et la surproduction de médiateurs inflammatoires et fibrosants (Suezawa et al., 2021). La disponibilité limitée d'échantillons humains et le faible rendement de cellules souches issues de la dissociation des tissus pulmonaires limitent l'usage d'organoïdes à partir de poumon de donneur. C'est pour cette raison que des cellules souches pluripotentes induites sont utilisées afin de former des organoïdes pulmonaires. Ce type de modèle permet d'étudier l'impact de mutations génétiques dans le développement d'une FP. Des mutations des gènes *HPS1*, *HPS2* et *HSP4* de cellules souches pluripotentes formant des organoïdes ont été

induites. Ces mutations favorisent le développement du syndrome d'Hermansky-Pudlak prédisposant les individus à la FPI. Ces modifications génétiques favorisent le développement de myofibroblastes et stimulent l'expression des protéines de la MEC (Strikoudis et al., 2019).

Les sphéroïdes et organoïdes ont l'avantage de mimer les interactions cellules/cellules et cellules/matrice et, s'ils sont issus de poumons de patients, ces modèles sont un atout dans le développement de la médecine personnalisée. Les sphéroïdes sont faciles à concevoir. Les principales limites de ces deux modèles sont leur taille et leur forme variable, ce qui induit des biais dans l'analyse. Les organoïdes ne sont pas vascularisés et n'ont pas d'alvéoles pulmonaires matures. De plus, le temps de culture nécessaire afin d'avoir des organoïdes est long (Lancaster & Knoblich, 2014; Sundarakrishnan et al., 2018).

1.4.5.2.7. Poumon sur puce

Les organes sur puce sont des dispositifs qui reproduisent des activités et réponses biologiques d'un organe ou d'un tissu sur des puces miniatures. Dans le cas de poumons sur puce, les dispositifs sont constitués de canaux recouverts de pneumocytes ou de cellules bronchiques cultivés sur une membrane poreuse. Des cellules endothéliales sont ensemencées dans le compartiment sous la membrane afin de mimer le système vasculaire. Des fibroblastes peuvent être ajoutés au dispositif afin de créer un micro-environnement plus complexe. L'utilisation de matériaux élastiques favorise la simulation de processus physiologiques comme la respiration ou la circulation sanguine (Huh et al., 2010; Sellgren et al., 2014).

Des fibroblastes pulmonaires issus de témoins sains ou atteints de FPI ont été cultivés dans un modèle de poumon sur puce constitué de cellules bronchiques et endothéliales. L'administration de TGF- β 1 favorise la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes associée à une surproduction d' α -SMA et induit une diminution du nombre de cellules ciliées. Un modèle de fibrose sur puce sensible aux forces de contractions a été utilisé afin d'évaluer une molécule aux propriétés anti-fibrosantes (Hsia et al., 2023; Mejías et al., 2020).

L'organe sur puce a l'avantage de modéliser facilement les réponses du tissu pulmonaire. Il peut répliquer les interactions cellules/cellules, cellules/matrice et les activités dynamiques grâce à

la circulation de sang et d'air. Cependant, ce modèle a de nombreuses limites techniques comme la dégradation progressive de la MEC ou les contaminations bactériennes. De plus, les fibroblastes sont cultivés sur une seule couche, ce qui ne reproduit pas l'environnement tridimensionnel des poumons humains. Des équipements spécialisés sont nécessaires pour la culture et l'analyse des poumons sur puce (Bhatia & Ingber, 2014).

Les différents modèles utilisés dans l'étude de la FP sont résumés dans la [Figure 9](#) et le [Tableau VI](#).

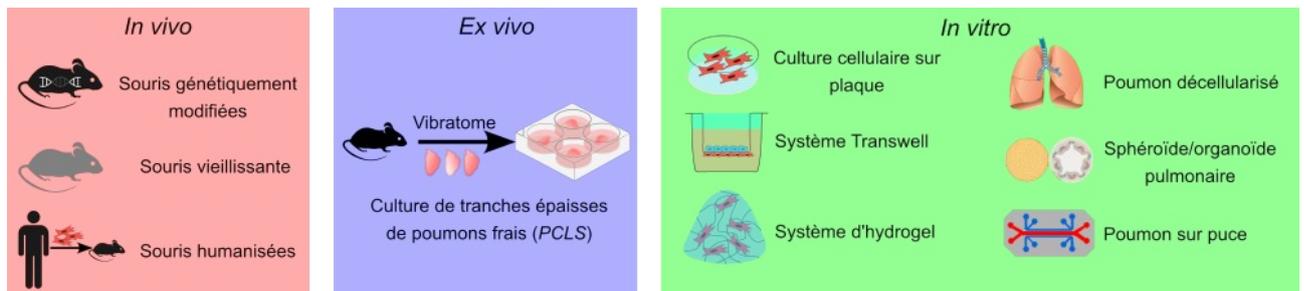


Figure 9. Schéma des différents modèles expérimentaux utilisés dans l'étude de la FP. De nombreux modèles *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro* sont utilisés pour étudier la FP. Bien qu'ils présentent de nombreux avantages, ces modèles comportent également des limites qui ralentissent la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la FP.

Tableau VI. Liste des différents modèles utilisés dans l'étude de la fibrose pulmonaire.

Modèle	Référence
<i>In vivo</i>	
Modèle de souris génétiquement modifiées – Variants génétiques associés aux FP ^a familiales – Souris transgéniques mimant une fibrose pulmonaire – Souris rapporteurs	(Hancock et al., 2018; Lee et al., 2004; Nureki et al., 2018)
Modèle de FP liée au vieillissement	(Bennett, 2009; Naik et al., 2012; Sueblinvong et al., 2012)
Modèle de souris humanisée	(Geng et al., 2019; Habiél et al., 2018; Pierce et al., 2007)
<i>Ex vivo</i>	
Tranches épaisses de poumons (PCLS) – Poumons d'animaux – Poumons de donneurs sains – Biopsies de patients atteints de FP	(Alsafadi et al., 2017; Cedilak et al., 2019; Mercer et al., 2016)
<i>In vitro</i>	
Culture cellulaire sur plaque – Cellules de modèles animaux – Cellules primaires de donneurs sains ou atteints de FP	(Balestrini et al., 2012; Joannes et al., 2016; Zheng et al., 2018)
Système Transwell – Co-cultures de cellules pulmonaires et de fibroblastes	(Epa et al., 2015; Prasad et al., 2014; Waghay et al., 2005)
Culture sur matrigel – Structures polarisées de sphéroïdes à partir de pneumocytes, de cellules épithéliales bronchiques ou de cellules endothéliales	(Evrard et al., 2012; Wu et al., 2011)

Système d'hydrogel (Brown et al., 2013; Marinković et al., 2012)
– Cellulesensemencées dans une matriced'hydrogel d'origine naturelle ou synthétique

Poumon décellularisé (Booth et al., 2012; Fernandez Davila et al., 2024; Sundarakrishnan et al., 2018)
– Obtention d'une matrice similaire à une MEC^b à partir de tissus pulmonaires humains et animaux

Sphéroïde et organoïde pulmonaires (Dsouza et al., 2023; Kabadi et al., 2019; Strikoudis et al., 2019; Suezawa et al., 2021)
– Cellules progénitrices isolées de biopsies pulmonaires formant des bronchosphères ou des alvéosphères

Poumon sur puce (Hsia et al., 2023; Mejías et al., 2020)

^a : Fibrose Pulmonaire ; ^b : Matrice ExtraCellulaire

2. STRATÉGIE D'ÉTUDE ET INTÉRÊT DU TRAVAIL

Malgré de nombreuses études cliniques, les thérapies anti-fibrosantes actuelles ralentissent la progression de la FP mais ne la soignent pas. Aussi, de nombreuses molécules anti-fibrosantes efficaces dans les études pré-cliniques échouent dans les études de phases cliniques. Ces échecs sont en grande partie dus à un manque de modèles expérimentaux capables de mimer certains patterns liés à une FP chez l'Homme. Les modèles existants ont de nombreux désavantages, tels qu'un développement lent de FP et une absence de reproductibilité. La mise en place d'un nouveau modèle d'étude pré-clinique a donc un intérêt tout particulier.

Le diagnostic permettant de déterminer la nature d'une PID fibrosante est complexe et est établi trop tardivement laissant le temps aux PID avec FPP de se développer. Ceci aggrave le pronostic des patients, alors que l'identification rapide de biomarqueurs précoces à l'origine de la progression de la FP est un atout majeur dans le diagnostic. De plus, trop peu de données sur les mécanismes d'initiation de la FP sont connus et l'identification de cibles thérapeutiques précoces liées à ce type de pathologie reste à être déterminée expérimentalement.

Afin de répondre à ces problématiques, notre stratégie d'étude s'est basée sur la mise en place d'un nouveau modèle expérimental original de FP induite qui repose sur des explants pulmonaires embryonnaires murins (EPEM) et un cocktail fibrosant (CF) constitué d'un mélange de médiateurs connus dans la physiopathologie de la FP.

Les deux principaux objectifs de cette thèse étaient donc :

1 – Développer et caractériser un nouveau modèle expérimental de FP dans le modèle d'EPEM avec des mécanismes physiopathologiques similaires à un pattern de PIC.

2 – Identifier des marqueurs génétiques précoces liés à l'initiation du développement de la FP par une analyse transcriptomique par single-cell RNA-sequencing 3' (scRNAseq3') sur le modèle d'EPEM avec FP expérimentalement induite.

Deux objectifs secondaires ont été développés :

1 – L'effet du CF a été testé sur des tranches de poumons murins adultes.

2 – Dans le but d’inhiber l’expression de certains marqueurs génétiques importants dans notre modèle, nous avons mis au point la méthode d’inhibition génique à l’aide d’oligonucléotides antisens (OAS). Nous avons ensuite appliqué cette technique sur certains marqueurs génétiques précocement surexprimés dans la FP induite.

3. MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1. Souris

L'expérimentation animale de ce travail de thèse suit les lignes directrices Françaises et de l'Union Européenne concernant le soin et l'utilisation des animaux en recherche. Les souris étaient hébergées dans une animalerie exempte d'organisme pathogène spécifique et avaient reçu un régime alimentaire chow *ad libitum*. Toutes les souris ont été identifiées au sevrage par une bague à l'oreille avec un numéro unique. Les souris utilisées dans notre étude sont des souris de type sauvages (WT) ou transgéniques. Dans ce dernier cas, il s'agit de souris rapporteurs Acta2-Rfp ou Muc5b-Gfp. Les souris Acta2-Rfp utilisées sont hétérozygotes (B6.FVB-Tg(Acta2-DsRed)1Rkl/J, JAX: 031159) et expriment le tag DsRed Rfp (*Red fluorescent protein*) sous le contrôle du promoteur du gène *Acta2*. Les souris Muc5b-Gfp utilisées sont homozygotes et ont été créées par recombinaison homologue avec insertion d'une séquence nucléique synthétique codant un variant de la protéine fluorescente Gfp (*Green fluorescent protein*). La séquence *Gfp* a été insérée dans le cadre de lecture de *Muc5b* à la place de l'unique codon stop du gène, localisé dans le dernier exon (Portal et al., 2017). Toutes les souris qui ont été manipulées sont en fond génétique C57BL/6J et âgées entre 2 et 6 mois pour les femelles et 2 à 8 mois pour les mâles.

3.2. Culture organotypique des explants pulmonaires embryonnaires murins

Pour obtenir des embryons âgés de 12,5 jours, deux femelles ont été placées dans la cage d'un mâle dans l'après-midi. Une femelle ou un mâle Acta2-Rfp hétérozygote a toujours été croisé avec une souris sauvage. Des femelles Muc5b-Gfp homozygotes ont été croisées avec des mâles Muc5b-Gfp homozygotes. Les femelles ont ensuite été séparées du mâle le lendemain matin. Ce premier jour est compté comme jour embryonnaire E0,5. Après 12,5 jours de gestation, la femelle a été tuée par dislocation cervicale et l'utérus contenant les embryons a été prélevé et rincé dans du PBS 1X (Gibco, Royaume-Uni). Une fois les embryons retirés de l'utérus, le placenta a été délicatement retiré et chaque embryon extrait de sa poche amniotique. L'embryon a ensuite été placé sur le côté gauche dans une boîte de pétri contenant du PBS 1X sous un stéréomicroscope afin d'effectuer la microdissection et d'extraire les EPEM selon la méthode décrite par (Del Moral & Warburton, 2010).

Une fois extraits, les EPEM ont été placés en culture ALI, c'est-à-dire qu'ils ont été déposés sur un filtre poreux en polycarbonate flottant dans un puits contenant 500 μ L de milieu DMEM/F12

sans sérum (Gibco, Royaume-Uni), qui est riche en acides aminés et vitamines, supplémentés en antibiotiques (pénicilline 100 U/mL et streptomycine 100 µg/mL ; Gibco). Les explants ont ensuite été placés dans un incubateur à 37 °C avec 5 % de CO₂. La croissance des EPEM en culture ainsi que les intensités de fluorescence émises par les tags Rfp et Gfp ont été suivies quotidiennement à l'aide d'un stéréomicroscope Leica M205 FA LasX à épifluorescence équipé d'une caméra 16-bits Hamamatsu (sCMOS ORCA-Flash4.0) au grossissement x30. Les images des explants ont été capturées tous les jours à partir de J0 (jour de dissection) jusqu'au dernier jour de culture. Les images ont été acquises à une exposition de 100 ms pour la lumière blanche, 1 s pour Acta2-rfp et 3 s pour Muc5b-Gfp. Les intensités de fluorescence émises par les tags Rfp et Gfp ont été quantifiées grâce au logiciel ImageJ/FIJI et normalisées par rapport à l'intensité/surface totale ou intensité/surface de la trachée et des grandes bronches respectivement pour chaque EPEM selon leurs génotypes. Les données sont exprimées par rapport à la variation en pourcentage de la valeur de l'intensité de fluorescence d'un jour donné par rapport au jour 0 pour les EPEM Acta2-Rfp, et par rapport au jour 2 de culture pour les EPEM Muc5b-Gfp. Des photos d'EPEM en culture transformées en pseudocoloration 16 couleurs à l'aide d'ImageJ/FIJI permettent d'apprécier l'intensité de fluorescence émise par les tags Rfp ou Gfp. Plus les intensités de fluorescences émises sont importantes, et plus les couleurs observées sont chaudes. Une couleur blanche indique que la valeur d'intensité de fluorescence est supérieure au seuil maximal de détection.

3.3. Protocole expérimental d'induction de fibrose pulmonaire à l'aide de cocktails fibrosants sur le modèle d'explant pulmonaire embryonnaire murin

Des études pilotes ont été réalisées afin de sélectionner le CF induisant une FP la plus physiopathologiquement similaire à celle identifiée chez l'Homme. Cinq différents CF ont été testés et sont adaptés de la littérature (Alsafadi et al., 2017; Hu, Fernandes, et al., 2017; Lee et al., 2001). Des cytokines et un facteur de croissance connus pour être surexprimés et impliqués dans la physiopathologie de la FP ainsi qu'un irritant ont été utilisés. Ces médiateurs sont le TGF-β1, PDGF-AB, IL-1β, IL-13, TNF-α (Sigma-Aldrich). De l'acide lysophosphatidique (Cayman chemical) ainsi qu'une solution de chlorure de cadmium (CdCl₂, Sigma-Aldrich) ont été utilisés également. Des EPEM qui ont été traités avec du PBS 1X servent de témoin. Le CF ou le PBS sont ajoutés dans 300 µL de milieu de culture DMEM/F12 supplémentés en antibiotiques à partir du 2^e jusqu'au 3^e, 4^e ou 5^e jour de culture. Un suivi cinétique du développement de la FP est effectué.

Une fois la culture arrêtée, les EPEM ont été fixés dans du paraformaldéhyde 4 % (Alfa Aesar, Allemagne) pendant 18 heures puis placés dans de l'éthanol 70 % (Carlo Erba Reagents, France) avant inclusion en paraffine et coupes pour effectuer les analyses histologiques et d'immunofluorescence. Les EPEM cultivés pour les études d'expression par RT-qPCR ont été directement immergés dans du RNAlater (ThermoFisher, France) pendant 24 heures à 4 °C, puis stockés à -80 °C jusqu'à extraction des ARN totaux.

3.4. Analyses histologiques et immunofluorescence

3.4.1. Histologie

Des coupes de 4 µm d'épaisseur d'EPEM inclus en paraffine ont été réalisées à l'aide d'un microtome et disposées sur des lames. Les coupes sont ensuite déparaffinées par deux bains de xylène (Carlo Erba Reagents, France) puis réhydratées par des bains successifs à concentration décroissante d'alcool : isopropanol 100 % (Carlo Erba Reagents, France), éthanol 95 %, éthanol 80 % et éthanol 70 %. Les colorations histologiques hématoxyline-éosine (HE), rouge picrosirius (RS) et trichrome Masson (TM) ont été effectuées selon un protocole classique (Geng et al., 2022; Tirunavalli & Andugulapati, 2024).

3.4.2. Évaluation histopathologique de la fibrose pulmonaire

La fibrose induite a été évaluée en aveugle des traitements par deux membres de l'équipe sur des coupes histologiques en HE et RS. Le score établi pour chaque EPEM se base sur la somme entre le score d'Ashcroft (Ashcroft et al., 1988) allant de 0 à 8, avec un score de FP établi en interne dans le laboratoire se basant sur la proportion de fibrose périphérique par rapport à la surface périphérique totale des EPEM allant de 0 à 3. La caractérisation du score total de fibrose est défini dans le [tableau VII](#). Au total 22 EPEM (10 traités au PBS et 12 au CF) ayant 3 jours de culture, 25 EPEM (11 traités au PBS et 14 au CF) ayant 4 jours de culture et 27 EPEM (12 traités au PBS et 15 au CF) ayant 5 jours de culture ont été évalués.

Une analyse de la quantification semi-automatique de fibrose sur les coupes histologiques d'EPEM en coloration RS a été effectuée à l'aide d'un plug-in ImageJ/Fiji (Ségard et al., 2024). Cet outil a également permis d'identifier automatiquement le parenchyme et les volumes des bourgeons

Tableau VII. Caractéristiques du score de fibrose défini selon la somme du score d'Ashcroft et du score de la fibrose pulmonaire périphérique.

Score de fibrose			
Score d'Ashcroft		Score de la FP^a périphérique	
Score	Caractéristiques	Score	Caractéristiques
0	Poumon sain	0	Poumon sain
1	Épaississement fibreux minime des parois alvéolaires ou bronchiolaires	1	zone de fibrose périphérique entre 0-20 % de la périphérie totale de l'EP ^b
2	Épaississement modéré des parois sans atteinte évidente de l'architecture pulmonaire	2	zone de fibrose périphérique entre 20-40 % de la périphérie totale de l'EP ^b
3		3	zone de fibrose périphérique >40 % de la périphérie totale de l'EP ^b
4	Augmentation de la fibrose avec atteinte nette de la structure pulmonaire et formation de bandes fibreuses ou de petites masses fibreuses		
5			
6	Grave déformation de la structure et présence de grandes zones fibreuses et de structures en rayon de miel		
7			
8	Oblitération fibreuse totale du champ		

^a : Fibrose Pulmonaire ; ^b : Explant Pulmonaire Embryonnaire Murin.

alvéolaires. Un nombre de 5 coupes par traitement et par jour d'arrêt de culture ont été analysées pour cette méthode.

3.4.3. Immunofluorescence

Après avoir déparaffiné les coupes, un démasquage a été réalisé dans du tampon citrate à pH 6 (10 mM citrate (Sigma-Aldrich, France)–0,05 % (vol/vol) Tween 20 (Sigma-Aldrich, France) pendant 20 min à 95 °C puis 20 min à température ambiante. Les lames ont été lavées deux fois 5 min. dans du PBS 1X. Les coupes ont été saturées par de l'albumine de sérum bovin (*Bovine Serum Albumine* (BSA), Sigma-Aldrich) 1 % dans du PBS 1X (PBS-BSA 1 %) pendant 45 min. Les anticorps primaires ont été dilués dans une solution de PBS-BSA 1 % et ajoutés sur les coupes pendant une nuit à 4 °C. Les anticorps primaires, utilisés en co-marquage ou non, ainsi que leurs dilutions sont listés dans le [tableau VIII](#). Le lendemain, les lames ont été lavées trois fois 10 minutes dans du PBS 1X. Les anticorps secondaires ont été dilués au 1/150 dans une solution de PBS/BSA 1 % et ajoutés sur les coupes pendant 90 min. à température ambiante. Les anticorps secondaires utilisés sont listés dans le [tableau VIII](#). Un lavage de 10 min. au PBS 1x a été effectué. Les noyaux ont été colorés pendant 5 min. à température ambiante par du Hoechst 33258 (Molecular Probes) dilué au 1/1000 dans du PBS 1X. Enfin, trois lavages successifs de 10 min au PBS 1X ont été effectués. Les lames ont été montées avec du liquide de montage Mowiol (Sigma-Aldrich, Allemagne).

Les évaluations et acquisitions d'images histologiques et d'immunofluorescence ont été réalisées au microscope à épifluorescence Leica DM5500B. Les images de ces coupes ont été analysées à l'aide du logiciel ImageJ/FIJI.

3.5. Expression des gènes par RT-qPCR

Les ARN ont été extraits et isolés à l'aide du kit innuPREP RNA Mini Kit 2.0 (Innuscreen GmbH, Allemagne). L'ARN a été retrotranscrit en ADN complémentaire (ADNc) par transcription inverse de 6,25 µL d'ARN dans un mélange contenant 6,25 µL d'eau traitée au diéthylpyrocarbonate, 1 µL d'hexanucléotides 50 ng/µL, 2 µL de tampon M-MuLV 5X, 1 µL de dNTP à 10mM, 0,5 µL de RNase inhibitor à 40U/µL et 1 µL de transcriptase inverse M-MuLV à 200U/µL (New England Biolabs, France) à 42 °C pendant 1heure. La qualité de l'ADNc néosynthétisé est systématiquement appréciée par une PCR ciblant l'ADNc de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (G3PDH).

Tableau VIII. Liste des anticorps utilisés pour l'immunofluorescence.

Anticorps	Fabricants	Dilutions	Hôtes	Identifiants
Primaires				
Anti- α -Sma (monoclonal, ab7817)	Abcam	1/750	Souris	RRID : AB_262054
Anti-Vimentine (polyclonal, ab137321)	Abcam	1/150	Lapin	RRID : AB_2921312
Anti-Muc5ac (monoclonal)	fourni par J.Bara	1/250	Souris	45M1
Anti-Gfp (polyclonal, ab290)	Abcam	1/500	Lapin	RRID : AB_303395
Secondaires				
Anti-IgG de souris couplé à la rhodamine	Jackson	1/150	Lapin	RRID : AB_2340049
Anti-IgG de lapin couplé au FITC ^a	Jackson	1/150	Chèvre	RRID : AB_2337982

^a : Fluorescein IsoThioCyanate.

Les expressions des gènes *Tgf-β1*, *Coll1a1* et *Acta2* par les EPEM traités au PBS ou par le FC entre les jours 3,4 ou 5 de culture ont été évaluées par RT-PCR semi-quantitative Taqman. Pour chaque gène cible, l'ARN ribosomal 18S, utilisé comme contrôle interne, a été amplifié avec les gènes d'intérêt dans le même puits. Les séquences des amorces et des sondes utilisées pour chaque gène sont indiquées dans le [tableau IX](#). Pour une amplification dans un volume final de 25 µL, 12,5 µL de Mix Taqman 2X (Applied Biosystems, Angleterre), 2 µL des oligonucléotides sens et antisens du gène cible à 5 pmol/µL, 1 µL de la sonde du gène cible à 5 pmol/µL, 1 µL des oligonucléotides sens et antisens du gène 18S à 1 µM (Applied Biosystems), 0,125 µL la sonde 18S à 40 µM (Applied Biosystems), 2 µL d'ADNc et 3,37 µL d'eau ultrapure ont été ajoutés. L'analyse par RTqPCR de chaque gène cible a été réalisée en triplicat et effectuée à l'aide de l'appareil QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Pour chaque échantillon, le rapport d'amplification a été calculé comme étant $2^{-(Ct_{\text{gène cible}} - Ct_{18S})}$. Au total, entre 7 et 8 EPEM ont été analysés par condition.

3.6. Single-cell RNA-sequencing 3'

3.6.1. Préparation des échantillons

Une fois placés en culture ALI, les EPEM WT ont été traités soit par du PBS soit par le CF à partir du 3^e jour de culture. Le lendemain, la culture a été arrêtée et la trachée de chaque explant a été retirée au stéréomicroscope à l'aide de pince de microdissection. Pour la dissociation 6 explants traités au PBS et 6 explants traités au CF ont été incubés dans une solution composée de DMEM/F12, libérase 5 % (Roche), DNase I 1 % (Roche) et du sérum de veau fœtal (*Fetal Bovine Serum* (FBS), (Gibco) 5 % au bain-marie à 37 °C pendant 2 heures. Durant cette étape, une dissociation mécanique a été effectuée toutes les 15 min. à l'aide d'une pointe de pipette à large orifice. Dix minutes avant la fin de la réaction, la trypsine EDTA 0,05 % (Gibco) a été ajoutée dans chaque tube. Après 2 heures d'incubation, du FBS 10 % a été ajouté dans les tubes. Une dernière dissociation mécanique à l'aide de pointes à large orifice a été effectuée.

Les cellules ont été filtrées à l'aide d'un filtre 70 µm (Falcon) lavé au préalable avec un mélange de PBS et du FBS 2 %. Les cellules ont ensuite été centrifugées pendant 15 min à 1 400 rpm et le surnageant retiré. Une étape de tri cellulaire magnétique permettant l'élimination des cellules mortes a été réalisée selon le protocole du fournisseur (Miltenyi Biotec).

Tableau IX. Détails des amorces et des sondes utilisées pour la PCR quantitative en temps réel.

Tgf-β1 (ENSMUST00000002678.10) Exon 6 – Exon 7

Amorces	Longueur (nt ^a)	Séquences (5'→3')
sens	20	AGGAGACGGAATACAGGGCT
antisens	20	TCATGTCATGGATGGTGCCC
sonde	24	GCGCTCACTGCTCTTGTGACAGCA

Coll1a1 (ENSMUST00000001547.8) Exon 39 – Exon 43

Amorce	Longueur (nt)	Séquences (5'→3')
sens	19	CTGCTGGCTCTCCTGGTAC
antisens	20	GAAGACCAGGGAAGCCTCTT
sonde	22	ACGTGGTGTGGTCGGTCTTCCC

Acta2 (ENSMUST000000039631.10) Exon 7 – Exon 8

Amorce	Longueur (nt)	Séquences (5'→3')
sens	20	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA
antisens	20	CCGCTGACTCCATCCCAATG
sonde	20	ACGAACGCTTCCGCTGCCCA

^a : nucléotide

Les cellules ont ensuite été centrifugées pendant 10 min. à 1 400 rpm et les culots cellulaires resuspendus dans du PBS/BSA 0,04 %. Les cellules ont été comptées sur cellule de Malassez et diluées à la concentration de 800 cellules/ μ L avec une solution de PBS/BSA 0,04 % puis transférées à la plateforme GO@L Génomique (PBLs UAR 2014 – US 41) localisée sur le site de l'Université de Lille pour analyse scRNAseq3'.

3.6.2. Analyses bio-informatiques des échantillons

L'analyse par scRNAseq3' a été réalisée à l'aide du kit Chromium Next GEM Single Cell 3' (10X genomics, v3.1). Le séquençage a été calibré sur l'organisme *mus musculus* avec le séquenceur Illumina Novaseq 6000. L'analyse primaire après le séquençage a été effectuée avec l'outil Cellranger (version 5.0) (Zheng et al., 2017). Pour le contrôle qualité, ont été exclus les cellules : qui expriment un nombre de gènes supérieur à 7716 ou inférieur à 200, les cellules potentiellement en apoptose avec un taux de mitochondries > 10 % et les doublets de cellules avec l'outil scDblFinder (Germain et al., 2021).

Les données bio-informatiques ont été analysées grâce à l'outil R et du package Seurat (Stuart et al., 2019). Les données issues du séquençage des cellules traités au PBS ou au CF ont été fusionnées afin de conserver uniquement les gènes en commun. Les gènes analysés ont été normalisés avec l'outil NormalizeData (méthode LogNormalize) et avec un facteur d'échelle (*scale factor*) de 10,000. Les données ont été transformées avec l'outil Seurat scale.data. Une analyse en composante principale a été effectuée. La méthode ElbowPlot a permis d'identifier que le nombre de composantes principales calculé est de 30. Une résolution de 0,8 a été appliquée via la fonction *shared nearest neighbor* à partir des 30 premières composantes principales afin de concevoir les cartes *Uniform Manifold Approximation and Projection* (UMAP) des clusters de cellules. Les types cellulaires ont été affectés à des groupes grâce au fichier source : <https://github.com/IanevskiAleksandr/sc-type> (Ianevski et al., 2022). Il s'agit d'un fichier qui regroupe des gènes humains. C'est pour cette raison que nous avons effectué au préalable un contrôle de compatibilité entre les gènes pulmonaires humains et embryonnaires murins grâce à un atlas de référence (Negretti et al., 2021). Les données brutes et le code R sont donnés dans le lien Zenodo suivant : <https://doi.org/10.5281/zenodo.13285840>. La fonction ggplot2 a permis de concevoir les figures et l'outil plotly a généré les liens interactifs.

L'outil ToppFun du site web de Toppgene (<https://toppgene.cchmc.org/>) a été utilisé pour identifier les différents processus biologiques associés aux gènes sous-exprimés ou surexprimés (Chen et al., 2009). Le site STRING (<https://string-db.org/>) a permis de modéliser les interactions entre les protéines issues des gènes surexprimés dans la condition CF (Szklarczyk et al., 2019). Le site GOrilla (<https://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/>) a permis d'effectuer l'analyse de l'ontologie des gènes (Eden et al., 2009).

3.7. Inhibition du développement de la fibrose pulmonaire à l'aide d'oligonucléotides antisens

Afin d'inhiber le développement de la FP induite par le CF sur le modèle d'EPeM, des OAS sont administrés. Les OAS utilisés sont des Morpholinos. Il s'agit d'OAS dans lesquels les désoxyriboses sont remplacés par des cycles morpholines et les groupements phosphates par des phosphorodiamidates (Crouvezier et al., 2023). Les OAS sont composés d'une séquence complémentaire à leur ARNm cible et se fixent sur le codon d'initiation. Une fois le complexe formé, l'OAS induit un encombrement stérique qui bloque la traduction protéique par le ribosome.

3.7.1. Mise au point

Pour la mise au point, le modèle de souris transgénique rapporteur *Muc5b-Gfp* a été utilisé. L'intensité de fluorescence émise par le tag *Gfp* permet de suivre la production de *Muc5b* dans la trachée et des grandes bronches. Des OAS (Gene Tools) ciblant l'ARNm de *Muc5b* ont été utilisés. Des OAS ciblant l'ARNm de *Muc5ac* ont servi de témoins pour cette étude. Les séquences nucléotidiques des OAS utilisés sont listées dans le [tableau X](#). Les solutions d'OAS ont été préparées à une concentration mère de 100 μM dans de l'eau ultrapure. Dans un premier temps, nous avons souhaité déterminer la concentration optimale d'OAS à administrer pour induire un taux maximal d'inhibition. Une gamme de concentration d'OAS ciblant les ARNm de *Muc5b* et *Muc5ac* entre 0,5 et 5 μM a été réalisée. Une administration unique d'OAS dans le milieu de culture a été effectuée au 5^e jour de culture ALI des EPeM issus de souris *Muc5b-Gfp*. Une fois la concentration optimale déterminée, une administration répétée d'OAS a été effectuée entre le 2^e et 6^e jour de culture pour évaluer le niveau d'inhibition induit par les OAS.

Tableau X. Séquences des oligonucléotides antisens utilisés.

Gène	Séquences (5'→3')
<i>Muc5b</i> (ENSMUST00000165147.2)	TCCAGTTTCTGCTGCCCATCCTG
<i>Muc5ac</i> (ENSMUST00000155534.8)	GAAATGTCCCCACTGGCAGCCTC
<i>Saa3</i> (ENSMUST00000006956.9)	ATGGAAGGCTTCATCCTGCTCGTGC
<i>Serpina3g</i> (ENSMUST00000043315.15)	ACCATCAATGTGCTCTCTTTCAGGC
<i>Lcn2</i> (ENSMUST00000050785.14)	CCAGACACATGACACTCAGGGCCAT

3.7.2. Inhibition de marqueurs génétiques impliqués dans le développement précoce de la fibrose pulmonaire

Des OAS ciblant les transcrits d'ARNm des gènes *Saa3* (Serum Amyloid A 3), *Serpina3g*, *Lcn2* (Lipocaline 2) et *Muc5ac* (OAS témoin) ont été préparés à une concentration de 100 μ M dans de l'eau ultrapure. Les séquences nucléotidiques des OAS utilisés sont listées dans le [tableau X](#). Les EPEM utilisés pour cette étude sont issus de souris sauvages. Les OAS ont directement été administrés dans le milieu de culture des EPEM traités par le CF à une concentration finale de 2 μ M. L'administration des OAS est effectuée en même temps que l'administration du CF du 2^e jusqu'au 4^e jour de culture. L'évaluation histopathologique de la FP induite est identique à la procédure précédemment utilisée. Au total 10 EPEM traités par le CF+l'OAS *Saa3* ont été comparés avec 9 EPEM traités par le CF+l'OAS *Muc5ac*, 12 EPEM traités par le CF+l'OAS *Lcn2* ont été comparés avec 8 EPEM traités par le CF+l'OAS *Muc5ac* et 12 EPEM traités par le CF+l'OAS *Serpina3g* ont été comparés avec 10 EPEM traités par le CF+l'OAS *Muc5ac*.

3.8. Préparation et culture organotypique de coupes de poumons murins adultes

Les souris adultes utilisées pour cette étude sont les mêmes que celles utilisées dans le modèle d'EPEM. Il s'agit des souris rapporteurs transgéniques *Acta2-Rfp* et *Muc5b-Gfp* âgées d'au minimum 6 mois. Les souris ont été tuées par une injection intrapéritonéale de 100 μ L de T61 (MSD santé animale, France). L'animal a ensuite été placé en décubitus dorsal. Une coupe longitudinale qui s'étend du bas de l'abdomen jusqu'à la gorge a été effectuée et la veine cave inférieure a été sectionnée afin d'exanguiner la souris. Le diaphragme a été perforé avant de couper longitudinalement la cage thoracique pour libérer les poumons. Après avoir dégagé la trachée, une petite incision a été effectuée entre 2 anneaux cartilagineux. En parallèle, une solution d'agarose à faible température de fusion (Invitrogen) 2 % a été préparée et placée dans un bain-marie à 40 °C. À l'aide d'une seringue avec une aiguille plate, un volume de 800 μ L d'agarose a été prélevé. L'aiguille a ensuite été rapidement introduite dans la trachée au niveau de l'incision et l'agarose injecté. La trachée a été ligaturée avec un fil afin de maintenir l'agarose dans les poumons. Le poumon a été retiré pour être transféré dans du milieu de culture DMEM/F12 et refroidi sur de la glace pendant 10 min afin de favoriser la polymérisation de l'agarose. Une fois l'agarose solidifié, un lobe pulmonaire a été prélevé et fixé sur le Compresstome Vibrating VF-210-0Z (Precisionary Instruments) afin de réaliser des tranches de poumons avec des épaisseurs de 120 ou 250 μ m ([Fig. 10](#)). Le Compresstome a été réglé à une vitesse de 3,5 mm/s et une oscillation de 32,5 Hz.

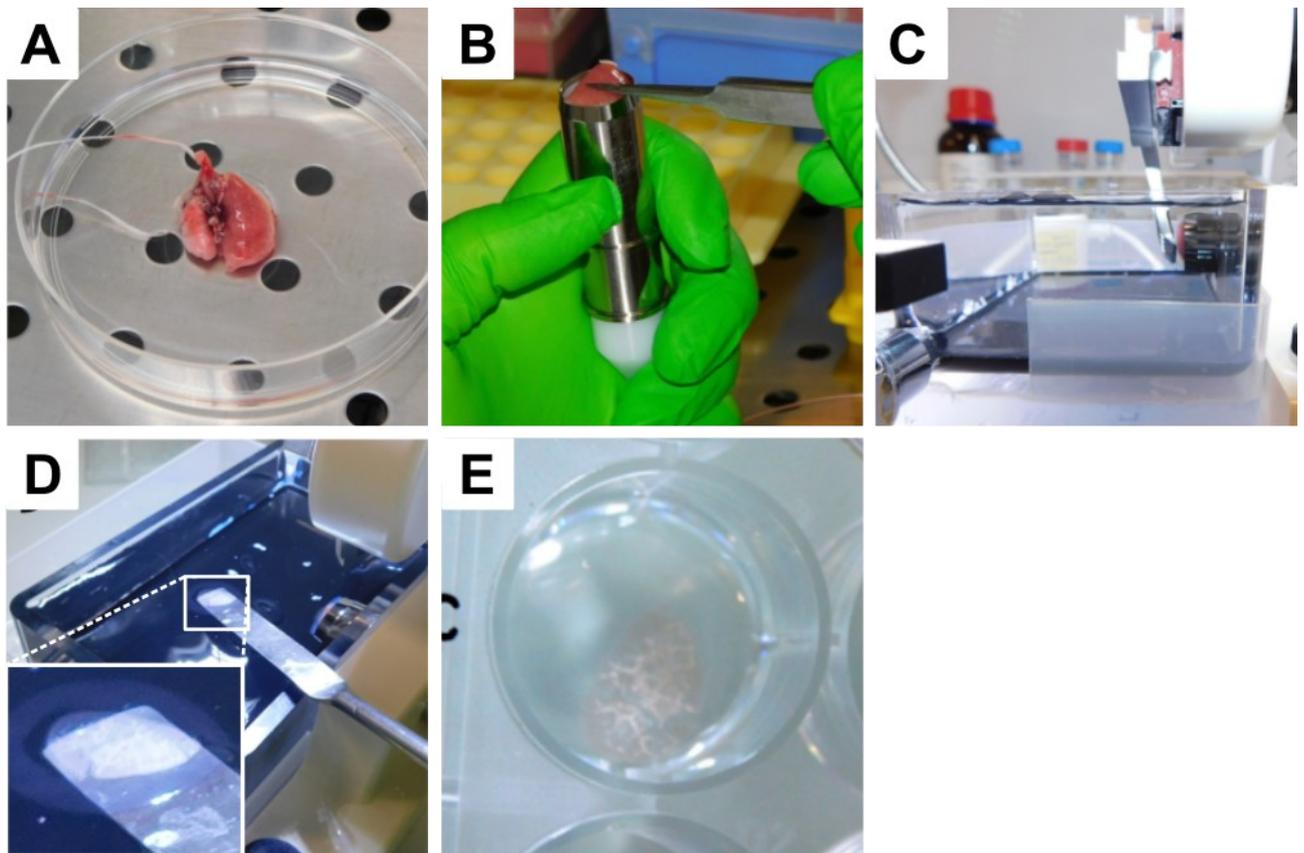


Figure 10. Étapes pour l'obtention des tranches épaisses de poumons murins adultes.

(A) Une fois l'agarose polymérisé, un lobe pulmonaire est prélevé du poumon entier. (B) Le lobe pulmonaire est fixé sur le support du Compressstome à laquelle un point de colle a été appliqué au préalable. (C) De l'agarose est ajouté autour de l'échantillon avant de mettre en place le lobe pulmonaire dans le Compressstome. (D) Le Compressstome tranche l'échantillon biologique. (E) Chaque tranche épaisse est délicatement prélevée du bain de récupération pour être placée dans un puits contenant du milieu de culture DMEM/F12.

Les tranches « *Precision cut Lung Slice* » (PCLS) ont été placées dans milieu de culture DMEM/F12 supplémenté avec 0,1 % de FBS, 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 3,125 µg/mL d'amphotéricine B (Gibco, Royaume-Uni). Les plaques contenant les PCLS sont placées dans un incubateur à 37 °C avec 5 % de CO₂ et les milieux de cultures sont renouvelés quotidiennement pour chaque puits.

L'administration du CF et des OAS dans le modèle de PCLS suit la même stratégie expérimentale que le modèle d'EPeM. Les coupes de 250 µm d'épaisseur ont été utilisées afin de suivre la production d'Acta2-Rfp en culture et d'effectuer les analyses histologiques et d'immunofluorescence. Parallèlement, des coupes de 250 µm d'épaisseur issues de souris *Muc5b-Gfp* ont été utilisées afin d'évaluer l'inhibition induite par les OAS *Muc5b*. Les coupes de 120 µm d'épaisseur ont été utilisées pour l'analyse par immunofluorescence de l' α -Sma par microscopie confocale.

Le stéréomicroscope a permis d'acquérir quotidiennement les images des PCLS en culture en lumière blanche et en fluorescence. La fluorescence émise par les tags Acta2-Rfp ou *Muc5b-Gfp* a été quantifiée grâce au logiciel ImageJ/FIJI à partir des photos des PCLS. Les données sont exprimées par rapport à la variation en pourcentage de la valeur de l'intensité de fluorescence d'un jour donné par rapport au jour 0 de culture. Les images transformées en pseudocoloration 16 couleurs permettent d'apprécier l'intensité de fluorescence émise par les tags Rfp ou Gfp. Les protocoles de coloration histologique et de marquage par immunofluorescence des PCLS suivent les mêmes procédures expérimentales que celles utilisées pour le modèle d'EPeM, mise à part les coupes de 120 µm qui sont fixées avec un volume égal de méthanol et d'acétone pendant 20 min avant l'étape de saturation par le BSA.

3.9. Analyses statistiques

Des tests non-paramétriques ont été effectués pour toutes les analyses statistiques à l'aide du logiciel R version 3.6.3. Le test bilatéral de Wilcoxon-Mann-Whitney, le test de Kruskal-Wallis et le test Z bilatéral à deux proportions ont été réalisés. Le volcano-plot a été établi avec une limite de valeur *P*-ajustée à 0,05 et un seuil de Log2 Fold change de -2,0/2,0. Une valeur *P*<0,05 a été considérée comme significative.

4. RÉSULTATS

4.1. Induction expérimentale d'une fibrose pulmonaire sur le modèle d'explant pulmonaire embryonnaire murin

La première partie de ce travail de thèse avait pour objectif de développer un nouveau modèle expérimental de FP sur des EPEM à l'aide du CF. Dans un premier temps, nous avons utilisé des EPEM issus de souris transgéniques *Acta2-Rfp* dont le gène *Rfp* est sous le contrôle du promoteur *Acta2*. L'intensité de fluorescence émise par la protéine Rfp reflète la production d' α -Sma. La protéine α -SMA, codée par *Acta2*, est un biomarqueur majeur des myofibroblastes qui ont un rôle majeur dans la FP.

4.1.1. Sélection du cocktail fibrosant

Afin d'induire expérimentalement une FP sur le modèle d'EPEM en culture ALI, différents CF ont été testés (Tableau XI). La nature des composants de ces différents CF a été définie selon la littérature. Tous les CF ont été administrés quotidiennement dans le milieu de culture des EPEM. Les analyses histologiques et d'immunofluorescence montrent que l'administration du CF, quelle que soit sa nature, induit une FP périphérique marquée par des dépôts de collagène avec la présence de cellules fusiformes et l'accumulation d' α -Sma (Fig. 11). Le cocktail n°5 induit une accumulation plus importante de cellules interstitielles dans le parenchyme pulmonaire si bien que certains bourgeons alvéolaires sont totalement collabés. La coloration en RS met en évidence un réseau dense de fibres de collagène dans les régions sous-pleurales. De plus, le CF n°5 induit une accumulation massive d' α -Sma dans le parenchyme pulmonaire, ce qui suggère une prolifération excessive de myofibroblastes par rapport aux autres cocktails pour lesquels les résultats sont plus modérés.

Le cocktail n°5 est composé de TGF- β 1 2ng/ μ L, CdCl₂ 600 μ M, PDGF-AB 2ng/ μ L, TNF- α 2ng/ μ L, IL-13 2ng/ μ L, IL-1 β 2ng/ μ L et LPA 500 μ M. Ce cocktail, dans nos expériences pilotes, semble le plus intéressant d'après la fibrose induite. C'est donc ce CF que nous avons retenu pour le reste de notre étude.

Tableau XI. Caractéristiques des différents cocktails pro-fibrosants utilisés.

Cocktail fibrosant n°	Composition	Concentration	Référence	Administration dans le milieu de culture
1	TGF-β1 CdCl ₂	2 ng/μL 600 μM	Adapté de Hu <i>et al</i> , 2017	Quotidienne de J+1 à J+5
2	TGF-β1 CdCl ₂ PDGF-AB TNF-α	2 ng/μL 600 μM 2 ng/μL 2 ng/μL		Quotidienne de J+2 à J+5
3	CdCl ₂ PDGF-AB TNF-α IL-13 IL-1β	600 μM 2 ng/μL 2 ng/μL 2 ng/μL 2 ng/μL	Adapté de Lee <i>et al</i> , 2001	Quotidienne de J+2 à J+5
4	TGF-β1 CdCl ₂ PDGF-AB TNF-α IL-13 IL-1β	2 ng/μL 600 μM 2 ng/μL 2 ng/μL 2 ng/μL 2 ng/μL		Quotidienne de J+2 à J+4
5	TGF-β1 CdCl ₂ PDGF-AB TNF-α IL-13 IL-1β LPA	2 ng/μL 600 μM 2 ng/μL 2 ng/μL 2 ng/μL 2 ng/μL 500 μM	Adapté d'Alsafadi <i>et al</i> , 2017	Quotidienne de J+2 à J+4

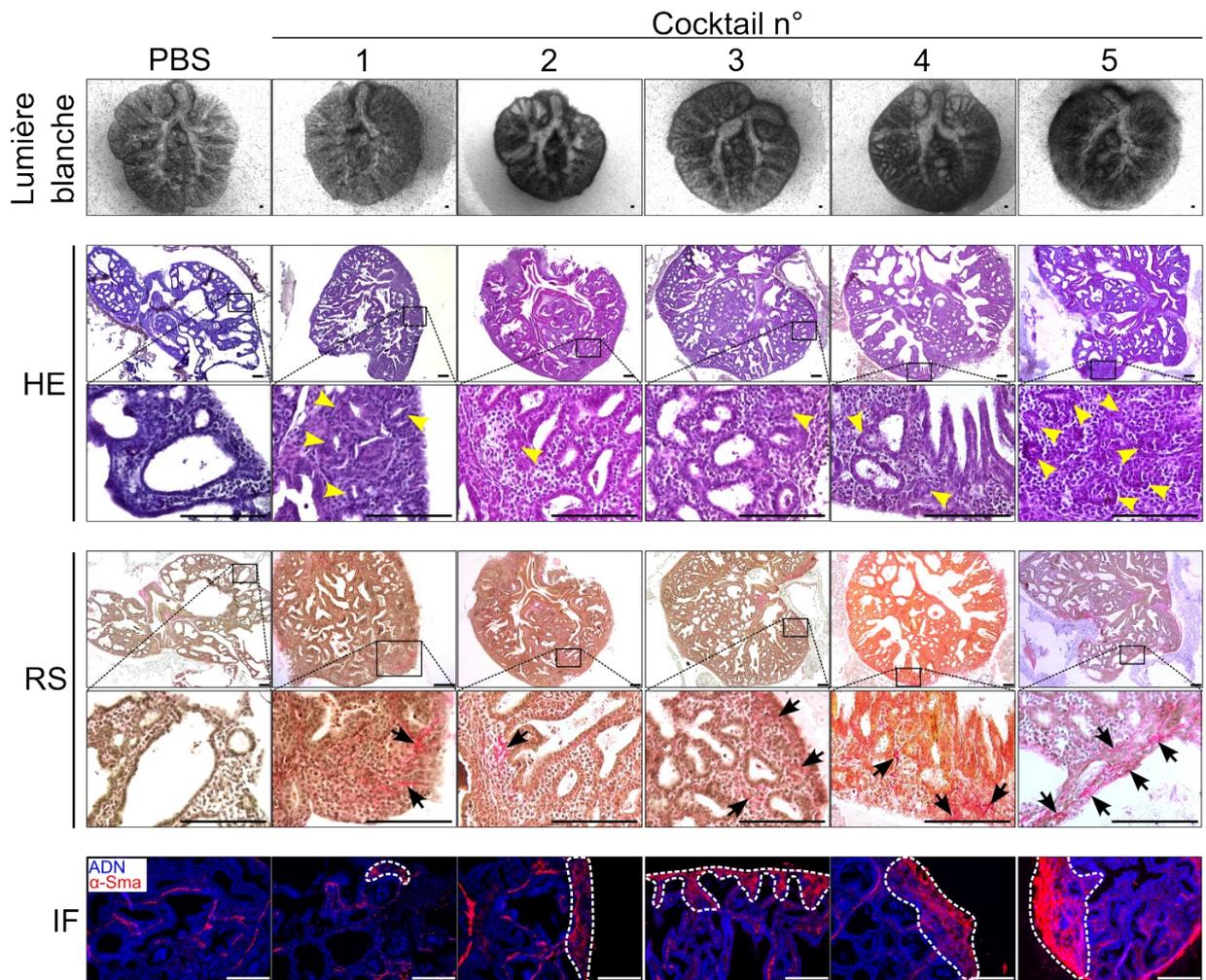


Figure 11. Caractérisation de la fibrose induite sur les explants pulmonaires embryonnaires murins selon les cocktails fibrosants administrés.

Un explant pulmonaire embryonnaire murin (EPEM) traité par du PBS sert de témoin pour la comparaison. Les détails sur la composition et la fréquence d'administration des différents CF sont donnés dans le [tableau XI](#). Les images en lumière blanche des EPEM en culture sont obtenues avec une exposition de 100 ms. Pour l'immunofluorescence (IF), l'ADN est marqué en bleu et l' α -Sma en rouge. Têtes de flèches jaunes, alvéoles collabées/destructurées ; flèches noires, dépôt de fibres de collagène ; zones entourées en pointillés blancs, régions riches en α -Sma. barre d'échelle : 50 μ m. HE, Hématoxyline/éosine ; RS, rouge Sirius.

4.1.2. Suivi en culture

L'effet d'un traitement chronique par le CF a tout d'abord été mesuré au cours du temps sur des EPEM issus de souris *Acta2-Rfp* (Fig. 12A). L'administration répétée du CF entraîne une modification progressive de la morphologie des EPEM associée à une densification du parenchyme pulmonaire comparée aux témoins (Fig. 12B). Par ailleurs, la surface des explants augmente quotidiennement sans différences significatives entre les deux conditions testées quel que soit le jour de culture (Fig. 13). L'intensité de fluorescence émise par *Acta2-Rfp* des EPEM traités par le CF est plus importante comparée à la condition témoin. Cette observation est confirmée par nos analyses quantitatives (Fig. 12C). Comparativement à la condition témoin, la variation de la fluorescence d'*Acta2-Rfp* de la surface totale des EPEM est plus importante dès la première administration du CF et devient de plus en plus significative au fur et à mesure des administrations. De plus, une accumulation importante d'*Acta2-rfp* dans les régions sous-pleurales est observée au 5^e jour de culture pour les EPEM traités par le CF, ce qui n'est pas observé dans la condition témoin (Fig. 12D).

L'administration répétée du CF favorise donc la densification des EPEM en culture ALI et stimule l'expression d'*Acta2-Rfp*, ce qui se traduit par une augmentation de la prolifération des myofibroblastes.

4.1.3. Caractérisation de la fibrose induite

L'analyse des coupes histologiques en coloration HE des EPEM traités au CF montre de nombreuses alvéoles pulmonaires collabées associées à un épaissement des septa alvéolaires dès le 3^e jour de culture. Des cellules fusiformes interstitielles, caractéristiques des fibroblastes/myofibroblastes, forment des foyers fibroblastiques et sont observées en périphérie pulmonaire. Les colorations RS et TM qui permettent de visualiser les fibres de collagène montrent des dépôts de MEC dans les régions sous-pleurales lorsque les EPEM sont traités au CF (Fig. 14A, Fig. 15). Ces analyses histologiques mettent en évidence une FP hétérogène pour les EPEM traités au CF. L'évaluation de la sévérité de la FP, réalisée à l'aide de notre score de fibrose, souligne une fibrose significativement plus importante pour les EPEM traités au CF comparés aux témoins. De plus, la FP induite est de plus en plus importante au fur et à mesure des administrations du CF avec une moyenne de score de fibrose à 0,14 et 0,53 pour le 3^e jour et une moyenne de score de fibrose à 0,20 et 3,82 pour le 5^e jour de culture pour les conditions PBS et CF respectivement (Fig. 14B).

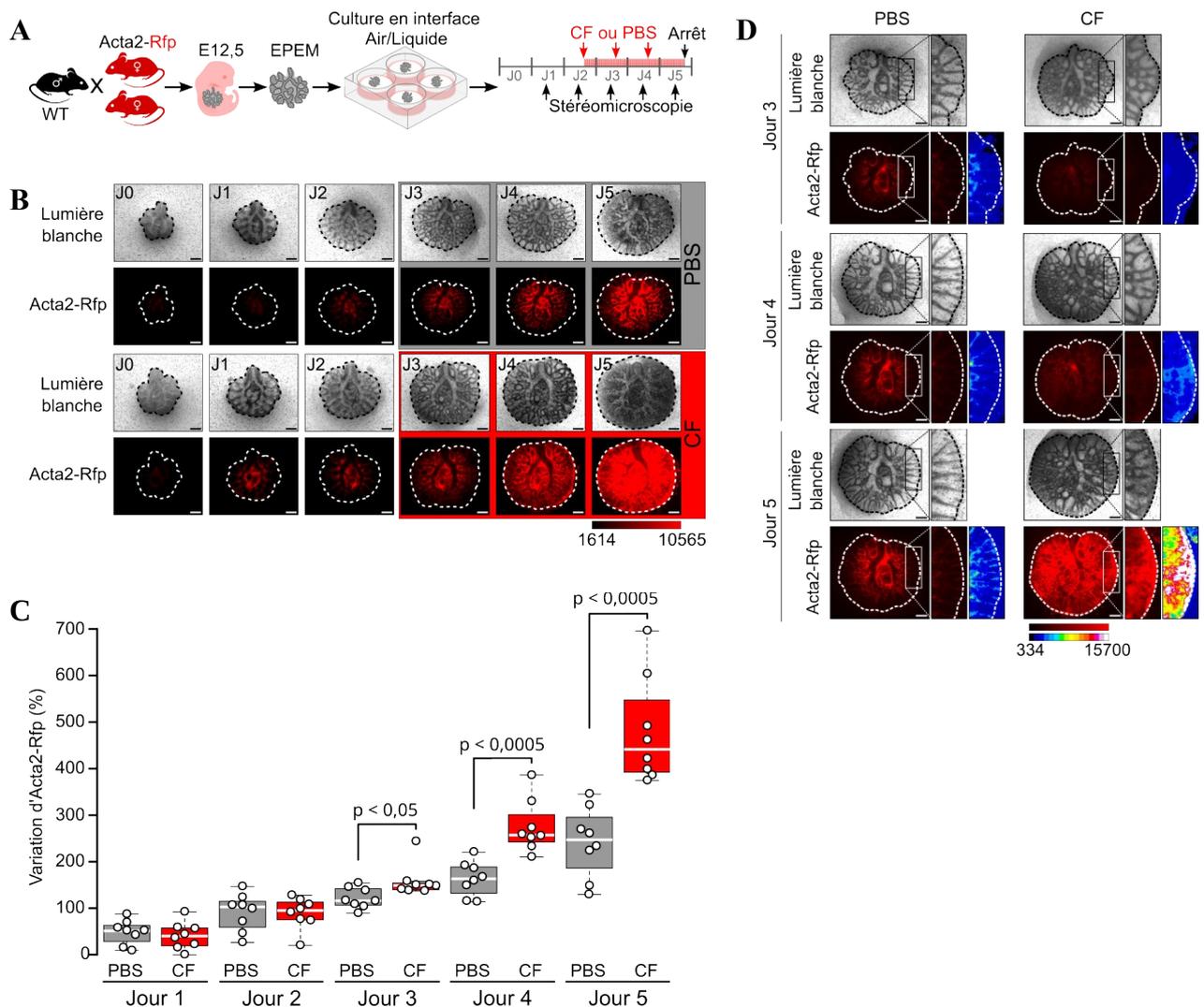


Figure 12. Le cocktail fibrosant stimule l'expression d'*Acta2-Rfp* des explants pulmonaires embryonnaires murins.

(A) Représentation schématique du protocole expérimental permettant d'obtenir et de cultiver des explants pulmonaires embryonnaires murins (EPEM) en culture en interface air/liquide (ALI). Au 2^e jour de culture, du PBS ou du cocktail fibrosant (CF) est administré dans le milieu de culture. Le développement de la fibrose pulmonaire est observé quotidiennement à l'aide de la lumière blanche et de la fluorescence émise par Acta2-Rfp. J = jour. WT = souris sauvage. (B) Images représentatives d'EPEM en lumière blanche et après la stimulation par fluorescence d'Acta2-Rfp en culture ALI du jour 0 (jour de dissection) jusqu'au 5^e jour de culture. Les EPEM ont été en contact avec le PBS ou le CF entre les jours 3 à 5 de culture. L'intensité de fluorescence émise par le tag Rfp est comprise entre 1614 et 10 565 unités arbitraires dans les deux conditions. Échelle : 500 μ m. J = jour. (C) Quantification de la variation de l'intensité de fluorescence émise par Acta2-Rfp de la surface totale des EPEM (n = 8/ groupe) du 1^{er} jusqu'au 5^e jour de culture ALI. Test statistique : Wilcoxon-Mann-Whitney. (D) Images d'EPEM traités par le PBS ou le CF du 3^e au 5^e jour de culture ALI. Un agrandissement de la périphérie pulmonaire est montré. La pseudocoloration 16 couleurs permet d'apprécier l'intensité de fluorescence émise par Acta2-Rfp. Les échelles de fluorescence du tag Rfp sont comprises entre 334 et 15 700 unités arbitraires. Échelle : 500 μ m.

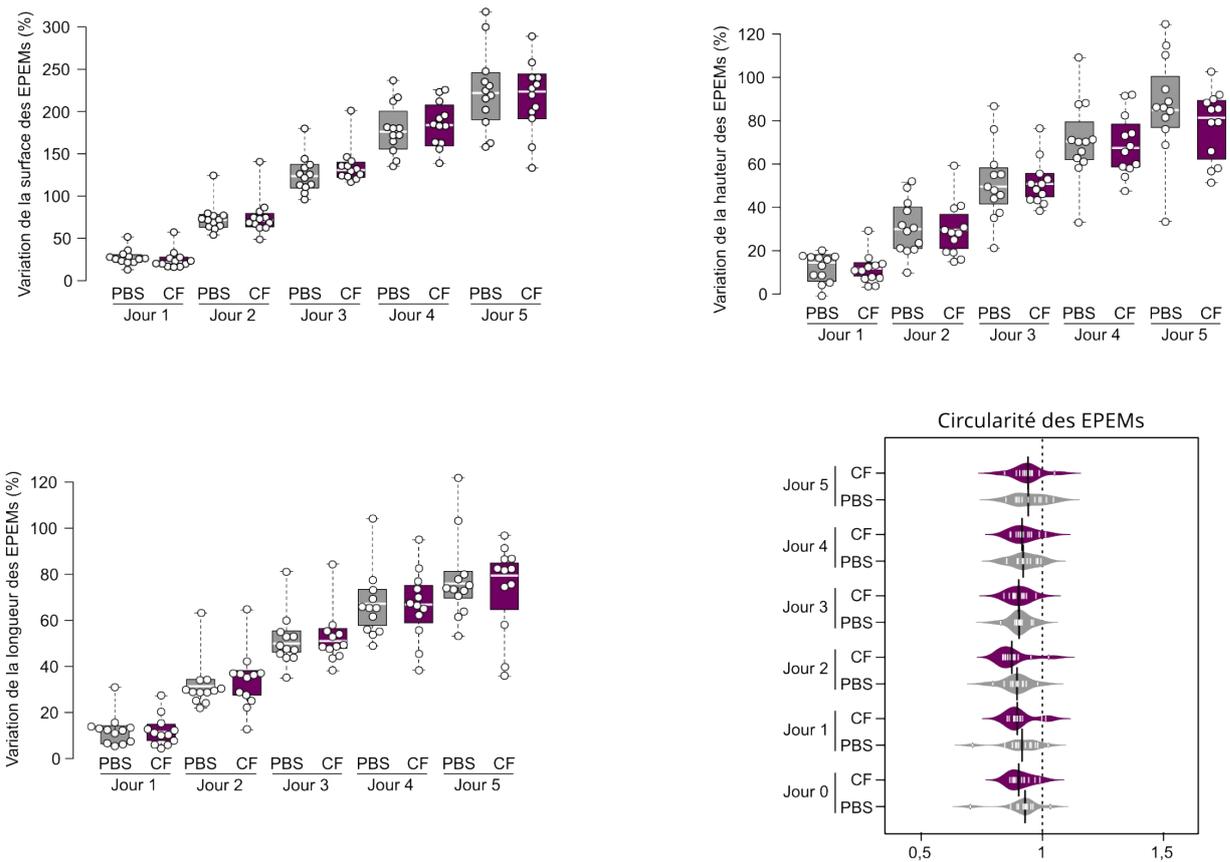


Figure 13. Comparaison de la surface, de la hauteur, de la longueur et de la circularité des explants pulmonaires embryonnaires murins (EPEMs) témoins ou traités par le cocktail fibrosant.

Les variations de surface, de hauteur et de longueur des EPEMs des jours 1 à 5 de culture sont données par rapport aux valeurs du jour 0 de culture. La circularité des EPEMs est obtenue par le rapport Hauteur/Longueur. Plus le quotient est proche de 1, plus l'EPEM est de forme arrondie. n = 12/groupe.

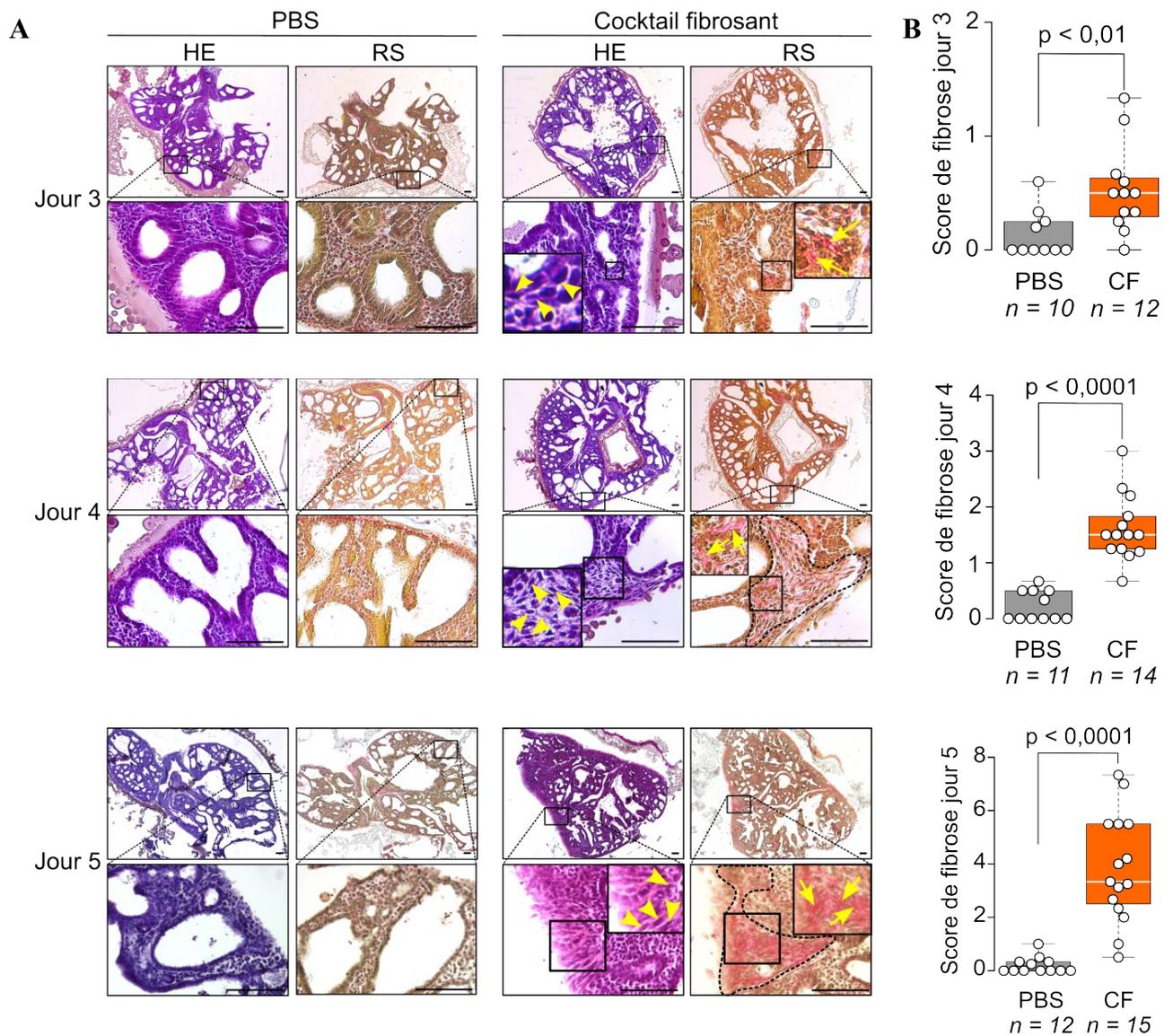


Figure 14. Fibrose pulmonaire progressive mimant un pattern de pneumopathie interstitielle commune sur le modèle d'explant pulmonaire embryonnaire murin.

(A) Images de coupes histologiques d'explants pulmonaires embryonnaires murins (EPEM) traités avec du PBS ou du cocktail fibrosant (CF) en coloration hématoxyline/éosine (HE) ou rouge Sirius (RS) après 3,4 ou 5 jours de culture en interface air liquide. Les têtes de flèches indiquent les cellules fusiformes. Les flèches représentent les dépôts de fibres de collagène. Les zones entourées par des pointillés noirs indiquent les régions denses de collagène. Les images sont représentatives de 10–15 EPEM/jour/groupe. Échelle : 100 μ m. **(B)** Score de fibrose des EPEM traités par le PBS ou le CF après 3, 4 ou 5 jours de culture. Entre 10 et 15 EPEM ont été évalués par jour et par groupe. Test statistique : Wilcoxon-Mann-Whitney.

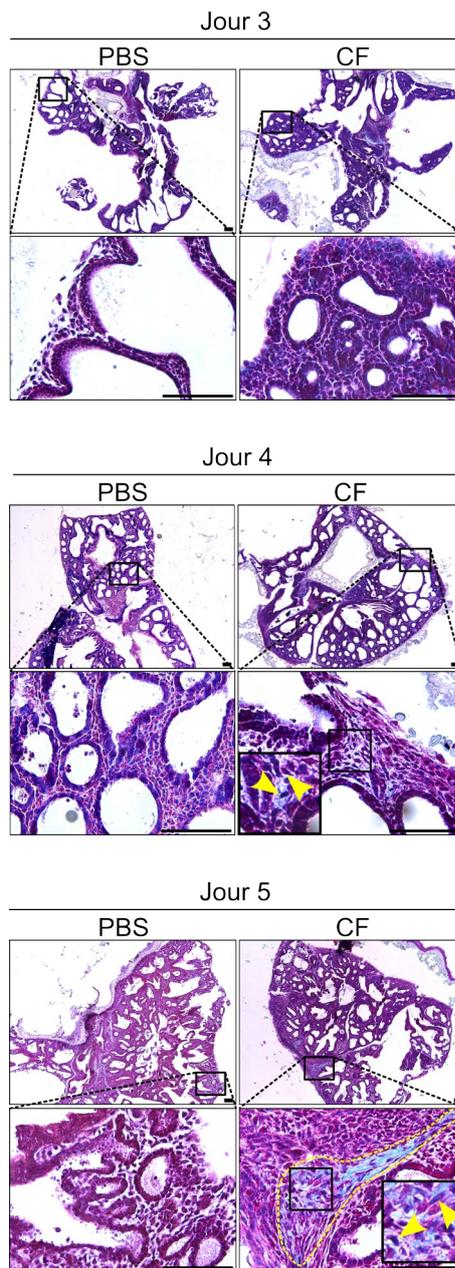


Figure 15. Coupes histologiques d'explants pulmonaires embryonnaires murins (EPEMs) colorées au Trichrome Masson.

Les coupes histologiques des EPEMs traités au PBS ou au cocktail fibrosant sont observées après 3,4 ou 5 jours de culture en interface air/liquide. Des cellules fusiformes sont localisées dans les régions sous-pleurales (têtes de flèches) dans une zone dense en collagène (entourée en jaune). Échelle : 100 μ m.

Ces observations sont confirmées grâce à l'analyse semi-quantitative de fibrose sur des coupes d'EPEM en coloration RS. L'analyse avec le plug-in ImageJ/Fiji détecte une fibrose qui est progressivement plus importante au fur et à mesure des administrations du CF contrairement aux EPEM témoins traités par du PBS où aucune différence notable n'est observée. À l'inverse, le volume des bourgeons alvéolaires diminue progressivement pour les EPEM traités par le CF (Fig. 16A). Comparativement aux EPEM témoins, la surface de fibrose des EPEM traités par le CF est significativement plus importante, et ce, quel que soit le jour d'arrêt de culture. De plus, l'analyse de Kruskal-Wallis met en évidence une *p-value* significative égale à 0,00193 pour la comparaison des 3 groupes d'EPEM traités par du CF au 3^e, 4^e et 5^e jour de culture (Fig. 16B). De façon intéressante, le volume des bourgeons alvéolaires des EPEM traités par le CF au 5^e jour de culture est significativement moins important par rapport aux témoins. L'analyse de Kruskal-Wallis met en évidence une *p-value* égale à 0,009279 uniquement pour les 3 groupes d'EPEM témoins traités par le PBS au 3^e, 4^e et 5^e jour de culture. Aucune différence notable n'est observée lorsque l'on compare l'évolution du volume des bourgeons alvéolaires pour les EPEM traités par le CF (Fig 16C).

Les expressions de gènes liés à l'inflammation (*Tgf-β1*) et à la fibrose (*Coll1a1* et *Acta2*) ont été évaluées par RT-qPCR pour les EPEM, traités par le PBS ou le CF, au 3^e, 4^e et 5^e jours de culture ALI. Alors qu'aucune différence n'est observée aux jours 3 et 4 pour l'expression de *Tgf-β1* entre les deux traitements, au jour 5, l'expression de ce gène est plus importante pour les EPEM traités au CF (Fig. 17A). Les niveaux d'expressions de *Coll1a1* et d'*Acta2* montrent une tendance de surexpression de ces gènes au 3^e jour de culture pour les EPEM traités au CF. Une expression significativement plus importante est observée au jour 4 pour *Coll1a1* et aux jours 4 et 5 pour *Acta2* pour les EPEM avec FP induite (Fig. 17B,C).

La production et la localisation d' α -Sma a ensuite été analysée par immunofluorescence. Les cellules mésenchymateuses sont marquées par la vimentine qui est une protéine constitutive des filaments intermédiaires dans ce type cellulaire. Nous observons une accumulation progressive d' α -Sma et de cellules mésenchymateuses dans les régions sous-pleurales lorsque les EPEM ont été traités avec le CF (Fig. 18A,B). Ceci reflète une augmentation de la prolifération et de l'activité des myofibroblastes interstitiels périphériques.

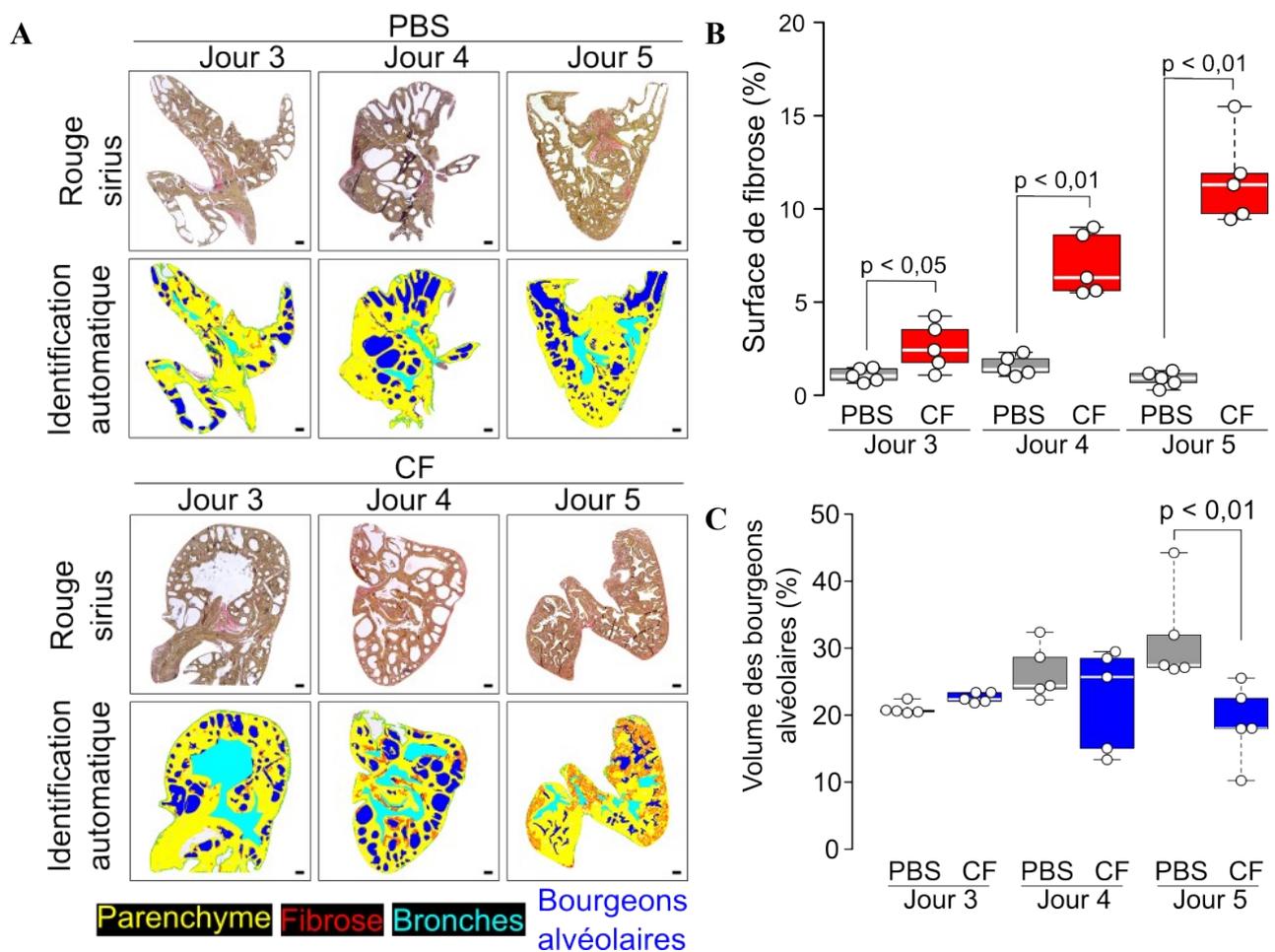


Figure 16. L'administration répétée du cocktail fibrosant (CF) induit une fibrose pulmonaire progressive bouleversant le développement des explants pulmonaires embryonnaires murins (EPEM).

(A) Suivi de l'accumulation de fibrose sur des coupes d'EPEM en coloration rouge sirius entre le 3^e et 5^e jour de culture. Les EPEM témoins sont traités par du PBS. Un module d'extension du logiciel ImageJ/Fiji permet d'identifier automatiquement le parenchyme pulmonaire (jaune), la fibrose (rouge) et les bourgeons alvéolaires (bleu) à partir des images de coupes d'EPEM en coloration rouge sirius. Les bronches (cyan) ont été tracées par l'utilisateur. Échelle : 100 μ m. (B) Graphique représentant la surface de fibrose (%) pour chaque EPEM en fonction de la nature du traitement administré et du jour d'arrêt de culture. (C) Graphique représentant le volume des bourgeons alvéolaires (%) pour chaque EPEM en fonction de la nature du traitement administré et du jour d'arrêt de culture. n=5/traitement/jour. Tests statistiques : Wilcoxon-Mann-Whitney et Kruskal-Wallis.

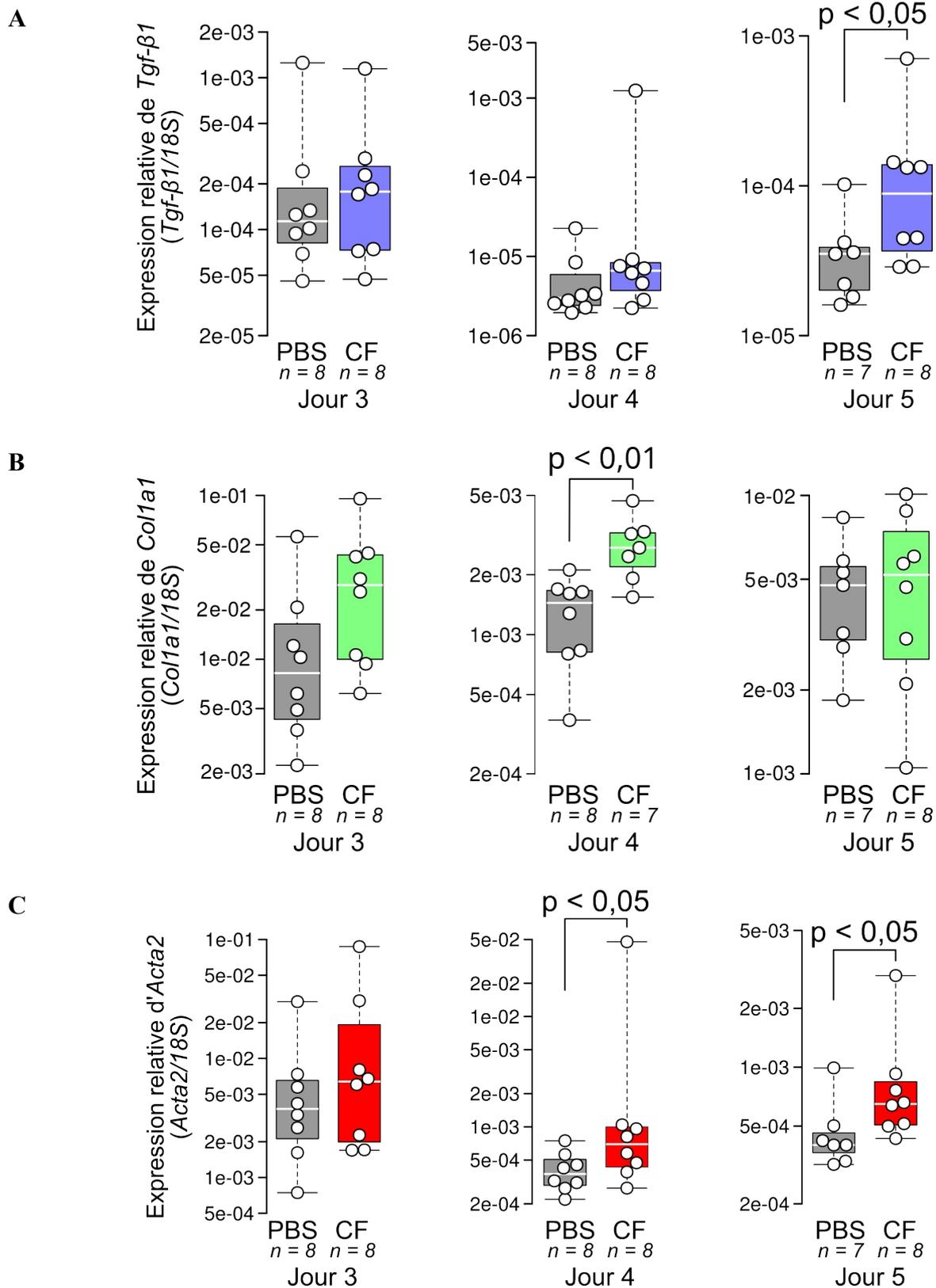


Figure 17. Expressions géniques relatives des explants pulmonaires embryonnaires. (A) *Tgf-β1*, (B) *Colla1* et (C) *Acta2*.

Entre 7 et 8 EPem sont étudiés par groupe. Test statistique : Wilcoxon-Mann-Whitney.

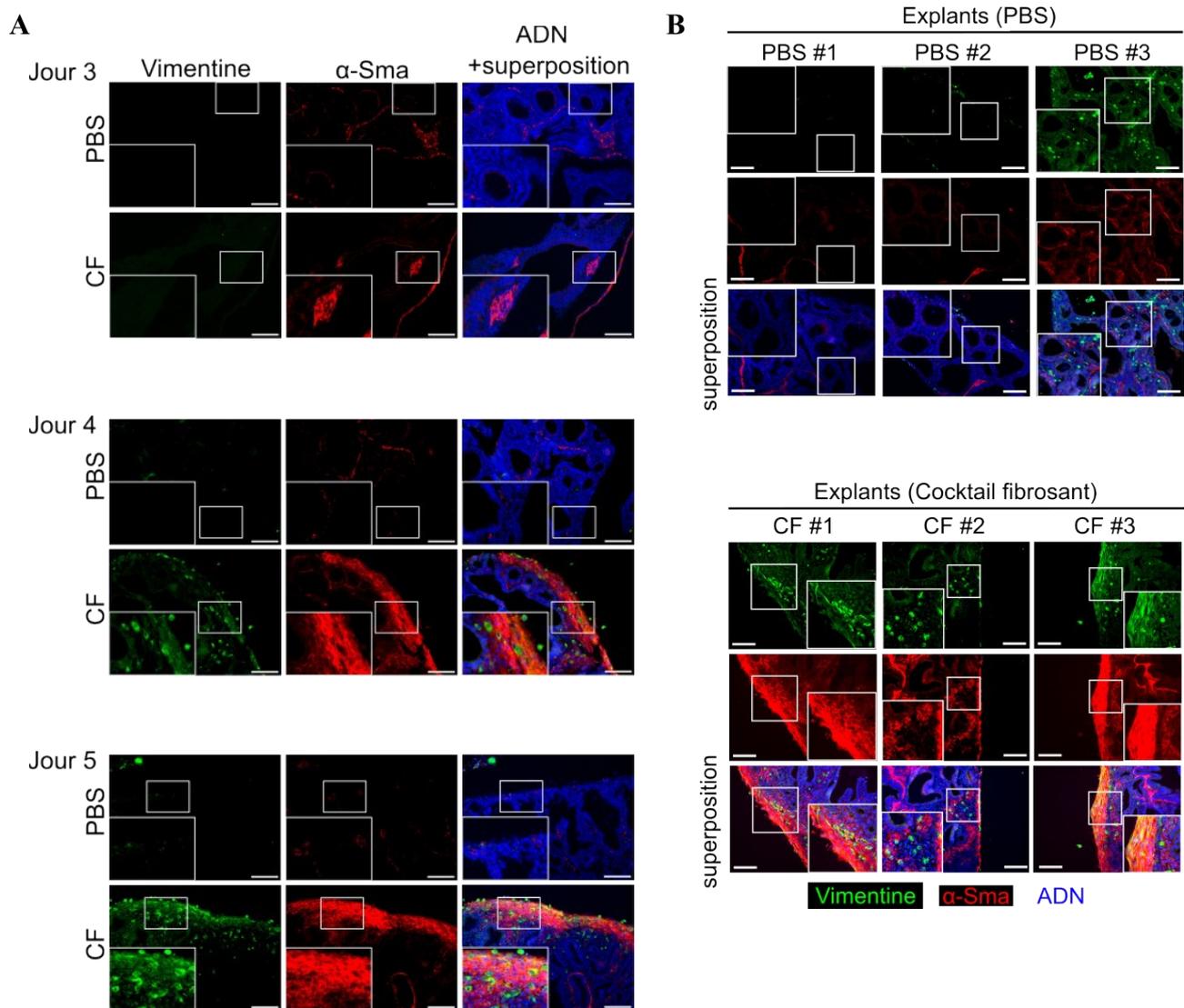


Figure 18. Localisation de la vimentine et de l' α -Sma.

(A) Images représentatives d'analyse en immunofluorescence de co-marquage de la vimentine et de l' α -sma d'explants pulmonaires embryonnaires murins (EPEM) témoins ou traités par le cocktail fibrosant (CF) étudiés aux jours 3 à 5 de culture en interface air/liquide. (B) Images de coupes d'EPEM en immunofluorescence après 5^e jour de traitement par du PBS ou de CF en culture d'interface air/liquide. Trois EPEM sont étudiés par chaque condition. La vimentine est marquée au vert, l' α -Sma en rouge et l'ADN en bleu. Échelle : 100 μ m.

L'ensemble de ces résultats montre qu'une administration répétée du CF induit une FP expérimentale sur le modèle d'EPEM en culture ALI caractérisée par une prolifération de myofibroblastes dans les espaces sous-pleuraux. La multiplication de ce type cellulaire entraîne la surexpression de marqueurs liés à l'inflammation et à la fibrose.

4.2. Identification de marqueurs précoces de fibrose pulmonaire

Le deuxième objectif de cette thèse était d'identifier des biomarqueurs génétiques exprimés précocement à l'origine du développement de la FP. Pour cela, nous avons réalisé une analyse par scRNAseq3' sur notre modèle d'EPEM après une unique administration du CF au 3^e jour de culture. L'analyse transcriptomique a eu lieu environ 18 heures après le traitement (Fig. 19A).

4.2.1. Types cellulaires impliqués dans le développement précoce de la fibrose pulmonaire

Après 18 heures de traitement, les EPEM ont été respectivement regroupés en fonction de la nature du traitement administré puis dissociés. Au total, 12 893 et 8 471 cellules issues d'EPEM traités au PBS ou au CF respectivement ont été analysées. Douze types cellulaires ont été mis en évidence grâce à l'identification des signatures génétiques (Fig. 19B, Fig. 20A). Les représentations tridimensionnelles interactives des superpositions UMAP pour les conditions PBS et CF sans ou avec indications des clusters sont disponibles dans les liens URL suivants : https://cbedart.github.io/scRNAseq/Hennion2024/UMAP_Conditions/, https://cbedart.github.io/scRNAseq/Hennion2024/UMAP_Celltypes/. Une représentation 3D UMAP regroupant à la fois les conditions et les types cellulaires est disponible dans le lien URL suivant : https://cbedart.github.io/scRNAseq/Hennion2024/UMAP_Celltypes_Conditions/.

Des différences sont observées dans le nombre de cellules par type cellulaire entre les conditions PBS et CF. La comparaison des deux conditions met en évidence un nombre plus important de myofibroblastes dans la condition CF (26,8 %) par rapport à la condition contrôle traitée par du PBS (0,7%). La proportion relative du nombre de cellules musculaires lisses est deux fois plus importante dans la condition CF (12 %) comparée aux témoins (6,2%). À l'inverse, la quantité de fibroblastes est majoritairement plus importante dans la condition PBS (46,4%) comparée à la condition CF (29,1%) comme le nombre de fibroblastes en prolifération (22,5 % et

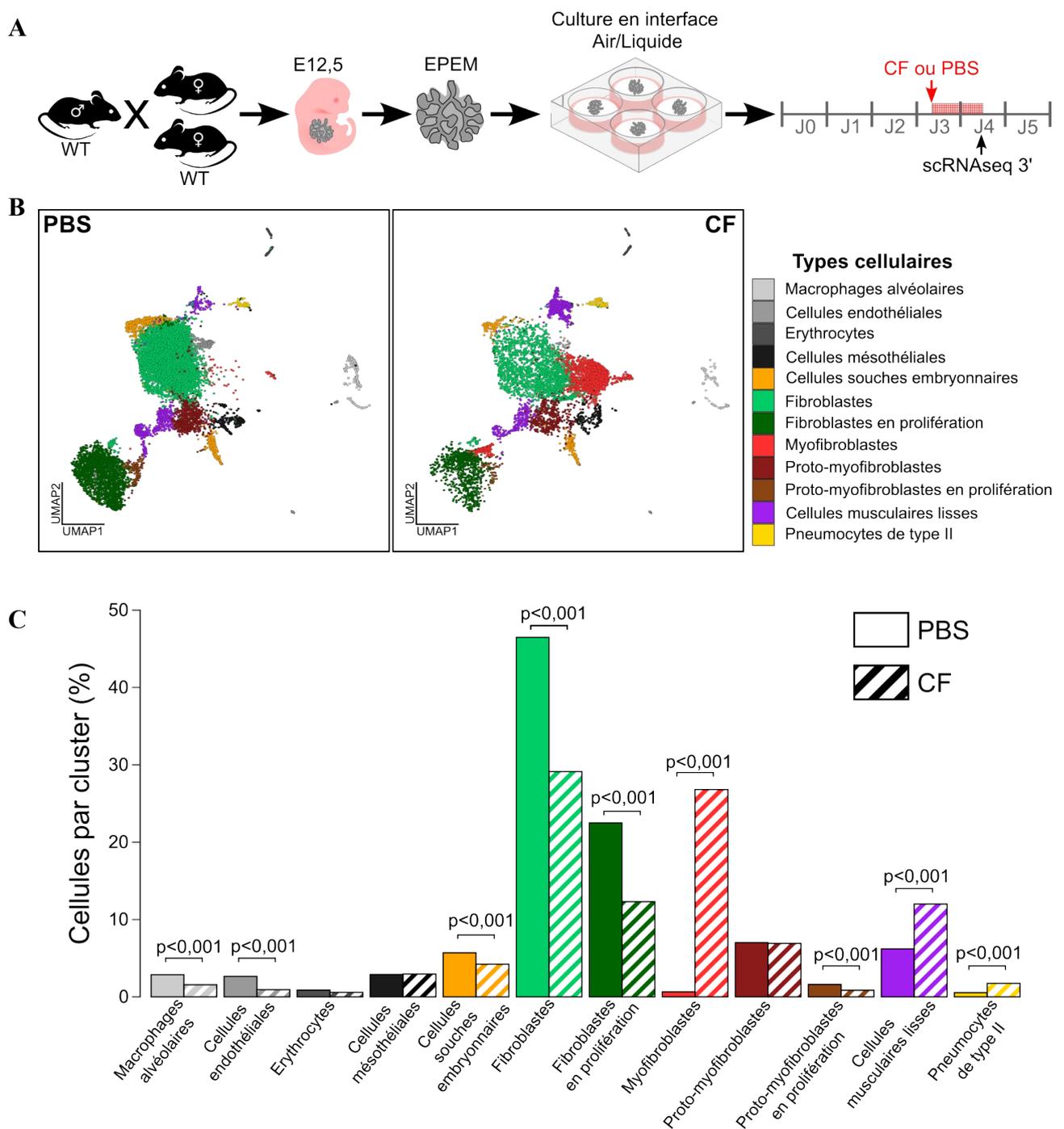


Figure 19. Caractérisation des types cellulaires après scRNAseq3' des explants pulmonaires embryonnaires murins 18 heures après traitement.

(A) Schéma du protocole expérimental permettant d'analyser les explants pulmonaires embryonnaires murins EPEM par scRNAseq3'. Les EPEM sont traités par du PBS ou le cocktail fibrosant (CF) à partir du 3^e jour de culture puis sont analysés le lendemain. WT = sauvage. (B) Représentation de deux cartographies *Uniform Manifold Approximation and Projection* (UMAP) de cellules issues d'EPEM témoins (PBS) ou traitées par le CF. Chaque type cellulaire (cluster) est défini par une couleur spécifique comme indiqué dans la légende. (C) Diagramme à barres de l'abondance relative (%) de chaque type cellulaire d'EPEM traités par le PBS ou le CF. Test statistique : Test Z.

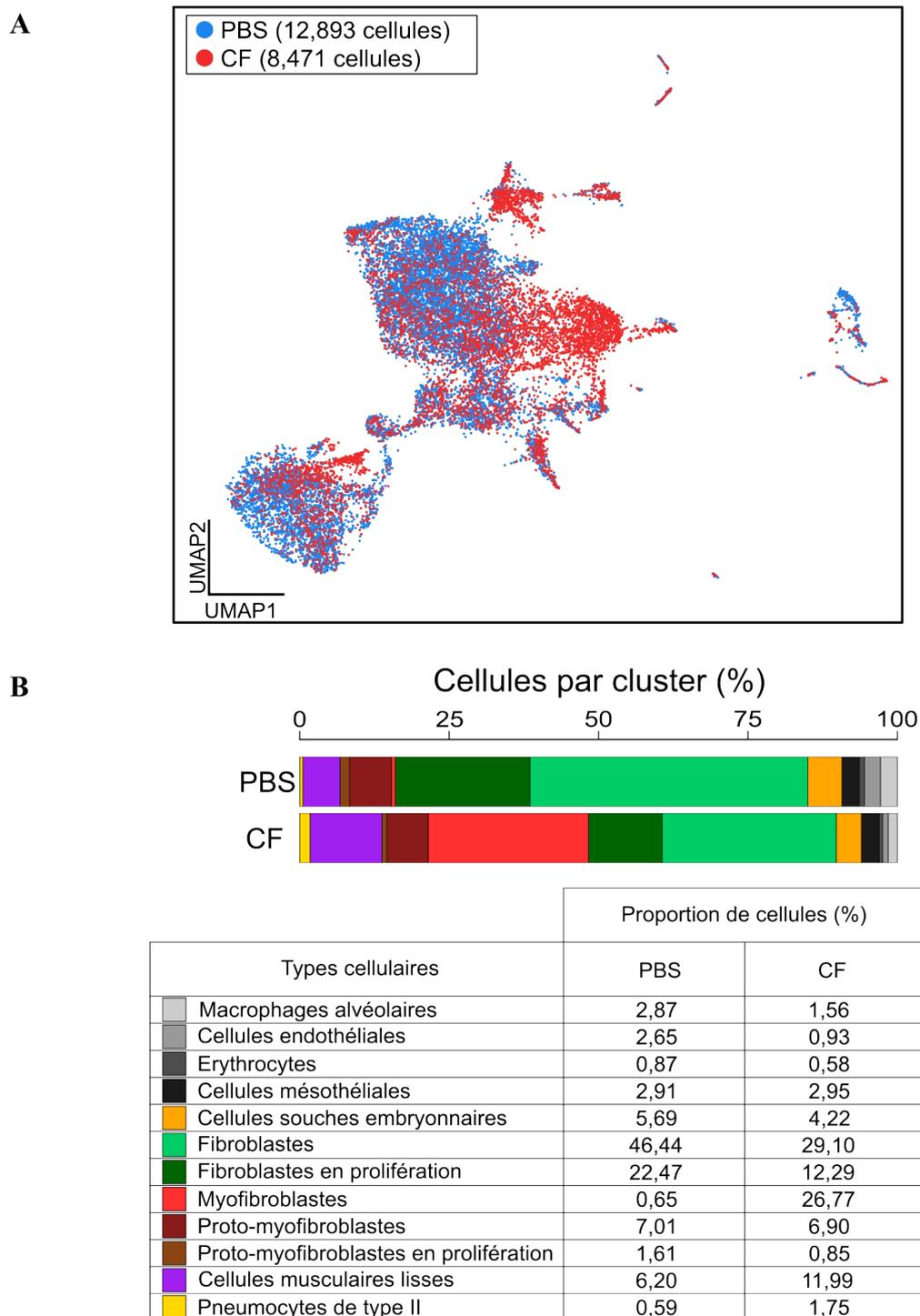


Figure 20. Analyse par single-cell RNA sequencing 3' d'explants pulmonaires embryonnaires murins (EPEMs) traités par le PBS ou le cocktail fibrosant (CF) pendant 18 heures.

(A) Représentation en cartographie *uniform manifold approximation and projection* (UMAP) sans clusterisation de cellules issues d'EPEMs témoins traitées au PBS (en bleu) ou traités par le CF (en rouge). Au total, 12,893 cellules issues d'EPEMs traités au PBS et 8,471 cellules issues d'EPEMs traités par le CF ont été analysées. (B) Diagramme à barres cumulatives du pourcentage de cellules par cluster relatif au nombre total de cellules entre les conditions PBS ou CF. Le tableau indique le nombre exact de proportions de cellules par condition et par type cellulaire.

12,3 % pour la condition PBS et CF respectivement). (Fig. 19C, Fig. 20B). Concernant les autres types cellulaires, les pneumocytes de type II sont retrouvés en quantité plus importante dans la condition CF. À l'inverse, les nombres de macrophages alvéolaires, cellules endothéliales, cellules souches embryonnaires et proto-myofibroblastes en prolifération sont diminués par rapport à la condition témoin.

La phase d'initiation de la FP entraîne donc des perturbations dans la nature des types cellulaires composant les EPÉM. Les cellules impliquées dans le développement de la fibrose, telles que les myofibroblastes et les cellules musculaires lisses, prolifèrent activement. À l'inverse, d'autres types cellulaires sont diminués dont majoritairement les fibroblastes.

4.2.2. Nature des gènes différentiellement exprimés

Les gènes différentiellement exprimés entre la condition CF et la condition PBS ont été ensuite identifiés. Nos analyses montrent que 25 gènes sont sous-exprimés et 112 gènes surexprimés dans la condition CF comparée à la condition témoin (Fig. 21A, Tableau XII et XIII). Le volcano plot interactif est disponible dans le lien URL suivant : <https://cbedart.github.io/scRNAseq/Hennion2024/VolcanoPlot/>. Parmi tous les gènes surexprimés dans la condition CF, une grande majorité est connue pour être impliquée dans l'inflammation. Certains gènes sont liés à la réponse inflammatoire aiguë comme *Saa1* (Serum amyloid A1), *Hp* (Haptoglobine) ou *Cp* (céruloplasmine) (Carleo et al., 2016; Saraswat et al., 2020; Vietri et al., 2019). D'autres gènes sont impliqués dans l'inflammation chronique comme *Cxcl13*, *Cxcl11* et *Ccl11* (Arger et al., 2019; Huaux et al., 2005; Vuga et al., 2014). Des gènes liés à l'expression de composants de la MEC sont également surexprimés comme *Coll8a1*, *Col22a1* et *Postn*, ainsi que des gènes en relation avec les processus de cicatrisation comme *Ccl2* et *Mmp9* (Caley et al., 2015; Whelan et al., 2020) (Fig. 21B). Ces résultats mettent en évidence que le CF induit une réponse génétique précoce de gènes en lien à l'inflammation et la fibrose. Plus précisément, l'analyse des 50 gènes les plus différentiellement exprimés entre ces deux conditions montrent que de nombreux gènes impliqués dans l'inflammation et la fibrose sont surexprimés par tous les types cellulaires issus d'EPÉM traités par le CF dont majoritairement les myofibroblastes (Fig. 21C).

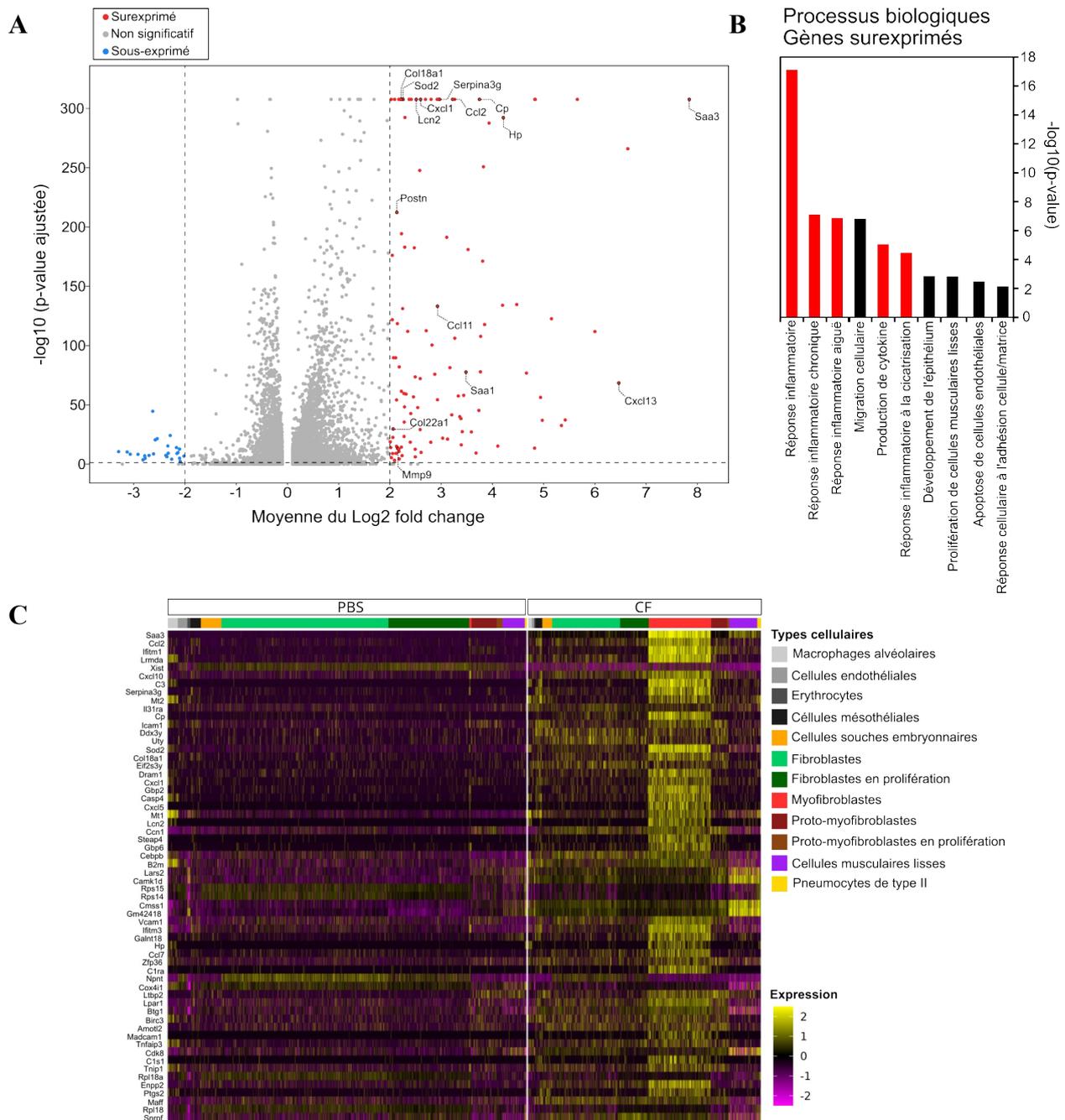


Figure 21. Le cocktail fibrosant induit la surexpression de gènes de l'inflammation et de la fibrose 18 heures après la fibrose induite.

(A) Volcano plot montrant les gènes sous-exprimés ($n=25$) en bleu ou surexprimés ($n=112$) en rouge de cellules des explants pulmonaires embryonnaires murins traités par le cocktail fibrosant (CF) comparées à la condition PBS. Les gènes indiqués en gris ($n=11\ 766$) ne montrent pas de différence significative. Les seuils de la P -value ajustée et de la moyenne du Log_2 fold change ont été fixés respectivement à 0,05 et $-2/2$. (B) Processus biologiques des gènes surexprimés après le traitement par le CF selon l'outil ToppFun. Les barres rouges indiquent les processus biologiques en lien avec l'inflammation. Les données sont fournies selon le $-\log_{10}$ (P -value). (C) Carte de chaleur des 50 gènes les plus différenciellement exprimés par type cellulaire entre les deux conditions étudiées.

Tableau XII. Liste des gènes sous-exprimés par les explants pulmonaires embryonnaires murins traités par le cocktail fibrosant.

Gène	Log2-fold change	P-value ajustée
<i>Ms4a7</i>	-3,30	3,03E-11
<i>C3ar1</i>	-3,13	5,29E-11
<i>Cd84</i>	-3,07	4,52E-09
<i>Fcrls</i>	-2,92	5,34E-09
<i>Ms4a6c</i>	-2,82	2,23E-04
<i>Mpeg1</i>	-2,79	1,04E-07
<i>Ltc4s</i>	-2,78	1,33E-05
<i>Tnf</i>	-2,70	4,40E-08
<i>Tpm3-rs7</i>	-2,63	2,63E-45
<i>Apoc2</i>	-2,61	2,17E-09
<i>Trem2</i>	-2,58	3,73E-21
<i>C1qa</i>	-2,54	3,21E-22
<i>Pld4</i>	-2,37	3,98E-08
<i>Cd300c2</i>	-2,35	6,10E-07
<i>Ccl4</i>	-2,34	4,61E-16
<i>Galnt6</i>	-2,33	6,30E-10
<i>C1qb</i>	-2,29	6,67E-25
<i>AU022793</i>	-2,26	7,07E-05
<i>C1qc</i>	-2,17	1,03E-14
<i>Cd86</i>	-2,16	9,20E-10
<i>Ifi207</i>	-2,14	1,79E-10
<i>Syng1</i>	-2,11	9,87E-06
<i>Ctss</i>	-2,11	2,25E-13
<i>Rapsn</i>	-2,09	4,96E-03
<i>Fcgr1</i>	-2,02	1,82E-07

Tableau XIII. Liste des gènes surexprimés par les explants pulmonaires embryonnaires murins traités par le cocktail fibrosant.

Gène	Log2-fold change	P-value ajustée
<i>Saa3</i>	7,84	0
<i>Madcam1</i>	6,64	9,91E-267
<i>Cxcl13</i>	6,47	3,50E-69
<i>Saa4</i>	6,00	1,54E-112
<i>Cxcl5</i>	5,66	0
<i>Vnn3</i>	5,42	5,66E-38
<i>Nts</i>	5,35	2,47E-33
<i>Ms4a4d</i>	5,15	2,39E-123
<i>Gm36107</i>	4,97	1,08E-37
<i>Gm48427</i>	4,94	5,09E-57
<i>C3</i>	4,84	0
<i>Steap4</i>	4,83	0
<i>AC106834.1</i>	4,82	3,07E-14
<i>Serpina3i</i>	4,66	1,60E-77
<i>Gm14275</i>	4,47	2,29E-135
<i>Hp</i>	4,21	6,19E-293
<i>C4b</i>	4,20	9,71E-135
<i>Serpina12</i>	4,10	5,69E-16
<i>C1ra</i>	3,93	2,39E-288
<i>Tnip3</i>	3,85	1,80E-118
<i>C1s1</i>	3,83	1,57E-251
<i>Serpina3f</i>	3,81	5,83E-172
<i>4930405A10Rik</i>	3,77	1,75E-108
<i>Il33</i>	3,77	1,42E-78
<i>Cp</i>	3,75	0
<i>Saa2</i>	3,73	4,67E-46
<i>Usp9y</i>	3,68	4,49E-10
<i>Spib</i>	3,59	6,90E-28
<i>Rgs16</i>	3,52	9,78E-182
<i>Saa1</i>	3,48	2,32E-78
<i>Gm7480</i>	3,44	8,59E-59
<i>Vnn1</i>	3,41	4,17E-28
<i>Gm11588</i>	3,39	5,38E-17
<i>Serpina3n</i>	3,39	4,32E-39
<i>Gm33782</i>	3,36	8,75E-41
<i>Gm10248</i>	3,33	3,42E-58
<i>AW112010</i>	3,27	6,21E-107
<i>Lrmda</i>	3,26	0
<i>Ccl2</i>	3,22	0
<i>Ptgs2os2</i>	3,21	2,75E-42
<i>Adamdec1</i>	3,17	4,27E-82
<i>Gm21123</i>	3,12	7,32E-22
<i>Lbp</i>	3,11	5,08E-192
<i>Cxcl9</i>	3,03	1,35E-22
<i>Serpina3g</i>	2,97	0
<i>Ifitm1</i>	2,94	0
<i>Ccl11</i>	2,93	6,14E-134

<i>Timp4</i>	2,93	4,81E-55
<i>Gbp6</i>	2,92	0
<i>Ecsr</i>	2,87	1,48E-76
<i>Gm46124</i>	2,82	3,61E-101
<i>Mt2</i>	2,80	0
<i>Npffr2</i>	2,80	3,80E-19
<i>Ch25h</i>	2,71	2,81E-113
<i>Casp4</i>	2,69	0
<i>Gm5084</i>	2,61	1,18E-10
<i>Cxcl1</i>	2,60	0
<i>Gbp9</i>	2,59	7,11E-73
<i>Csf3</i>	2,59	7,51E-30
<i>Ptgs2</i>	2,58	1,98E-248
<i>Ptx3</i>	2,54	1,99E-48
<i>Lcn2</i>	2,51	0
<i>Fabp4</i>	2,49	7,30E-07
<i>Gbp2b</i>	2,49	2,61E-74
<i>Nos2</i>	2,49	2,84E-13
<i>Gm12840</i>	2,48	3,50E-183
<i>Ntrk1</i>	2,46	1,87E-57
<i>Gbp2</i>	2,42	0
<i>Sftpc</i>	2,41	2,15E-43
<i>Gm21860</i>	2,40	2,96E-19
<i>Eif2s3y</i>	2,37	0
<i>Gm16685</i>	2,35	1,13E-112
<i>Pik3c2g</i>	2,31	8,23E-60
<i>Galnt18</i>	2,29	4,30E-293
<i>Calcr1</i>	2,29	9,54E-184
<i>Ces1f</i>	2,28	5,14E-49
<i>6720468P15Rik</i>	2,28	3,32E-36
<i>Ifi44</i>	2,28	4,73E-24
<i>Bdkrb1</i>	2,27	2,81E-60
<i>Sod2</i>	2,26	0
<i>Ces1d</i>	2,25	6,66E-132
<i>Trim34a</i>	2,24	6,69E-08
<i>Kdm5d</i>	2,23	4,45E-195
<i>Gm5149</i>	2,22	4,49E-15
<i>Gm47601</i>	2,22	3,47E-62
<i>Coll8a1</i>	2,22	0
<i>Ddx3y</i>	2,20	0
<i>Csta2</i>	2,18	4,23E-05
<i>Pthlh</i>	2,18	9,27E-83
<i>1700121C08Rik</i>	2,18	2,16E-11
<i>Htr1b</i>	2,18	3,77E-13
<i>Dram1</i>	2,17	0
<i>Mmp9</i>	2,15	8,16E-14
<i>Batf</i>	2,15	2,91E-119
<i>Dhrs9</i>	2,14	6,02E-15
<i>Postn</i>	2,13	5,02E-213
<i>Casp12</i>	2,13	6,84E-55

<i>Havcr1</i>	2,13	7,59E-16
<i>Ankrd1</i>	2,12	8,76E-10
<i>Shisa3</i>	2,11	1,93E-90
<i>Uty</i>	2,09	0
<i>Sfta2</i>	2,09	5,07E-04
<i>Esrrg</i>	2,07	1,82E-90
<i>Col22a1</i>	2,06	2,42E-30
<i>Gm47520</i>	2,06	2,81E-23
<i>Prok2</i>	2,05	1,07E-09
<i>Syn2</i>	2,05	1,44E-122
<i>Bckdhb</i>	2,05	7,49E-177
<i>Olfm4</i>	2,03	3,73E-06
<i>Cxcl10</i>	2,02	0
<i>Barx2</i>	2,02	1,15E-14
<i>Gm14249</i>	2,01	1,54E-19

Des gènes liés à l'inflammation tels que *Ccl2*, *Cxcl1*, *Ccl7* et *Cxcl5* sont surexprimés par les cellules mésothéliales et mésenchymateuses principalement les myofibroblastes (Fig. 22A). L'étude des interactions des protéines issues des gènes surexprimés par le CF révèle que de nombreux médiateurs inflammatoires interagissent entre eux. Ces protéines inflammatoires font partie de la phase aiguë de l'inflammation dont la famille Saa (*Serum Amyloid A*) et Serpina (*Serine protease inhibitor*) principalement. De nombreuses cytokines et des médiateurs du système complément interagissent entre-eux également (Fig. 22B).

En dehors de l'inflammation, des gènes associés à la fibrose sont également surexprimés par les EPEM traités par le CF (Fig.23A). Les gènes *Postn*, *Coll8a1* et *Ccn1* sont surexprimés par les myofibroblastes, les cellules mésothéliales et les proto-myofibroblastes en prolifération. *Ccn1* est également surexprimé par les pneumocytes de type II et les cellules endothéliales.

Parallèlement, l'analyse de l'ontologie des gènes à l'aide de l'application GOrilla a mis en évidence que des gènes surexprimés par les EPEM traités par le CF sont associés à l'homéostasie des ions métalliques. Ces gènes, *Mt2*, *Steap4*, *Cp*, *Lcn2* et *Sod2*, sont tous surexprimés par les myofibroblastes dans la condition CF. Les gènes *Steap4* et *Lcn2* sont uniquement surexprimés par les EPEM traités avec le CF (Fig. 23B,C).

4.3. Inhibition des marqueurs génétiques impliqués dans le développement précoce de la fibrose pulmonaire

L'analyse par scRNAseq3' a permis d'identifier des marqueurs génétiques responsables du développement précoce de la FP. Nous avons souhaité par la suite inhiber certains de ces gènes sur le modèle d'EPEM avec FP induite par le CF. Pour cela, nous avons utilisé des OAS dont les séquences nucléotidiques sont complémentaires aux transcrits des gènes cibles.

Dans un premier temps, nous avons mis au point le protocole d'inhibition à l'aide d'OAS sur des EPEM issus de souris rapporteur *Muc5b-Gfp* traités avec une administration unique d'OAS ciblant l'ARNm de *Muc5b* à différentes concentrations. Nous avons d'abord déterminé la concentration d'OAS qui induit une inhibition optimale de l'activité de ce gène. Les mesures de

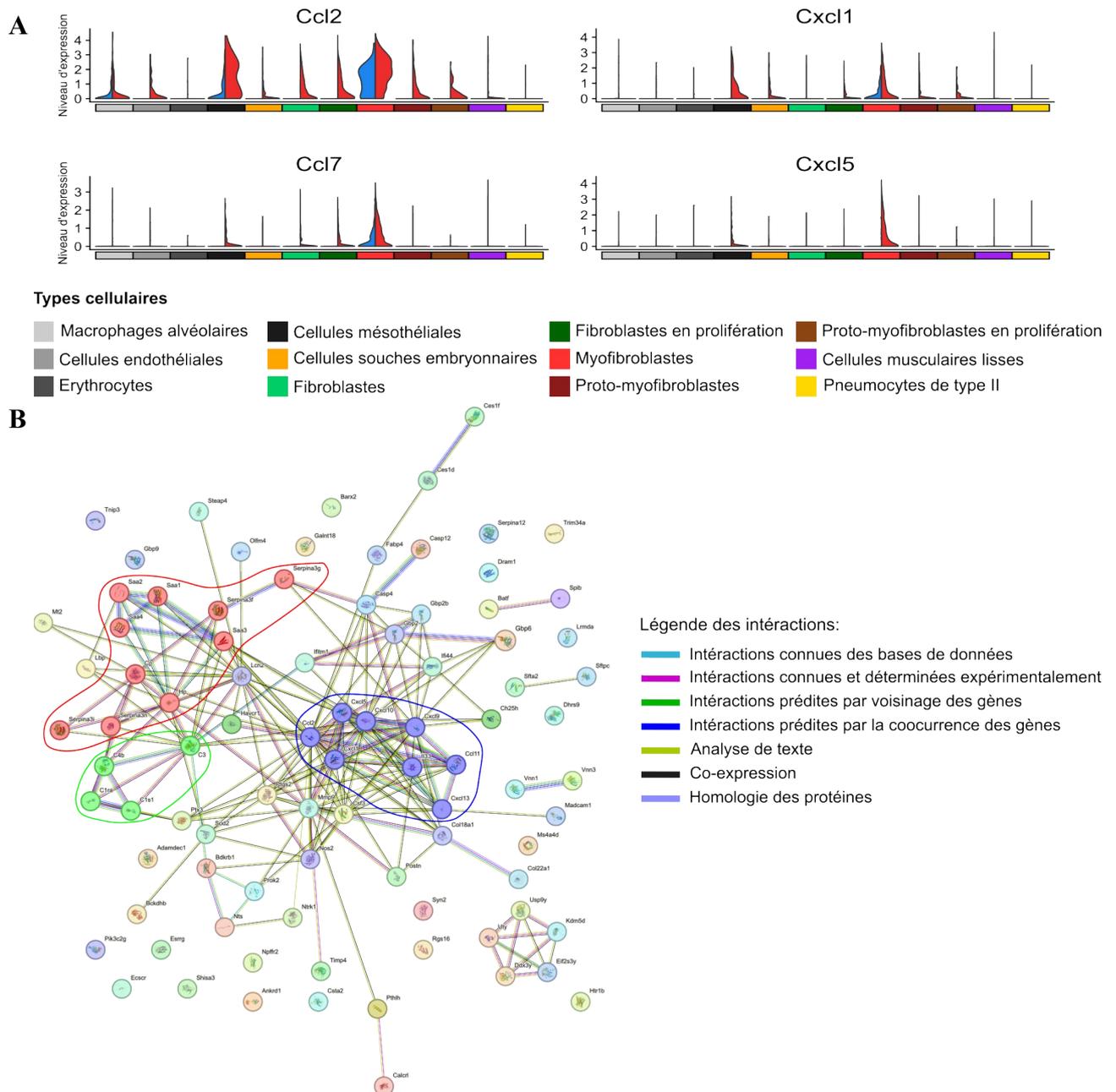


Figure 22. Gènes associés à l'inflammation surexprimés par les différents types cellulaires des explants pulmonaires embryonnaires murins après le traitement par le cocktail fibrosant et interactions protéiques.

(A) Diagrammes en violon des gènes *Ccl2*, *Cxcl1*, *Ccl7* et *Cxcl5* liés à l'inflammation exprimés par les différents types cellulaires issus d'explants pulmonaires embryonnaires murins traités par le PBS (en bleu) ou par le CF (en rouge). Les clusters sont définis par des couleurs spécifiques indiquées dans la légende. **(B)** Réseaux des interactions protéiques issus des gènes surexprimés par le CF. Les 3 familles de protéines associées à l'inflammation sont respectivement entourées en rouge, vert ou bleu pour les médiateurs de la phase aiguë de l'inflammation, les protéines du système complément et les cytokines. Ce résultat a été obtenu grâce à l'application STRING.

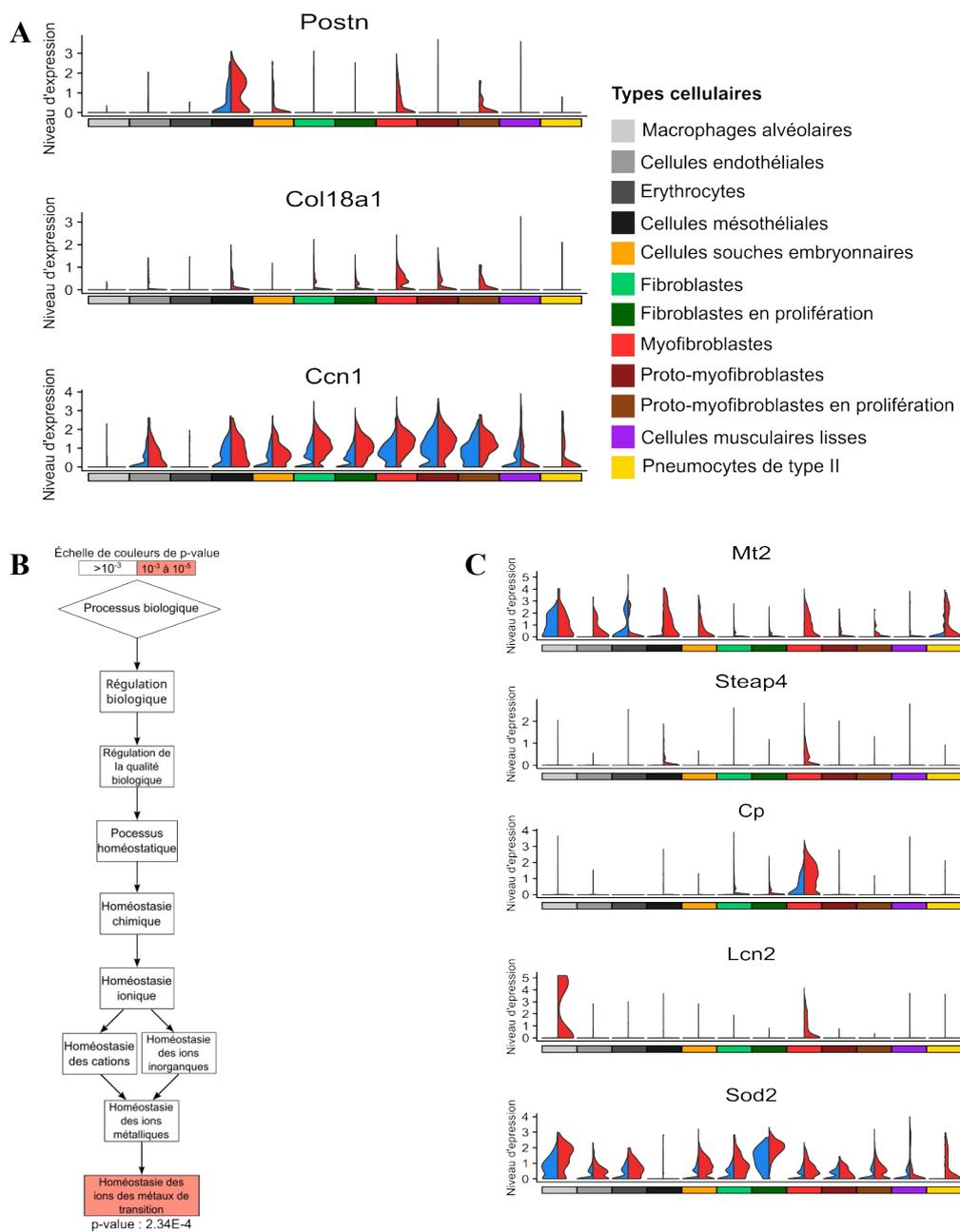


Figure 23. Gènes associés à la fibrose et à l'homéostasie des ions métalliques surexprimés par les différents types cellulaires des explants pulmonaires embryonnaires murins après le traitement par le cocktail fibrosant.

(A) Les différents diagrammes en violon mettent en évidence l'expression des gènes *Postn*, *Col18a1* et *Ccn1* liés à la fibrose par les différents types cellulaires après traitement par le PBS (en bleu) ou par le cocktail fibrosant (en rouge). (B) Graphique représentant le processus biologique en lien avec les gènes surexprimés par les explants pulmonaires embryonnaires murins (EPEM) traités par le cocktail fibrosant (CF). Selon l'outil GOrilla, de nombreux gènes surexprimés sont impliqués dans l'homéostasie des ions métalliques. (C) Diagrammes en violons de l'expression des gènes *Mt2*, *Steap4*, *Cp*, *Lcn2* et *Sod2* impliqués dans l'homéostasie des ions métalliques par les différents types cellulaires des EPEM. Les expressions des gènes par les EPEM traités au PBS sont indiquées en bleu et ceux traités par le CF en rouge.

l'intensité de fluorescence émise par le tag Gfp ont permis de déterminer le niveau d'inhibition induite par l'OAS selon la concentration administrée. Une fois la concentration optimale déterminée, une administration quotidienne d'OAS ciblant l'ARNm de *Muc5b* dans le modèle d'EPeM *Muc5b*-Gfp a été effectuée afin de déterminer le pourcentage d'inhibition induit.

Trois gènes surexprimés précocement dans la condition CF ont été choisis comme cible d'inhibition. Il s'agit des gènes *Saa3*, *Lcn2* et *Serpina3g* et une administration répétée d'OAS ciblant chacun de ces gènes individuellement a été effectuée dans un modèle d'EPeM.

4.3.1. Identification d'une concentration optimale d'inhibition

Dans un premier temps, nous avons déterminé la concentration optimale d'inhibition de l'activité du gène *Muc5b*. Pour cela, nous avons utilisé une gamme de concentration d'OAS à 0,5, 1, 3 et 5 μM qui ont été administrées une seule fois au 5^e jour de culture des EPeM en culture ALI (Fig. 24A).

Les images d'EPeM en culture ALI avant et 24 heures après les administrations des différentes concentrations d'OAS semblent montrer une diminution de l'intensité de fluorescence émise par *Muc5b*-Gfp. Cette observation a été confirmée par l'analyse quantitative de la variation de fluorescence émise par le tag Gfp entre le 5^e et 6^e jours de culture. Plus la concentration en OAS est importante et plus la variation de fluorescence diminue suggérant une diminution de la production de *Muc5b* (Fig. 24B,C). L'analyse par immunofluorescence de coupes d'EPeM montre une diminution de plus en plus importante de la production de *Muc5b* dans la trachée et les grandes bronches à des concentrations croissantes d'OAS. Cette inhibition est spécifique de *Muc5b*, car les quantités de *Muc5ac* ne sont pas modifiées, quelles que soient les concentrations d'OAS *Muc5b* administrées (Fig. 24D). En conséquence, l'inhibition de gène par l'utilisation d'OAS est spécifique et dose-dépendante.

Pour la suite du projet, nous avons décidé de sélectionner une concentration d'OAS à 2 μM puisque l'inhibition de *Muc5b* était satisfaisante entre 1 et 3 μM . Nous ne souhaitons pas utiliser une concentration supérieure pour des administrations répétées afin de réduire au maximum la cytotoxicité induite sur les EPeM.

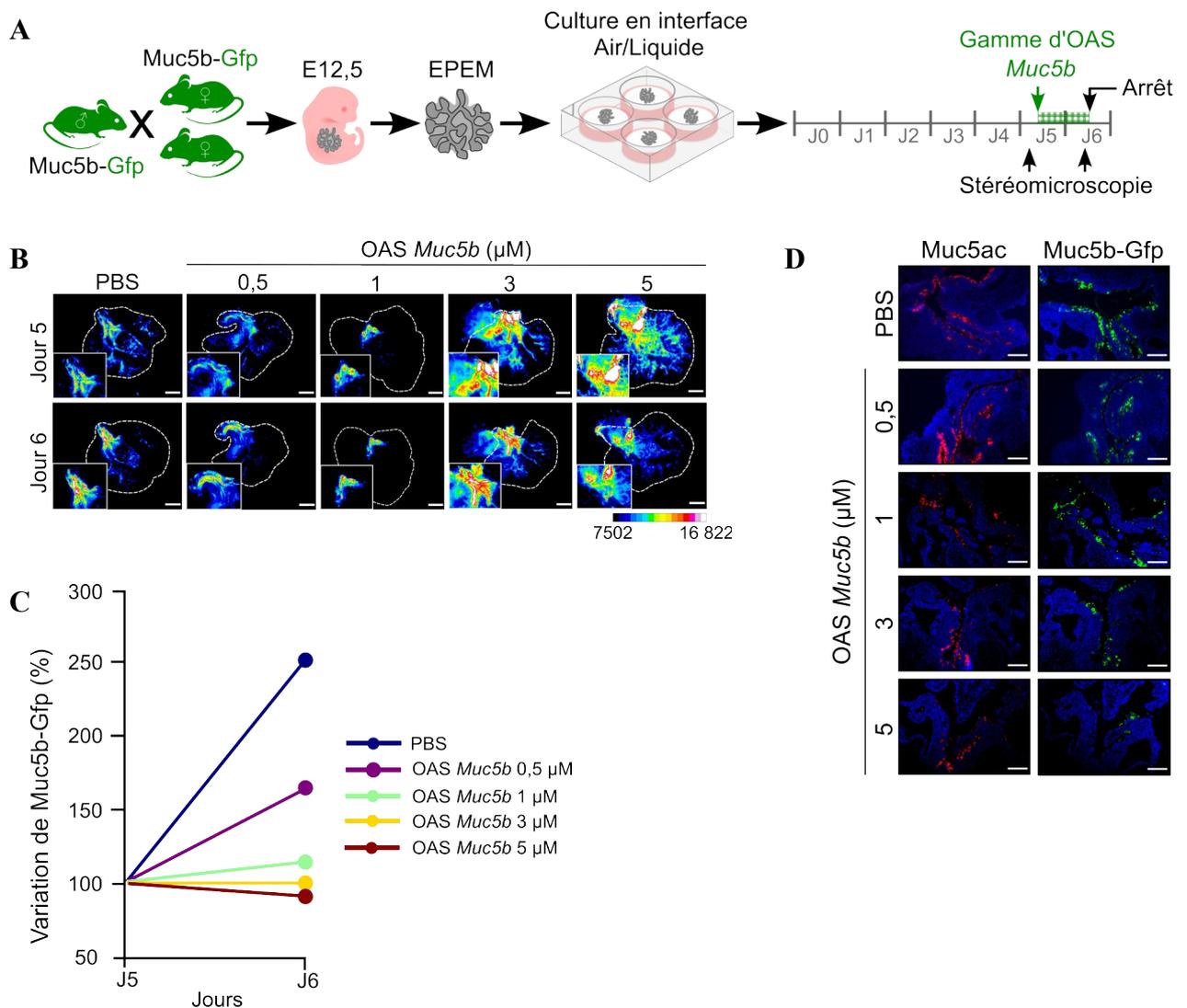


Figure 24. L'administration d'oligonucléotides antisens induit une inhibition dose-dépendante et spécifique de l'activité du gène cible.

(A) Représentation schématique du protocole expérimental. Une gamme de concentration d'oligonucléotides antisens (OAS) de 0,5, 1, 3 et 5 μM ciblant l'ARNm de *Muc5b* a été réalisée au 5^e jour de culture en interface air/liquide (ALI) d'explants pulmonaires embryonnaires murins (EPEM) issus de souris Muc5b-Gfp. Des photos des EPEM en culture à l'aide d'un stéréomicroscope et l'utilisation du logiciel ImageJ/FIJI ont permis de déterminer les valeurs d'intensité de fluorescence émises par le tag Gfp avant et après 24 heures de traitement par l'OAS. (B) Photos d'EPEM en culture ALI en pseudocoloration 16 couleurs avant (Jour 5) et après traitement (Jour 6) par les différentes concentrations d'OAS. L'intensité de fluorescence émise par le tag Gfp est représentée par les différentes couleurs de la pseudocoloration. L'intensité de fluorescence est comprise entre 7 502 et 16 822 unités arbitraires. Échelle = 500 μm. (C) Graphique représentant la variation de fluorescence émise par le tag Gfp entre les jours 5 et 6 de culture en fonction des différentes concentrations d'OAS ciblant l'ARNm de *Muc5b*. (D) Images représentatives en immunofluorescence de coupes d'EPEM de la trachée et des grandes bronches traitées à différentes concentrations d'OAS. La mucine Muc5ac est colorée en rouge, Muc5b en vert et l'ADN en bleu. Échelle = 100 μm.

4.3.2. Administrations répétées d'oligonucléotides antisens sur le modèle de souris rapporteur Muc5b-Gfp

Afin d'évaluer le pourcentage d'inhibition induit par l'OAS, des administrations répétées d'OAS à 2 μ M ciblant les ARNm de *Muc5b* ou *Muc5ac* (témoin) ont été effectuées dans le milieu de culture d'EPEM issus de souris transgéniques Muc5b-Gfp. Les administrations ont eu lieu entre le 2^e et le 7^e jour de culture (Fig. 25A). Chaque jour, des photos d'EPEM ont été prises au stéréomicroscope. L'administration répétée d'OAS *Muc5b* ralentit la production de Muc5b par rapport au contrôle traité par un OAS *Muc5ac*. Les analyses quantitatives des variations de fluorescence du tag Gfp montrent que l'OAS *Muc5b* inhibe la production de cette mucine d'environ 40 % (Fig. 25B,C).

L'administration répétée de 2 μ M d'OAS dans notre modèle expérimental permet donc de diminuer l'expression d'un gène sans l'inactiver complètement.

4.3.3. Inhibition des gènes précocement surexprimés dans la fibrose pulmonaire à l'aide d'oligonucléotides antisens

Afin de limiter le développement de la FP induite sur le modèle d'EPEM, des OAS ciblant des gènes précocement surexprimés dans la condition CF identifiés par scRNAseq3' ont été utilisés. Les gènes *Saa3*, *Lcn2* et *Serpina3g* ont été choisis car ils sont surexprimés dans la condition CF principalement par les myofibroblastes. Une grande partie des types cellulaires n'expriment pas ces gènes dans la condition PBS, ce qui en fait des cibles de choix dans la stratégie d'inhibition de la fibrose induite (Fig. 26A).

Le protocole expérimental de cette étude est le même que celui présenté dans la figure 12A, hormis le fait que les EPEM sont issus de souris sauvages et qu'aucun d'entre eux n'a été traité par du PBS. En plus de l'administration du CF, 2 μ M d'OAS ciblant les ARNm des gènes *Saa3*, *Lcn2* ou *Serpina3g* ont été ajoutés. Parallèlement, des EPEM traités par du CF et des OAS ciblant l'ARNm de *Muc5ac* ont été utilisés comme témoin.

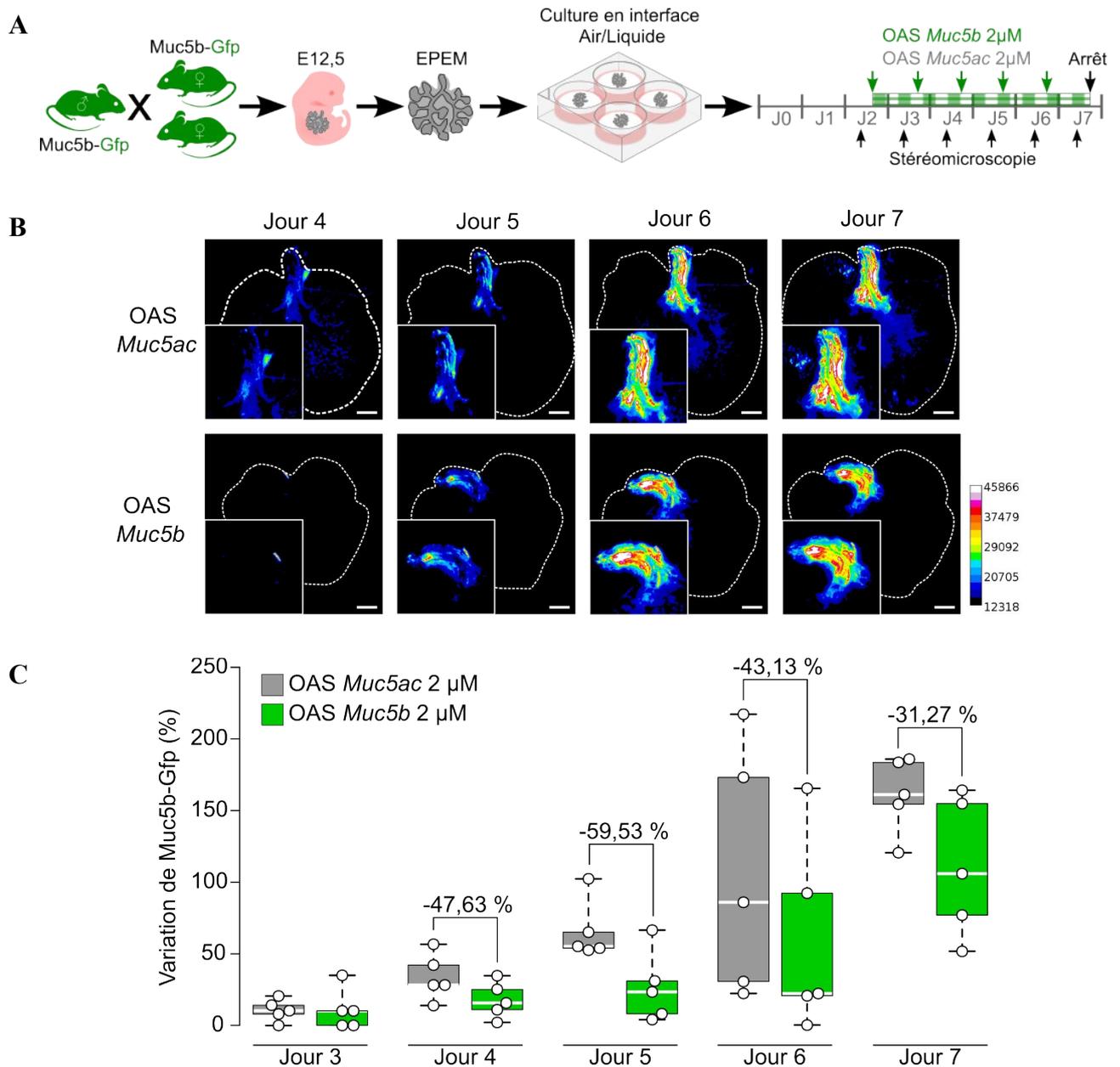


Figure 25. L'administration répétée d'oligonucléotide antisens *Muc5b* ralentit la production de *Muc5b*.

(A) Schéma du protocole expérimental. Des administrations quotidiennes d'oligonucléotide antisens (OAS) à 2 µM ciblant l'ARNm de *Muc5b* ont été effectuées entre le 2^e et 6^e jour de culture des explants pulmonaires embryonnaires murins (EPEM) issus de souris *Muc5b-Gfp*. En parallèle, des EPEM traités par un OAS à 2 µM ciblant l'ARNm de *Muc5ac* ont servi de témoins. Des photos des EPEM en culture en épifluorescence de *Muc5b-Gfp* avec une exposition de 3 sec. ont été effectuées quotidiennement à partir du 2^e jour jusqu'au 7^e jour de culture. (B) Images représentatives en pseudocoloration 16 couleurs d'EPEM traités par 2 µM d'OAS *Muc5b* ou *Muc5ac* entre les jours 4 à 7 de culture. Les intensités de fluorescence émises par le tag *Gfp* sont comprises entre 12 318 et 45 866 unités arbitraires. Échelle = 500 µm. (C) Graphique représentant la variation de fluorescence de *Muc5b-Gfp* entre les jours 3 à 7 de culture en fonction de la nature de l'OAS administré. Pour un jour donné, les comparaisons des moyennes entre chaque cohorte ont permis de calculer le pourcentage minimum d'inhibition induit par l'OAS *Muc5b*. n = 5 EPEM/groupe/jour.

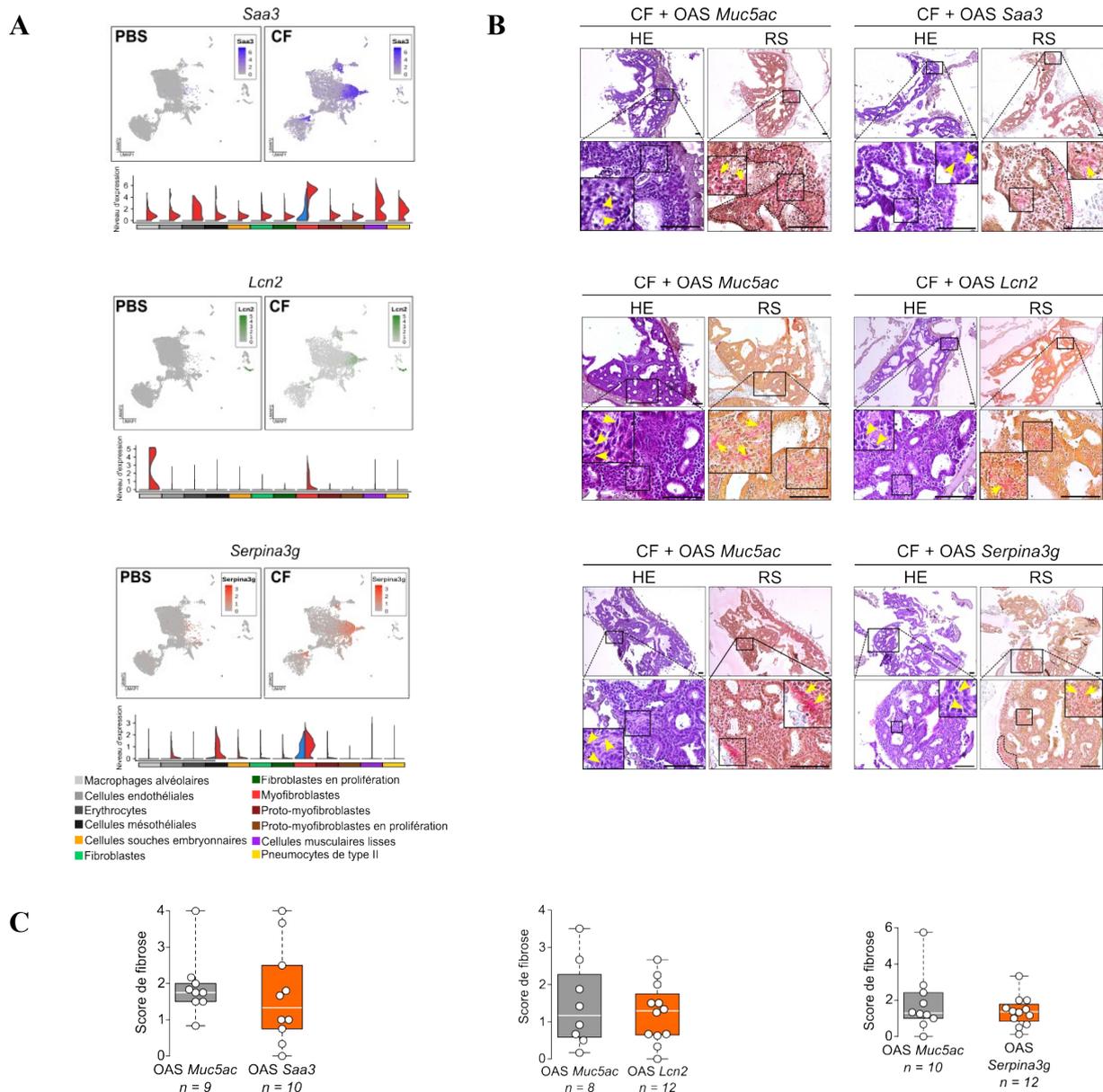


Figure 26. Inhibition des gènes *Saa3*, *Lcn2* et *Serpina3g* par des oligonucléotides anti-sens sur le modèle d'explant pulmonaire embryonnaire murin.

(A) Niveaux d'expressions des gènes *Saa3*, *Lcn2* et *Serpina3g* par les différents types cellulaires d'explants pulmonaires embryonnaires murins (EPEM) traités par du PBS (bleu) ou le cocktail fibrosant (CF, rouge). Un type cellulaire est désigné par une couleur spécifique comme indiqué dans la légende. (B) Images représentatives de coupes histologiques en coloration hématoxyline/éosine (HE) et rouge sirius (RS) d'EPEM à 5 jours de culture traités par le CF et les oligonucléotides anti-sens (OAS) ciblant les ARNm des gènes *Saa3*, *Lcn2* ou *Serpina3g*. Un OAS ciblant l'ARNm de *Muc5ac* est utilisé comme témoin. Les têtes de flèches représentent les cellules fusiformes. Les flèches indiquent les dépôts de collagène. Les zones entourées par les pointillés noirs correspondent aux régions denses de collagène. Échelle : 100 μ m. (C) Score de fibrose des EPEM traités par le CF et par les OAS ciblant respectivement les ARNm des gènes *Saa3*, *Lcn2* et *Serpina3g*. Des EPEM traités par le CF et l'OAS qui cible l'ARNm de *Muc5ac* sont utilisés comme témoins de l'étude. N = 9–12 selon la condition. Test statistique : Wilcoxon-Mann-Whitney.

Comparativement à la condition témoin traitée par l'OAS *Muc5ac*, l'administration d'OAS ciblant les ARNm des gènes *Saa3*, *Lcn2* et *Serpina3g* ne semblent pas limiter le développement de la FP induite. Des dépôts de collagène et des cellules fusiformes interstitielles sont observés en périphérie pulmonaire dans tous les EPEM, quel que soit l'OAS administré (Fig. 26B). Les analyses de score de fibrose ne permettent pas de mettre en évidence des différences significatives entre les EPEM témoins ou traités par les différents OAS ciblant les gènes d'intérêt (Fig. 26C).

L'administration d'OAS inhibant individuellement les gènes *Saa3*, *Lcn2* et *Serpina3g* dans notre modèle expérimental n'a pas permis, dans nos conditions expérimentales, de montrer un ralentissement du développement de la FP induite.

4.4. Le modèle de coupes de poumons murins adultes

Le modèle d'EPEM a permis de déterminer un CF induisant une FP caractérisée par une accumulation de cellules fusiformes et de MEC dans les régions basales et sous-pleurales des poumons. Cependant, le modèle d'EPEM est un modèle embryonnaire. Nous avons donc testé l'effet du CF dans un modèle de coupes de poumons de souris adulte (PCLS) en culture.

4.4.1. Induction expérimentale d'une fibrose pulmonaire sur le modèle de PCLS

Dans un premier temps, le développement de la FP induite par le CF sur le modèle de PCLS a été suivi en culture. Plusieurs paires de PCLS comparables selon leurs morphologies ont été choisies. Au sein d'une paire, une PCLS a été traitée par du PBS et une autre par le CF. Les PCLS issues du modèle de souris transgénique rapporteur *Acta2-Rfp* permettent de suivre en temps réel à l'aide d'un stéréomicroscope l'évolution de la FP par fluorescence. Des administrations répétées de CF ont eu lieu dans le milieu de culture de PCLS tous les 2 jours pour une durée totale de culture de 15 jours (Fig. 27A).

Au stéréomicroscope en lumière blanche, nous observons une accumulation péribronchique progressive d'*Acta2-Rfp* pour les PCLS traitées par le CF par rapport aux témoins traités par le PBS dès la 1^{re} semaine de culture. Cette observation est confirmée par l'analyse quantitative de la variation de fluorescence émise par *Acta2-Rfp* pour toutes les paires de PCLS étudiées (Fig. 27B,C). Les analyses par immunofluorescence mettent en évidence des dépôts du marqueur de

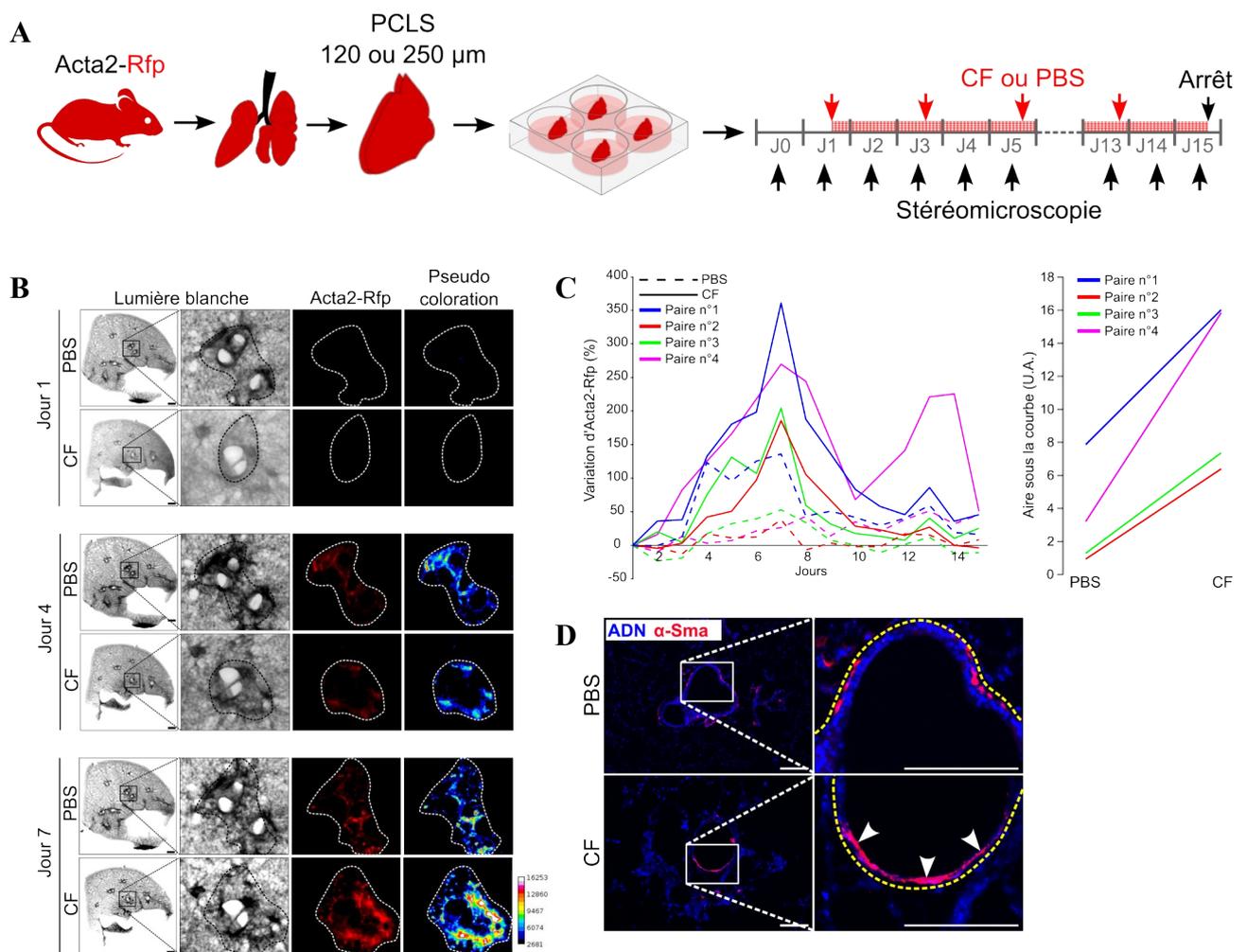


Figure 27. L'administration du cocktail fibrosant favorise l'accumulation péribronchique d'Acta2-Rfp sur le modèle de tranches épaisses de poumons murins adultes.

(A) Représentation schématique du protocole expérimental. Une souris Acta2-Rfp a été tuée et les poumons ont été utilisés pour préparer des tranches épaisses de poumons murins adultes (PCLS) sériées d'une épaisseur de 120 ou 250 μm . Des paires de PCLS sériées ont été immergées dans du milieu de culture DMEM/F12. Du cocktail fibrosant (CF) ou du PBS (témoin) a été administré tous les deux jours à partir du 1^{er} jour jusqu'au 15^e jour de culture. La production d'Acta2-Rfp a été suivie au stéréomicroscope. (B) Suivi de 2 tranches épaisses de poumons sériées (2 PCLS) issues d'une souris adulte Acta2-Rfp au jour 1, 4 et 7 de culture. Une PCLS témoin a été traitée avec du PBS et l'autre par le CF. Les expositions de la lumière blanche et de la lumière de stimulation d'Acta2-Rfp sont respectivement de 100 ms et 1 sec. L'intensité de fluorescence émise par le tag Rfp est comprise entre 2 681 et 16 253 unités arbitraires. Échelle : 1 mm. (C) Graphique représentant la variation de l'intensité de fluorescence émise par Acta2-Rfp des bronches entre les PCLS témoins traitées par le PBS (courbes en pointillés) et les PCLS traitées par le CF (courbes pleines) entre les jours 1 à 15 de culture (à gauche). Un total de 4 paires de PCLS sériées a été comparé. Une couleur de courbe correspond à une comparaison d'une paire de PCLS. Graphique comparant les valeurs d'aires sous les courbes en unité arbitraire (U.A.) entre les conditions PBS et CF (à droite). (D) Images représentatives en immunofluorescence de coupes de PCLS traitées avec du PBS ou le CF. Les bronches sont entourées par les pointillés jaunes. Les têtes de flèches indiquent les dépôts d' α -Sma. L'ADN est marqué en bleu et l' α -Sma en rouge. Échelle : 500 μm .

fibrose α -Sma autour des bronches en lien avec la surexpression d'*Acta2-Rfp* identifiée précédemment (Fig. 27D).

Les colorations histologiques en HE et RS montrent que le CF induit une fibrose modérée localisée en périphérie des poumons associée à une déformation des structures alvéolaires et stimule la formation de collagène dans les alvéoles pulmonaires (Fig. 28A). Similairement aux résultats obtenus pour le modèle d'EPeM traité au CF, les analyses par immunofluorescence de coupes de PCLS montrent que des dépôts d' α -Sma sont localisés dans les régions sous-pleurales. L'analyse tridimensionnelle par microscopie confocale montre que les dépôts d' α -Sma forment un réseau en périphérie pulmonaire (Fig. 28B,C).

Comme dans le modèle d'EPeM, l'administration du CF dans le modèle adulte de PCLS induit une FP qui reste cependant modérée.

4.4.2. Inhibition de *Muc5b* sur le modèle de PCLS par oligonucléotides antisens

Tout d'abord, la détermination de la concentration optimale d'inhibition des OAS sur le modèle de PCLS issus de souris *Muc5b-Gfp* a été effectuée. Pour cela, une gamme d'OAS ciblant l'ARNm de *Muc5b* allant de 1 à 5 μ M a été testée. L'administration des OAS a été effectuée tous les 2 jours à partir du 1^{er} jusqu'au 7^e et dernier jour de culture des PCLS (Fig. 29A).

Comparativement à la condition témoin traitée avec du PBS, les OAS à 2 et 5 μ M limitent la production de *Muc5b* par les PCLS en culture. En effet, la variation de l'intensité de fluorescence émise par *Muc5b-Gfp* au niveau des bronches est diminuée pour ces deux concentrations. L'administration d'OAS à 1 μ M n'est pas suffisante pour limiter la synthèse de *Muc5b* (Fig. 29B,C).

Les OAS limitent donc la production de *Muc5b* sur le modèle de PCLS à partir de 2 μ M. Pour la suite de l'étude, une concentration d'OAS à 5 μ M a été choisie.

Afin de déterminer le pourcentage d'inhibition moyen induit par l'administration de 5 μ M d'OAS, cinq paires de PCLS ayant des morphologies similaires ont été formées. Pour une paire, une

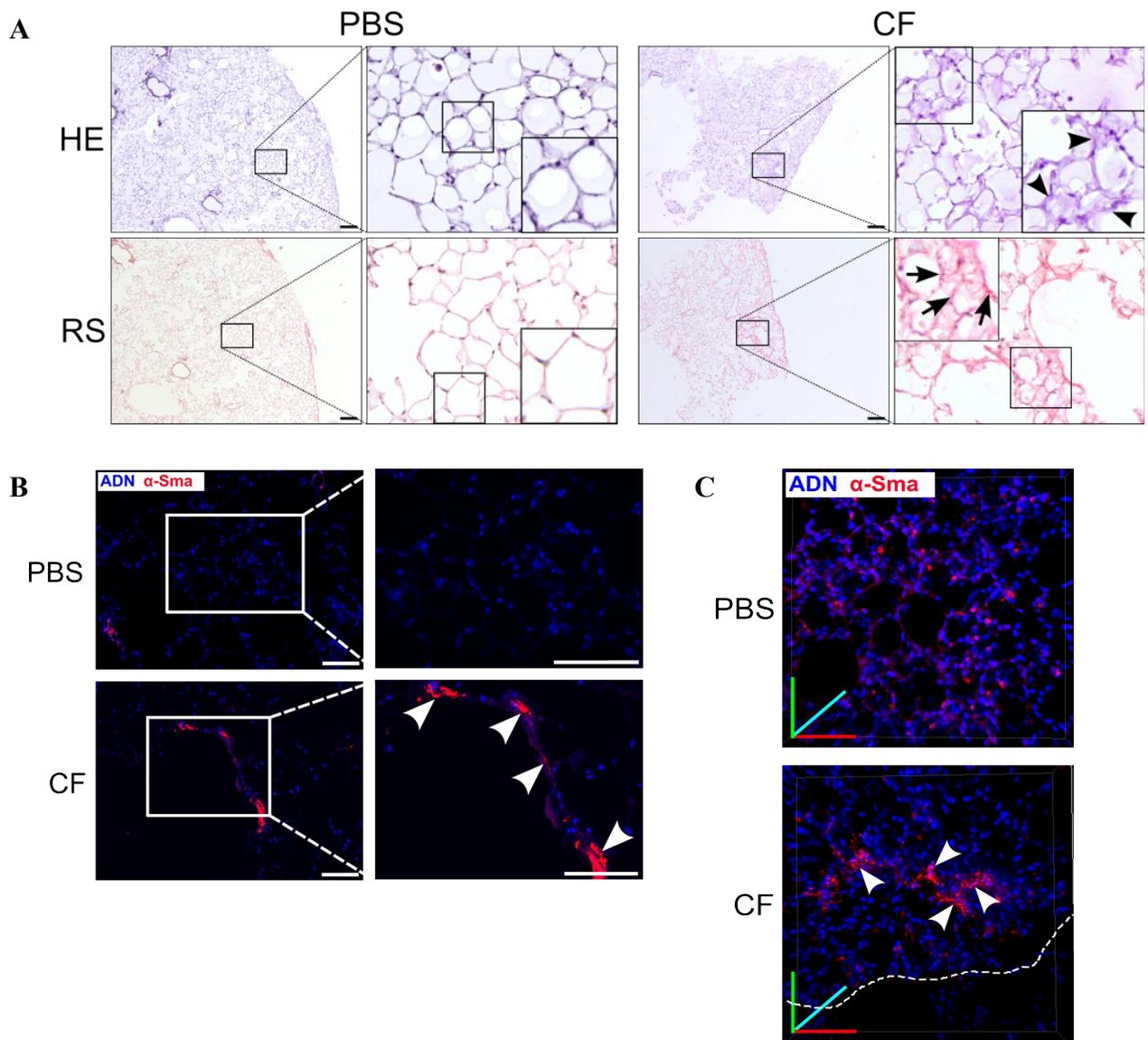


Figure 28. Le cocktail fibrosant induit une fibrose pulmonaire périphérique modérée sur le modèle de tranches épaisses de poumons de souris adultes.

(A) Images représentatives de coupes de tranches épaisses de souris adultes (PCLS) traitées par du PBS ou le cocktail fibrosant (CF) en coloration hématoxyline/éosine (HE) ou rouge sirius (RS). Les têtes de flèches indiquent les structures alvéolaires déformées. Les flèches montrent des fibres de collagène dans les alvéoles pulmonaires. Échelle : 500 μ m. (B) Images représentatives en immunofluorescence de coupes de PCLS traitées avec du PBS ou le CF. Les têtes de flèches indiquent les dépôts d' α -Sma en périphérie pulmonaire. L'ADN est marqué en bleu et l' α -Sma en rouge. Échelle : 500 μ m. (C) Images par microscopie confocale de la périphérie pulmonaire de PCLS de 120 μ m d'épaisseur traitées par du PBS ou le CF. Les pointillés blancs délimitent la périphérie du poumon. Les têtes de flèches indiquent les dépôts d' α -Sma. L'ADN est marqué en bleu et l' α -Sma en rouge. Échelle : X (en rouge), 50 μ m ; Y (en vert), 50 μ m ; Z (en cyan), 45 μ m.

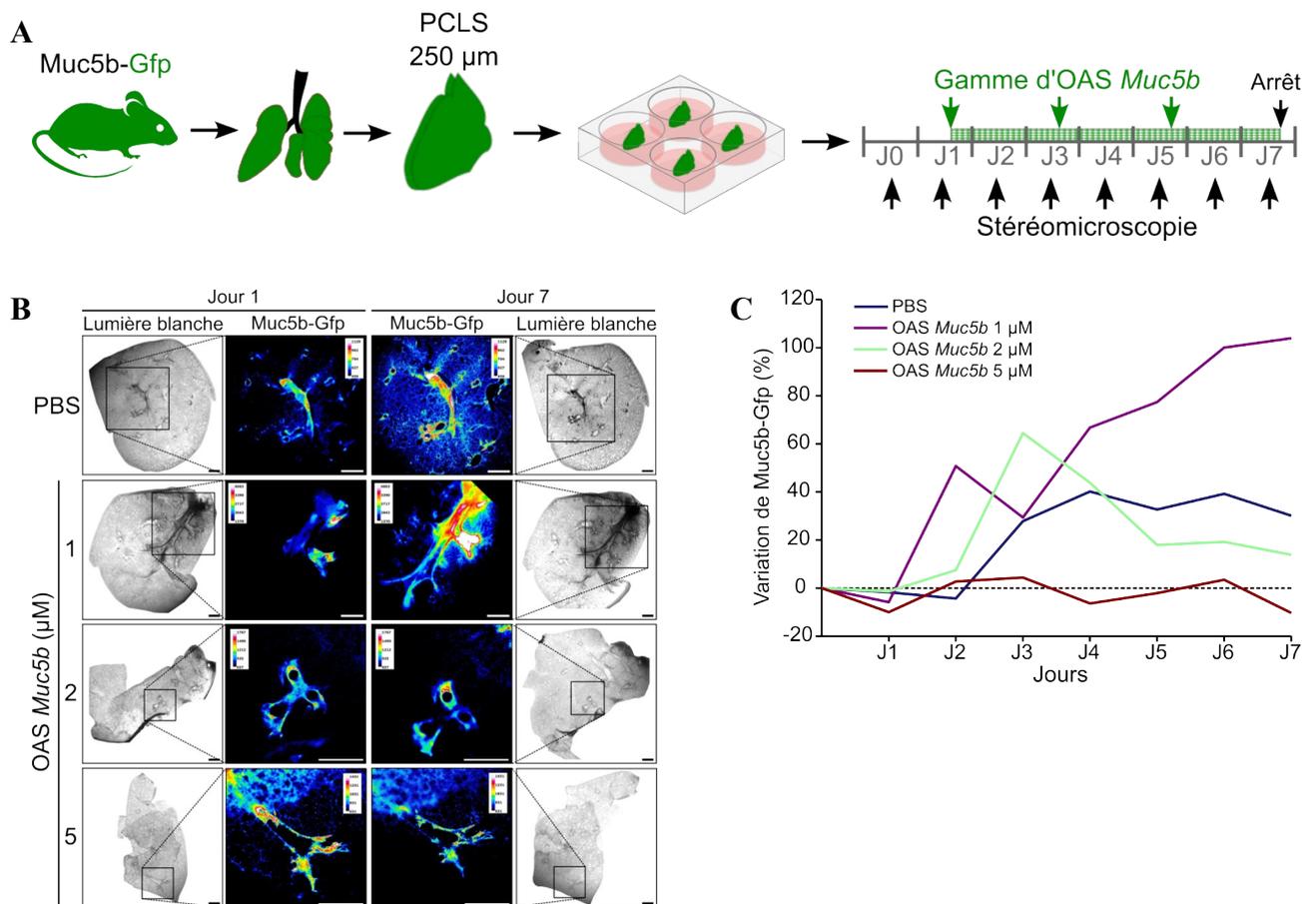


Figure 29. Gamme de concentration d'oligonucléotides antisens ciblant *Muc5b* sur le modèle de tranches épaisses de poumons de souris *Muc5b-Gfp*.

(A) Représentation schématique du protocole expérimental. Une gamme de concentration d'oligonucléotides antisens (OAS) de 1, 2 et 5 µM ciblant l'ARNm de *Muc5b* a été réalisée et administrée tous les 2 jours à partir du 1^{er} jusqu'au 7^e jour de culture de tranches épaisses de poumons (PCLS) issues d'une souris *Muc5b-Gfp*. Les valeurs d'intensité de fluorescence émises par le tag Gfp avant et après traitement par l'OAS ont été déterminées à l'aide ImageJ/FIJI par l'analyse d'images des PCLS en culture prises à l'aide d'un stéréomicroscope. (B) Images en lumière blanche et en pseudocoloration 16 couleurs *Muc5b-Gfp* de PCLS au 1^{er} et au 7^e jour de culture. La PCLS témoin a été traitée avec du PBS. Échelle : 1 mm. (C) Graphique représentant la variation de la fluorescence émise par le tag Gfp en fonction de la concentration d'OAS *Muc5b* administrée entre les jours 1 à 7 de culture.

PCLS témoin a été traitée par un OAS *Muc5ac* et l'autre PCLS a été traitée par un OAS *Muc5b*. L'administration des OAS a été effectuée tous les 2 jours à partir du 2^e jusqu'au 9^e jour de culture des PCLS (Fig. 30A).

L'intensité de fluorescence émise par Muc5b-Gfp dans les bronches est plus importante pour les PCLS traitées avec un OAS *Muc5ac* comparée à celles traitées avec un OAS *Muc5b*. L'administration répétée d'OAS ciblant l'ARNm de *Muc5b* semble limiter la synthèse de Muc5b-Gfp comparé aux PCLS traitées par un OAS *Muc5ac* (Fig. 30B). L'analyse quantitative de la variation de l'intensité de fluorescence émise par Muc5b-Gfp confirme cette observation. Parmi les 5 paires étudiées, toutes les PCLS traitées par l'OAS *Muc5b* ont une intensité de fluorescence plus faible par rapport aux témoins traités par l'OAS *Muc5ac* (Fig. 30C).

Similairement au résultat obtenu dans le modèle d'EPeM, l'administration de 5 μ M d'OAS *Muc5b* dans le modèle de PCLS induit un pourcentage d'inhibition de la synthèse de Muc5b d'environ 40 % (Fig. 30D).

Nos résultats démontrent que les OAS peuvent induire une inhibition de la production de protéine dans le modèle de PCLS. Ces inhibiteurs pourront être utilisés afin d'induire une inhibition de la production de protéines impliquées dans le développement précoce de la FP.

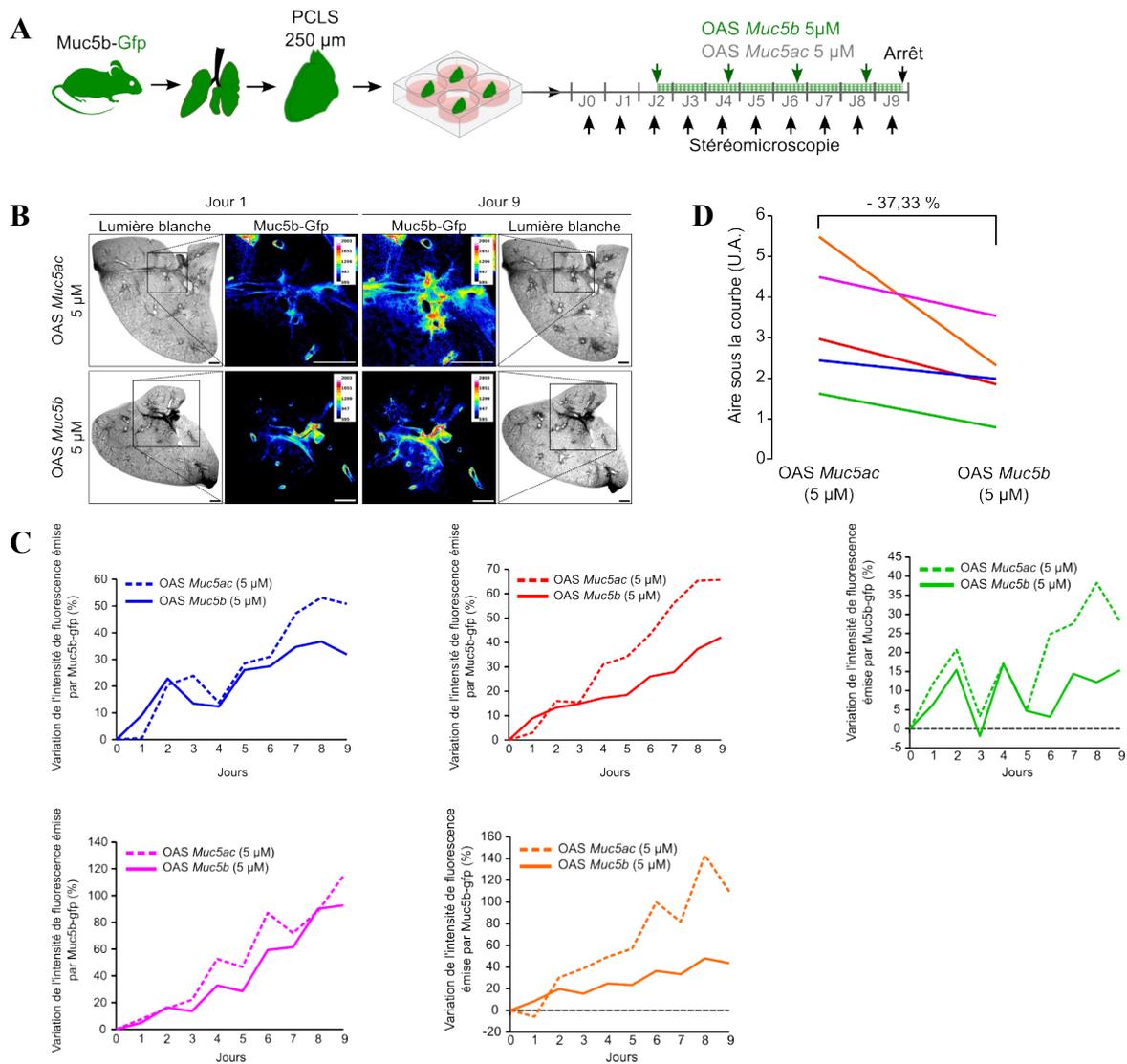


Figure 30. Inhibition de *Muc5b* par un oligonucléotide antisens sur le modèle de tranches épaisses de poumons.

(A) Schéma du protocole expérimental. Des administrations d'oligonucléotides antisens (OAS) à 5 µM ciblant l'ARNm de *Muc5b* ont été effectuées tous les 2 jours à partir du 2^e jusqu'au 9^e jour de culture des tranches épaisses de poumons adultes (PCLS) d'une souris *Muc5b-Gfp*. En parallèle, des PCLS traitées par un OAS à 5 µM ciblant l'ARNm de *Muc5ac* ont servi de témoins. (B) Images représentatives en lumière blanche et en pseudocoloration 16 couleurs de *Muc5b-Gfp* de PCLS au 1^{er} et au 9^e jour de culture. Les PCLS ont été traitées par un OAS ciblant *Muc5b* ou *Muc5ac*. Les photos en lumière blanche et en épifluorescence ont été acquises avec une exposition respectivement de 100 ms et 3 sec. L'intensité de fluorescence émise par *Muc5b-Gfp* est comprise entre 595 et 2003 unités arbitraires. Échelle : 1 mm. (C) Graphiques représentant la variation de la fluorescence émise par *Muc5b-Gfp* entre les jours 0 à 9 de culture des PCLS. Cinq paires de PCLS ayant des morphologies similaires ont été comparées. Une couleur de courbe correspond à une paire de PCLS comparée. Les variations de fluorescence des PCLS traitées par un OAS ciblant *Muc5ac* ou un OAS ciblant *Muc5b* sont représentées respectivement par les courbes en pointillés et les courbes continues. (D) graphique comparant les valeurs d'aires sous les courbes en unité arbitraire (U.A.) entre les PCLS traitées par les OAS.

5. DISCUSSION

5.1. Le modèle d'explant pulmonaire embryonnaire murin

L'EPeM est un organe entier isolé qui a pour avantage d'être un modèle intégré pour l'étude de la FP. Il est constitué de tous les types cellulaires pulmonaires résidents impliqués dans le développement de la FP, comme les cellules mésenchymateuses (fibroblastes/myofibroblastes), les cellules mésothéliales, les pneumocytes ou encore les cellules endothéliales. L'utilisation d'un organe entier en culture garantit une fibrose reproductible et hétérogène entre chaque explant par rapport à la FP induite sur des animaux entiers. L'induction expérimentale de FP dans ce modèle permet d'observer facilement les modifications morphologiques associées. Les EPeM ne contiennent pas de cellules immunitaires circulantes ni de flore pulmonaire. Ces deux composantes majeures dans le poumon post-natal contribuent à moduler l'expression génique et à amplifier la réponse inflammatoire. Le modèle EPeM permet donc une analyse transcriptomique épithéliale plus fine et précise qui est indépendante de toute modulation de la flore et d'une grande partie de l'immunité.

Ces avantages sont bien entendu à mettre en balance avec les limites du modèle. Tout d'abord, la taille des EPeM est relativement petite. Au jour de la dissection à E12,5 de gestation, les EPeM mesurent environ 2 mm de longueur. Après 5 jours de culture, le modèle mesure en moyenne 4 mm de longueur. Cette petite taille reste un écueil pour des analyses protéomiques. De plus, le modèle est embryonnaire. Certaines cellules sont immatures ou peu différenciées comme les pneumocytes de type I qui deviennent totalement matures à partir du jour de naissance des souris. Les cellules du modèle d'EPeM ne sont pas pertinentes au regard d'un poumon mature et les abondances relatives des différents types cellulaires sont différentes entre le poumon en développement et le poumon adulte. Par exemple, les pneumocytes de type I et de type II représentent respectivement 22 % et 14 % de la proportion de cellules épithéliales composant les poumons de la souris adulte. Pour les poumons embryonnaires murins au 16^e jour de gestation, les pneumocytes de type I sont quasi inexistantes et le nombre de pneumocyte de type II est d'environ 35 % par rapport à toutes les autres cellules épithéliales (Ciccimarra et al., 2022; Negretti et al., 2021). Enfin, au-delà de 5 jours de culture, les EPeM traités par le CF se dégradent, ce qui ne permet pas d'étudier ce modèle sur une longue période expérimentale. Les avantages et les inconvénients du modèle d'EPeM dans l'étude de la FP sont définis dans le [tableau XIV](#).

Tableau XIV. Liste des avantages et des inconvénients du modèle d'explant pulmonaire embryonnaire murin dans l'étude de la fibrose pulmonaire.

Avantages	Inconvénients
<p>– Modèle d'organe isolé mimant la morphologie pulmonaire entière.</p>	<p>– Petite taille du modèle limitant dans les analyses protéomiques.</p>
<p>– Modèle intégré pour l'étude de la FP^a, constitué de tous les types cellulaires résidents impliqués dans le développement de la FP.</p>	<p>– Modèle embryonnaire : certaines cellules sont immatures ou peu différenciées.</p>
<p>– Absence de cellules immunitaires circulantes et de flore pulmonaire contribuant à la modulation de l'expression génique.</p>	<p>– Différences d'abondances relatives des différents types cellulaires par rapport à un poumon de souris adulte.</p>
	<p>– Incapacité d'étudier ce modèle sur une période expérimentale supérieure à 5 jours de culture.</p>

^a : Fibrose Pulmonaire.

5.2. Le cocktail fibrosant

De nombreux modèles expérimentaux ont été développés pour étudier la FP. Parmi eux, l'instillation intra-trachéale de BLM chez la souris reste, comme vue dans la partie introductive, la méthode standard. Ce modèle a de nombreuses limites, dont notamment l'incapacité à reproduire des patterns de PID fibrosantes similaires à ceux identifiés chez les patients (Carrington et al., 2018; Yanagihara et al., 2020). Dans le modèle d'EPeM, le CF utilisé a une composition adaptée de la littérature (Alsafadi et al., 2017; Hu, Fernandes, et al., 2017; Lee et al., 2001). Les composés sont connus pour être surexprimés et impliqués dans la physiopathologie de la FP et favorisent, entre autres, la prolifération et la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, la surexpression d' α -Sma et la surproduction de MEC (Bonner, 2004; Gauldie et al., 1999; Kolb et al., 2001). Ceci est en faveur d'une fibrose induite plus proche de la FP des patients par rapport à une fibrose induite par la bléomycine.

Dans la littérature, de nombreux CF sont utilisés afin d'induire une FP expérimentale sur différents modèles d'études. Un CF constitué de TGF- β 1, IL-1 β , TNF- α , IL-13 et d'autres cytokines perturbe la différenciation cellulaire des cellules souches humaines de pneumocytes de type II en culture ALI et induit une bronchiolisation de ces cellules (Schruf et al., 2020). Une étude récente a utilisé un CF constitué de TGF- β , TNF- α , PDGF-AB et LPA sur un modèle d'organoïdes alvéolaires humains dérivés de cellules souches pluripotentes. L'analyse RNA-seq dans cette étude a démontré que l'administration du CF induit la surexpression de gènes de la famille des serpins et des métalloprotéases. Par ailleurs, les analyses par immunofluorescence ont mis en évidence la surproduction de vimentine et de collagène (Ptasinski et al., 2023). Ceci est donc en très bonne adéquation avec les analyses sur notre modèle de fibrose induite par le CF où nous avons retrouvé une surproduction de marqueurs de fibrose comme l' α -Sma et la vimentine. Nos analyses par scRNAseq3' ont également mis en évidence la surexpression de nombreux gènes de la famille des serpins et des métalloprotéases.

5.3. Modèle de pneumopathie interstitielle commune

Plus le nombre d'administration du CF est important, plus on observe des cellules fusiformes interstitielles qui forment des foyers fibroblastiques dans les zones basales et sous-pleurales. L'administration répétée du CF entraîne donc le développement d'une fibrose hétérogène qui se caractérise par une accumulation de fibres de collagène dans le parenchyme pulmonaire dans

les espaces sous-pleuraux. D'un point de vue histopathologique, la fibrose induite dans notre modèle est donc représentative avant tout d'une PIC (Yi et al., 2024). De plus, l'utilisation du plugin ImageJ/Fiji permet de démontrer que la fibrose induite est progressive. Plus le cocktail est administré et plus la surface de fibrose d'un jour donné est significativement importante par rapport au jour précédent. Le volume des bourgeons alvéolaires, à l'origine des alvéoles pulmonaires, est significativement plus petit au 5^e jour de culture là où la FP est la plus importante. Le test de Kruskal-Wallis met en évidence une augmentation significative du volume des bourgeons alvéolaires pour les EPEM témoins ce qui n'est pas observé pour les EPEM traités par le CF. En conséquence, la progression de la fibrose pulmonaire entraîne des perturbations dans la croissance des EPEM.

Après plusieurs administrations du CF, les gènes de fibrose tels qu'*Acta2* et *Colla1* sont surexprimés. Ceci s'accompagne d'un score de fibrose de plus en plus élevé et d'une augmentation relative du nombre de cellules mésenchymateuses avec une accumulation d' α -Sma dans les espaces sous-pleuraux. L'ensemble de ces résultats est caractéristique d'un pattern de PIC avec FPP. Cette FPP est par ailleurs en adéquation avec la surexpression retrouvée des biomarqueurs de fibrose que sont l' α -Sma et la vimentine chez les patients atteints de FPI et dans des modèles expérimentaux de FP (Chen et al., 2015; Marchal-Duval et al., 2023).

Notre modèle expérimental a des caractéristiques du pattern de PIC que peu de modèles expérimentaux sont capables de reproduire à notre connaissance. Cependant, le pattern de PIC chez les patients est également caractérisé par la formation de rayons de miel, signe d'une FP avancée (Shih et al., 2021). Nous n'observons pas ce type de structure dans notre modèle expérimental. Cela est probablement dû à la courte durée de notre modèle avec une FP précoce avant toute formation de rayons de miel. Afin d'obtenir une fibrose avec des caractéristiques plus proches de celle des patients, il serait intéressant de tester d'autres conditions expérimentales, telles que la durée d'administration, des concentrations différentes de chaque composé seul ou en association, ou encore le mode d'administration. Cependant, ces tests suivis des analyses adéquates nécessiteraient beaucoup de temps.

5.4. Données transcriptomiques

5.4.1. Types cellulaires

Nous avons décidé d'effectuer une analyse par scRNAseq3' sur le modèle d'EPEM 18 heures seulement après l'administration du CF puisque les mécanismes cellulaires impliqués dans le développement précoce de la FP sont peu connus. Des modifications dans les abondances relatives des types cellulaires sont observées entre les deux conditions testées, PBS vs FC. Les abondances relatives des myofibroblastes et des cellules musculaires lisses sont significativement plus importantes dans la condition CF. Ces deux types cellulaires sont des éléments-clefs dans la physiopathologie de la FP chez les patients avec une FPI et dans les modèles expérimentaux (Carmo-Fernandes et al., 2021; Huang et al., 2023). À l'inverse, les abondances relatives de fibroblastes, fibroblastes en prolifération et cellules endothéliales sont diminuées dans la condition avec FP induite. Ceci est probablement dû aux médiateurs impliqués dans la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et dans la transition endothelio/mesenchymateuse, tels que le TGF- β 1 ou l'IL-13 présents dans le CF (Lai & Baumann, 1992; Wermuth et al., 2016). Une étude d'ingérence de trajectoire par scRNAseq permettant d'étudier les changements dynamiques de l'expression des gènes peut être mise en place afin de confirmer ou non notre hypothèse (Van den Berge et al., 2020).

Nos résultats montrent aussi que les pneumocytes de type II sont retrouvés en plus grand nombre dans la condition CF, ce qui est une caractéristique qu'on retrouve dans des PID fibrosantes chez l'Homme dont notamment le pattern de pneumopathie interstitielle aiguë (Ficial et al., 2014). Un tel phénotype, à savoir une hyperplasie de l'épithélium alvéolaire, a déjà été obtenu expérimentalement dans un modèle de rat avec inhalation de nanoparticules d'oxyde de cuivre (Costa et al., 2018).

5.4.2. Expression génique

Nos analyses transcriptomiques mettent en exergue de nombreux gènes connus comme impliqués dans l'inflammation et la fibrose. Ces gènes sont également retrouvés surexprimés dans des atlas de FP. L'atlas de Curras-Alonso, basé sur un modèle murin de FP induite par radiation, met en évidence la surexpression de gènes comme *Lcn2*, *Serpina3g* et *Cp*, tous les trois surexprimés dans notre modèle d'explants embryonnaires (Curras-Alonso et al., 2023). L'atlas de Banovich/Kropski, qui regroupe l'expression génique chez des patients atteints de PID montre,

comme dans notre modèle, une surexpression de *CCL2*, *POSTN* et *COL18A1*. De façon intéressante, les gènes impliqués dans la physiopathologie de la FP dans ces atlas sont aussi surexprimés par les mêmes types cellulaires que ceux dans notre modèle expérimental de FP induite. Par exemple, le gène *Coll8a1* codant une protéine constitutive de la MEC et impliquée dans la physiopathologie de la FPI (Stella et al., 2022), est surexprimé par les cellules mésothéliales et les myofibroblastes dans les deux atlas tout comme dans notre modèle. Ces données mettent en évidence la pertinence de notre modèle pour l'étude de la FP.

5.4.2.1. Gènes de l'inflammation

Nous avons trouvé plusieurs familles de gènes surexprimées après induction de la fibrose sur explants embryonnaires. Ces familles sont toutes liées à l'inflammation avec des gènes codant des protéines de la phase aiguë de l'inflammation. Parmi elles, des protéines de la famille des SAA qui sont des apolipoprotéines secrétées en réponse à des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF ou IL-1 β (Sack, 2018). Ceci est en parfaite adéquation avec les données de la littérature. En effet, chez les patients atteints de FPI, les taux sériques de SAA sont plus importants et plus la concentration est élevée, moins les capacités pulmonaires sont bonnes. De plus, dans un modèle murin avec FP induite par radiation, la concentration sérique de SAA augmente dès le lendemain de l'irradiation (Liu et al., 2024; Vietri et al., 2019).

Nous avons aussi trouvé des gènes surexprimés codant des protéines de la famille des Serpina3. Les serpins sont des inhibiteurs de protéases à sérine ou cystéine. Ceci est aussi en accord avec des données expérimentales. En effet, il a été montré que l'induction expérimentale de FP par instillation intratrachéale de BLM chez la souris entraîne la surexpression précoce de *Serpina3n* dans les poumons. Un mois après l'administration de BLM, le taux de Serpina3n revient aux conditions physiologiques, ce qui suggère un rôle précoce des serpins dans la physiopathologie de la FP (Gong et al., 2020). À côté des serpins, d'autres marqueurs de l'inflammation aiguë surexprimés dans notre modèle après induction de fibrose, comme la ceruloplasmine (*Cp*) et l'haptoglobine (*Hp*), sont connus comme étant quantitativement plus importants chez les patients atteints de FPI comparés aux sujets sains (Carleo et al., 2016; Saraswat et al., 2020).

À côté des protéines de la phase aiguë de l'inflammation, d'autres cytokines et interleukines surexprimées dans la condition CF sont connues comme impliquées dans la physiopathologie de la FP chez l'Homme. C'est notamment le cas de *CCL2* qui favorise le recrutement de fibrocytes circulants dans l'espace alvéolaire et stimule leur différenciation en fibroblastes, ce qui induit une production excessive de collagène (Moore et al., 2005). C'est aussi le cas du gène *CCL7* qui est exprimé à un niveau significativement plus élevé dans les biopsies pulmonaires de patients avec un pattern de PIC par rapport à des patterns de PID. Des niveaux plus élevés de *CCL7* sont également retrouvés dans des cultures de fibroblastes issus de patients avec une PII (Choi et al., 2004). Des gènes de chimioattractants sont surexprimés par les cellules mésothéliales et les myofibroblastes après induction d'une FP dans notre condition expérimentale. Ces chimioattractants sont impliqués dans le recrutement de cellules immunitaires dans le parenchyme pulmonaire (Komolafe & Pacurari, 2022). Parmi eux, *Cxcl1* est une chimiokine impliquée dans la migration et la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (Yang et al., 2023).

Nous avons aussi trouvé dans notre modèle de nombreux gènes codant des protéines du système du complément après induction de fibrose. Le système du complément appartient au système immunitaire inné et joue un rôle majeur dans l'inflammation et la régénération tissulaire. En effet, la déplétion du système du complément dans un modèle murin avec FP induite par administration de BLM diminue l'accumulation délétère de collagène dans les poumons (Phan & Thrall, 1982).

5.4.2.2. Gènes de fibrose

Concernant les gènes liés à la fibrose, nous avons retrouvé *Postn* et *Coll8a1* surexprimés par les cellules mésenchymateuses, majoritairement les myofibroblastes, dans les EPEM avec fibrose induite ce qui en fait des marqueurs d'intérêt dans l'étude de la FP. Les cellules mésothéliales expriment uniquement *Coll8a1* et surexpriment *Postn* et *Ccn1* dans la condition CF. Ces gènes sont possiblement des cibles précoces dans l'accumulation sous-pleurale de MEC. La périostine et *Ccn1*, codées respectivement par les gènes *Postn* et *Ccn1*, sont des composants de la MEC retrouvés en excès dans les poumons de patients atteints de FPI. Ces deux protéines favorisent la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. La périostine stimule la synthèse de collagène de type I. L'expression de *Ccn1* est corrélée avec les expressions des gènes *Colla1*, *Fn* et *Acta2*,

tous codant des protéines de la MEC. De plus, *Ccn1* potentialise l'activité pro-fibrosante du TGF- β (Kurundkar et al., 2016; O'Dwyer & Moore, 2017; Stella et al., 2022).

5.4.2.3. Gènes du métabolisme du fer

Les analyses transcriptomiques ont par ailleurs mis en évidence 5 gènes surexprimés dans la condition CF associés à l'homéostasie des ions métalliques. Il s'agit des gènes *Mt2*, *Lcn2*, *Steap4*, *Cp* et *Sod2*. Ces gènes sont impliqués dans le métabolisme du fer. De nombreux articles mettent en évidence un lien entre la ferroptose, qui définit une dysfonction du métabolisme du fer responsable de la mort cellulaire, avec la FP. Une dérégulation du métabolisme du fer induit une augmentation du taux de dérivés réactifs à l'oxygène favorisant le développement de la FP (Huang et al., 2023). *Sod2* est une enzyme aux propriétés anti-oxydantes qui cible les dérivés réactifs à l'oxygène et limite leur toxicité cellulaire. De façon intéressante, *Sod2* est uniquement exprimé par les pneumocytes de type II dans la condition CF. Or, il a été démontré que les dérivés réactifs à l'oxygène dans ce type cellulaire sont responsables de bouleversements induisant la formation de FP (Antoniou et al., 2007). Des dépôts de fer sont retrouvés dans les poumons de patients avec FP et des biomarqueurs de ferroptose sont localisés dans les pneumocytes de type II de souris ayant reçu de la BLM. Enfin, l'utilisation d'un traitement afin d'éliminer les surcharges de fer diminue la quantité de collagène dans les poumons (Cheng et al., 2021).

5.4.2.4. Nouveaux gènes liés à la FP

L'analyse par scRNAseq3' a mis en évidence des gènes précocement surexprimés dans la condition CF qui ne sont pas connus dans la littérature pour être impliqués dans la physiopathologie de la FP mais dans d'autres pathologies comme le cancer. Par exemple *IFITM1* est impliqué dans le cancer colorectal ou le gliome. Le *knockdown* de ce gène limite la migration et la tumorigénicité des cellules cancéreuses (Yu et al., 2011, 2015). *In vitro*, *DRAM1* inhibe la croissance, la migration et l'invasion de cellules cancéreuses du cancer du poumon non à petites cellules (Geng et al., 2020). Les PID, dont notamment la FPI, partagent de nombreuses similarités pathogéniques avec le cancer. Pour 1000 personnes atteintes de FPI, 29 cas ont un cancer généralement pulmonaire (Lee et al., 2021). L'analyse par scRNAseq3' a mis en évidence la surexpression de la cystatine A2 codée par le gène *Csta2*. La famille des cystatines regroupe les protéines inhibitrices principales des protéases à cystéines extracellulaires. La cystatine C est retrouvée à une concentration importante dans le LBA de patients atteints de FPI, ce qui en fait un biomarqueur d'intérêt (Kasabova et al., 2014).

Cependant, aucune étude montre à notre connaissance le rôle de la cystatine A2 dans la physiopathologie de la FP. La compréhension de l'implication potentielle de ces gènes dans la physiopathologie de la FP pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques d'intérêt.

L'analyse des 25 gènes sous-exprimés par l'administration du CF n'a pas mis en évidence des résultats pertinents dans notre étude. En effet, ces gènes sont uniquement exprimés par les macrophages alvéolaires, population très mineure dans notre modèle, et sont liés à la régulation de l'activité du système immunitaire.

5.5. Le modèle de coupes de poumons murins adultes

Le modèle d'EPeM est embryonnaire. Par conséquent, toutes les cellules ne sont pas totalement différenciées et le poumon est largement immature. C'est pour cette raison que dans la seconde partie de ce travail nous avons mis en place un modèle de PCLS sur poumons de souris adultes avec une fibrose induite par le CF. Les avantages et inconvénients de ce modèle sont résumés dans le paragraphe §1.4.5.1. de l'introduction.

Le modèle de PCLS est largement utilisé dans de nombreuses études pré-cliniques de pathologies pulmonaires. Ce modèle est également utilisé pour étudier les mécanismes physiopathologiques de la FP (Cedilak et al., 2019; Huang et al., 2019). L'administration d'un CF, différent de celui utilisé dans notre étude, dans un modèle de PCLS humain entraîne une déstructuration du parenchyme pulmonaire marquée par une surproduction de MEC et d' α -Sma (Alsafadi et al., 2017).

Nous avons rencontré des difficultés concernant la culture des PCLS. Nous observons une chute drastique de l'expression d'*Acta2-Rfp* après 7 jours de culture, synonyme de mort cellulaire (Fig. 27C). Cela peut s'expliquer par le fait que l'intégrité et la viabilité cellulaire dans ce modèle n'excède pas une semaine (Yanagihara et al., 2020). Des améliorations sont donc encore nécessaires, comme l'utilisation d'éponges en gélatine sur lesquelles reposent les PCLS en culture (Lee-Ferris et al., 2024).

Notre cocktail mis au point pour le modèle d'EPeM induit également une fibrose dans un modèle de tissu adulte. Cependant, la fibrose induite est plus modérée. Les conditions d'induction expérimentale de FP, telles que la concentration ou la fréquence d'administration du CF, doivent être optimisées.

5.6. Inhibition génique par oligonucléotides anti-sens

De nombreuses méthodes expérimentales sont utilisées afin de modifier l'expression d'un gène, comme les systèmes d'édition du génome (TALEN, CRISPR/Cas9) ou l'utilisation de petites molécules à ARN (siRNA, shRNA). Cependant, ces méthodes ont de nombreux inconvénients. Les systèmes d'édition du génome peuvent être à l'origine d'effets *off-target* à l'origine de mutations génomiques et de translocations chromosomiques. Les petites molécules à ARN ont quant à elles des effets transitoires (Tsai et al., 2022). Dans notre étude, nous avons décidé d'utiliser des OAS qui ont les avantages d'être simples d'utilisation, stables, qui pénètrent facilement l'épithélium et le mésenchyme, qui sont peu toxiques et ont une longue durée d'efficacité. De plus, les concentrations optimales en culture cellulaire sont connues.

Parmi les OAS disponibles, nous avons choisi les Morpholino qui sont des analogues d'acides nucléiques stéréoréguliers non chargés (Stirchak et al., 1989). La structure de cette molécule est quasiment similaire à celle de molécule d'ADN ou d'ARN. Les bases azotées sont identiques mais le groupement ribose/désoxyribose est remplacé par un groupement morpholine et les phosphates anioniques sont remplacés par les groupements phosphorodiamidates non-chargés. Des AOS Morpholino ont déjà montré leur efficacité clinique puisqu'à ce jour quatre médicaments dont le principe actif est un OAS de nature Morpholino sont autorisés par la *Food and Drug Administration* dans le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne (Gupta et al., 2023). Les séquences nucléiques des OAS que nous avons choisis cible la région juste en amont des AUG initiateurs des ARNm cibles. L'encombrement stérique empêche l'ARN cible d'interagir avec d'autres composants cellulaires et bloque la traduction protéique (Subbotina et al., 2016).

Dans la littérature, les OAS induisent une inhibition d'environ 40 % (Jearawiriyapaisarn et al., 2008), ce qui est tout à fait conforme à nos résultats d'inhibition de *Muc5b* d'après l'extinction de la fluorescence du tag GFP. De plus, l'inhibition de la production de *Muc5b* est dose-dépendante,

comme le montre une autre étude où l'administration croissante d'OAS ciblant l'ARNm de l'activine B entraîne, dans un modèle embryonnaire de xénope, une diminution dose-dépendante de la production de la protéine correspondante (Piepenburg et al., 2004).

Les administrations d'OAS ciblant les gènes *Saa3*, *Lcn2* ou *Serpina3g* n'ont malheureusement pas permis de ralentir la progression de la FP induite par le CF sur le modèle d'EPeM. Les conditions expérimentales sont probablement à optimiser. De plus, l'inhibition d'un unique gène cible pourrait être insuffisante au regard des 112 gènes retrouvés surexprimés dans notre modèle. L'inhibition de plusieurs gènes simultanément est donc à envisager.

6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons mis en place deux modèles d'étude de FP par administration d'un CF : un modèle de poumon entier embryonnaire murin en culture ALI et des cultures en tranches épaisses de poumons murins adultes.

La FP induite sur le modèle embryonnaire est caractéristique d'un pattern de PIC avec FPP. À notre connaissance, aucun autre modèle expérimental montre ce type de pattern. Notre modèle est donc unique et à fortiori relevant dans l'étude des PID fibrosantes humaines. L'analyse transcriptomique par scRNAseq3' après traitement par le cocktail fibrotique mais avant apparition des premiers signes histopathologiques de fibrose a mis en évidence une prolifération importante de myofibroblastes et de cellules musculaires lisses. La majorité des gènes précocement surexprimés sont connus pour être impliqués dans des mécanismes inflammatoires, fibrosants et de ferroptose. Ceci valide le modèle de FP induite et permet de lister de nouvelles cibles potentielles génétiques dans le but de ralentir la progression de la fibrose (Fig. 31).

L'administration du CF sur le modèle de culture en tranches épaisses de poumons de souris entraîne une FP modérée. Une optimisation des conditions expérimentales est encore nécessaire afin de reproduire au mieux la physiopathologie de la FP. Il sera intéressant de poursuivre les études sur un modèle pulmonaire plus proche de l'Homme en utilisant des cultures en tranches épaisses de poumon de porc. Si les résultats sont satisfaisants, la culture en tranches épaisses de poumons humains pourra être envisagée (Fig. 32).

Enfin, nos résultats ont mis en évidence le rôle majeur des myofibroblastes dans la progression de la FP induite par l'administration du CF. Dans le but de comprendre les mécanismes cellulaires de fibrose par les fibroblastes/myofibroblastes, la stimulation par le CF de fibroblastes pulmonaires, murins et porcins, sera évaluée.

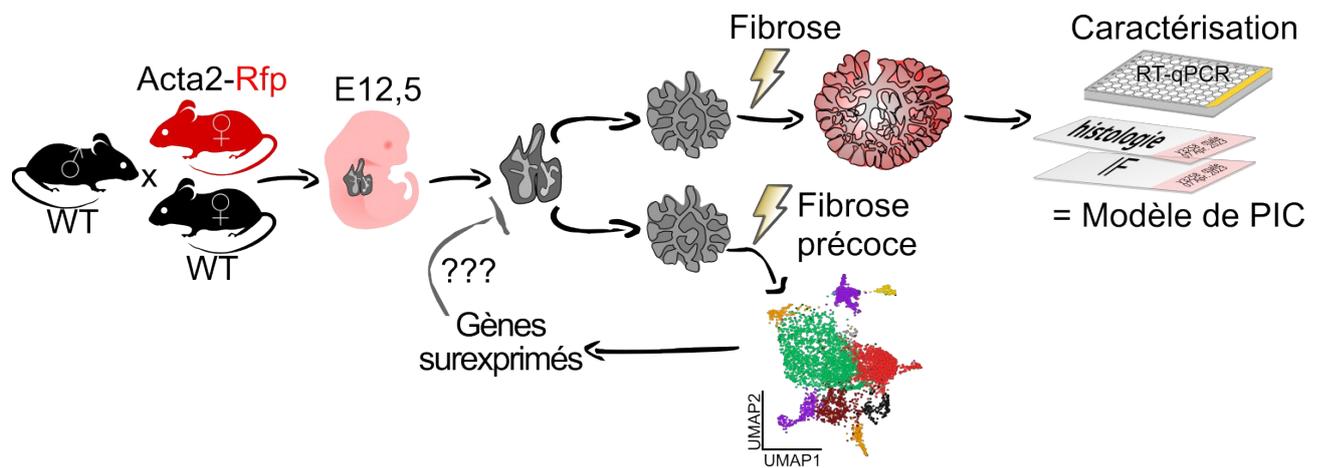


Figure 31. Représentation schématique de l'étude sur explants embryonnaires.

La culture d'explants pulmonaires embryonnaires murins a été utilisée. Une fibrose a été induite et caractérisée par histologie, immunofluorescence et RT-qPCR. Une analyse transcriptomique par single-cell RNA-sequencing 3' a été menée avant que les premiers signes histologiques de fibrose soient visibles. Un total de 112 gènes surexprimés ont été identifiés dont des gènes connus dans la fibrose et/ou l'inflammation et/ou la ferroptose et d'autres qui représentent autant de nouvelles cibles potentielles. IF:ImmunoFluorescence ; PIC : Pneumopathie Interstitielle Commune.

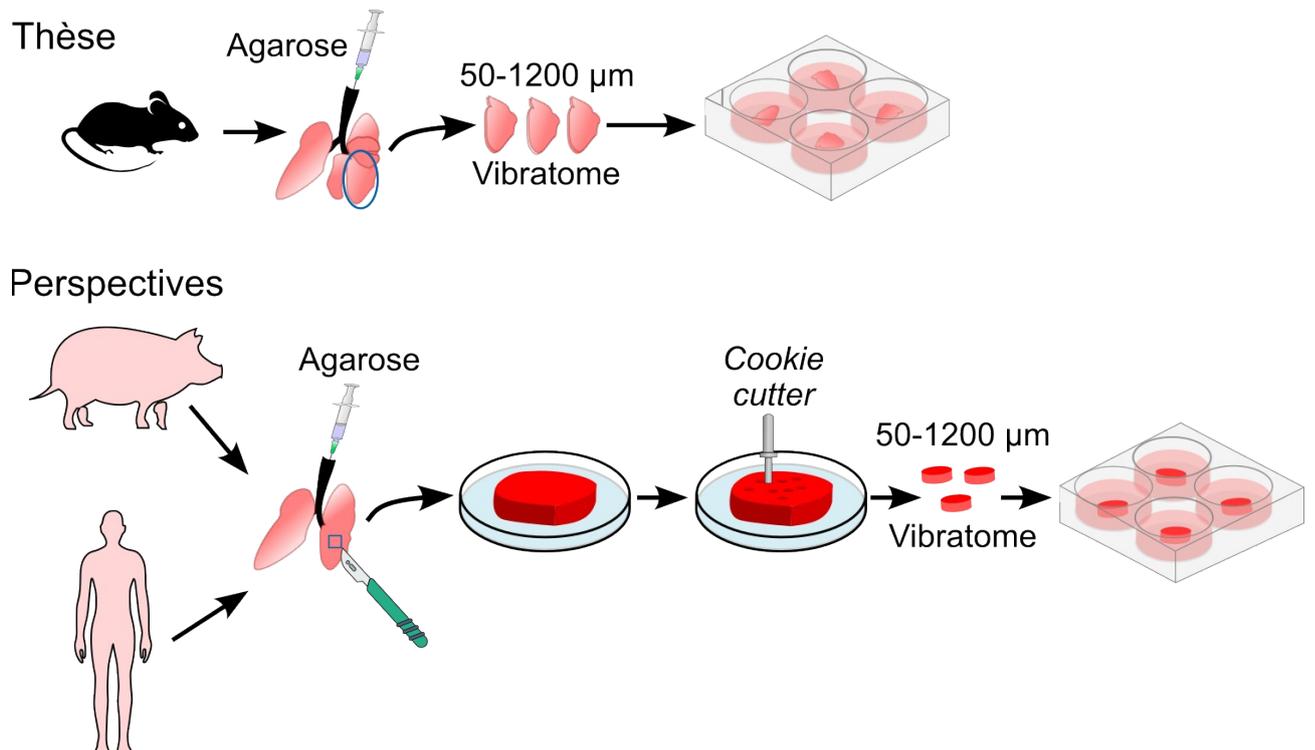


Figure 32. Représentation schématique de la préparation des tranches épaisses.

De l'agarose est injecté dans les poumons par voie intra-trachéale pour tous les modèles étudiés. Les poumons de souris sont assez petits pour qu'un lobe pulmonaire entier puisse être directement placé sur le dispositif du vibratome afin d'obtenir des tranches pulmonaires qui seront placées en culture. Les poumons de porc et d'Homme étant trop grands, un explant d'un lobe pulmonaire est prélevé. Plusieurs poinçons de l'explant pulmonaire sont formés à l'aide d'un *cookie cutter*. Les poinçons pulmonaires sont débités par le vibratome en tranches épaisses qui sont ensuite mises en culture.

Références

A

- Adegunsoye, A., Vij, R., & Noth, I. (2019). Integrating Genomics Into Management of Fibrotic Interstitial Lung Disease. *Chest*, *155*(5), 1026-1040. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.12.011>
- Agassandian, M., Tedrow, J. R., Sembrat, J., Kass, D. J., Zhang, Y., Goncharova, E. A., Kaminski, N., Mallampalli, R. K., & Vuga, L. J. (2015). VCAM-1 is a TGF- β 1 inducible gene upregulated in idiopathic pulmonary fibrosis. *Cellular Signalling*, *27*(12), 2467-2473. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.09.003>
- Ahn, M.-H., Park, B.-L., Lee, S.-H., Park, S.-W., Park, J.-S., Kim, D.-J., Jang, A.-S., Park, J.-S., Shin, H.-K., Uh, S.-T., Kim, Y.-K., Kim, Y. W., Han, S. K., Jung, K.-S., Lee, K. Y., Jeong, S. H., Park, J. W., Choi, B. W., Park, I. W., ... Shim, Y.-S. (2011). A promoter SNP rs4073T>A in the common allele of the interleukin 8 gene is associated with the development of idiopathic pulmonary fibrosis via the IL-8 protein enhancing mode. *Respiratory Research*, *12*(1), 73. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-12-73>
- Alder, J. K., Barkauskas, C. E., Limjunyawong, N., Stanley, S. E., Kembou, F., Tuder, R. M., Hogan, B. L. M., Mitzner, W., & Armanios, M. (2015). Telomere dysfunction causes alveolar stem cell failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(16), 5099-5104. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504780112>
- Alexandre, Y. (2014). *Développement d'une application oropharyngée de lactobacilles pour lutter contre les infections respiratoires à Pseudomonas aeruginosa*. [Phdthesis, Université de Bretagne occidentale - Brest]. <https://theses.hal.science/tel-02110713>
- Allen, R. J., Guillen-Guio, B., Oldham, J. M., Ma, S.-F., Dressen, A., Paynton, M. L., Kraven, L. M., Obeidat, M., Li, X., Ng, M., Braybrooke, R., Molina-Molina, M., Hobbs, B. D., Putman, R. K., Sakornsakolpat, P., Booth, H. L., Fahy, W. A., Hart, S. P., Hill, M. R., ... Wain, L. V. (2020). Genome-Wide Association Study of Susceptibility to Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *201*(5), 564-574. <https://doi.org/10.1164/rccm.201905-1017OC>

- Allen, R. J., Porte, J., Braybrooke, R., Flores, C., Fingerlin, T. E., Oldham, J. M., Guillen-Guio, B., Ma, S.-F., Okamoto, T., John, A. E., Obeidat, M., Yang, I. V., Henry, A., Hubbard, R. B., Navaratnam, V., Saini, G., Thompson, N., Booth, H. L., Hart, S. P., ... Jenkins, R. G. (2017). Genetic variants associated with susceptibility to idiopathic pulmonary fibrosis in people of European ancestry : A genome-wide association study. *The Lancet. Respiratory Medicine*, 5(11), 869-880. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(17\)30387-9](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(17)30387-9)
- Alsafadi, H. N., Staab-Weijnitz, C. A., Lehmann, M., Lindner, M., Peschel, B., Königshoff, M., & Wagner, D. E. (2017). An ex vivo model to induce early fibrosis-like changes in human precision-cut lung slices. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 312(6), L896-L902. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00084.2017>
- Am J Respir Crit Care Med. (2002). American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 165(2), 277-304. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.165.2.ats01>
- Antoniades, H. N., Bravo, M. A., Avila, R. E., Galanopoulos, T., Neville-Golden, J., Maxwell, M., & Selman, M. (1990). Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 86(4), 1055-1064. <https://doi.org/10.1172/JCI114808>
- Antoniou, K. M., Pataka, A., Bouros, D., & Siafakas, N. M. (2007). Pathogenetic pathways and novel pharmacotherapeutic targets in idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 20(5), 453-461. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2006.01.002>
- Arger, N. K., Ho, M., Woodruff, P. G., & Koth, L. L. (2019). Serum CXCL11 correlates with pulmonary outcomes and disease burden in sarcoidosis. *Respiratory Medicine*, 152, 89-96. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2019.04.005>
- Armanios, M. Y., Chen, J. J.-L., Cogan, J. D., Alder, J. K., Ingersoll, R. G., Markin, C., Lawson, W. E., Xie, M., Vulto, I., Phillips, J. A., Lansdorp, P. M., Greider, C. W., & Loyd, J. E. (2007). Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *The New England Journal of Medicine*, 356(13), 1317-1326. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa066157>
- Arras, M., Huaux, F., Vink, A., Delos, M., Coutelier, J. P., Many, M. C., Barbarin, V., Renauld, J. C., & Lison, D. (2001). Interleukin-9 reduces lung fibrosis and type 2 immune polarization

- induced by silica particles in a murine model. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 24(4), 368-375. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.24.4.4249>
- Asano, S., Ito, S., Takahashi, K., Furuya, K., Kondo, M., Sokabe, M., & Hasegawa, Y. (2017). Matrix stiffness regulates migration of human lung fibroblasts. *Physiological Reports*, 5(9), e13281. <https://doi.org/10.14814/phy2.13281>
- Ashcroft, T., Simpson, J. M., & Timbrell, V. (1988). Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *Journal of Clinical Pathology*, 41(4), 467-470. <https://doi.org/10.1136/jcp.41.4.467>
- Ask, K., Bonniaud, P., Maass, K., Eickelberg, O., Margetts, P. J., Warburton, D., Groffen, J., Gauldie, J., & Kolb, M. (2008). Progressive pulmonary fibrosis is mediated by TGF-beta isoform 1 but not TGF-beta3. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(3), 484-495. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.08.016>
- Atamas, S. P., Luzina, I. G., Choi, J., Tsymbalyuk, N., Carbonetti, N. H., Singh, I. S., Trojanowska, M., Jimenez, S. A., & White, B. (2003). Pulmonary and Activation-Regulated Chemokine Stimulates Collagen Production in Lung Fibroblasts. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 29(6), 743-749. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2003-0078OC>
- Aumiller, V., Balsara, N., Wilhelm, J., Günther, A., & Königshoff, M. (2013). WNT/ β -catenin signaling induces IL-1 β expression by alveolar epithelial cells in pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 49(1), 96-104. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2012-0524OC>
- Azambuja, E., Fleck, J. F., Batista, R. G., & Menna Barreto, S. S. (2005). Bleomycin lung toxicity : Who are the patients with increased risk? *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 18(5), 363-366. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2005.01.007>

B

- Balestrini, J. L., Chaudhry, S., Sarrazy, V., Koehler, A., & Hinz, B. (2012). The mechanical memory of lung myofibroblasts. *Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro*, 4(4), 410-421. <https://doi.org/10.1039/c2ib00149g>

- Barlo, N. P., van Moorsel, C. H. M., Korthagen, N. M., Heron, M., Rijkers, G. T., Ruven, H. J. T., van den Bosch, J. M. M., & Grutters, J. C. (2011). Genetic variability in the IL1RN gene and the balance between interleukin (IL)-1 receptor agonist and IL-1 β in idiopathic pulmonary fibrosis. *Clinical and Experimental Immunology*, 166(3), 346-351. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04468.x>
- Barron, L., & Wynn, T. A. (2011). Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 300(5), G723-728. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00414.2010>
- Bartram, U., & Speer, C. P. (2004). The role of transforming growth factor beta in lung development and disease. *Chest*, 125(2), 754-765. <https://doi.org/10.1378/chest.125.2.754>
- Bauer, Y., Tedrow, J., de Bernard, S., Birker-Robaczewska, M., Gibson, K. F., Guardela, B. J., Hess, P., Klenk, A., Lindell, K. O., Poirey, S., Renault, B., Rey, M., Weber, E., Nayler, O., & Kaminski, N. (2015). A novel genomic signature with translational significance for human idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 52(2), 217-231. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0310OC>
- Belperio, J. A., Dy, M., Murray, L., Burdick, M. D., Xue, Y. Y., Strieter, R. M., & Keane, M. P. (2004). The Role of the Th2 CC Chemokine Ligand CCL17 in Pulmonary Fibrosis¹. *The Journal of Immunology*, 173(7), 4692-4698. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.7.4692>
- Bennett, R. G. (2009). Relaxin and its role in the development and treatment of fibrosis. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 154(1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2009.03.007>
- Bhatia, S. N., & Ingber, D. E. (2014). Microfluidic organs-on-chips. *Nature Biotechnology*, 32(8), 760-772. <https://doi.org/10.1038/nbt.2989>
- Blauboer, M. E., Boeijen, F. R., Emson, C. L., Turner, S. M., Zandieh-Doulabi, B., Hanemaaijer, R., Smit, T. H., Stoop, R., & Everts, V. (2014). Extracellular matrix proteins : A positive feedback loop in lung fibrosis? *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 34, 170-178. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2013.11.002>

- Blanc, P. D., Annesi-Maesano, I., Balmes, J. R., Cummings, K. J., Fishwick, D., Miedinger, D., Murgia, N., Naidoo, R. N., Reynolds, C. J., Sigsgaard, T., Torén, K., Vinnikov, D., & Redlich, C. A. (2019). The Occupational Burden of Nonmalignant Respiratory Diseases. An Official American Thoracic Society and European Respiratory Society Statement. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 199(11), 1312-1334. <https://doi.org/10.1164/rccm.201904-0717ST>
- Bonner, J. C. (2004). Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 15(4), 255-273. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2004.03.006>
- Bonnaud, P., Margetts, P. J., Ask, K., Flanders, K., Gauldie, J., & Kolb, M. (2005). TGF-beta and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 175(8), 5390-5395. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.8.5390>
- Booth, A. J., Hadley, R., Cornett, A. M., Dreffs, A. A., Matthes, S. A., Tsui, J. L., Weiss, K., Horowitz, J. C., Fiore, V. F., Barker, T. H., Moore, B. B., Martinez, F. J., Niklason, L. E., & White, E. S. (2012). Acellular normal and fibrotic human lung matrices as a culture system for in vitro investigation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 186(9), 866-876. <https://doi.org/10.1164/rccm.201204-0754OC>
- Borie, R., Kannengiesser, C., Fontbrune, F. S. de, Gouya, L., Nathan, N., & Crestani, B. (2017). Management of suspected monogenic lung fibrosis in a specialised centre. *European Respiratory Review*, 26(144). <https://doi.org/10.1183/16000617.0122-2016>
- Borzone, G., Moreno, R., Urrea, R., Meneses, M., Oyarzún, M., & Lisboa, C. (2001). Bleomycin-induced chronic lung damage does not resemble human idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 163(7), 1648-1653. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.7.2006132>
- Boveda-Ruiz, D., D'Alessandro-Gabazza, C. N., Toda, M., Takagi, T., Naito, M., Matsushima, Y., Matsumoto, T., Kobayashi, T., Gil-Bernabe, P., Chelakkot-Govindalayathil, A.-L., Miyake, Y., Yasukawa, A., Morser, J., Taguchi, O., & Gabazza, E. C. (2013). Differential role of regulatory T cells in early and late stages of pulmonary fibrosis. *Immunobiology*, 218(2), 245-254. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.05.020>

Brown, A. C., Fiore, V. F., Sulchek, T. A., & Barker, T. H. (2013). Physical and chemical microenvironmental cues orthogonally control the degree and duration of fibrosis-associated epithelial-to-mesenchymal transitions. *The Journal of Pathology*, 229(1), 25-35. <https://doi.org/10.1002/path.4114>

Burgstaller, G., Oehrle, B., Gerckens, M., White, E. S., Schiller, H. B., & Eickelberg, O. (2017). The instructive extracellular matrix of the lung: Basic composition and alterations in chronic lung disease. *The European Respiratory Journal*, 50(1), 1601805. <https://doi.org/10.1183/13993003.01805-2016>

C

Caley, M. P., Martins, V. L. C., & O'Toole, E. A. (2015). Metalloproteinases and Wound Healing. *Advances in Wound Care*, 4(4), 225-234. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0581>

Caliari, S. R., & Burdick, J. A. (2016). A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nature Methods*, 13(5), 405-414. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3839>

Cao, H., Duan, L., Zhang, Y., Cao, J., & Zhang, K. (2021). Current hydrogel advances in physicochemical and biological response-driven biomedical application diversity. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 426. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00830-x>

Carleo, A., Bargagli, E., Landi, C., Bennett, D., Bianchi, L., Gagliardi, A., Carnemolla, C., Perari, M. G., Cillis, G., Armini, A., Bini, L., & Rottoli, P. (2016). Comparative proteomic analysis of bronchoalveolar lavage of familial and sporadic cases of idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of Breath Research*, 10(2), 026007. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/10/2/026007>

Carmo-Fernandes, A., Puschkarow, M., Peters, K., Gnipp, S., & Peters, M. (2021). The Pathogenic Role of Smooth Muscle Cell-Derived Wnt5a in a Murine Model of Lung Fibrosis. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 14(8), 755. <https://doi.org/10.3390/ph14080755>

Carrington, R., Jordan, S., Pitchford, S. C., & Page, C. P. (2018). Use of animal models in IPF research. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 51, 73-78. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2018.07.002>

- Catoira, M. C., Fusaro, L., Di Francesco, D., Ramella, M., & Boccafoschi, F. (2019). Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 30(10), 115. <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6318-7>
- Cavarra, E., Carraro, F., Fineschi, S., Naldini, A., Bartalesi, B., Pucci, A., & Lungarella, G. (2004). Early response to bleomycin is characterized by different cytokine and cytokine receptor profiles in lungs. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 287(6), L1186-1192. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00170.2004>
- Cedilak, M., Banjanac, M., Belamarić, D., Paravić Radičević, A., Faraho, I., Ilić, K., Čužić, S., Glojnaric, I., Eraković Haber, V., & Bosnar, M. (2019). Precision-cut lung slices from bleomycin treated animals as a model for testing potential therapies for idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 55, 75-83. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2019.02.005>
- Chao, C.-M., Moiseenko, A., Zimmer, K.-P., & Bellusci, S. (2016). Alveologenesi s : Key cellular players and fibroblast growth factor 10 signaling. *Molecular and Cellular Pediatrics*, 3(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s40348-016-0045-7>
- Chaudhary, N. I., Schnapp, A., & Park, J. E. (2006). Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat bleomycin model. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 173(7), 769-776. <https://doi.org/10.1164/rccm.200505-717OC>
- Chaudhuri, T., Rehfeldt, F., Sweeney, H. L., & Discher, D. E. (2010). Preparation of collagen-coated gels that maximize in vitro myogenesis of stem cells by matching the lateral elasticity of in vivo muscle. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 621, 185-202. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-063-2_13
- Chen, J., Bardes, E. E., Aronow, B. J., & Jegga, A. G. (2009). ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic Acids Research*, 37(Web Server issue), W305-311. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp427>
- Chen, J., Liao, S., Xiao, Z., Pan, Q., Wang, X., Shen, K., Wang, S., Yang, L., Guo, F., Liu, H.-F., & Pan, Q. (2022). The development and improvement of immunodeficient mice and humanized immune system mouse models. *Frontiers in Immunology*, 13, 1007579. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1007579>

- Chen, L.-J., Ye, H., Zhang, Q., Li, F.-Z., Song, L.-J., Yang, J., Mu, Q., Rao, S.-S., Cai, P.-C., Xiang, F., Zhang, J.-C., Su, Y., Xin, J.-B., & Ma, W.-L. (2015). Bleomycin induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in pleural mesothelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 283(2), 75-82. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.01.004>
- Chen, Y., Li, C., Weng, D., Song, L., Tang, W., Dai, W., Yu, Y., Liu, F., Zhao, M., Lu, C., & Chen, J. (2014). Neutralization of interleukin-17A delays progression of silica-induced lung inflammation and fibrosis in C57BL/6 mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 275(1), 62-72. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.11.012>
- Cheng, H., Feng, D., Li, X., Gao, L., Tang, S., Liu, W., Wu, X., Yue, S., Li, C., & Luo, Z. (2021). Iron deposition-induced ferroptosis in alveolar type II cells promotes the development of pulmonary fibrosis. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 1867(12), 166204. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166204>
- Choi, E. S., Jakubzick, C., Carpenter, K. J., Kunkel, S. L., Evanoff, H., Martinez, F. J., Flaherty, K. R., Toews, G. B., Colby, T. V., Kazerooni, E. A., Gross, B. H., Travis, W. D., & Hogaboam, C. M. (2004). Enhanced Monocyte Chemoattractant Protein-3/CC Chemokine Ligand-7 in Usual Interstitial Pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 170(5), 508-515. <https://doi.org/10.1164/rccm.200401-002OC>
- Choi, J.-E., Lee, S.-S., Sunde, D. A., Huizar, I., Haugk, K. L., Thannickal, V. J., Vittal, R., Plymate, S. R., & Schnapp, L. M. (2009). Insulin-like growth factor-I receptor blockade improves outcome in mouse model of lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 179(3), 212-219. <https://doi.org/10.1164/rccm.200802-228OC>
- Chua, F., Dunsmore, S. E., Clingen, P. H., Mutsaers, S. E., Shapiro, S. D., Segal, A. W., Roes, J., & Laurent, G. J. (2007). Mice lacking neutrophil elastase are resistant to bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *The American Journal of Pathology*, 170(1), 65-74. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060352>
- Chua, F., Gauldie, J., & Laurent, G. J. (2005). Pulmonary fibrosis : Searching for model answers. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 33(1), 9-13. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2005-0062TR>

- Ciccimarra, R., Bolognesi, M. M., Zoboli, M., Cattoretti, G., Stellari, F. F., & Ravanetti, F. (2022). The normal and fibrotic mouse lung classified by spatial proteomic analysis. *Scientific Reports*, *12*(1), 8742. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12738-9>
- Conte, E., Gili, E., Fagone, E., Fruciano, M., Iemmolo, M., & Vancheri, C. (2014). Effect of pirfenidone on proliferation, TGF- β -induced myofibroblast differentiation and fibrogenic activity of primary human lung fibroblasts. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, *58*, 13-19. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.02.014>
- Conti, S., Harari, S., Caminati, A., Zanobetti, A., Schwartz, J. D., Bertazzi, P. A., Cesana, G., & Madotto, F. (2018). The association between air pollution and the incidence of idiopathic pulmonary fibrosis in Northern Italy. *The European Respiratory Journal*, *51*(1), 1700397. <https://doi.org/10.1183/13993003.00397-2017>
- Corbel, M., Caulet-Maugendre, S., Germain, N., Molet, S., Lagente, V., & Boichot, E. (2001). Inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat. *The Journal of Pathology*, *193*(4), 538-545. <https://doi.org/10.1002/path.826>
- Corvol, H., Flamein, F., Epaud, R., Clement, A., & Guillot, L. (2009). Lung alveolar epithelium and interstitial lung disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *41*(8-9), 1643-1651. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.02.009>
- Costa, P. M., Gosens, I., Williams, A., Farcas, L., Pantano, D., Brown, D. M., Stone, V., Cassee, F. R., Halappanavar, S., & Fadeel, B. (2018). Transcriptional profiling reveals gene expression changes associated with inflammation and cell proliferation following short-term inhalation exposure to copper oxide nanoparticles. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, *38*(3), 385-397. <https://doi.org/10.1002/jat.3548>
- Crapo, P. M., Gilbert, T. W., & Badylak, S. F. (2011). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, *32*(12), 3233-3243. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057>

Crouvezier, N., Marie, A.-C., & Moumné, L. (2023). [Mechanisms of action and patentability of therapeutic oligonucleotides]. *Medecine Sciences: M/S*, 39(2), 111-118. <https://doi.org/10.1051/medsci/2023005>

Curras-Alonso, S., Soulier, J., Defard, T., Weber, C., Heinrich, S., Laporte, H., Leboucher, S., Lameiras, S., Dutreix, M., Favaudon, V., Massip, F., Walter, T., Mueller, F., Londoño-Vallejo, J.-A., & Fouillade, C. (2023). An interactive murine single-cell atlas of the lung responses to radiation injury. *Nature Communications*, 14(1), 2445. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38134-z>

D

De Lauretis, A., & Renzoni, E. A. (2014). Molecular biomarkers in interstitial lung diseases. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 18(5), 505-522. <https://doi.org/10.1007/s40291-014-0109-0>

Decaris, M. L., Gatmaitan, M., FlorCruz, S., Luo, F., Li, K., Holmes, W. E., Hellerstein, M. K., Turner, S. M., & Emson, C. L. (2014). Proteomic analysis of altered extracellular matrix turnover in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 13(7), 1741-1752. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.037267>

Dees, C., Chakraborty, D., & Distler, J. H. W. (2021). Cellular and molecular mechanisms in fibrosis. *Experimental Dermatology*, 30(1), 121-131. <https://doi.org/10.1111/exd.14193>

Degryse, A. L., & Lawson, W. E. (2011). Progress toward improving animal models for idiopathic pulmonary fibrosis. *The American Journal of the Medical Sciences*, 341(6), 444-449. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e31821aa000>

Degryse, A. L., Tanjore, H., Xu, X. C., Polosukhin, V. V., Jones, B. R., McMahon, F. B., Gleaves, L. A., Blackwell, T. S., & Lawson, W. E. (2010). Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 299(4), L442-452. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00026.2010>

Del Moral, P.-M., & Warburton, D. (2010). Explant culture of mouse embryonic whole lung, isolated epithelium, or mesenchyme under chemically defined conditions as a system to

- evaluate the molecular mechanism of branching morphogenesis and cellular differentiation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 633, 71-79. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-019-5_5
- de Lauretis, A., Veeraraghavan, S., & Renzoni, E. (2011). Review series : Aspects of interstitial lung disease: connective tissue disease-associated interstitial lung disease: how does it differ from IPF? How should the clinical approach differ? *Chronic Respiratory Disease*, 8(1), 53-82. <https://doi.org/10.1177/1479972310393758>
- Deng, Z., Fear, M. W., Suk Choi, Y., Wood, F. M., Allahham, A., Mutsaers, S. E., & Prêle, C. M. (2020). The extracellular matrix and mechanotransduction in pulmonary fibrosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 126, 105802. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105802>
- Domyan, E. T., & Sun, X. (2011). Patterning and plasticity in development of the respiratory lineage. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 240(3), 477-485. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22504>
- Dsouza, K. G., Surolia, R., Kulkarni, T., Li, F. J., Singh, P., Zeng, H., Stephens, C., Kumar, A., Wang, Z., & Antony, V. B. (2023). Use of a pulmosphere model to evaluate drug antifibrotic responses in interstitial lung diseases. *Respiratory Research*, 24(1), 96. <https://doi.org/10.1186/s12931-023-02404-7>
- Duchemann, B., Annesi-Maesano, I., Jacobe de Naurois, C., Sanyal, S., Brillet, P.-Y., Brauner, M., Kambouchner, M., Huynh, S., Naccache, J. M., Borie, R., Piquet, J., Mekinian, A., Virally, J., Uzunhan, Y., Cadranel, J., Crestani, B., Fain, O., Lhote, F., Dhote, R., ... Nunes, H. (2017). Prevalence and incidence of interstitial lung diseases in a multi-ethnic county of Greater Paris. *The European Respiratory Journal*, 50(2), 1602419. <https://doi.org/10.1183/13993003.02419-2016>
- Dunkern, T. R., Feurstein, D., Rossi, G. A., Sabatini, F., & Hatzelmann, A. (2007). Inhibition of TGF-beta induced lung fibroblast to myofibroblast conversion by phosphodiesterase inhibiting drugs and activators of soluble guanylyl cyclase. *European Journal of Pharmacology*, 572(1), 12-22. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.06.036>

E

- Eden, E., Navon, R., Steinfeld, I., Lipson, D., & Yakhini, Z. (2009). GOrilla : A tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics*, *10*, 48. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-48>
- El-Brolosy, M. A., & Stainier, D. Y. R. (2017). Genetic compensation : A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genetics*, *13*(7), e1006780. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006780>
- Elowsson Rendin, L., Löfdahl, A., Åhrman, E., Müller, C., Notermans, T., Michaliková, B., Rosmark, O., Zhou, X.-H., Dellgren, G., Silverborn, M., Bjermer, L., Malmström, A., Larsson-Callerfelt, A.-K., Isaksson, H., Malmström, J., & Westergren-Thorsson, G. (2019). Matrisome Properties of Scaffolds Direct Fibroblasts in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(16), 4013. <https://doi.org/10.3390/ijms20164013>
- Epa, A. P., Thatcher, T. H., Pollock, S. J., Wahl, L. A., Lyda, E., Kottmann, R. M., Phipps, R. P., & Sime, P. J. (2015). Normal Human Lung Epithelial Cells Inhibit Transforming Growth Factor- β Induced Myofibroblast Differentiation via Prostaglandin E2. *PLoS One*, *10*(8), e0135266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135266>
- Evrard, S. M., d'Audigier, C., Mauge, L., Israël-Biet, D., Guerin, C. L., Bieche, I., Kovacic, J. C., Fischer, A.-M., Gaussem, P., & Smadja, D. M. (2012). The profibrotic cytokine transforming growth factor- β 1 increases endothelial progenitor cell angiogenic properties. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, *10*(4), 670-679. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2012.04644.x>

F

- Falfán-Valencia, R., Camarena, Á., Pineda, C. L., Montaña, M., Juárez, A., Buendía-Roldán, I., Pérez-Rubio, G., Reséndiz-Hernández, J. M., Páramo, I., Vega, A., Granados, J., Zúñiga, J., & Selman, M. (2014). Genetic susceptibility to multicase hypersensitivity pneumonitis is associated with the TNF-238 GG genotype of the promoter region and HLA-DRB1*04

- bearing HLA haplotypes. *Respiratory Medicine*, 108(1), 211-217.
<https://doi.org/10.1016/j.rmed.2013.11.004>
- Fernandez Davila, J. G., Singh, A. K., Moore, D. W., Kim, J., Khan, J. A., Lemma, M., King, C. S., Nathan, S. D., Rodriguez, L. R., Grant, G. M., & Moran, J. L. (2024). Pulmonary matrix-derived hydrogels from patients with idiopathic pulmonary fibrosis induce a proinflammatory state in lung fibroblasts in vitro. *Molecular Biology of the Cell*, 35(8), ar114. <https://doi.org/10.1091/mbc.E23-11-0428>
- Fernandez, I. E., & Eickelberg, O. (2012). The impact of TGF- β on lung fibrosis : From targeting to biomarkers. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 9(3), 111-116.
<https://doi.org/10.1513/pats.201203-023AW>
- Ficial, M., Antonaglia, C., Chilosi, M., Santagiuliana, M., Tahseen, A.-O., Confalonieri, D., Zandonà, L., Bussani, R., & Confalonieri, M. (2014). Keratin-14 expression in pneumocytes as a marker of lung regeneration/repair during diffuse alveolar damage. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 189(9), 1142-1145.
<https://doi.org/10.1164/rccm.201312-2134LE>
- Fingerlin, T. E., Murphy, E., Zhang, W., Peljto, A. L., Brown, K. K., Steele, M. P., Loyd, J. E., Cosgrove, G. P., Lynch, D., Groshong, S., Collard, H. R., Wolters, P. J., Bradford, W. Z., Kossen, K., Seiwert, S. D., du Bois, R. M., Garcia, C. K., Devine, M. S., Gudmundsson, G., ... Schwartz, D. A. (2013). Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pulmonary fibrosis. *Nature Genetics*, 45(6), 613-620.
<https://doi.org/10.1038/ng.2609>
- Fingerlin, T. E., Zhang, W., Yang, I. V., Ainsworth, H. C., Russell, P. H., Blumhagen, R. Z., Schwarz, M. I., Brown, K. K., Steele, M. P., Loyd, J. E., Cosgrove, G. P., Lynch, D. A., Groshong, S., Collard, H. R., Wolters, P. J., Bradford, W. Z., Kossen, K., Seiwert, S. D., du Bois, R. M., ... Schwartz, D. A. (2016). Genome-wide imputation study identifies novel HLA locus for pulmonary fibrosis and potential role for auto-immunity in fibrotic idiopathic interstitial pneumonia. *BMC Genetics*, 17(1), 74. <https://doi.org/10.1186/s12863-016-0377-2>
- Flaherty, K. R., Wells, A. U., Cottin, V., Devaraj, A., Walsh, S. L. F., Inoue, Y., Richeldi, L., Kolb, M., Tetzlaff, K., Stowasser, S., Coeck, C., Clerisme-Beaty, E., Rosenstock, B., Quaresma,

M., Haeufel, T., Goeldner, R.-G., Schlenker-Herceg, R., Brown, K. K., & INBUILD Trial Investigators. (2019). Nintedanib in Progressive Fibrosing Interstitial Lung Diseases. *The New England Journal of Medicine*, 381(18), 1718-1727. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1908681>

Furukawa, H., Oka, S., Shimada, K., Sugii, S., Ohashi, J., Matsui, T., Ikenaka, T., Nakayama, H., Hashimoto, A., Takaoka, H., Arinuma, Y., Okazaki, Y., Futami, H., Komiya, A., Fukui, N., Nakamura, T., Migita, K., Suda, A., Nagaoka, S., ... Tohma, S. (2012). Association of Human Leukocyte Antigen with Interstitial Lung Disease in Rheumatoid Arthritis: A Protective Role for Shared Epitope. *PLoS One*, 7(5), e33133. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033133>

G

Gauldie, J., Sime, P. J., Xing, Z., Marr, B., & Tremblay, G. M. (1999). Transforming growth factor-beta gene transfer to the lung induces myofibroblast presence and pulmonary fibrosis. *Current Topics in Pathology. Ergebnisse Der Pathologie*, 93, 35-45. https://doi.org/10.1007/978-3-642-58456-5_5

Geng, J., Zhang, R., Yuan, X., Xu, H., Zhu, Z., Wang, X., Wang, Y., Xu, G., Guo, W., Wu, J., & Qin, Z.-H. (2020). DRAM1 plays a tumor suppressor role in NSCLC cells by promoting lysosomal degradation of EGFR. *Cell Death & Disease*, 11(9), 768. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02979-9>

Geng, Y., Li, L., Yan, J., Liu, K., Yang, A., Zhang, L., Shen, Y., Gao, H., Wu, X., Noth, I., Huang, Y., Liu, J., & Fan, X. (2022). PEAR1 regulates expansion of activated fibroblasts and deposition of extracellular matrix in pulmonary fibrosis. *Nature Communications*, 13(1), 7114. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34870-w>

Geng, Y., Liu, X., Liang, J., Habel, D. M., Kulur, V., Coelho, A. L., Deng, N., Xie, T., Wang, Y., Liu, N., Huang, G., Kurciyan, A., Liu, Z., Tang, J., Hogaboam, C. M., Jiang, D., & Noble, P. W. (2019). PD-L1 on invasive fibroblasts drives fibrosis in a humanized model of idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of Clinical Investigation Insight*, 4(6), e125326, 125326. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.125326>

- Germain, P.-L., Lun, A., Garcia Meixide, C., Macnair, W., & Robinson, M. D. (2021). Doublet identification in single-cell sequencing data using scDbtFinder. *F1000Research*, *10*, 979. <https://doi.org/10.12688/f1000research.73600.2>
- Giannandrea, M., & Parks, W. C. (2014). Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *Disease Models & Mechanisms*, *7*(2), 193-203. <https://doi.org/10.1242/dmm.012062>
- Gibbons, M. A., MacKinnon, A. C., Ramachandran, P., Dhaliwal, K., Duffin, R., Phythian-Adams, A. T., van Rooijen, N., Haslett, C., Howie, S. E., Simpson, A. J., Hirani, N., Gauldie, J., Iredale, J. P., Sethi, T., & Forbes, S. J. (2011). Ly6Chi monocytes direct alternatively activated profibrotic macrophage regulation of lung fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *184*(5), 569-581. <https://doi.org/10.1164/rccm.201010-1719OC>
- Gong, G.-C., Song, S.-R., Xu, X., Luo, Q., Han, Q., He, J.-X., & Su, J. (2020). Serpina3n is closely associated with fibrotic procession and knockdown ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *532*(4), 598-604. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.08.094>
- Goto, H., Ledford, J. G., Mukherjee, S., Noble, P. W., Williams, K. L., & Wright, J. R. (2010). The role of surfactant protein A in bleomycin-induced acute lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *181*(12), 1336-1344. <https://doi.org/10.1164/rccm.200907-1002OC>
- Gregory, A. D., Kliment, C. R., Metz, H. E., Kim, K.-H., Kargl, J., Agostini, B. A., Crum, L. T., Oczypok, E. A., Oury, T. A., & Houghton, A. M. (2015). Neutrophil elastase promotes myofibroblast differentiation in lung fibrosis. *Journal of Leukocyte Biology*, *98*(2), 143-152. <https://doi.org/10.1189/jlb.3HI1014-493R>
- Grinnell, F., & Petroll, W. M. (2010). Cell motility and mechanics in three-dimensional collagen matrices. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *26*, 335-361. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113318>
- Guler, S. A., & Corte, T. J. (2021). Interstitial Lung Disease in 2020 : A History of Progress. *Clinics in Chest Medicine*, *42*(2), 229-239. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2021.03.001>

Gupta, S., Sharma, S. N., Kundu, J., Pattanayak, S., & Sinha, S. (2023). Morpholino oligonucleotide-mediated exon skipping for DMD treatment: Past insights, present challenges and future perspectives. *Journal of Biosciences*, 48, 38.

H

Habel, D. M., Espindola, M. S., Coelho, A. L., & Hogaboam, C. M. (2018). Modeling Idiopathic Pulmonary Fibrosis in Humanized Severe Combined Immunodeficient Mice. *The American Journal of Pathology*, 188(4), 891-903. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.12.020>

Han, G., Zhang, H., Xie, C. H., & Zhou, Y. F. (2011). Th2-like immune response in radiation-induced lung fibrosis. *Oncology Reports*, 26(2), 383-388. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1300>

Hancock, L. A., Hennessy, C. E., Solomon, G. M., Dobrinskikh, E., Estrella, A., Hara, N., Hill, D. B., Kissner, W. J., Markovetz, M. R., Grove Villalon, D. E., Voss, M. E., Tearney, G. J., Carroll, K. S., Shi, Y., Schwarz, M. I., Thelin, W. R., Rowe, S. M., Yang, I. V., Evans, C. M., & Schwartz, D. A. (2018). Muc5b overexpression causes mucociliary dysfunction and enhances lung fibrosis in mice. *Nature Communications*, 9(1), 5363. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07768-9>

Hashimoto, S., Gon, Y., Takeshita, I., Maruoka, S., & Horie, T. (2001). IL-4 and IL-13 induce myofibroblastic phenotype of human lung fibroblasts through c-Jun NH2-terminal kinase-dependent pathway. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(6), 1001-1008. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.114702>

Hennion, N., Chenivresse, C., Humez, S., Gottrand, F., Desseyn, J.-L., & Gouyer, V. (2024). [Idiopathic pulmonary fibrosis: Desperately seeking a model]. *Revue Des Maladies Respiratoires*, 41(4), 274-278. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2024.02.009>

Hennion, N., Desseyn, J.-L., Gottrand, F., Wémeau-Stervinou, L., & Gouyer, V. (2022). [Idiopathic pulmonary fibrosis]. *Medecine Sciences: M/S*, 38(6-7), 579-584. <https://doi.org/10.1051/medsci/2022084>

Henry, E., Cores, J., Hensley, M. T., Anthony, S., Vandergriff, A., de Andrade, J. B. M., Allen, T., Caranasos, T. G., Lobo, L. J., & Cheng, K. (2015). Adult Lung Spheroid Cells Contain

- Progenitor Cells and Mediate Regeneration in Rodents With Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *Stem Cells Translational Medicine*, 4(11), 1265-1274. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0062>
- Henry, M. T., McMahon, K., Mackarel, A. J., Prikk, K., Sorsa, T., Maisi, P., Sepper, R., Fitzgerald, M. X., & O'Connor, C. M. (2002). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in sarcoidosis and IPF. *The European Respiratory Journal*, 20(5), 1220-1227. <https://doi.org/10.1183/09031936.02.00022302>
- Hilberg, F., Roth, G. J., Krssak, M., Kautschitsch, S., Sommergruber, W., Tontsch-Grunt, U., Garin-Chesa, P., Bader, G., Zoephel, A., Quant, J., Heckel, A., & Rettig, W. J. (2008). BIBF 1120 : Triple angiokinase inhibitor with sustained receptor blockade and good antitumor efficacy. *Cancer Research*, 68(12), 4774-4782. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6307>
- Hinz, B. (2012). Mechanical aspects of lung fibrosis : A spotlight on the myofibroblast. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 9(3), 137-147. <https://doi.org/10.1513/pats.201202-017AW>
- Hinz, B., Phan, S. H., Thannickal, V. J., Galli, A., Bochaton-Piallat, M.-L., & Gabbiani, G. (2007). The myofibroblast : One function, multiple origins. *The American Journal of Pathology*, 170(6), 1807-1816. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070112>
- Hirano, A., Kanehiro, A., Ono, K., Ito, W., Yoshida, A., Okada, C., Nakashima, H., Tanimoto, Y., Kataoka, M., Gelfand, E. W., & Tanimoto, M. (2006). Pirfenidone modulates airway responsiveness, inflammation, and remodeling after repeated challenge. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 35(3), 366-377. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2005-0452OC>
- Hodgson, U., Laitinen, T., & Tukiainen, P. (2002). Nationwide prevalence of sporadic and familial idiopathic pulmonary fibrosis : Evidence of founder effect among multiplex families in Finland. *Thorax*, 57(4), 338-342. <https://doi.org/10.1136/thorax.57.4.338>
- Horan, G. S., Wood, S., Ona, V., Li, D. J., Lukashev, M. E., Weinreb, P. H., Simon, K. J., Hahm, K., Allaire, N. E., Rinaldi, N. J., Goyal, J., Feghali-Bostwick, C. A., Matteson, E. L., O'Hara, C., Lafyatis, R., Davis, G. S., Huang, X., Sheppard, D., & Violette, S. M. (2008). Partial inhibition of integrin alpha(v)beta6 prevents pulmonary fibrosis without exacerbating

- inflammation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 177(1), 56-65.
<https://doi.org/10.1164/rccm.200706-805OC>
- Horowitz, J. C., & Thannickal, V. J. (2006). Idiopathic pulmonary fibrosis: New concepts in pathogenesis and implications for drug therapy. *Treatments in Respiratory Medicine*, 5(5), 325-342. <https://doi.org/10.2165/00151829-200605050-00004>
- Hoshiba, T., Lu, H., Kawazoe, N., & Chen, G. (2010). Decellularized matrices for tissue engineering. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 10(12), 1717-1728.
<https://doi.org/10.1517/14712598.2010.534079>
- Hostettler, K. E., Zhong, J., Papakonstantinou, E., Karakiulakis, G., Tamm, M., Seidel, P., Sun, Q., Mandal, J., Lardinois, D., Lambers, C., & Roth, M. (2014). Anti-fibrotic effects of nintedanib in lung fibroblasts derived from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Research*, 15(1), 157. <https://doi.org/10.1186/s12931-014-0157-3>
- Hou, J., Ma, T., Cao, H., Chen, Y., Wang, C., Chen, X., Xiang, Z., & Han, X. (2018). TNF- α -induced NF- κ B activation promotes myofibroblast differentiation of LR-MSCs and exacerbates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Journal of Cellular Physiology*, 233(3), 2409-2419. <https://doi.org/10.1002/jcp.26112>
- Hoyer, N., Prior, T. S., Bendstrup, E., Wilcke, T., & Shaker, S. B. (2019). Risk factors for diagnostic delay in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Research*, 20(1), 103.
<https://doi.org/10.1186/s12931-019-1076-0>
- Hsia, I., Asmani, M., & Zhao, R. (2023). Predicting the preclinical efficacy of anti-fibrosis agents using a force-sensing fibrosis on chip system. *Biosensors & Bioelectronics*, 228, 115194.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2023.115194>
- Hu, X., Fernandes, J., Jones, D. P., & Go, Y.-M. (2017). Cadmium stimulates myofibroblast differentiation and mouse lung fibrosis. *Toxicology*, 383, 50-56.
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.03.018>
- Huang, X., Li, L., Ammar, R., Zhang, Y., Wang, Y., Ravi, K., Thompson, J., & Jarai, G. (2019). Molecular characterization of a precision-cut rat lung slice model for the evaluation of antifibrotic drugs. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 316(2), L348-L357. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00339.2018>

- Huang, X., Song, Y., Wei, L., Guo, J., Xu, W., & Li, M. (2023). The emerging roles of ferroptosis in organ fibrosis and its potential therapeutic effect. *International Immunopharmacology*, *116*, 109812. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.109812>
- Huang, X., Wang, X., Xie, X., Zeng, S., Li, Z., Xu, X., Yang, H., Qiu, F., Lin, J., & Diao, Y. (2017). Kallistatin protects against bleomycin-induced idiopathic pulmonary fibrosis by inhibiting angiogenesis and inflammation. *American Journal of Translational Research*, *9*(3), 999-1011.
- Huang, Y., Guzy, R., Ma, S.-F., Bonham, C. A., Jou, J., Schulte, J. J., Kim, J. S., Barros, A. J., Espindola, M. S., Husain, A. N., Hogaboam, C. M., Sperling, A. I., & Noth, I. (2023). Central lung gene expression associates with myofibroblast features in idiopathic pulmonary fibrosis. *BMJ Open Respiratory Research*, *10*(1), e001391. <https://doi.org/10.1136/bmjresp-2022-001391>
- Huax, F., Gharaee-Kermani, M., Liu, T., Morel, V., McGarry, B., Ullenbruch, M., Kunkel, S. L., Wang, J., Xing, Z., & Phan, S. H. (2005). Role of Eotaxin-1 (CCL11) and CC Chemokine Receptor 3 (CCR3) in Bleomycin-Induced Lung Injury and Fibrosis. *The American Journal of Pathology*, *167*(6), 1485-1496. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61235-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61235-7)
- Huh, D., Matthews, B. D., Mammoto, A., Montoya-Zavala, M., Hsin, H. Y., & Ingber, D. E. (2010). Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science (New York, N.Y.)*, *328*(5986), 1662-1668. <https://doi.org/10.1126/science.1188302>
- Hünerwadel, A., Fagagnini, S., Rogler, G., Lutz, C., Jaeger, S. U., Mamie, C., Weder, B., Ruiz, P. A., & Hausmann, M. (2018). Severity of local inflammation does not impact development of fibrosis in mouse models of intestinal fibrosis. *Scientific Reports*, *8*(1), 15182. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33452-5>
- Hung, C. F., Rohani, M. G., Lee, S., Chen, P., & Schnapp, L. M. (2013). Role of IGF-1 pathway in lung fibroblast activation. *Respiratory Research*, *14*(1), 102. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-14-102>

I

- Ianevski, A., Giri, A. K., & Aittokallio, T. (2022). Fully-automated and ultra-fast cell-type identification using specific marker combinations from single-cell transcriptomic data. *Nature Communications*, *13*(1), 1246. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28803-w>
- Inoue, Y., Kaner, R. J., Guiot, J., Maher, T. M., Tomassetti, S., Moiseev, S., Kuwana, M., & Brown, K. K. (2020). Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Chronic Fibrosing Interstitial Lung Diseases With a Progressive Phenotype. *Chest*, *158*(2), 646-659. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2020.03.037>
- Iyer, S. N., Margolin, S. B., Hyde, D. M., & Giri, S. N. (1998). Lung fibrosis is ameliorated by pirfenidone fed in diet after the second dose in a three-dose bleomycin-hamster model. *Experimental Lung Research*, *24*(1), 119-132. <https://doi.org/10.3109/01902149809046058>
- Izbicki, G., Segel, M. J., Christensen, T. G., Conner, M. W., & Breuer, R. (2002). Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *International Journal of Experimental Pathology*, *83*(3), 111-119. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.2002.00220.x>

J

- Jaffar, J., Yang, S.-H., Kim, S. Y., Kim, H.-W., Faiz, A., Chrzanowski, W., & Burgess, J. K. (2018). Greater cellular stiffness in fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, *315*(1), L59-L65. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00030.2018>
- Jearawiriyapaisarn, N., Moulton, H. M., Buckley, B., Roberts, J., Sazani, P., Fucharoen, S., Iversen, P. L., & Kole, R. (2008). Sustained dystrophin expression induced by peptide-conjugated morpholino oligomers in the muscles of mdx mice. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, *16*(9), 1624-1629. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.120>
- Jenkins, R. G., Simpson, J. K., Saini, G., Bentley, J. H., Russell, A.-M., Braybrooke, R., Molyneaux, P. L., McKeever, T. M., Wells, A. U., Flynn, A., Hubbard, R. B., Leeming, D. J., Marshall, R. P., Karsdal, M. A., Lukey, P. T., & Maher, T. M. (2015). Longitudinal change in collagen degradation biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis : An analysis from the

- prospective, multicentre PROFILE study. *The Lancet. Respiratory Medicine*, 3(6), 462-472. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00048-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00048-X)
- Joannes, A., Brayer, S., Besnard, V., Marchal-Sommé, J., Jaillet, M., Mordant, P., Mal, H., Borie, R., Crestani, B., & Mailleux, A. A. (2016). FGF9 and FGF18 in idiopathic pulmonary fibrosis promote survival and migration and inhibit myofibroblast differentiation of human lung fibroblasts in vitro. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 310(7), L615-629. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00185.2015>
- Johannson, K. A., Vittinghoff, E., Lee, K., Balmes, J. R., Ji, W., Kaplan, G. G., Kim, D. S., & Collard, H. R. (2014). Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis associated with air pollution exposure. *The European Respiratory Journal*, 43(4), 1124-1131. <https://doi.org/10.1183/09031936.00122213>
- Juge, P.-A., Lee, J. S., Ebstein, E., Furukawa, H., Dobrinskikh, E., Gazal, S., Kannengiesser, C., Ottaviani, S., Oka, S., Tohma, S., Tsuchiya, N., Rojas-Serrano, J., González-Pérez, M. I., Mejía, M., Buendía-Roldán, I., Falfán-Valencia, R., Ambrocio-Ortiz, E., Manali, E., Papiris, S. A., ... Dieudé, P. (2018). MUC5B Promoter Variant and Rheumatoid Arthritis with Interstitial Lung Disease. *The New England Journal of Medicine*, 379(23), 2209-2219. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1801562>
- Jun, J.-I., & Lau, L. F. (2018). Resolution of organ fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 128(1), 97-107. <https://doi.org/10.1172/JCI93563>

K

- Kabadi, P. K., Rodd, A. L., Simmons, A. E., Messier, N. J., Hurt, R. H., & Kane, A. B. (2019). A novel human 3D lung microtissue model for nanoparticle-induced cell-matrix alterations. *Particle and Fibre Toxicology*, 16(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s12989-019-0298-0>
- Kasabova, M., Joulin-Giet, A., Lecaille, F., Saidi, A., Marchand-Adam, S., & Lalmanach, G. (2014). Human cystatin C : A new biomarker of idiopathic pulmonary fibrosis? *Proteomics. Clinical Applications*, 8(5-6), 447-453. <https://doi.org/10.1002/prca.201300047>

- Kasai, H., Allen, J. T., Mason, R. M., Kamimura, T., & Zhang, Z. (2005). TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respiratory Research*, 6(1), 56. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-6-56>
- Katayanagi, S., Setoguchi, Y., Kitagawa, S., Okamoto, T., & Miyazaki, Y. (2022). Alternative Gene Expression by TOLLIP Variant Is Associated With Lung Function in Chronic Hypersensitivity Pneumonitis. *Chest*, 161(2), 458-469. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2021.08.052>
- Katzen, J., & Beers, M. F. (2020). Contributions of alveolar epithelial cell quality control to pulmonary fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 130(10), 5088-5099. <https://doi.org/10.1172/JCI139519>
- Kaur, R., Shaikh, T. B., Priya Sripadi, H., Kuncha, M., Vijaya Sarathi, U. V. R., Kulhari, H., Balaji Andugulapati, S., & Sistla, R. (2024). Nintedanib solid lipid nanoparticles improve oral bioavailability and ameliorate pulmonary fibrosis in vitro and in vivo models. *International Journal of Pharmaceutics*, 649, 123644. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123644>
- Kheirollahi, V., Wasnick, R. M., Biasin, V., Vazquez-Armendariz, A. I., Chu, X., Moiseenko, A., Weiss, A., Wilhelm, J., Zhang, J.-S., Kwapiszewska, G., Herold, S., Schermuly, R. T., Mari, B., Li, X., Seeger, W., Günther, A., Bellusci, S., & El Agha, E. (2019). Metformin induces lipogenic differentiation in myofibroblasts to reverse lung fibrosis. *Nature Communications*, 10(1), 2987. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10839-0>
- Kia'i, N., & Bajaj, T. (2024). Histology, Respiratory Epithelium. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Kibbey, M. C. (1994). Maintenance of the EHS sarcoma and Matrigel preparation. *Journal of tissue culture methods*, 16(3), 227-230. <https://doi.org/10.1007/BF01540656>
- Kim, K. K., & Chapman, H. A. (2007). Endothelin-1 as initiator of epithelial-mesenchymal transition : Potential new role for endothelin-1 during pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 37(1), 1-2. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0001ED>
- Kim, K. K., Kugler, M. C., Wolters, P. J., Robillard, L., Galvez, M. G., Brumwell, A. N., Sheppard, D., & Chapman, H. A. (2006). Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in

- vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(35), 13180-13185. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605669103>
- Kinder, B. W., Brown, K. K., Schwarz, M. I., Ix, J. H., Kervitsky, A., & King, T. E. (2008). Baseline BAL neutrophilia predicts early mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*, 133(1), 226-232. <https://doi.org/10.1378/chest.07-1948>
- King, T. E., Bradford, W. Z., Castro-Bernardini, S., Fagan, E. A., Glaspole, I., Glassberg, M. K., Gorina, E., Hopkins, P. M., Kardatzke, D., Lancaster, L., Lederer, D. J., Nathan, S. D., Pereira, C. A., Sahn, S. A., Sussman, R., Swigris, J. J., Noble, P. W., & ASCEND Study Group. (2014). A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *The New England Journal of Medicine*, 370(22), 2083-2092. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1402582>
- Klingberg, F., Hinz, B., & White, E. S. (2013). The myofibroblast matrix : Implications for tissue repair and fibrosis. *The Journal of Pathology*, 229(2), 298-309. <https://doi.org/10.1002/path.4104>
- Knust, J., Ochs, M., Gundersen, H. J. G., & Nyengaard, J. R. (2009). Stereological estimates of alveolar number and size and capillary length and surface area in mice lungs. *Anatomical Record (Hoboken, N.J.: 2007)*, 292(1), 113-122. <https://doi.org/10.1002/ar.20747>
- Koh, R. Y., Lim, C. L., Uhal, B. D., Abdullah, M., Vidyadaran, S., Ho, C. C., & Seow, H. F. (2015). Inhibition of transforming growth factor- β via the activin receptor-like kinase-5 inhibitor attenuates pulmonary fibrosis. *Molecular Medicine Reports*, 11(5), 3808-3813. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3193>
- Kohyama, T., Liu, X., Wen, F.-Q., Zhu, Y. K., Wang, H., Kim, H. J., Takizawa, H., Cieslinski, L. B., Barnette, M. S., & Rennard, S. I. (2002). PDE4 inhibitors attenuate fibroblast chemotaxis and contraction of native collagen gels. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 26(6), 694-701. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.26.6.4743>
- Kolahian, S., Fernandez, I. E., Eickelberg, O., & Hartl, D. (2016). Immune Mechanisms in Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 55(3), 309-322. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0121TR>

- Kolanko, E., Cargnoni, A., Papait, A., Silini, A. R., Czekaj, P., & Parolini, O. (2024). The evolution of in vitro models of lung fibrosis : Promising prospects for drug discovery. *European Respiratory Review: An Official Journal of the European Respiratory Society*, 33(171), 230127. <https://doi.org/10.1183/16000617.0127-2023>
- Kolb, M., Bonniaud, P., Galt, T., Sime, P. J., Kelly, M. M., Margetts, P. J., & Gauldie, J. (2002). Differences in the fibrogenic response after transfer of active transforming growth factor-beta1 gene to lungs of « fibrosis-prone » and « fibrosis-resistant » mouse strains. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 27(2), 141-150. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.27.2.4674>
- Kolb, M., Margetts, P. J., Anthony, D. C., Pitossi, F., & Gauldie, J. (2001). Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 107(12), 1529-1536. <https://doi.org/10.1172/JCI12568>
- Kolodsick, J. E., Toews, G. B., Jakubzick, C., Hogaboam, C., Moore, T. A., McKenzie, A., Wilke, C. A., Chrisman, C. J., & Moore, B. B. (2004). Protection from fluorescein isothiocyanate-induced fibrosis in IL-13-deficient, but not IL-4-deficient, mice results from impaired collagen synthesis by fibroblasts. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(7), 4068-4076. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.7.4068>
- Komolafe, K., & Pacurari, M. (2022). CXC Chemokines in the Pathogenesis of Pulmonary Disease and Pharmacological Relevance. *International Journal of Inflammation*, 2022, 4558159. <https://doi.org/10.1155/2022/4558159>
- Konopka, K. E., & Myers, J. L. (2021). Interstitial lung disease pathology in systemic sclerosis. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 13, 1759720X211032437. <https://doi.org/10.1177/1759720X211032437>
- Korthagen, N. M., van Moorsel, C. H. M., Kazemier, K. M., Ruven, H. J. T., & Grutters, J. C. (2012). IL1RN genetic variations and risk of IPF : A meta-analysis and mRNA expression study. *Immunogenetics*, 64(5), 371-377. <https://doi.org/10.1007/s00251-012-0604-6>
- Koudstaal, T., Funke-Chambour, M., Kreuter, M., Molyneaux, P. L., & Wijsenbeek, M. S. (2023). Pulmonary fibrosis : From pathogenesis to clinical decision-making. *Trends in Molecular Medicine*, 29(12), 1076-1087. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2023.08.010>

- Kropski, J. A., Blackwell, T. S., & Loyd, J. E. (2015). The genetic basis of idiopathic pulmonary fibrosis. *The European Respiratory Journal*, 45(6), 1717-1727. <https://doi.org/10.1183/09031936.00163814>
- Kropski, J. A., Mitchell, D. B., Markin, C., Polosukhin, V. V., Choi, L., Johnson, J. E., Lawson, W. E., Phillips, J. A., Cogan, J. D., Blackwell, T. S., & Loyd, J. E. (2014). A Novel Dyskerin (DKC1) Mutation Is Associated With Familial Interstitial Pneumonia. *Chest*, 146(1), e1-e7. <https://doi.org/10.1378/chest.13-2224>
- Kular, J. K., Basu, S., & Sharma, R. I. (2014). The extracellular matrix : Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering*, 5, 2041731414557112. <https://doi.org/10.1177/2041731414557112>
- Kulkarni, T., de Andrade, J., Zhou, Y., Luckhardt, T., & Thannickal, V. J. (2016). Alveolar epithelial disintegrity in pulmonary fibrosis. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 311(2), L185-191. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00115.2016>
- Kumar, R. K., Watkins, S. G., & Lykke, A. W. (1985). Pulmonary responses to bleomycin-induced injury : An immunomorphologic and electron microscopic study. *Experimental Pathology*, 28(1), 33-43. [https://doi.org/10.1016/s0232-1513\(85\)80030-x](https://doi.org/10.1016/s0232-1513(85)80030-x)
- Kurundkar, A. R., Kurundkar, D., Rangarajan, S., Locy, M. L., Zhou, Y., Liu, R.-M., Zmijewski, J., & Thannickal, V. J. (2016). The matricellular protein CCN1 enhances TGF- β 1/SMAD3-dependent profibrotic signaling in fibroblasts and contributes to fibrogenic responses to lung injury. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 30(6), 2135-2150. <https://doi.org/10.1096/fj.201500173>
- Kuwano, K. (2008). Involvement of epithelial cell apoptosis in interstitial lung diseases. *Internal Medicine (Tokyo, Japan)*, 47(5), 345-353. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.47.0713>

L

- LaFemina, M. J., Sutherland, K. M., Bentley, T., Gonzales, L. W., Allen, L., Chapin, C. J., Rokkam, D., Sweerus, K. A., Dobbs, L. G., Ballard, P. L., & Frank, J. A. (2014). Claudin-18 deficiency results in alveolar barrier dysfunction and impaired alveologenesis in mice.

- American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 51(4), 550-558.
<https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0456OC>
- Lai, C. Y., & Baumann, P. (1992). Sequence analysis of a DNA fragment from *Buchnera aphidicola* (an endosymbiont of aphids) containing genes homologous to *dnaG*, *rpoD*, *cysE*, and *secB*. *Gene*, 119(1), 113-118. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90074-y](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90074-y)
- Lancaster, M. A., & Knoblich, J. A. (2014). Organogenesis in a dish : Modeling development and disease using organoid technologies. *Science (New York, N.Y.)*, 345(6194), 1247125. <https://doi.org/10.1126/science.1247125>
- Lappi-Blanco, E., Lehtonen, S. T., Sormunen, R., Merikallio, H. M., Soini, Y., & Kaarteenaho, R. L. (2013). Divergence of tight and adherens junction factors in alveolar epithelium in pulmonary fibrosis. *Human Pathology*, 44(5), 895-907. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2012.08.016>
- Lawson, W. E., Cheng, D.-S., Degryse, A. L., Tanjore, H., Polosukhin, V. V., Xu, X. C., Newcomb, D. C., Jones, B. R., Roldan, J., Lane, K. B., Morrissey, E. E., Beers, M. F., Yull, F. E., & Blackwell, T. S. (2011). Endoplasmic reticulum stress enhances fibrotic remodeling in the lungs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(26), 10562-10567. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107559108>
- Lawson, W. E., Grant, S. W., Ambrosini, V., Womble, K. E., Dawson, E. P., Lane, K. B., Markin, C., Renzoni, E., Lympny, P., Thomas, A. Q., Roldan, J., Scott, T. A., Blackwell, T. S., Phillips, J. A., Loyd, J. E., & du Bois, R. M. (2004). Genetic mutations in surfactant protein C are a rare cause of sporadic cases of IPF. *Thorax*, 59(11), 977-980. <https://doi.org/10.1136/thx.2004.026336>
- Lawson, W. E., Polosukhin, V. V., Stathopoulos, G. T., Zoia, O., Han, W., Lane, K. B., Li, B., Donnelly, E. F., Holburn, G. E., Lewis, K. G., Collins, R. D., Hull, W. M., Glasser, S. W., Whitsett, J. A., & Blackwell, T. S. (2005). Increased and prolonged pulmonary fibrosis in surfactant protein C-deficient mice following intratracheal bleomycin. *The American Journal of Pathology*, 167(5), 1267-1277. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61214-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61214-X)
- Lee, C. G., Cho, S. J., Kang, M. J., Chapoval, S. P., Lee, P. J., Noble, P. W., Yehualaeshet, T., Lu, B., Flavell, R. A., Milbrandt, J., Homer, R. J., & Elias, J. A. (2004). Early growth response gene

- 1-mediated apoptosis is essential for transforming growth factor beta1-induced pulmonary fibrosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 200(3), 377-389. <https://doi.org/10.1084/jem.20040104>
- Lee, C. G., Homer, R. J., Zhu, Z., Lanone, S., Wang, X., Koteliansky, V., Shipley, J. M., Gotwals, P., Noble, P., Chen, Q., Senior, R. M., & Elias, J. A. (2001). Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *The Journal of Experimental Medicine*, 194(6), 809-821. <https://doi.org/10.1084/jem.194.6.809>
- Lee, H. Y., Lee, J., Lee, C.-H., Han, K., & Choi, S. M. (2021). Risk of cancer incidence in patients with idiopathic pulmonary fibrosis : A nationwide cohort study. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 26(2), 180-187. <https://doi.org/10.1111/resp.13911>
- Lee, H.-K., Kim, D. S., Yoo, B., Seo, J. B., Rho, J.-Y., Colby, T. V., & Kitaichi, M. (2005). Histopathologic pattern and clinical features of rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Chest*, 127(6), 2019-2027. <https://doi.org/10.1378/chest.127.6.2019>
- Lee, J. Y., Reyes, N. S., Ravishankar, S., Zhou, M., Krasilnikov, M., Ringler, C., Pohan, G., Wilson, C., Ang, K. K.-H., Wolters, P. J., Tsukui, T., Sheppard, D., Arkin, M. R., & Peng, T. (2024). An in vivo screening platform identifies senolytic compounds that target p16INK4a+ fibroblasts in lung fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 134(9), e173371. <https://doi.org/10.1172/JCI173371>
- Lee-Ferris, R. E., Okuda, K., Galiger, J. R., Schworer, S. A., Rogers, T. D., Dang, H., Gilmore, R., Edwards, C., Nakano, S., Cawley, A. M., Pickles, R. J., Gallant, S. C., Crisci, E., Rivier, L., Hagood, J. S., O'Neal, W. K., Baric, R. S., Grubb, B. R., Boucher, R. C., & Randell, S. H. (2024). Prolonged airway explant culture enables study of health, disease, and viral pathogenesis. *BioRxiv: The Preprint Server for Biology*, 2024.02.03.578756. <https://doi.org/10.1101/2024.02.03.578756>
- Lehmann, M., Buhl, L., Alsafadi, H. N., Klee, S., Hermann, S., Mutze, K., Ota, C., Lindner, M., Behr, J., Hilgendorff, A., Wagner, D. E., & Königshoff, M. (2018). Differential effects of Nintedanib and Pirfenidone on lung alveolar epithelial cell function in ex vivo murine and human lung tissue cultures of pulmonary fibrosis. *Respiratory Research*, 19(1), 175. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0876-y>

- Ley, B., Newton, C. A., Arnould, I., Elicker, B. M., Henry, T. S., Vittinghoff, E., Golden, J. A., Jones, K. D., Batra, K., Torrealba, J., Garcia, C. K., & Wolters, P. J. (2017). The MUC5B promoter polymorphism and telomere length in patients with chronic hypersensitivity pneumonitis : An observational cohort-control study. *The Lancet. Respiratory Medicine*, 5(8), 639-647. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(17\)30216-3](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(17)30216-3)
- Li, Y., Zhao, J., Yin, Y., Li, K., Zhang, C., & Zheng, Y. (2022). The Role of IL-6 in Fibrotic Diseases : Molecular and Cellular Mechanisms. *International Journal of Biological Sciences*, 18(14), 5405-5414. <https://doi.org/10.7150/ijbs.75876>
- Liu, F., Mih, J. D., Shea, B. S., Kho, A. T., Sharif, A. S., Tager, A. M., & Tschumperlin, D. J. (2010). Feedback amplification of fibrosis through matrix stiffening and COX-2 suppression. *The Journal of Cell Biology*, 190(4), 693-706. <https://doi.org/10.1083/jcb.201004082>
- Liu, G., Cooley, M. A., Jarnicki, A. G., Borghuis, T., Nair, P. M., Tjin, G., Hsu, A. C., Haw, T. J., Fricker, M., Harrison, C. L., Jones, B., Hansbro, N. G., Wark, P. A., Horvat, J. C., Argraves, W. S., Oliver, B. G., Knight, D. A., Burgess, J. K., & Hansbro, P. M. (2019). Fibulin-1c regulates transforming growth factor- β activation in pulmonary tissue fibrosis. *Journal of Clinical Investigation Insight*, 5(16), e124529, 124529. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.124529>
- Liu, T., De Los Santos, F. G., & Phan, S. H. (2017). The Bleomycin Model of Pulmonary Fibrosis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1627, 27-42. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8_2
- Liu, X. (2008). Inflammatory cytokines augments TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in A549 cells by up-regulating TbetaR-I. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 65(12), 935-944. <https://doi.org/10.1002/cm.20315>
- Liu, X., Song, Y., Hu, S., Bai, Y., Zhang, J., Tai, G., Shao, C., & Pan, Y. (2024). Serum amyloid A contributes to radiation-induced lung injury by activating macrophages through FPR2/Rac1/NF- κ B pathway. *International Journal of Biological Sciences*, 20(12), 4941-4956. <https://doi.org/10.7150/ijbs.100823>

- Lo Re, S., Lecocq, M., Uwambayinema, F., Yakoub, Y., Delos, M., Demoulin, J.-B., Lucas, S., Sparwasser, T., Renauld, J.-C., Lison, D., & Huaux, F. (2011). Platelet-derived growth factor-producing CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T lymphocytes promote lung fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 184(11), 1270-1281. <https://doi.org/10.1164/rccm.201103-0516OC>
- Loonstra, A., Vooijs, M., Beverloo, H. B., Allak, B. A., van Drunen, E., Kanaar, R., Berns, A., & Jonkers, J. (2001). Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(16), 9209-9214. <https://doi.org/10.1073/pnas.161269798>
- Lu, Y., Azad, N., Wang, L., Iyer, A. K. V., Castranova, V., Jiang, B.-H., & Rojanasakul, Y. (2010). Phosphatidylinositol-3-kinase/akt regulates bleomycin-induced fibroblast proliferation and collagen production. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 42(4), 432-441. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0002OC>
- Luzina, I. G., Papadimitriou, J. C., Anderson, R., Pochetuhen, K., & Atamas, S. P. (2006). Induction of prolonged infiltration of T lymphocytes and transient T lymphocyte-dependent collagen deposition in mouse lungs following adenoviral gene transfer of CCL18. *Arthritis and Rheumatism*, 54(8), 2643-2655. <https://doi.org/10.1002/art.21950>

M

- MacKenzie, B., Gopal, V., Fan, L., Maier, E., Zhang, Y., Wasnick, R., Günther, A., Williams 3rd, R., & Shetty, S. (2019). Late Breaking Abstract—Caveolin-1 derived peptide LTI-03 promotes epithelial cell survival and attenuates pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal*, 54(suppl 63). <https://doi.org/10.1183/13993003.congress-2019.PA1299>
- Magkrioti, C., & Aidinis, V. (2013). Autotaxin and lysophosphatidic acid signalling in lung pathophysiology. *World Journal of Respirology*, 3(3), 77-103. <https://doi.org/10.5320/wjr.v3.i3.77>
- Marchal-Duval, E., Homps-Legend, M., Froidure, A., Jaillet, M., Ghanem, M., Lou, D., Justet, A., Maurac, A., Vadel, A., Fortas, E., Cazes, A., Joannes, A., Giersh, L., Mal, H., Mordant, P., Piolot, T., Truchin, M., Mounier, C. M., Schirduan, K., ... Mailleux, A. A. (2023).

- Identification of Paired-related Homeobox Protein 1 as a key mesenchymal transcription factor in pulmonary fibrosis. *ELife*, 12, e79840. <https://doi.org/10.7554/eLife.79840>
- Marinković, A., Mih, J. D., Park, J.-A., Liu, F., & Tschumperlin, D. J. (2012). Improved throughput traction microscopy reveals pivotal role for matrix stiffness in fibroblast contractility and TGF- β responsiveness. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 303(3), L169-180. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00108.2012>
- Marshall, R. P., Puddicombe, A., Cookson, W. O., & Laurent, G. J. (2000). Adult familial cryptogenic fibrosing alveolitis in the United Kingdom. *Thorax*, 55(2), 143-146. <https://doi.org/10.1136/thorax.55.2.143>
- Mejías, J. C., Nelson, M. R., Liseth, O., & Roy, K. (2020). A 96-well format microvascularized human lung-on-a-chip platform for microphysiological modeling of fibrotic diseases. *Lab on a Chip*, 20(19), 3601-3611. <https://doi.org/10.1039/d0lc00644k>
- Mercer, P. F., Woodcock, H. V., Eley, J. D., Platé, M., Sulikowski, M. G., Durrenberger, P. F., Franklin, L., Nanthakumar, C. B., Man, Y., Genovese, F., McAnulty, R. J., Yang, S., Maher, T. M., Nicholson, A. G., Blanchard, A. D., Marshall, R. P., Lukey, P. T., & Chambers, R. C. (2016). Exploration of a potent PI3 kinase/mTOR inhibitor as a novel anti-fibrotic agent in IPF. *Thorax*, 71(8), 701-711. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-207429>
- Metzger, R. J., Klein, O. D., Martin, G. R., & Krasnow, M. A. (2008). The branching programme of mouse lung development. *Nature*, 453(7196), 745-750. <https://doi.org/10.1038/nature07005>
- Mi, S., Li, Z., Yang, H.-Z., Liu, H., Wang, J.-P., Ma, Y.-G., Wang, X.-X., Liu, H.-Z., Sun, W., & Hu, Z.-W. (2011). Blocking IL-17A promotes the resolution of pulmonary inflammation and fibrosis via TGF-beta1-dependent and -independent mechanisms. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 187(6), 3003-3014. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1004081>
- Moeller, A., Ask, K., Warburton, D., Gauldie, J., & Kolb, M. (2008). The bleomycin animal model : A useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(3), 362-382. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.08.011>
- Molina-Molina, M., Machahua-Huamani, C., Vicens-Zygmunt, V., Llatjós, R., Escobar, I., Sala-Llinas, E., Luburich-Hernaiz, P., Dorca, J., & Montes-Worboys, A. (2018). Anti-fibrotic

- effects of pirfenidone and rapamycin in primary IPF fibroblasts and human alveolar epithelial cells. *BMC Pulmonary Medicine*, 18(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s12890-018-0626-4>
- Moodley, Y. P., Misso, N. L. A., Scaffidi, A. K., Fogel-Petrovic, M., McAnulty, R. J., Laurent, G. J., Thompson, P. J., & Knight, D. A. (2003). Inverse effects of interleukin-6 on apoptosis of fibroblasts from pulmonary fibrosis and normal lungs. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 29(4), 490-498. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2002-0262OC>
- Moore, B. B., & Hogaboam, C. M. (2008). Murine models of pulmonary fibrosis. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 294(2), L152-160. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00313.2007>
- Moore, B. B., Kolodsick, J. E., Thannickal, V. J., Cooke, K., Moore, T. A., Hogaboam, C., Wilke, C. A., & Toews, G. B. (2005). CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury. *The American Journal of Pathology*, 166(3), 675-684. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62289-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62289-4)
- Moore, B. B., Paine, R., Christensen, P. J., Moore, T. A., Sitterding, S., Ngan, R., Wilke, C. A., Kuziel, W. A., & Toews, G. B. (2001). Protection from pulmonary fibrosis in the absence of CCR2 signaling. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 167(8), 4368-4377. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.8.4368>
- Moore, B., Lawson, W. E., Oury, T. D., Sisson, T. H., Raghavendran, K., & Hogaboam, C. M. (2013). Animal models of fibrotic lung disease. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 49(2), 167-179. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0094TR>
- Moran-Mendoza, O., Aldhaheri, S., Black, C. J. A., Clements-Baker, M., Khalil, M., & Boag, A. (2021). Mold in Foam Pillows and Mattresses: A Novel Cause of Hypersensitivity Pneumonitis. *Chest*, 160(3), e259-e263. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2021.04.068>
- Morrisey, E. E., & Hogan, B. L. M. (2010). Preparing for the first breath: Genetic and cellular mechanisms in lung development. *Developmental Cell*, 18(1), 8-23. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.12.010>

- Müller, M., & Coiby, C. (1997). Idiopathic interstitial pneumonias : High-resolution CT and histologic findings. *Radiographics : A Review Publication of the Radiological Society of North America, Inc*, 17(4). <https://doi.org/10.1148/radiographics.17.4.9225401>
- Mulugeta, S., Maguire, J. A., Newitt, J. L., Russo, S. J., Kotorashvili, A., & Beers, M. F. (2007). Misfolded BRICHOS SP-C mutant proteins induce apoptosis via caspase-4- and cytochrome c-related mechanisms. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 293(3), L720-729. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00025.2007>
- Muro, A. F., Moretti, F. A., Moore, B. B., Yan, M., Atrasz, R. G., Wilke, C. A., Flaherty, K. R., Martinez, F. J., Tsui, J. L., Sheppard, D., Baralle, F. E., Toews, G. B., & White, E. S. (2008). An essential role for fibronectin extra type III domain A in pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 177(6), 638-645. <https://doi.org/10.1164/rccm.200708-1291OC>
- Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews. Immunology*, 11(11), 723-737. <https://doi.org/10.1038/nri3073>

N

- Naik, P. K., Bozyk, P. D., Bentley, J. K., Popova, A. P., Birch, C. M., Wilke, C. A., Fry, C. D., White, E. S., Sisson, T. H., Tayob, N., Carnemolla, B., Orecchia, P., Flaherty, K. R., Hershenson, M. B., Murray, S., Martinez, F. J., Moore, B. B., & COMET Investigators. (2012). Periostin promotes fibrosis and predicts progression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 303(12), L1046-1056. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00139.2012>
- Naik, P. N., Horowitz, J. C., Moore, T. A., Wilke, C. A., Toews, G. B., & Moore, B. B. (2012). Pulmonary fibrosis induced by γ -herpesvirus in aged mice is associated with increased fibroblast responsiveness to transforming growth factor- β . *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 67(7), 714-725. <https://doi.org/10.1093/gerona/qlr211>
- Naikawadi, R. P., Disayabutr, S., Mallavia, B., Donne, M. L., Green, G., La, J. L., Rock, J. R., Looney, M. R., & Wolters, P. J. (2016). Telomere dysfunction in alveolar epithelial cells

- causes lung remodeling and fibrosis. *Journal of Clinical Investigation Insight*, 1(14), e86704. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.86704>
- Nathan, N., Corvol, H., Amselem, S., & Clement, A. (2015). Biomarkers in Interstitial lung diseases. *Paediatric Respiratory Reviews*, 16(4), 219-224. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2015.05.002>
- Naugle, J. E., Olson, E. R., Zhang, X., Mase, S. E., Pilati, C. F., Maron, M. B., Folkesson, H. G., Horne, W. I., Doane, K. J., & Meszaros, J. G. (2006). Type VI collagen induces cardiac myofibroblast differentiation : Implications for postinfarction remodeling. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 290(1), H323-330. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00321.2005>
- Negretti, N. M., Plosa, E. J., Benjamin, J. T., Schuler, B. A., Habermann, A. C., Jetter, C. S., Gulleman, P., Bunn, C., Hackett, A. N., Ransom, M., Taylor, C. J., Nichols, D., Matlock, B. K., Guttentag, S. H., Blackwell, T. S., Banovich, N. E., Kropski, J. A., & Sucre, J. M. S. (2021). A single-cell atlas of mouse lung development. *Development (Cambridge, England)*, 148(24), dev199512. <https://doi.org/10.1242/dev.199512>
- Newton, C. A., Batra, K., Torrealba, J., Kozlitina, J., Glazer, C. S., Aravena, C., Meyer, K., Raghu, G., Collard, H. R., & Garcia, C. K. (2016). Telomere-related lung fibrosis is diagnostically heterogeneous but uniformly progressive. *European Respiratory Journal*, 48(6), 1710-1720. <https://doi.org/10.1183/13993003.00308-2016>
- Noble, P. W., Albera, C., Bradford, W. Z., Costabel, U., Glassberg, M. K., Kardatzke, D., King, T. E., Lancaster, L., Sahn, S. A., Szwarcberg, J., Valeyre, D., du Bois, R. M., & CAPACITY Study Group. (2011). Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY) : Two randomised trials. *Lancet (London, England)*, 377(9779), 1760-1769. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60405-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60405-4)
- Nogee, L. M., Dunbar, A. E., Wert, S. E., Askin, F., Hamvas, A., & Whitsett, J. A. (2001). A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. *The New England Journal of Medicine*, 344(8), 573-579. <https://doi.org/10.1056/NEJM200102223440805>

- Noth, I., Zhang, Y., Ma, S.-F., Flores, C., Barber, M., Huang, Y., Broderick, S. M., Wade, M. S., Hysi, P., Scurba, J., Richards, T. J., Juan-Guardela, B. M., Vij, R., Han, M. K., Martinez, F. J., Kossen, K., Seiwert, S. D., Christie, J. D., Nicolae, D., ... Garcia, J. G. N. (2013). Genetic variants associated with idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility and mortality : A genome-wide association study. *The lancet. Respiratory Medicine*, *1*(4), 309-317. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(13\)70045-6](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(13)70045-6)
- Nureki, S.-I., Tomer, Y., Venosa, A., Katzen, J., Russo, S. J., Jamil, S., Barrett, M., Nguyen, V., Kopp, M., Mulugeta, S., & Beers, M. F. (2018). Expression of mutant Sftpc in murine alveolar epithelia drives spontaneous lung fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, *128*(9), 4008-4024. <https://doi.org/10.1172/JCI99287>

O

- Ochs, M., Nyengaard, J. R., Jung, A., Knudsen, L., Voigt, M., Wahlers, T., Richter, J., & Gundersen, H. J. G. (2004). The number of alveoli in the human lung. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *169*(1), 120-124. <https://doi.org/10.1164/rccm.200308-1107OC>
- O'Dwyer, D. N., Armstrong, M. E., Trujillo, G., Cooke, G., Keane, M. P., Fallon, P. G., Simpson, A. J., Millar, A. B., McGrath, E. E., Whyte, M. K., Hirani, N., Hogaboam, C. M., & Donnelly, S. C. (2013). The Toll-like Receptor 3 L412F Polymorphism and Disease Progression in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *188*(12), 1442-1450. <https://doi.org/10.1164/rccm.201304-0760OC>
- O'Dwyer, D. N., & Moore, B. B. (2017). The role of periostin in lung fibrosis and airway remodeling. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *74*(23), 4305-4314. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2649-z>
- Okuma, T., Terasaki, Y., Kaikita, K., Kobayashi, H., Kuziel, W. A., Kawasuji, M., & Takeya, M. (2004). C-C chemokine receptor 2 (CCR2) deficiency improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis by attenuation of both macrophage infiltration and production of macrophage-derived matrix metalloproteinases. *The Journal of Pathology*, *204*(5), 594-604. <https://doi.org/10.1002/path.1667>

- Organ, L. A., Duggan, A.-M. R., Oballa, E., Taggart, S. C., Simpson, J. K., Kang'ombe, A. R., Braybrooke, R., Molyneaux, P. L., North, B., Karkera, Y., Leeming, D. J., Karsdal, M. A., Nanthakumar, C. B., Fahy, W. A., Marshall, R. P., Jenkins, R. G., & Maher, T. M. (2019). Biomarkers of collagen synthesis predict progression in the PROFILE idiopathic pulmonary fibrosis cohort. *Respiratory Research*, *20*(1), 148. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1118-7>
- Organ, L., Bacci, B., Koumoundouros, E., Barcham, G., Milne, M., Kimpton, W., Samuel, C., & Snibson, K. (2015). Structural and functional correlations in a large animal model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *BMC Pulmonary Medicine*, *15*, 81. <https://doi.org/10.1186/s12890-015-0071-6>
- Ortiz, L. A., Lasky, J., Hamilton, R. F., Holian, A., Hoyle, G. W., Banks, W., Peschon, J. J., Brody, A. R., Lungarella, G., & Friedman, M. (1998). Expression of TNF and the necessity of TNF receptors in bleomycin-induced lung injury in mice. *Experimental Lung Research*, *24*(6), 721-743. <https://doi.org/10.3109/01902149809099592>

P

- Pan, L., Cheng, Y., Yang, W., Wu, X., Zhu, H., Hu, M., Zhang, Y., & Zhang, M. (2023). Nintedanib Ameliorates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis, Inflammation, Apoptosis, and Oxidative Stress by Modulating PI3K/Akt/mTOR Pathway in Mice. *Inflammation*, *46*(4), 1531-1542. <https://doi.org/10.1007/s10753-023-01825-2>
- Pardo, A., Gibson, K., Cisneros, J., Richards, T. J., Yang, Y., Becerril, C., Yousem, S., Herrera, I., Ruiz, V., Selman, M., & Kaminski, N. (2005). Up-regulation and profibrotic role of osteopontin in human idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Medicine*, *2*(9), e251. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020251>
- Park, S.-W., Ahn, M.-H., Jang, H. K., Jang, A. S., Kim, D.-J., Koh, E.-S., Park, J.-S., Uh, S.-T., Kim, Y. H., Park, J. S., Paik, S. H., Shin, H.-K., Youm, W., & Park, C.-S. (2009). Interleukin-13 and its receptors in idiopathic interstitial pneumonia: Clinical implications for lung function. *Journal of Korean Medical Science*, *24*(4), 614-620. <https://doi.org/10.3346/jkms.2009.24.4.614>

- Parker, M. W., Rossi, D., Peterson, M., Smith, K., Sikström, K., White, E. S., Connett, J. E., Henke, C. A., Larsson, O., & Bitterman, P. B. (2014). Fibrotic extracellular matrix activates a profibrotic positive feedback loop. *The Journal of Clinical Investigation*, *124*(4), 1622-1635. <https://doi.org/10.1172/JCI71386>
- Peabody Lever, J. E., Li, Q., Pavelkova, N., Hussain, S. S., Bakshi, S., Ren, J. Q., Jones, L. I., Kennemur, J., Weupe, M., Campos-Gomez, J., Tang, L., Lever, J. M. P., Wang, D., Stanford, D. D., Foote, J., Harrod, K. S., Kim, H., Phillips, S. E., & Rowe, S. M. (2024). Pulmonary Fibrosis Ferret Model Demonstrates Sustained Fibrosis, Restrictive Physiology, and Aberrant Repair. *BioRxiv: The Preprint Server for Biology*, 2024.06.04.597198. <https://doi.org/10.1101/2024.06.04.597198>
- Pechkovsky, D. V., Prasse, A., Kollert, F., Engel, K. M. Y., Dentler, J., Luttmann, W., Friedrich, K., Müller-Quernheim, J., & Zissel, G. (2010). Alternatively activated alveolar macrophages in pulmonary fibrosis-mediator production and intracellular signal transduction. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, *137*(1), 89-101. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2010.06.017>
- Peljto, A. L., Selman, M., Kim, D. S., Murphy, E., Tucker, L., Pardo, A., Lee, J. S., Ji, W., Schwarz, M. I., Yang, I. V., Schwartz, D. A., & Fingerlin, T. E. (2015). The MUC5B promoter polymorphism is associated with idiopathic pulmonary fibrosis in a Mexican cohort but is rare among Asian ancestries. *Chest*, *147*(2), 460-464. <https://doi.org/10.1378/chest.14-0867>
- Petrovski, S., Todd, J. L., Durheim, M. T., Wang, Q., Chien, J. W., Kelly, F. L., Frankel, C., Mebane, C. M., Ren, Z., Bridgers, J., Urban, T. J., Malone, C. D., Finlen Copeland, A., Brinkley, C., Allen, A. S., O'Riordan, T., McHutchison, J. G., Palmer, S. M., & Goldstein, D. B. (2017). An Exome Sequencing Study to Assess the Role of Rare Genetic Variation in Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *196*(1), 82-93. <https://doi.org/10.1164/rccm.201610-2088OC>
- Phan, S. H., & Thrall, R. S. (1982). Inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by cobra venom factor. *The American Journal of Pathology*, *107*(1), 25-28.
- Phogat, S., Thiam, F., Al Yazeedi, S., Abokor, F. A., & Osei, E. T. (2023). 3D in vitro hydrogel models to study the human lung extracellular matrix and fibroblast function. *Respiratory Research*, *24*(1), 242. <https://doi.org/10.1186/s12931-023-02548-6>

- Piepenburg, O., Grimmer, D., Williams, P. H., & Smith, J. C. (2004). Activin redux : Specification of mesodermal pattern in *Xenopus* by graded concentrations of endogenous activin B. *Development (Cambridge, England)*, *131*(20), 4977-4986. <https://doi.org/10.1242/dev.01323>
- Pierce, E. M., Carpenter, K., Jakubzick, C., Kunkel, S. L., Flaherty, K. R., Martinez, F. J., & Hogaboam, C. M. (2007). Therapeutic targeting of CC ligand 21 or CC chemokine receptor 7 abrogates pulmonary fibrosis induced by the adoptive transfer of human pulmonary fibroblasts to immunodeficient mice. *The American Journal of Pathology*, *170*(4), 1152-1164. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060649>
- Pignatti, P., Brunetti, G., Moretto, D., Yacoub, M.-R., Fiori, M., Balbi, B., Balestrino, A., Cervio, G., Nava, S., & Moscato, G. (2006). Role of the Chemokine Receptors CXCR3 and CCR4 in Human Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *173*(3), 310-317. <https://doi.org/10.1164/rccm.200502-244OC>
- Pociask, D. A., Chen, K., Choi, S. M., Oury, T. D., Steele, C., & Kolls, J. K. (2011). $\Gamma\delta$ T cells attenuate bleomycin-induced fibrosis through the production of CXCL10. *The American Journal of Pathology*, *178*(3), 1167-1176. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.11.055>
- Portal, C., Gouyer, V., Magnien, M., Plet, S., Gottrand, F., & Desseyn, J.-L. (2017). In vivo imaging of the Muc5b gel-forming mucin. *Scientific Reports*, *7*, 44591. <https://doi.org/10.1038/srep44591>
- Pourgholamhossein, F., Rasooli, R., Pournamdari, M., Pourgholi, L., Samareh-Fekri, M., Ghazi-Khansari, M., Iranpour, M., Poursalehi, H.-R., Heidari, M.-R., & Mandegary, A. (2018). Pirfenidone protects against paraquat-induced lung injury and fibrosis in mice by modulation of inflammation, oxidative stress, and gene expression. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *112*, 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.12.034>
- Povedano, J. M., Martinez, P., Flores, J. M., Mulero, F., & Blasco, M. A. (2015). Mice with Pulmonary Fibrosis Driven by Telomere Dysfunction. *Cell Reports*, *12*(2), 286-299. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.028>

- Powell, D. W., Mifflin, R. C., Valentich, J. D., Crowe, S. E., Saada, J. I., & West, A. B. (1999). Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *The American Journal of Physiology*, 277(1), C1-9. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.277.1.C1>
- Prasad, S., Hogaboam, C. M., & Jarai, G. (2014). Deficient repair response of IPF fibroblasts in a co-culture model of epithelial injury and repair. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 7, 7. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-7-7>
- Price, A. P., England, K. A., Matson, A. M., Blazar, B. R., & Panoskaltsis-Mortari, A. (2010). Development of a decellularized lung bioreactor system for bioengineering the lung : The matrix reloaded. *Tissue Engineering. Part A*, 16(8), 2581-2591. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2009.0659>
- Ptasinski, V., Monkley, S. J., Öst, K., Tammia, M., Alsafadi, H. N., Overed-Sayer, C., Hazon, P., Wagner, D. E., & Murray, L. A. (2023). Modeling fibrotic alveolar transitional cells with pluripotent stem cell-derived alveolar organoids. *Life Science Alliance*, 6(8). <https://doi.org/10.26508/lisa.202201853>
- Pulkkinen, V., Bruce, S., Rintahaka, J., Hodgson, U., Laitinen, T., Alenius, H., Kinnula, V. L., Myllarniemi, M., Matikainen, S., & Kere, J. (2010). ELMOD2, a candidate gene for idiopathic pulmonary fibrosis, regulates antiviral responses. *The FASEB Journal*, 24(4), 1167-1177. <https://doi.org/10.1096/fj.09-138545>

R

- Rackley, C. R., & Stripp, B. R. (2012). Building and maintaining the epithelium of the lung. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(8), 2724-2730. <https://doi.org/10.1172/JCI60519>
- Raghu, G., Remy-Jardin, M., Ryerson, C. J., Myers, J. L., Kreuter, M., Vasakova, M., Bargagli, E., Chung, J. H., Collins, B. F., Bendstrup, E., Chami, H. A., Chua, A. T., Corte, T. J., Dalphin, J.-C., Danoff, S. K., Diaz-Mendoza, J., Duggal, A., Egashira, R., Ewing, T., ... Wilson, K. C. (2020). Diagnosis of Hypersensitivity Pneumonitis in Adults. An Official ATS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 202(3), e36-e69. <https://doi.org/10.1164/rccm.202005-2032ST>

- Raghu, G., Remy-Jardin, M., Myers, J. L., Richeldi, L., Ryerson, C. J., Lederer, D. J., Behr, J., Cottin, V., Danoff, S. K., Morell, F., Flaherty, K. R., Wells, A., Martinez, F. J., Azuma, A., Bice, T. J., Bouros, D., Brown, K. K., Collard, H. R., Duggal, A., ... American Thoracic Society, European Respiratory Society, Japanese Respiratory Society, and Latin American Thoracic Society. (2018). Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 198(5), e44-e68. <https://doi.org/10.1164/rccm.201807-1255ST>
- Redente, E. F., Jacobsen, K. M., Solomon, J. J., Lara, A. R., Faubel, S., Keith, R. C., Henson, P. M., Downey, G. P., & Riches, D. W. H. (2011). Age and sex dimorphisms contribute to the severity of bleomycin-induced lung injury and fibrosis. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 301(4), L510-518. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00122.2011>
- Richards, T. J., Park, C., Chen, Y., Gibson, K. F., Peter Di, Y., Pardo, A., Watkins, S. C., Choi, A. M. K., Selman, M., Pilewski, J., Kaminski, N., & Zhang, Y. (2012). Allele-specific transactivation of matrix metalloproteinase 7 by FOXA2 and correlation with plasma levels in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 302(8), L746-L754. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00319.2011>
- Richeldi, L., Costabel, U., Selman, M., Kim, D. S., Hansell, D. M., Nicholson, A. G., Brown, K. K., Flaherty, K. R., Noble, P. W., Raghu, G., Brun, M., Gupta, A., Juhel, N., Klüglich, M., & du Bois, R. M. (2011). Efficacy of a tyrosine kinase inhibitor in idiopathic pulmonary fibrosis. *The New England Journal of Medicine*, 365(12), 1079-1087. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103690>
- Richeldi, L., du Bois, R. M., Raghu, G., Azuma, A., Brown, K. K., Costabel, U., Cottin, V., Flaherty, K. R., Hansell, D. M., Inoue, Y., Kim, D. S., Kolb, M., Nicholson, A. G., Noble, P. W., Selman, M., Taniguchi, H., Brun, M., Le Maulf, F., Girard, M., ... INPULSIS Trial Investigators. (2014). Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *The New England Journal of Medicine*, 370(22), 2071-2082. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1402584>

- Rock, J. R., & Hogan, B. L. M. (2011). Epithelial progenitor cells in lung development, maintenance, repair, and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27, 493-512. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100109-104040>
- Rock, J. R., Randell, S. H., & Hogan, B. L. M. (2010). Airway basal stem cells : A perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Disease Models & Mechanisms*, 3(9-10), 545-556. <https://doi.org/10.1242/dmm.006031>
- Rohani, M. G., McMahan, R. S., Razumova, M. V., Hertz, A. L., Cieslewicz, M., Pun, S. H., Regnier, M., Wang, Y., Birkland, T. P., & Parks, W. C. (2015). MMP-10 Regulates Collagenolytic Activity of Alternatively Activated Resident Macrophages. *The Journal of Investigative Dermatology*, 135(10), 2377-2384. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.167>
- Rosmark, O., Åhrman, E., Müller, C., Elowsson Rendin, L., Eriksson, L., Malmström, A., Hallgren, O., Larsson-Callerfelt, A.-K., Westergren-Thorsson, G., & Malmström, J. (2018). Quantifying extracellular matrix turnover in human lung scaffold cultures. *Scientific Reports*, 8(1), 5409. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23702-x>
- Ross, B., D'Orléans-Juste, P., & Giaid, A. (2010). Potential Role of Endothelin-1 in Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 42(1), 16-20. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0175TR>
- Rozin, G. F., Gomes, M. M., Parra, E. R., Kairalla, R. A., de Carvalho, C. R. R., & Capelozzi, V. L. (2005). Collagen and elastic system in the remodelling process of major types of idiopathic interstitial pneumonias (IIP). *Histopathology*, 46(4), 413-421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2005.02103.x>
- Ryerson, C. J., Corte, T. J., Myers, J. L., Walsh, S. L. F., & Guler, S. A. (2021). A contemporary practical approach to the multidisciplinary management of unclassifiable interstitial lung disease. *The European Respiratory Journal*, 58(6), 2100276. <https://doi.org/10.1183/13993003.00276-2021>
- Ryu, J. H., Colby, T. V., Hartman, T. E., & Vassallo, R. (2001). Smoking-related interstitial lung diseases : A concise review. *The European Respiratory Journal*, 17(1), 122-132. <https://doi.org/10.1183/09031936.01.17101220>

S

- Sack, G. H. (2018). Serum amyloid A - a review. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 24(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s10020-018-0047-0>
- Sakanashi, Y., Takeya, M., Yoshimura, T., Feng, L., Morioka, T., & Takahashi, K. (1994). Kinetics of macrophage subpopulations and expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in bleomycin-induced lung injury of rats studied by a novel monoclonal antibody against rat MCP-1. *Journal of Leukocyte Biology*, 56(6), 741-750. <https://doi.org/10.1002/jlb.56.6.741>
- Salisbury, M. L., Myers, J. L., Belloli, E. A., Kazerooni, E. A., Martinez, F. J., & Flaherty, K. R. (2017). Diagnosis and Treatment of Fibrotic Hypersensitivity Pneumonia. Where We Stand and Where We Need to Go. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 196(6), 690-699. <https://doi.org/10.1164/rccm.201608-1675PP>
- Saraswat, M., Joenväärä, S., Tohmola, T., Sutinen, E., Vartiainen, V., Koli, K., Myllärniemi, M., & Renkonen, R. (2020). Label-free plasma proteomics identifies haptoglobin-related protein as candidate marker of idiopathic pulmonary fibrosis and dysregulation of complement and oxidative pathways. *Scientific Reports*, 10(1), 7787. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64759-x>
- Schiller, H. B., Fernandez, I. E., Burgstaller, G., Schaab, C., Scheltema, R. A., Schwarzmayr, T., Strom, T. M., Eickelberg, O., & Mann, M. (2015). Time- and compartment-resolved proteome profiling of the extracellular niche in lung injury and repair. *Molecular Systems Biology*, 11(7), 819. <https://doi.org/10.15252/msb.20156123>
- Schrier, D. J., Kunkel, R. G., & Phan, S. H. (1983). The role of strain variation in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *The American Review of Respiratory Disease*, 127(1), 63-66. <https://doi.org/10.1164/arrd.1983.127.1.63>
- Schruf, E., Schroeder, V., Le, H. Q., Schönberger, T., Raedel, D., Stewart, E. L., Fundel-Clemens, K., Bluhmki, T., Weigle, S., Schuler, M., Thomas, M. J., Heilker, R., Webster, M. J., Dass, M., Frick, M., Stierstorfer, B., Quast, K., & Garnett, J. P. (2020). Recapitulating idiopathic pulmonary fibrosis related alveolar epithelial dysfunction in a human iPSC-derived air-

- liquid interface model. *The FASEB Journal*, 34(6), 7825-7846.
<https://doi.org/10.1096/fj.201902926R>
- Ségard, B.-D., Kimura, K., Matsuoka, Y., Imamura, T., Ikeda, A., & Iwamiya, T. (2024). Quantification of fibrosis extent and airspace availability in lung: A semi-automatic ImageJ/Fiji toolbox. *PLoS One*, 19(2), e0298015.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0298015>
- Seibold, M. A., Wise, A. L., Speer, M. C., Steele, M. P., Brown, K. K., Loyd, J. E., Fingerlin, T. E., Zhang, W., Gudmundsson, G., Groshong, S. D., Evans, C. M., Garantziotis, S., Adler, K. B., Dickey, B. F., du Bois, R. M., Yang, I. V., Herron, A., Kervitsky, D., Talbert, J. L., ... Schwartz, D. A. (2011). A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis. *The New England Journal of Medicine*, 364(16), 1503-1512.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1013660>
- Sellgren, K. L., Butala, E. J., Gilmour, B. P., Randell, S. H., & Grego, S. (2014). A biomimetic multicellular model of the airways using primary human cells. *Lab on a Chip*, 14(17), 3349-3358. <https://doi.org/10.1039/c4lc00552j>
- Selman, M., King, T. E., Pardo, A., American Thoracic Society, European Respiratory Society, & American College of Chest Physicians. (2001). Idiopathic pulmonary fibrosis: Prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Annals of Internal Medicine*, 134(2), 136-151. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-134-2-200101160-00015>
- Sgalla, G., Biffi, A., & Richeldi, L. (2016). Idiopathic pulmonary fibrosis: Diagnosis, epidemiology and natural history. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 21(3), 427-437.
<https://doi.org/10.1111/resp.12683>
- Shahzeidi, S., Mulier, B., de Crombrughe, B., Jeffery, P. K., McAnulty, R. J., & Laurent, G. J. (1993). Enhanced type III collagen gene expression during bleomycin induced lung fibrosis. *Thorax*, 48(6), 622-628. <https://doi.org/10.1136/thx.48.6.622>
- Sharma, S. K., MacLean, J. A., Pinto, C., & Kradin, R. L. (1996). The effect of an anti-CD3 monoclonal antibody on bleomycin-induced lymphokine production and lung injury.

- American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 154(1), 193-200.
<https://doi.org/10.1164/ajrccm.154.1.8680680>
- Shih, A. R., Nitiwarangkul, C., Little, B. P., Roop, B. W., Nandy, S., Szabari, M. V., Mercaldo, N., Mercaldo, S., Montesi, S. B., Muniappan, A., Berigei, S. R., Lynch, D. A., Sharma, A., & Hariri, L. P. (2021). Practical application and validation of the 2018 ATS/ERS/JRS/ALAT and Fleischner Society guidelines for the diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Research*, 22(1), 124. <https://doi.org/10.1186/s12931-021-01670-7>
- Silvertown, J. D., Walia, J. S., Summerlee, A. J., & Medin, J. A. (2006). Functional expression of mouse relaxin and mouse relaxin-3 in the lung from an Ebola virus glycoprotein-pseudotyped lentivirus via tracheal delivery. *Endocrinology*, 147(8), 3797-3808. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0028>
- Sime, P. J., Marr, R. A., Gauldie, D., Xing, Z., Hewlett, B. R., Graham, F. L., & Gauldie, J. (1998). Transfer of tumor necrosis factor-alpha to rat lung induces severe pulmonary inflammation and patchy interstitial fibrogenesis with induction of transforming growth factor-beta1 and myofibroblasts. *The American Journal of Pathology*, 153(3), 825-832. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)65624-6](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)65624-6)
- Sime, P. J., Xing, Z., Graham, F. L., Csaky, K. G., & Gauldie, J. (1997). Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *The Journal of Clinical Investigation*, 100(4), 768-776. <https://doi.org/10.1172/JCI119590>
- Simonian, P. L., Roark, C. L., Wehrmann, F., Lanham, A. K., Diaz del Valle, F., Born, W. K., O'Brien, R. L., & Fontenot, A. P. (2009). Th17-polarized immune response in a murine model of hypersensitivity pneumonitis and lung fibrosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 182(1), 657-665.
- Simonian, P. L., Wehrmann, F., Roark, C. L., Born, W. K., O'Brien, R. L., & Fontenot, A. P. (2010). $\Gamma\delta$ T cells protect against lung fibrosis via IL-22. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(10), 2239-2253. <https://doi.org/10.1084/jem.20100061>
- Singer, J. P., Katz, P. P., Soong, A., Shrestha, P., Huang, D., Ho, J., Mindo, M., Greenland, J. R., Hays, S. R., Golden, J., Kukreja, J., Kleinhenz, M. E., Shah, R. J., & Blanc, P. D. (2017).

- Effect of Lung Transplantation on Health-Related Quality of Life in the Era of the Lung Allocation Score : A U.S. Prospective Cohort Study. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 17(5), 1334-1345. <https://doi.org/10.1111/ajt.14081>
- Sisson, T. H., Hansen, J. M., Shah, M., Hanson, K. E., Du, M., Ling, T., Simon, R. H., & Christensen, P. J. (2006). Expression of the reverse tetracycline-transactivator gene causes emphysema-like changes in mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 34(5), 552-560. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2005-0378OC>
- Sisson, T. H., Mendez, M., Choi, K., Subbotina, N., Courey, A., Cunningham, A., Dave, A., Engelhardt, J. F., Liu, X., White, E. S., Thannickal, V. J., Moore, B. B., Christensen, P. J., & Simon, R. H. (2010). Targeted injury of type II alveolar epithelial cells induces pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 181(3), 254-263. <https://doi.org/10.1164/rccm.200810-1615OC>
- Southern, B. D., Grove, L. M., Rahaman, S. O., Abraham, S., Scheraga, R. G., Niese, K. A., Sun, H., Herzog, E. L., Liu, F., Tschumperlin, D. J., Egelhoff, T. T., Rosenfeld, S. S., & Olman, M. A. (2016). Matrix-driven Myosin II Mediates the Pro-fibrotic Fibroblast Phenotype. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(12), 6083-6095. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.712380>
- Specks, U., Nerlich, A., Colby, T. V., Wiest, I., & Timpl, R. (1995). Increased expression of type VI collagen in lung fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 151(6), 1956-1964. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.151.6.7767545>
- Stella, G. M., D'Agnano, V., Piloni, D., Saracino, L., Lettieri, S., Mariani, F., Lancia, A., Bortolotto, C., Rinaldi, P., Falanga, F., Primiceri, C., Corsico, A. G., & Bianco, A. (2022). The oncogenic landscape of the idiopathic pulmonary fibrosis : A narrative review. *Translational Lung Cancer Research*, 11(3). <https://doi.org/10.21037/tlcr-21-880>
- Stirchak, E. P., Summerton, J. E., & Weller, D. D. (1989). Uncharged stereoregular nucleic acid analogs : 2. Morpholino nucleoside oligomers with carbamate internucleoside linkages. *Nucleic Acids Research*, 17(15), 6129-6141. <https://doi.org/10.1093/nar/17.15.6129>

- Strikoudis, A., Cieślak, A., Loffredo, L., Chen, Y.-W., Patel, N., Saqi, A., Lederer, D. J., & Snoeck, H.-W. (2019). Modeling of Fibrotic Lung Disease Using 3D Organoids Derived from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Reports*, 27(12), 3709-3723.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.077>
- Strobel, B., Duechs, M. J., Schmid, R., Stierstorfer, B. E., Bucher, H., Quast, K., Stiller, D., Hildebrandt, T., Mennerich, D., Gantner, F., Erb, K. J., & Kreuz, S. (2015). Modeling Pulmonary Disease Pathways Using Recombinant Adeno-Associated Virus 6.2. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 53(3), 291-302. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2014-0338MA>
- Stuart, T., Butler, A., Hoffman, P., Hafemeister, C., Papalexi, E., Mauck, W. M., Hao, Y., Stoeckius, M., Smibert, P., & Satija, R. (2019). Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell*, 177(7), 1888-1902.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.031>
- Subbotina, E., Koganti, S., Hodgson-Zingman, D., & Zingman, L. (2016). Morpholino-driven gene editing: A new horizon for disease treatment and prevention. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 99(1), 21-25. <https://doi.org/10.1002/cpt.276>
- Sueblinvong, V., Neujahr, D. C., Mills, S. T., Roser-Page, S., Ritzenthaler, J. D., Guidot, D., Rojas, M., & Roman, J. (2012). Predisposition for disrepair in the aged lung. *The American Journal of the Medical Sciences*, 344(1), 41-51. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e318234c132>
- Suezawa, T., Kanagaki, S., Moriguchi, K., Masui, A., Nakao, K., Toyomoto, M., Tamai, K., Mikawa, R., Hirai, T., Murakami, K., Hagiwara, M., & Gotoh, S. (2021). Disease modeling of pulmonary fibrosis using human pluripotent stem cell-derived alveolar organoids. *Stem Cell Reports*, 16(12), 2973-2987. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.10.015>
- Suga, M., Iyonaga, K., Ichiyasu, H., Saita, N., Yamasaki, H., & Ando, M. (1999). Clinical significance of MCP-1 levels in BALF and serum in patients with interstitial lung diseases. *The European Respiratory Journal*, 14(2), 376-382. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.1999.14b23.x>
- Sun, H., Calle, E., Chen, X., Mathur, A., Zhu, Y., Mendez, J., Zhao, L., Niklason, L., Peng, X., Peng, H., & Herzog, E. L. (2014). Fibroblast engraftment in the decellularized mouse lung occurs via a β 1-integrin-dependent, FAK-dependent pathway that is mediated by ERK and

opposed by AKT. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 306(6), L463-475. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00100.2013>

Sundarakrishnan, A., Chen, Y., Black, L. D., Aldridge, B. B., & Kaplan, D. L. (2018). Engineered cell and tissue models of pulmonary fibrosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 129, 78-94. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.12.013>

Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., & Mering, C. von. (2019). STRING v11 : Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D607-D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>

T

Takemasa, A., Ishii, Y., & Fukuda, T. (2012). A neutrophil elastase inhibitor prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *The European Respiratory Journal*, 40(6), 1475-1482. <https://doi.org/10.1183/09031936.00127011>

Tanaka, N., Kim, J. S., Newell, J. D., Brown, K. K., Cool, C. D., Meehan, R., Emoto, T., Matsumoto, T., & Lynch, D. A. (2004). Rheumatoid Arthritis-related Lung Diseases : CT Findings. *Radiology*, 232(1), 81-91. <https://doi.org/10.1148/radiol.2321030174>

Tarique, A. A., Logan, J., Thomas, E., Holt, P. G., Sly, P. D., & Fantino, E. (2015). Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 53(5), 676-688. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0012OC>

Thannickal, V. J., Toews, G. B., White, E. S., Lynch, J. P., & Martinez, F. J. (2004). Mechanisms of pulmonary fibrosis. *Annual Review of Medicine*, 55, 395-417. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.55.091902.103810>

Thomas, A. Q., Lane, K., Phillips, J., Prince, M., Markin, C., Speer, M., Schwartz, D. A., Gaddipati, R., Marney, A., Johnson, J., Roberts, R., Haines, J., Stahlman, M., & Loyd, J. E. (2002). Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred. *American*

- Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 165(9), 1322-1328.
<https://doi.org/10.1164/rccm.200112-123OC>
- Thrall, R. S., McCormick, J. R., Jack, R. M., McReynolds, R. A., & Ward, P. A. (1979). Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat : Inhibition by indomethacin. *The American Journal of Pathology*, 95(1), 117-130.
- Tirunavalli, S. K., & Andugulapati, S. B. (2024). Geneticin ameliorates pulmonary fibrosis by attenuating the TGF- β /Smad via modulating AMPK/SIRT1 signaling. *Life Sciences*, 346, 122626. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2024.122626>
- Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., & Brown, R. A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3(5), 349-363. <https://doi.org/10.1038/nrm809>
- Torres-González, E., Bueno, M., Tanaka, A., Krug, L. T., Cheng, D.-S., Polosukhin, V. V., Sorescu, D., Lawson, W. E., Blackwell, T. S., Rojas, M., & Mora, A. L. (2012). Role of endoplasmic reticulum stress in age-related susceptibility to lung fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 46(6), 748-756. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2011-0224OC>
- Treutlein, B., Brownfield, D. G., Wu, A. R., Neff, N. F., Mantalas, G. L., Espinoza, F. H., Desai, T. J., Krasnow, M. A., & Quake, S. R. (2014). Reconstructing lineage hierarchies of the distal lung epithelium using single-cell RNA-seq. *Nature*, 509(7500), 371-375. <https://doi.org/10.1038/nature13173>
- Trujillo, G., Meneghin, A., Flaherty, K. R., Sholl, L. M., Myers, J. L., Kazerooni, E. A., Gross, B. H., Oak, S. R., Coelho, A. L., Evanoff, H., Day, E., Toews, G. B., Joshi, A. D., Schaller, M. A., Waters, B., Jarai, G., Westwick, J., Kunkel, S. L., Martinez, F. J., & Hogaboam, C. M. (2010). TLR9 differentiates rapidly from slowly progressing forms of idiopathic pulmonary fibrosis. *Science Translational Medicine*, 2(57), 57ra82. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001510>
- Tsai, H.-C., Pietrobon, V., Peng, M., Wang, S., Zhao, L., Marincola, F. M., & Cai, Q. (2022). Current strategies employed in the manipulation of gene expression for clinical purposes. *Journal of Translational Medicine*, 20(1), 535. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03747-3>

- Tsakiri, K. D., Cronkhite, J. T., Kuan, P. J., Xing, C., Raghu, G., Weissler, J. C., Rosenblatt, R. L., Shay, J. W., & Garcia, C. K. (2007). Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(18), 7552-7557. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701009104>
- Tsou, Y.-H., Khoneisser, J., Huang, P.-C., & Xu, X. (2016). Hydrogel as a bioactive material to regulate stem cell fate. *Bioactive Materials*, *1*(1), 39-55. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2016.05.001>
- Tsutsui, T., Miyazaki, Y., Kuramochi, J., Uchida, K., Eishi, Y., & Inase, N. (2015). The amount of avian antigen in household dust predicts the prognosis of chronic bird-related hypersensitivity pneumonitis. *Annals of the American Thoracic Society*, *12*(7), 1013-1021. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201412-569OC>

U

- Uchida, M., Shiraishi, H., Ohta, S., Arima, K., Taniguchi, K., Suzuki, S., Okamoto, M., Ahlfeld, S. K., Ohshima, K., Kato, S., Toda, S., Sagara, H., Aizawa, H., Hoshino, T., Conway, S. J., Hayashi, S., & Izuhara, K. (2012). Periostin, a matricellular protein, plays a role in the induction of chemokines in pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *46*(5), 677-686. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2011-0115OC>

V

- Valapour, M., Lehr, C. J., Skeans, M. A., Smith, J. M., Carrico, R., Uccellini, K., Lehman, R., Robinson, A., Israni, A. K., Snyder, J. J., & Kasiske, B. L. (2018). OPTN/SRTR 2016 Annual Data Report : Lung. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, *18 Suppl 1*, 363-433. <https://doi.org/10.1111/ajt.14562>
- Van den Berge, K., Roux de Bézieux, H., Street, K., Saelens, W., Cannoodt, R., Saeys, Y., Dudoit, S., & Clement, L. (2020). Trajectory-based differential expression analysis for single-cell

- sequencing data. *Nature Communications*, 11(1), 1201. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14766-3>
- van den Brûle, S., Heymans, J., Havaux, X., Renauld, J.-C., Lison, D., Huaux, F., & Denis, O. (2007). Profibrotic effect of IL-9 overexpression in a model of airway remodeling. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 37(2), 202-209. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2006-0397OC>
- van Moorsel, C. H. M., Ten Klooster, L., van Oosterhout, M. F. M., de Jong, P. A., Adams, H., Wouter van Es, H., Ruven, H. J. T., van der Vis, J. J., & Grutters, J. C. (2015). SFTPA2 Mutations in Familial and Sporadic Idiopathic Interstitial Pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 192(10), 1249-1252. <https://doi.org/10.1164/rccm.201504-0675LE>
- Vietri, L., Bennett, D., Cameli, P., Bergantini, L., Cillis, G., Sestini, P., Bargagli, E., & Rottoli, P. (2019). Serum amyloid A in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Investigation*, 57(5), 430-434. <https://doi.org/10.1016/j.resinv.2019.03.010>
- Virk, H. S., Biddle, M. S., Smallwood, D. T., Weston, C. A., Castells, E., Bowman, V. W., McCarthy, J., Amrani, Y., Duffy, S. M., Bradding, P., & Roach, K. M. (2021). TGFβ1 induces resistance of human lung myofibroblasts to cell death via down-regulation of TRPA1 channels. *British Journal of Pharmacology*, 178(15), 2948-2962. <https://doi.org/10.1111/bph.15467>
- Vuga, L. J., Tedrow, J. R., Pandit, K. V., Tan, J., Kass, D. J., Xue, J., Chandra, D., Leader, J. K., Gibson, K. F., Kaminski, N., Sciruba, F. C., & Duncan, S. R. (2014). C-X-C Motif Chemokine 13 (CXCL13) Is a Prognostic Biomarker of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 189(8), 966-974. <https://doi.org/10.1164/rccm.201309-1592OC>

W

- Waghray, M., Cui, Z., Horowitz, J. C., Subramanian, I. M., Martinez, F. J., Toews, G. B., & Thannickal, V. J. (2005). Hydrogen peroxide is a diffusible paracrine signal for the induction of epithelial cell death by activated myofibroblasts. *FASEB Journal: Official Publication of*

- the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(7), 854-856.
<https://doi.org/10.1096/fj.04-2882fje>
- Wallis, J. M., Borg, Z. D., Daly, A. B., Deng, B., Ballif, B. A., Allen, G. B., Jaworski, D. M., & Weiss, D. J. (2012). Comparative assessment of detergent-based protocols for mouse lung de-cellularization and re-cellularization. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, 18(6), 420-432. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2011.0567>
- Walsh, S. M., Worrell, J. C., Fabre, A., Hinz, B., Kane, R., & Keane, M. P. (2018). Novel differences in gene expression and functional capabilities of myofibroblast populations in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 315(5), L697-L710. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00543.2017>
- Walters, D. M., & Kleeberger, S. R. (2008). Mouse models of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Current Protocols in Pharmacology*, Chapter 5, Unit 5.46. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0546s40>
- Wang, C., Zhuang, Y., Guo, W., Cao, L., Zhang, H., Xu, L., Fan, Y., Zhang, D., & Wang, Y. (2014). Mucin 5B promoter polymorphism is associated with susceptibility to interstitial lung diseases in Chinese males. *PLoS One*, 9(8), e104919. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104919>
- Wang, Y., Kuan, P. J., Xing, C., Cronkhite, J. T., Torres, F., Rosenblatt, R. L., DiMaio, J. M., Kinch, L. N., Grishin, N. V., & Garcia, C. K. (2009). Genetic Defects in Surfactant Protein A2 Are Associated with Pulmonary Fibrosis and Lung Cancer. *The American Journal of Human Genetics*, 84(1), 52-59. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.11.010>
- Warburton, D., El-Hashash, A., Carraro, G., Tiozzo, C., Sala, F., Rogers, O., Langhe, S. D., Kemp, P. J., Riccardi, D., Torday, J., Bellusci, S., Shi, W., Lubkin, S. R., & Jesudason, E. (2010). Chapter Three—Lung Organogenesis. In P. Koopman (Éd.), *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 90, p. 73-158). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(10\)90003-3](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(10)90003-3)
- Wasnick, R., Korfei, M., Piskulak, K., Henneke, I., Wilhelm, J., Mahavadi, P., Dartsch, R. C., von der Beck, D., Koch, M., Shalashova, I., Weiss, A., Klymenko, O., Askevold, I., Fink, L., Witt, H., Hackstein, H., El Agha, E., Bellusci, S., Klepetko, W., ... Guenther, A. (2023).

- Notch1 Induces Defective Epithelial Surfactant Processing and Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 207(3), 283-299. <https://doi.org/10.1164/rccm.202105-1284OC>
- Wermuth, P. J., Li, Z., Mendoza, F. A., & Jimenez, S. A. (2016). Stimulation of Transforming Growth Factor- β 1-Induced Endothelial-To-Mesenchymal Transition and Tissue Fibrosis by Endothelin-1 (ET-1): A Novel Profibrotic Effect of ET-1. *PLoS One*, 11(9), e0161988. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161988>
- Whelan, D. S., Caplice, N. M., & Clover, A. J. P. (2020). Mesenchymal stromal cell derived CCL2 is required for accelerated wound healing. *Scientific Reports*, 10(1), 2642. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59174-1>
- Wijsenbeek, M., & Cottin, V. (2020). Spectrum of Fibrotic Lung Diseases. *The New England Journal of Medicine*, 383(10), 958-968. <https://doi.org/10.1056/NEJMra2005230>
- Wijsenbeek, M., Kreuter, M., Olson, A., Fischer, A., Bendstrup, E., Wells, C. D., Denton, C. P., Mounir, B., Zouad-Lejour, L., Quaresma, M., & Cottin, V. (2019). Progressive fibrosing interstitial lung diseases : Current practice in diagnosis and management. *Current Medical Research and Opinion*, 35(11), 2015-2024. <https://doi.org/10.1080/03007995.2019.1647040>
- Willis, B. C., & Borok, Z. (2007). TGF-beta-induced EMT : Mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 293(3), L525-534. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00163.2007>
- Willis, B. C., Liebler, J. M., Luby-Phelps, K., Nicholson, A. G., Crandall, E. D., du Bois, R. M., & Borok, Z. (2005). Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1 : Potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *The American Journal of Pathology*, 166(5), 1321-1332. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)62351-6](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)62351-6)
- Wipff, P.-J., Rifkin, D. B., Meister, J.-J., & Hinz, B. (2007). Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix. *The Journal of Cell Biology*, 179(6), 1311-1323. <https://doi.org/10.1083/jcb.200704042>
- Wollin, L., Maillet, I., Quesniaux, V., Holweg, A., & Ryffel, B. (2014). Antifibrotic and anti-inflammatory activity of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib in experimental models of

- lung fibrosis. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 349(2), 209-220. <https://doi.org/10.1124/jpet.113.208223>
- Wu, X., Peters-Hall, J. R., Bose, S., Peña, M. T., & Rose, M. C. (2011). Human bronchial epithelial cells differentiate to 3D glandular acini on basement membrane matrix. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 44(6), 914-921. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0329OC>
- Wynn, T. A. (2003). IL-13 effector functions. *Annual Review of Immunology*, 21, 425-456. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141142>
- Wynn, T. A. (2004). Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nature Reviews. Immunology*, 4(8), 583-594. <https://doi.org/10.1038/nri1412>
- Wynn, T. A. (2007). Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(3), 524-529. <https://doi.org/10.1172/JCI31487>
- Wynn, T. A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of Pathology*, 214(2), 199-210. <https://doi.org/10.1002/path.2277>
- Wynn, T. A. (2011). Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(7), 1339-1350. <https://doi.org/10.1084/jem.20110551>

X

- Xie, T., Liang, J., Liu, N., Huan, C., Zhang, Y., Liu, W., Kumar, M., Xiao, R., D'Armiento, J., Metzger, D., Chambon, P., Papaioannou, V. E., Stripp, B. R., Jiang, D., & Noble, P. W. (2016). Transcription factor TBX4 regulates myofibroblast accumulation and lung fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(8), 3063-3079. <https://doi.org/10.1172/JCI85328>
- Xu, H., Pan, G., & Wang, J. (2023). Repairing Mechanisms for Distal Airway Injuries and Related Targeted Therapeutics for Chronic Lung Diseases. *Cell Transplantation*, 32, 9636897231196488. <https://doi.org/10.1177/09636897231196489>
- Xu, J., Gonzalez, E. T., Iyer, S. S., Mac, V., Mora, A. L., Sutliff, R. L., Reed, A., Brigham, K. L., Kelly, P., & Rojas, M. (2009). Use of senescence-accelerated mouse model in bleomycin-induced lung injury suggests that bone marrow-derived cells can alter the outcome of lung

injury in aged mice. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 64(7), 731-739. <https://doi.org/10.1093/gerona/glp040>

Xu, Q., Norman, J. T., Shrivastav, S., Lucio-Cazana, J., & Kopp, J. B. (2007). In vitro models of TGF-beta-induced fibrosis suitable for high-throughput screening of antifibrotic agents. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 293(2), F631-640. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00379.2006>

Y

Yamada, H. (2011). ANCA : Associated lung fibrosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 32(3), 322-327. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1279828>

Yanagihara, T., Chong, S. G., Vierhout, M., Hirota, J. A., Ask, K., & Kolb, M. (2020). Current models of pulmonary fibrosis for future drug discovery efforts. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 15(8), 931-941. <https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1755252>

Yanagihara, T., Tsubouchi, K., Gholiof, M., Chong, S. G., Lipson, K. E., Zhou, Q., Scallan, C., Upagupta, C., Tikkanen, J., Keshavjee, S., Ask, K., & Kolb, M. R. J. (2022). Connective-Tissue Growth Factor Contributes to TGF- β 1-induced Lung Fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 66(3), 260-270. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2020-0504OC>

Yang, G., Volk, A., Petley, T., Emmell, E., Giles-Komar, J., Shang, X., Li, J., Das, A. M., Shealy, D., Griswold, D. E., & Li, L. (2004). Anti-IL-13 monoclonal antibody inhibits airway hyperresponsiveness, inflammation and airway remodeling. *Cytokine*, 28(6), 224-232. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2004.08.007>

Yang, L., Herrera, J., Gilbertsen, A., Xia, H., Smith, K., Benyumov, A., Bitterman, P. B., & Henke, C. A. (2018). IL-8 mediates idiopathic pulmonary fibrosis mesenchymal progenitor cell fibrogenicity. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 314(1), L127-L136. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00200.2017>

Yang, X., Chen, X., Zhang, S., Fan, W., Zhong, C., Liu, T., Cheng, G., Zhu, L., Liu, Q., Xi, Y., Tan, W., Lin, D., & Wu, C. (2023). Collagen 1-mediated CXCL1 secretion in tumor cells

- activates fibroblasts to promote radioresistance of esophageal cancer. *Cell Reports*, 42(10).
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113270>
- Yao, C., Guan, X., Carraro, G., Parimon, T., Liu, X., Huang, G., Mulay, A., Soukiasian, H. J., David, G., Weigt, S. S., Belperio, J. A., Chen, P., Jiang, D., Noble, P. W., & Stripp, B. R. (2021). Senescence of Alveolar Type 2 Cells Drives Progressive Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 203(6), 707-717.
<https://doi.org/10.1164/rccm.202004-1274OC>
- Yi, E. S., Wawryko, P., & Ryu, J. H. (2024). Diagnosis of interstitial lung diseases : From Averill A. Liebow to artificial intelligence. *Journal of Pathology and Translational Medicine*, 58(1), 1-11. <https://doi.org/10.4132/jptm.2023.11.17>
- Yoshida, M., Sakuma, J., Hayashi, S., Abe, K., Saito, I., Harada, S., Sakatani, M., Yamamoto, S., Matsumoto, N., & Kaneda, Y. (1995). A histologically distinctive interstitial pneumonia induced by overexpression of the interleukin 6, transforming growth factor beta 1, or platelet-derived growth factor B gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(21), 9570-9574. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.21.9570>
- Yoshihara, T., Nanri, Y., Nunomura, S., Yamaguchi, Y., Feghali-Bostwick, C., Ajito, K., Murakami, S., Mawatari, M., & Izuhara, K. (2020). Periostin plays a critical role in the cell cycle in lung fibroblasts. *Respiratory Research*, 21(1), 38. <https://doi.org/10.1186/s12931-020-1299-0>
- Yu, F., Ng, S. S. M., Chow, B. K. C., Sze, J., Lu, G., Poon, W. S., Kung, H.-F., & Lin, M. C. M. (2011). Knockdown of interferon-induced transmembrane protein 1 (IFITM1) inhibits proliferation, migration, and invasion of glioma cells. *Journal of Neuro-Oncology*, 103(2), 187-195. <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0377-4>
- Yu, F., Xie, D., Ng, S. S., Lum, C. T., Cai, M.-Y., Cheung, W. K., Kung, H.-F., Lin, G., Wang, X., & Lin, M. C. (2015). IFITM1 promotes the metastasis of human colorectal cancer via CAV-1. *Cancer Letters*, 368(1), 135-143. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.034>
- Yu, W., Fang, X., Ewald, A., Wong, K., Hunt, C. A., Werb, Z., Matthay, M. A., & Mostov, K. (2007). Formation of cysts by alveolar type II cells in three-dimensional culture reveals a

novel mechanism for epithelial morphogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, 18(5), 1693-1700. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-11-1052>

Z

- Zhang, H. Y., Gharaee-Kermani, M., Zhang, K., Karmioli, S., & Phan, S. H. (1996). Lung fibroblast alpha-smooth muscle actin expression and contractile phenotype in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *The American Journal of Pathology*, 148(2), 527-537.
- Zhang, K., Rekhter, M. D., Gordon, D., & Phan, S. H. (1994). Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and in situ hybridization study. *The American Journal of Pathology*, 145(1), 114-125.
- Zheng, G. X. Y., Terry, J. M., Belgrader, P., Ryvkin, P., Bent, Z. W., Wilson, R., Ziraldo, S. B., Wheeler, T. D., McDermott, G. P., Zhu, J., Gregory, M. T., Shuga, J., Montesclaros, L., Underwood, J. G., Masquelier, D. A., Nishimura, S. Y., Schnall-Levin, M., Wyatt, P. W., Hindson, C. M., ... Bielas, J. H. (2017). Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells. *Nature Communications*, 8, 14049. <https://doi.org/10.1038/ncomms14049>
- Zheng, S., Wang, Q., D'Souza, V., Bartis, D., Dancer, R., Parekh, D., Gao, F., Lian, Q., Jin, S., & Thickett, D. R. (2018). ResolvinD1 stimulates epithelial wound repair and inhibits TGF- β -induced EMT whilst reducing fibroproliferation and collagen production. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 98(1), 130-140. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2017.114>
- Zhu, Z., Homer, R. J., Wang, Z., Chen, Q., Geba, G. P., Wang, J., Zhang, Y., & Elias, J. A. (1999). Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *The Journal of Clinical Investigation*, 103(6), 779-788. <https://doi.org/10.1172/JCI5909>

Annexes

Annexe 1 : Hennion, N., Desseyn, J.-L., Gottrand, F., Wémeau-Stervinou, L., & Gouyer, V. (2022).
La fibrose pulmonaire idiopathique. *médecine/sciences*, 38(6-7), 579-584.
<https://doi.org/10.1051/medsci/2022084>

> La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie pulmonaire chronique, évolutive et mortelle dont l'origine est inconnue. Elle se caractérise par une cicatrisation aberrante de l'épithélium alvéolaire aboutissant à une accumulation de matrice extracellulaire (MÉC). Les foyers fibroblastiques, constitués de fibroblastes et de myofibroblastes, sont responsables de la production excessive de MÉC. Les deux seules molécules thérapeutiques disponibles sur le marché permettent seulement de ralentir l'évolution de la maladie. Dans cette revue, nous présentons les mécanismes impliqués dans la progression de la maladie, ses traitements et les modèles d'étude. <

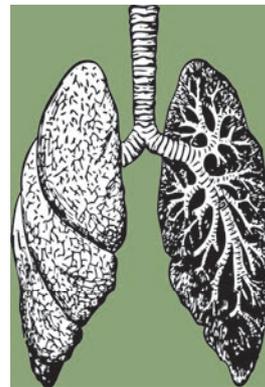
La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie caractérisée par une fibrose progressive du parenchyme pulmonaire, irréversible, de cause inconnue et limitée aux poumons [1] (→). La destruction de l'épithélium alvéolaire est à l'origine d'une diminution des échanges gazeux et d'une réduction des volumes pulmonaires qui conduisent au décès, avec une médiane de survie entre 2 et 5 ans [2]. La FPI est une maladie rare. Sa prévalence en France est estimée à 8,2 pour 100 000 habitants (soit environ 5 500 patients) et son incidence annuelle à 2,8 pour 100 000 habitants (soit environ 1 800 nouveaux cas par an) [3]. Trois millions de personnes souffriraient de cette maladie actuellement dans le monde [4] et une méta-analyse, publiée en 2015, prédit que ce nombre doublera d'ici 2030 [5]. Cette maladie est plus fréquente chez les hommes que les femmes, avec une moyenne d'âge au diagnostic de 65 ans [6]. Aucun traitement n'est efficace à ce jour pour guérir les patients atteints de FPI, exceptée la transplantation pulmonaire. Une des raisons principales

(→) Voir la Nouvelle de G. Savary et al., m/s n° 10, octobre 2019, page 739

Vignette (© DR).

La fibrose pulmonaire idiopathique

Nathan Hennion¹, Jean-Luc Desseyn¹, Frédéric Gottrand¹, Lidwine Wémeau-Stervinou², Valérie Gouyer¹



¹ Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1286 Infinite, F-59000 Lille, France

² Service de pneumologie et immuno-allergologie, Centre de référence constitutif pour les maladies pulmonaires rares, CHU Lille, F-59000 Lille, France
jean-luc.desseyn@inserm.fr

de cette absence de traitement est que les mécanismes précoces de la maladie sont trop peu connus.

Quelques définitions

La fibrose

Les maladies fibrosantes seraient responsables de 45 % des décès dans le monde. La fibrose est une accumulation excessive et anormale de matrice extra-cellulaire¹ produite par les fibroblastes et les myofibroblastes, activés par des cytokines et des facteurs de croissance, avec, pour conséquence, une modification et une destruction progressive de l'architecture tissulaire de l'organe atteint [7]. Elle peut toucher différents organes, tels que le foie, le cœur, les reins ou les poumons. La fibrose peut, mais ce n'est pas toujours le cas, avoir pour origine une inflammation chronique.

Les pneumopathies interstitielles diffuses fibrosantes

La FPI appartient à une vaste famille de maladies touchant le poumon : les pneumopathies interstitielles diffuses (PID), un ensemble hétérogène de maladies caractérisées par une infiltration de l'interstitium pulmonaire par des cellules, de l'œdème ou une présence importante de matrice extra-cellulaire. Les PID présentent des degrés variables d'inflammation et de fibrose. Cette fibrose peut rester stable, ou progresser de façon autonome, sans besoin du déclencheur initial. La FPI est la plus sévère des PID fibrosantes. Le rôle de l'inflammation dans sa progression est mineur et son évolution est inéluctable (Figure 1).

¹ La matrice extracellulaire est composée de collagène, d'élastine et de glycoprotéines, qui jouent un rôle dans l'adhérence cellulaire, et de polysaccharides.

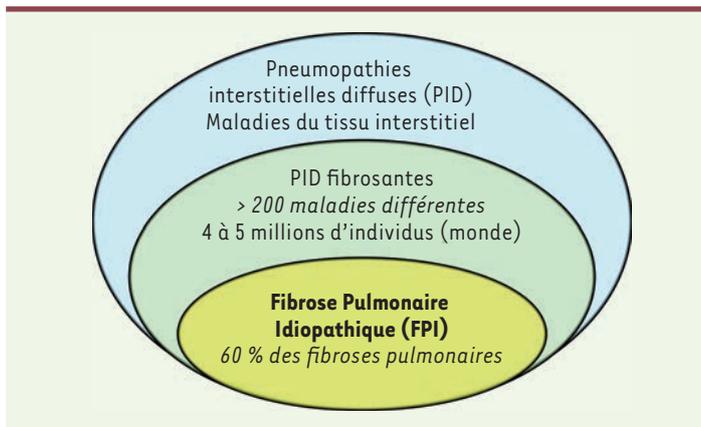


Figure 1. Répartition des pneumopathies interstitielles.

Une classification des maladies pulmonaires fibrosantes est présentée dans le *Tableau I*.

La fibrose pulmonaire idiopathique

La FPI est une fibrose pulmonaire dont l'origine reste inconnue. Les symptômes de cette maladie ne sont pas spécifiques (*Tableau II*), expliquant le retard au diagnostic, qui est fréquent.

Les causes de la FPI

Si l'origine de la FPI est inconnue, de nombreux facteurs qui la favorisent ont été rapportés, qu'ils soient environnementaux ou génétiques (*Figure 2*).

Les facteurs environnementaux favorisants

Des facteurs de risque liés à l'environnement professionnel et extra-professionnel (exposition à la fumée de tabac, agriculture/élevage, oiseaux, coiffure, poussières végétale/animale, textile, métallique, poussières de bois, moisissures, pierre/sable/silice, feux de bois) ont été identifiés. D'autres facteurs de risque sont liés à des comorbidités (diabète, reflux gastro-œsophagien). Mais pour chaque malade, le rôle de ces facteurs de risque est souvent incertain et la cause de la maladie reste inconnue. Les principaux facteurs environnementaux associés à une augmentation du risque de développer une FPI sont le tabagisme, des infections virales, l'inhalation chronique de particules de bois, de métaux ou de silice, ainsi que la prise de certains médicaments [8, 9].

Les facteurs génétiques

Chez 5 à 10 % des personnes, la FPI survient dans un contexte familial ; le plus souvent, la transmission des caractères responsables est autosomique dominante [10].

Formes monogéniques de fibrose pulmonaire familiale

Des mutations touchant principalement deux grandes familles de gènes peuvent être identifiées chez 15 à 20 % des patients atteints de fibrose pulmonaire familiale [11] :

1. Exposition (environnementale, médicamenteuse, professionnelle, etc.)
2. Pneumopathies interstitielles idiopathiques (FPI, pneumonie interstitielle non spécifique idiopathique, etc.)
3. Pathologie du tissu conjonctif (sclérodémie systémique, polyarthrite rhumatoïde, etc.)
4. Sarcoidose
5. Autres (pneumonie à granulocytes éosinophiles, etc.)

Tableau I. Classification des pneumopathies interstitielles diffuses (d'après [3]).

- Toux sèche
- Dyspnée d'effort
- Râles crépitants auscultatoires
- Hippocratisme digital
- Cyanose et signes d'insuffisance cardiaque droite à un stade avancé
- Altération de l'état général (rarement et de mauvais pronostic)

Tableau II. Les symptômes et les signes cliniques de la FPI.

– Des gènes associés à la régulation des télomères : *TERT* (telomerase reverse transcriptase), *TERC* (telomerase RNA component), *TINF2* (*TERF1*-interacting nuclear factor 2), *DKC1* (dyskératose congénitale 1), *RTEL1* (regulator of telomere elongation helicase 1), *PARN* (poly (A)-specific ribonuclease), *NAF1* (nuclear assembly factor 1 ribonucleoprotein). Les mutations affectant ces gènes induisent une diminution de la taille des télomères. Elles modifient l'activité des cellules épithéliales alvéolaires de type 2 (AEC2) [4], mais peuvent également entraîner des atteintes hépatiques, médullaires ou cutanées.

– Des gènes codant des protéines participant à la production de surfactant par les pneumocytes de type 2 : *SFTPA1* (surfactant protein A1), *SFTPA2* (surfactant protein A2), *SFTPC* (surfactant protein C), *ABCA3* (ATP-binding cassette sub-family A member 3), *NKX2-1* (*NK2 homeobox 1*). La modification structurale de la protéine induite par la mutation est à l'origine d'un stress du réticulum endoplasmique.

Variants et polymorphismes génétiques

Plusieurs études d'association entre génotype et maladie ont identifié des polymorphismes nucléotidiques (ou SNP pour *single nucleotide polymorphism*) associés à une augmentation du risque de fibrose pulmonaire, en particulier de FPI. Il s'agit notamment de SNP situés dans les gènes *MUC5B* (mucin 5B, oligomeric mucus/gel-forming), *TERT*, *FAM13A* (family with sequence similarity 13 member A), *OBFC1* (oligonucleotide/oligosaccharide-binding

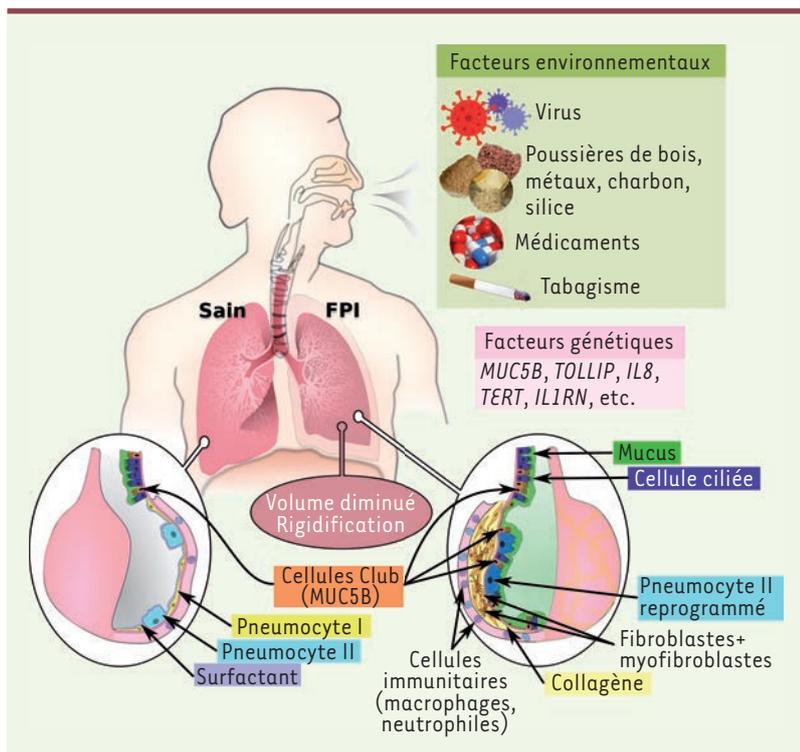


Figure 2. Facteurs et mécanismes mis en jeu dans le développement de la FPI. Des facteurs environnementaux et génétiques sont associés à un risque accru de développer une FPI. Les atteintes caractéristiques se situent dans le secteur interstitiel, avec une multiplication des fibroblastes et leur différenciation en myofibroblastes, des dépôts de collagène, une réparation exacerbée, une reprogrammation des pneumocytes de type 2, du mucus riche en mucine gélifiante MUC5B sécrétée par les cellules Club dans la lumière alvéolaire, et une accumulation de cellules immunitaires. Le poumon perd en souplesse et en volume.

La délocalisation et l'accumulation de mucus en périphérie du poumon, dans des néostructures dites en « rayon de miel », sont deux des caractéristiques de la FPI. Ce mucus est riche en mucine gélifiante MUC5B. Cette mucine est exprimée, normalement, uniquement par des glandes localisées dans la trachée et les grandes bronches, et par des cellules de surface spécialisées, appelées cel-

lules Club, dans les petites bronches et les bronchioles. Des cellules ciliées et des cellules à mucus remplacent progressivement les pneumocytes de type 1 et les pneumocytes de type 2 alvéolaires, diminuant les capacités pulmonaires. On observe donc, au cours de la FPI, une « bronchiolisation » de l'épithélium alvéolaire qui est typique de cette maladie. Une hypothèse expliquant cette augmentation de mucus est qu'il ne serait pas évacué. Il constituerait alors un frein à la réparation tissulaire, voire un réservoir pour des agents agressifs à l'origine de l'inflammation.

lules Club, dans les petites bronches et les bronchioles. Des cellules ciliées et des cellules à mucus remplacent progressivement les pneumocytes de type 1 et les pneumocytes de type 2 alvéolaires, diminuant les capacités pulmonaires. On observe donc, au cours de la FPI, une « bronchiolisation » de l'épithélium alvéolaire qui est typique de cette maladie. Une hypothèse expliquant cette augmentation de mucus est qu'il ne serait pas évacué. Il constituerait alors un frein à la réparation tissulaire, voire un réservoir pour des agents agressifs à l'origine de l'inflammation.

fold-contg 1), *TOLLIP* (*Toll interacting protein*, inhibiteur du *transforming growth factor-β1*, *TGF-β1*), ou *ATP11A* (*ATPase phospholipid-transporting 11A*), ou dans des gènes impliqués dans le maintien de l'intégrité structurale des cellules entre elles, comme *DSP* et *DPP9* qui codent respectivement la desmoplakine et la dipeptidyl peptidase 9 [4]. Un polymorphisme (rs35705950) situé dans le promoteur du gène *MUC5B* est présent chez 10 % de la population caucasienne. La présence de l'allèle à risque multiplie le risque de développer une FPI par six, chez les porteurs hétérozygotes, et par vingt, chez les porteurs homozygotes. Ce polymorphisme est associé à la surexpression de la mucine gélifiante MUC5B et à sa délocalisation en périphérie du poumon, ce qui pourrait induire une inflammation chronique au niveau des cellules épithéliales alvéolaires. Il représente le SNP le plus communément retrouvé chez les patients atteints de FPI [12].

Les mécanismes de la FPI

Certains des mécanismes moléculaires à l'origine de la FPI sont connus (Figure 1), mais le ou les événement(s) déclencheur(s) reste(nt) hypothétique(s). Il est admis qu'une agression chronique de l'épithélium alvéolaire, par des poussières par exemple, stimulerait des voies d'activation de la réparation tissulaire [12]. Dans le tissu conjonctif, cette activation se traduit par une multiplication excessive des fibroblastes qui se différencient en myofibroblastes à l'origine de la formation des foyers fibroblastiques que l'on observe à la périphérie du poumon. Ces foyers produisent une importante quantité de facteurs de croissance, comme le *TGF-β*, et de matrice extracellulaire, qui rigidifie l'épithélium alvéolaire. Cette rigidification entraîne une diminution du volume pulmonaire et, donc, une perte progressive et irréversible des capacités respiratoires.

lules Club, dans les petites bronches et les bronchioles. Des cellules ciliées et des cellules à mucus remplacent progressivement les pneumocytes de type 1 et les pneumocytes de type 2 alvéolaires, diminuant les capacités pulmonaires. On observe donc, au cours de la FPI, une « bronchiolisation » de l'épithélium alvéolaire qui est typique de cette maladie. Une hypothèse expliquant cette augmentation de mucus est qu'il ne serait pas évacué. Il constituerait alors un frein à la réparation tissulaire, voire un réservoir pour des agents agressifs à l'origine de l'inflammation.

La mucine MUC5B, une molécule « émergente » dans la FPI

De tous les polymorphismes associés à la FPI, le variant situé dans la région promotrice du gène *MUC5B* est le facteur de risque génétique le plus important pour la survenue d'une FPI, qu'elle soit sporadique ou familiale. La mucine MUC5B est ainsi devenue, depuis les premières études de polymorphismes réalisées en 2010, une molécule clé pour expliquer la survenue de la FPI. MUC5B est une macro-glycoprotéine sécrétée par les cellules caliciformes, les glandes sous-muqueuses, et les cellules séreuses. Cette mucine est gélifiante² : elle se polymérise et capte des molécules d'eau pour

² La structure complexe des mucines gélifiantes et la composition et fonctions du mucus, que nous ne détaillons pas dans cette revue, sont l'objet d'un article publié dans *médecine/sciences* [13].



Figure 3. Coupe scanographique passant par les bases pulmonaires, montrant les réticulations intralobulaires et les rayons de miel, de topographie prédominante sous-pleurale (Bull Acad Natle Méd 2010 ; 194 : 353-65, séance du 2 février 2010).

former un gel de mucus [14]. En étant sécrété et en recouvrant les épithéliums, ce mucus participe à la protection des cellules épithéliales contre les particules toxiques et contre les agents pathogènes [15] (→). Chez la souris, l'invalidation du gène orthologue, *Muc5b*, a révélé que cette mucine était indispensable à la clairance mucociliaire et qu'elle protégeait les poumons d'éventuelles entrées d'agents pathogènes [16].

(→) Voir la Nouvelle de J.-L. Desseyn et al., m/s n° 5, mai 2017, page 478

Les agents pro-fibrosants

Le rôle de nombreuses molécules, des cytokines ou des facteurs de croissance, a été décrit comme étant à l'origine ou participant à la progression de la fibrose. Le *Tableau III* recense les principales molécules, les cellules qui les produisent, les cellules cibles, et leurs fonctions.

Le diagnostic de FPI

Le diagnostic de la FPI est désormais bien codifié, et implique des pneumologues, des radiologues et des anatomo-pathologistes spécialisés, au sein d'équipes multidisciplinaires [17, 18]. Il repose sur la présence de signes spécifiques observés sur un scanner thoracique : aspect dit de pneumopathie interstitielle commune, associant des réticulations, des bronchectasies par traction, des images en rayon de miel, avec une distribution sous-pleurale et un gradient apico-dorsal, ainsi que l'exclusion de toute autre cause de fibrose pulmonaire (Figure 3). Si la combinaison des données cliniques et des images du scanner thoracique ne permet pas d'établir clairement le diagnostic, une biopsie pulmonaire (chirurgicale ou par cryo-

biopsie³) devient nécessaire. Cependant, cette intervention est invasive et non dénuée de risque pour le patient. D'autres approches diagnostiques sont donc en cours de développement, comme l'identification de marqueurs biologiques circulants, tels que les métalloprotéase MMP1 et MMP7 [19], ou l'utilisation d'une approche par intelligence artificielle utilisant les données d'expression de gènes sans *a priori*, obtenues par des analyses réalisées par utilisation de *micro-arrays* ou par séquençage d'ARN [20].

Les traitements

Les traitements pharmacologiques

La FPI est une maladie grave, pour laquelle il n'existe pas de traitement curatif en dehors de la transplantation pulmonaire. Celle-ci est envisagée chez tous les patients âgés de moins de 65 ans dont le diagnostic définitif de FPI est établi, si la maladie est sévère ou s'aggrave. Cet âge limite est relatif et dépend des pratiques locales ; les comorbidités doivent être prises en compte [21].

Deux médicaments anti-fibrosants, dont les principes actifs sont la pirféridone et le nintédanib, sont aujourd'hui disponibles. Ils permettent de ralentir l'évolution de la maladie et d'allonger la durée de vie du patient. Les mécanismes d'action de la pirféridone dans la FPI restent peu compris. On sait néanmoins que cette molécule inhibe l'expression des pro-collagènes de type I et II et la synthèse de TGF- β 1 [22]. Le nintédanib est, quant à lui, un inhibiteur de tyrosine kinase. Il cible le récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), diminuant l'angiogenèse, ainsi que les récepteurs du FGF (*fibroblast growth factor*) et du PDGF (*platelet-derived growth factor*), réduisant ainsi l'activité et la différenciation des fibroblastes [23]. Ces molécules ont montré leur efficacité dans d'autres maladies fibrosantes et progressives du poumon [24-26]. Leurs effets secondaires sont cependant fréquents (diarrhées, nausées, diminution de l'appétit, augmentation de la photosensibilité, etc.). Ces molécules ne font que ralentir la maladie et l'absence de traitement curatif stimule grandement la recherche pharmaceutique. Plusieurs molécules candidates, en cours d'essais cliniques, pourraient ainsi être mises sur le marché dans les prochaines années.

³ La cryobiopsie pulmonaire utilise une cryosonde appliquée par l'endoscope qui permet de recueillir des échantillons d'une taille supérieure à ceux obtenus avec des pinces à biopsie standard. Cette méthode est moins dangereuse pour le patient qu'une biopsie pulmonaire standard (<https://www.edimark.fr/lettre-pneumologue/fi/evidence-fpi/cryobiopsie-pulmonaire-transbronchique-comme-alternative-a-biopsie-pulmonaire-chirurgicale>).

Molécules	Origines	Cibles	Fonctions	Références
TGF- β 1	Macrophages	Fibroblastes	<i>Action pléiotrope :</i> – Différenciation des fibroblastes en myofibroblastes – Inhibe la prolifération des cellules épithéliales alvéolaires – Stimule la synthèse de la matrice extracellulaire	[29]
IL-13	Lymphocytes Th2	Cellules souches de l'épithélium alvéolaire	<i>Bronchiolisation de l'épithélium alvéolaire :</i> les cellules souches des alvéoles se différencient en cellules à mucus et non en cellules épithéliales alvéolaires	[30]
IL-1 β	Macrophages	Fibroblastes Cellules épithéliales pulmonaires Neutrophiles Lymphocytes	Stimule l'inflammation pulmonaire et la production de collagène, induisant une destruction tissulaire	[31]
TNF- α	Fibroblastes	Fibroblastes	<i>Action paracrine</i> Stimule la migration des fibroblastes	[32]
PDGF-AB	Macrophages	Fibroblastes	<i>Substance mitogène</i> – Stimule la migration de fibroblastes – Augmente la production de collagène	[33]
LPA	Synthèse extracellulaire	Cellules épithéliales Cellules endothéliales Fibroblastes	– Apoptose des cellules épithéliales – Augmentation de la perméabilité vasculaire – Stimule la prolifération, la persistance et le recrutement des fibroblastes	[34]

Tableau III. Les principales molécules pro-fibrosantes intervenant dans la FPI. TGF- β 1 : transforming growth factor β 1 ; IL-13 : interleukine 13 ; IL-1 β : interleukine 1 β ; TNF- α : tumor necrosis factor α ; PDGF-AB : platelet-derived growth factor AB ; LPA : lysophosphatidic acid.

Les interventions non pharmacologiques

À côté des prescriptions de molécules, les premières mesures de prise en charge des patients consistent à effectuer un sevrage tabagique, si le patient est fumeur, à assurer le maintien d'une activité physique régulière ainsi qu'un suivi nutritionnel, et à vacciner contre la grippe, contre le pneumocoque, et, désormais, contre le virus responsable de la COVID-19 (*coronavirus disease 2019*). La réhabilitation respiratoire, l'oxygénothérapie de déambulation, si elle est indiquée, et les traitements symptomatiques, ont, quant à eux, pour objectif d'améliorer la tolérance à l'effort du patient et sa qualité de vie⁴.

Les modèles d'étude de la FPI

L'absence de traitement curatif de la FPI résulte, en partie, de l'absence de modèles expérimentaux de fibrose pulmonaire satisfaisants, permettant d'en comprendre les mécanismes physiopathologiques. *In vivo*, le modèle de référence chez le rongeur, est celui de la fibrose pulmonaire induite par instillation de bléomycine, à l'origine d'une

fibrose pulmonaire massive et centrale. Cependant, la FPI se caractérise au contraire par une fibrose localisée à la périphérie du poumon, avec des foyers fibroblastiques et des structures en rayon de miel [27], rendant ce modèle murin inadapté. Plus récemment, *in vitro*, plusieurs modèles expérimentaux, comme la culture cellulaire en deux ou trois dimensions, la culture de sphéroïdes ou d'organoïdes, et la technique d'*organ-on-chip* (organe sur puce) ont été développés [28]. Cependant, ces modèles ne permettent pas d'étudier les interactions entre épithélium et mésenchyme, pourtant primordiales dans la maladie.

Conclusion

Le diagnostic de la FPI reste encore trop tardif, puisque les mécanismes précoces participant à l'instauration et au développement de la maladie demeurent inconnus. L'objectif majeur pour la recherche sur cette maladie, est donc de développer un modèle expérimental, le plus intégré possible, afin de déterminer les gènes impliqués

⁴ https://has-sante.fr/jcms/p_3278607/fr/fibrose-pulmonaire-idiopathique

et les mécanismes moléculaires responsables de son installation et de son évolution. Un tel modèle devrait permettre d'identifier de nouveaux biomarqueurs spécifiques de cette maladie et donc de nouvelles cibles thérapeutiques afin de limiter, voire d'empêcher la progression de la FPI. \diamond

SUMMARY

Idiopathic pulmonary fibrosis

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic, progressive and fatal lung disease of unknown origin. It is characterized by aberrant scarring of the alveolar epithelium leading to an accumulation of extracellular matrix (ECM). Fibroblastic foci, consisting of fibroblasts and myofibroblasts, are responsible for the excessive production of ECM. The two therapeutic molecules available on the market to date only allow to slow down the evolution of the disease. In this review, we present the mechanisms involved in the progression of the disease, its treatments and the study models. \diamond

LIENS D'INTÉRÊT

Lidwine Wémeau-Stervinoù déclare des liens d'intérêt avec les laboratoires Boehringer-Ingelheim, Roche et Sanofi.

REMERCIEMENTS

Nathan Hennion est soutenu par une allocation de doctorat de la région Hauts-de-France et du Centre hospitalo-universitaire de Lille. Ce travail a reçu le soutien de la région Hauts-de-France (Start-AIRR), de l'1-SITE université Lille Nord-Europe et du programme fédératif hospitalo-universitaire (FHU) lillois « 1 000 jours pour la santé ».

RÉFÉRENCES

- Savary G, Pottier N, Mari B, et al. La fonction d'un long ARN non codant décodée dans la fibrose pulmonaire idiopathique. *Med Sci (Paris)* 2019 ; 35 : 739-42.
- Cruwys S, Hein P, Humphries B, et al. Drug discovery and development in idiopathic pulmonary fibrosis: challenges and opportunities. *Drug Discov Today* 2020 ; 25 : 2277-83.
- Duchemann B, Annesi-Maesano I, Jacobe de Naurois C, et al. Prevalence and incidence of interstitial lung diseases in a multi-ethnic county of Greater Paris. *Eur Respir J* 2017 ; 50 : 1602419.
- Martinez FJ, Collard HR, Pardo A, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat Rev Dis Primer* 2017 ; 3 : 17074.
- Hutchinson J, Fogarty A, Hubbard R, et al. Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review. *Eur Respir J* 2015 ; 46 : 795-806.
- Hopkins RB, Burke N, Fell C, et al. Epidemiology and survival of idiopathic pulmonary fibrosis from national data in Canada. *Eur Respir J* 2016 ; 48 : 187-95.
- Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008 ; 214 : 199-210.
- Ranzieri S, Illica Magrini E, Mozzoni P, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis and occupational risk factors. *Med Lav* 2019 ; 110 : 407-36.
- Sheng G, Chen P, Wei Y, et al. Viral Infection Increases the Risk of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Meta-Analysis. *Chest* 2020 ; 157 : 1175-87.
- Kropski JA, Lawson WE, Young LR, et al. Genetic studies provide clues on the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Dis Model Mech* 2013 ; 6 : 9-17.
- Spagnolo P, Grunewald J, Bois RM du. Genetic determinants of pulmonary fibrosis: evolving concepts. *Lancet Respir Med* 2014 ; 2 : 416-28.
- Evans CM, Fingerlin TE, Schwarz MI, et al. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Genetic Disease That Involves Mucociliary Dysfunction of the Peripheral Airways. *Physiol Rev* 2016 ; 96 : 1567-91.
- Demouveau B, Gouyer V, Magnien M, et al. La structure des mucines conditionne les propriétés viscoélastiques des gels de mucus. *Med Sci (Paris)* 2018 ; 34 : 806-12.
- Portal C, Gouyer V, Gottrand F, et al. Ocular mucins in dry eye disease. *Exp Eye Res* 2019 ; 186 : 107724.
- Desseyn J-L, Portal C, Gottrand F, et al. Différenciation des cellules à mucus et régulation de la mucine gélifiante Muc5b : un nouvel outil pour des études ex vivo et précliniques in vivo. *Med Sci (Paris)* 2017 ; 33 : 478-80.
- Roy MG, Livraghi-Butrica A, Fletcher AA, et al. Muc5b is required for airway defence. *Nature* 2014 ; 505 : 412-16.

- Cottin V, Bonniaud P, Cadranel J, et al. [French practical guidelines for the diagnosis and management of IPF - 2021 update, short version]. *Rev Mal Respir* 2022 ; S0761-8425(22)00026-2.
- Raghu G, Rochberg B, Zhang Y, 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* 2015 ; 192 : e3-19.
- Somogyi V, Chaudhuri N, Torrisi SE, et al. The therapy of idiopathic pulmonary fibrosis: what is next? *Eur Respir Rev* 2019 ; 28 : 190021.
- Kim SY, Diggins J, Pankratz D, et al. Classification of usual interstitial pneumonia in patients with interstitial lung disease: assessment of a machine learning approach using high-dimensional transcriptional data. *Lancet Respir Med* 2015 ; 3 : 473-82.
- Cottin V, Crestani B, Valeyre D, et al. Diagnosis and management of idiopathic pulmonary fibrosis: French practical guidelines. *Eur Respir Rev* 2014 ; 23 : 193-214.
- Lederer DJ, Martinez FJ. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med* 2018 ; 378 : 1811-23.
- Korfei M, Stelmaszek D, MacKenzie B, et al. Comparison of the antifibrotic effects of the pan-histone deacetylase-inhibitor panobinostat versus the IPF-drug pirfenidone in fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One* 2018 ; 13 : e0207915.
- Flaherty KR, Wells AU, Cottin V, et al. Nintedanib in Progressive Fibrosing Interstitial Lung Diseases. *N Engl J Med* 2019 ; 381 : 1718-27.
- Maher TM, Corte TJ, Fischer A, et al. Pirfenidone in patients with unclassifiable progressive fibrosing interstitial lung disease: a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Respir Med* 2020 ; 8 : 147-57.
- Behr J, Prasse A, Kreuter M, et al. Pirfenidone in patients with progressive fibrotic interstitial lung diseases other than idiopathic pulmonary fibrosis (RELIEF): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet Respir Med* 2021 ; 9 : 476-86.
- Blackwell TS, Tager AM, Borok Z, et al. Future directions in idiopathic pulmonary fibrosis research. An NHLBI workshop report. *Am J Respir Crit Care Med* 2014 ; 189 : 214-22.
- Sundarakrishnan A, Chen Y, Black LD, et al. Engineered cell and tissue models of pulmonary fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev* 2018 ; 129 : 78-94.
- Saito A, Horie M, Micke P, et al. The Role of TGF- β Signaling in Lung Cancer Associated with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Int J Mol Sci* 2018 ; 19 : E3611.
- Glisinski KM, Schlobohm AJ, Paramore SV, et al. Interleukin-13 disrupts type 2 pneumocyte stem cell activity. *JCI Insight* 2020 ; 5 : 131232.
- Song C, He L, Zhang J, et al. Fluorofenidone attenuates pulmonary inflammation and fibrosis via inhibiting the activation of NALP3 inflammasome and IL-1 β /IL-1R1/MyD88/NF- κ B pathway. *J Cell Mol Med* 2016 ; 20 : 2064-77.
- Epstein Shochet G, Brook E, Israeli-Shani L, et al. Fibroblast paracrine TNF- α signaling elevates integrin α 5 expression in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). *Respir Res* 2017 ; 18 : 122.
- Antoniades HN, Bravo MA, Avila RE, et al. Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 1990 ; 86 : 1055-64.
- Tager AM. Autotaxin emerges as a therapeutic target for idiopathic pulmonary fibrosis: limiting fibrosis by limiting lysophosphatidic acid synthesis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012 ; 47 : 563-65.

TIRÉS À PART



**Abonnez-vous
à médecine/sciences**

**Bulletin d'abonnement page 612
dans ce numéro de m/s**

Annexe 2 : Hennion, N., Chenivresse, C., Humez, S., Gottrand, F., Desseyn, J.-L., & Gouyer, V. (2024). Fibrose pulmonaire idiopathique : Recherche modèle désespérément. *Revue des Maladies Respiratoires*, 41(4), 274-278. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2024.02.009>



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com



RECHERCHE EN PNEUMOLOGIE

Fibrose pulmonaire idiopathique : recherche modèle désespérément



Idiopathic pulmonary fibrosis: Desperately seeking a model

N. Hennion^a, C. Chenivresse^b, S. Humez^{c,d},
F. Gottrand^a, J.-L. Desseyn^{a,*}, V. Gouyer^a

^a Inserm, U1286 – Infinite, Université de Lille, CHU de Lille, 59000 Lille, France

^b Inserm, CNRS, U1019 – UMR 9017 – Center for Infection and Immunity of Lille (CIIL), Centre de Référence Constitutif des Maladies Pulmonaires Rares, Université de Lille, CHU de Lille, Lille, France

^c Department of Pathology, Université de Lille, CHU de Lille, Lille, France

^d Inserm, CNRS, UMR9020 – UMR1277 – Canther – Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, Institut Pasteur de Lille, Université de Lille, CHU de Lille, Lille, France

Reçu le 5 février 2024 ; accepté le 5 février 2024

Disponible sur Internet le 12 mars 2024

MOTS CLÉS

Fibrose pulmonaire
idiopathique ;
Modèles
expérimentaux ;
Souris

Résumé La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie pulmonaire chronique, évolutive et mortelle dont l'origine et les mécanismes de développement restent inconnus. Les rares traitements pharmacologiques disponibles ne font que ralentir la progression de la maladie. Le développement de traitements curatifs est limité par l'absence de modèles expérimentaux capables de mimer les mécanismes physiopathologiques spécifiques de la FPI. Cette mini-revue a pour but de passer en revue les modèles animaux expérimentaux les plus utilisés dans l'étude de la FPI et montrer la nécessité de rechercher de nouveaux modèles plus satisfaisants.

© 2024 SPLF. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : jean-luc.desseyn@inserm.fr (J.-L. Desseyn).

KEYWORDS

Idiopathic pulmonary fibrosis;
Experimental models;
Mouse

Summary Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic, progressive and fatal lung disease of which the origin and development mechanisms remain unknown. The few available pharmacological treatments can only slow the progression of the disease. The development of curative treatments is hampered by the absence of experimental models that can mimic the specific pathophysiological mechanisms of IPF. The aim of this mini-review is to provide an overview of the most commonly used experimental animal models in the study of IPF and to underline the urgent need to seek out new, more satisfactory models.

© 2024 SPLF. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Introduction

La fibrose pulmonaire (FP) est la conséquence d'une accumulation excessive et anormale de matrice extra-cellulaire (MEC) produite par les fibroblastes et les myofibroblastes dans le parenchyme pulmonaire. Elle a pour conséquence une rigidification du poumon et une destruction progressive du tissu alvéolaire à l'origine d'une diminution des volumes et de la capacité de diffusion pulmonaires. De nombreuses formes de FP ont été décrites en fonction de leurs caractéristiques histologiques et/ou évolutives. La FP idiopathique (FPI) est une maladie rare d'origine inconnue par définition et dont la prévalence en France est de 8,2 cas pour 100 000 habitants [1]. Dans la FPI, la fibrose est typiquement dense, associée à une destruction architecturale (rayon de miel) et à la présence de foyers fibroblastiques (sites de prolifération des fibroblastes), de distribution prédominante sous-pleurale mais disséminée (alternance de zones saines et pathologiques) [2]. Ce profil histologique est appelé pneumopathie interstitielle commune. Le diagnostic de la FPI est tardif et touche préférentiellement les hommes. Plusieurs facteurs de risques ont été identifiés dont l'environnement (pollution, fumée de cigarette, poussières, virus) et des polymorphismes de gènes associés aux télomères, à des protéines du surfactant ou encore un polymorphisme du promoteur du gène codant la mucine géliifiante respiratoire MUC5B [3]. La FPI est une maladie chronique évolutive et incurable avec une médiane de survie entre 2 et 5 ans. Les traitements disponibles (nintédanib et pirféridone) permettent de ralentir la progression de la FP mais pas de la faire régresser. De nombreuses molécules ont démontré une efficacité pour limiter la progression de la FP dans les modèles précliniques de FPI mais se sont avérées décevantes dans les essais cliniques [4]. Ceci est probablement en partie expliqué par le fait que les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu dans la FPI restent encore insuffisamment décryptés et que les modèles précliniques disponibles de FP ne récapitulent pas en tous points la FPI. Le but de cette revue est de faire le point sur les principaux modèles expérimentaux intégrés de FP mimant une FPI. Les modèles alternatifs, à savoir *ex vivo* comme les cultures en tranches épaisses de poumons et *in vitro* (culture 2D et 3D de cellules), ne seront pas traités ici.

Modèles bléomycine

Le modèle standard d'induction de FP chez l'animal est l'instillation de bléomycine (BLM), antibiotique isolé de *Streptomyces vericillatus*. La BLM, utilisée par voie intraveineuse comme anticancéreux chez des patients souffrant notamment d'un lymphome, a montré des propriétés profibrosantes dans le poumon de ces mêmes patients. Depuis, elle est très largement utilisée pour induire expérimentalement une FP chez l'animal de laboratoire, particulièrement chez la souris, généralement par une administration intra-trachéale unique. La BLM induit des cassures simple brin et double brins dans l'ADN, ce qui induit l'apoptose cellulaire. La BLM induit l'apoptose des cellules épithéliales du parenchyme pulmonaire (jours 1 à 3), suivie d'une infiltration inflammatoire excessive (jours 3 à 9) [5]. Le poumon est particulièrement sensible aux effets de la BLM puisque la BLM hydrolase, enzyme d'inactivation de la BLM, y est faiblement exprimée [6]. La réponse inflammatoire pulmonaire est caractérisée par une augmentation de l'expression des cytokines interleukine (IL)-1, IL-6, de *Tumor Necrosis Factor* (TNF)- α , de l'interféron (IFN)- γ suivie de l'étape de fibrogenèse caractérisée par une augmentation de *Transforming Growth Factor* (TGF)- β 1, de *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF) et du collagène de type 1 [7]. Des neutrophiles sont retrouvés dans le lavage broncho-alvéolaire au jour 3 et des lymphocytes au jour 6 après administration intra-trachéale de BLM. Cette inflammation entraîne la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes à l'origine de dépôts de MEC et du développement de FP (jours 10 à 21). La signature moléculaire de FP induite par une instillation unique de BLM chez la souris est très similaire à celle retrouvée chez l'Homme lors de la phase fibrosante active de la maladie [8]. Sur le plan histologique, on observe un épaississement du septum alvéolaire, une fibrose intra-alvéolaire et interstitielle (Fig. 1), une augmentation du nombre de macrophages alvéolaires, une dilatation des bronchioles et des conduits alvéolaires [8,9]. Cependant, la FP induite chez la souris n'est pas entièrement représentative de la FPI du fait de la rapidité de développement de la fibrose et de son auto-résolution habituellement 21 à 28 jours après administration de BLM [5]. Des modèles d'administrations intra-trachéales répétées de bléomycine ont d'ailleurs été mis en place afin de limiter cette auto-résolution [10]. Les

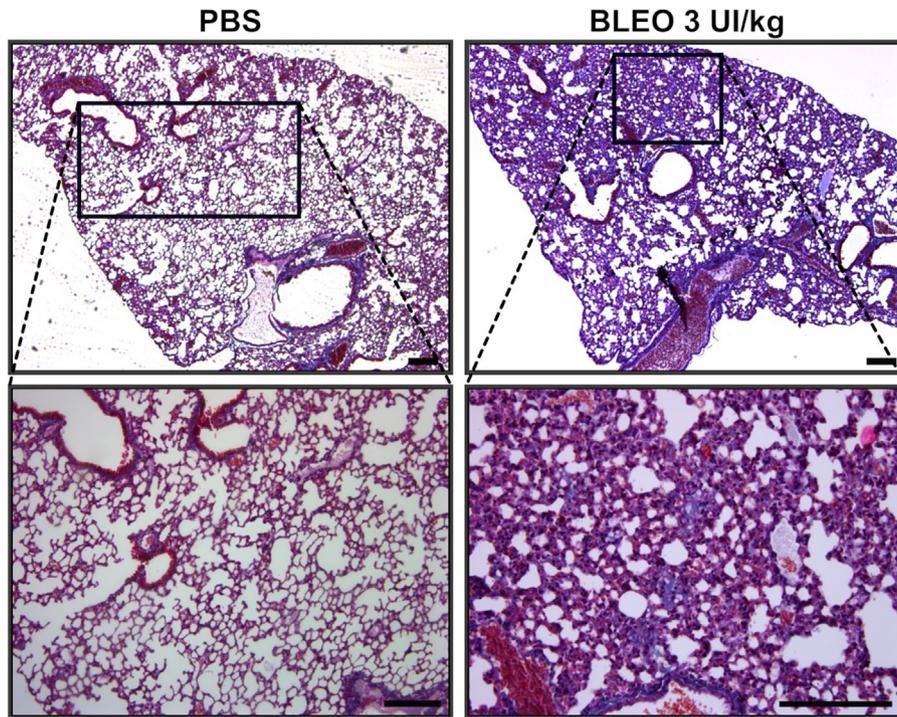


Figure 1. Coupes histologiques colorées au trichrome de Masson de poumons de souris après instillation intra-trachéale de bléomycine. L'instillation de bléomycine (BLEO) induit une désorganisation des alvéoles (zoom) avec un épaississement des septas et des dépôts de collagène (bleu) par rapport à un poumon de souris ayant reçu par instillation du PBS (contrôle). Barres d'échelle : 100 μ m. Valérie Gouyer, données non publiées.

principales voies d'administrations, avantages et désavantages du modèle BLM sont listés dans le [Tableau 1](#).

Infections virales, vecteurs viraux

Le rôle du virome comme médiateur pro-fibrosant dans un contexte d'âge avancé a été démontré. En effet, les souris âgées d'au moins 15 mois développent une FP suite à une infection expérimentale par le virus murin de l'herpès γ HV-68 qui induit une surexpression de TGF- β par les fibroblastes et les macrophages alvéolaires [12]. Ces résultats suggèrent un lien entre la présence de génomes viraux dans les poumons et la progression de la FPI. Des vecteurs de transferts viraux, adénovirus, et lentivirus sont utilisés pour induire la surexpression de cytokines pro-fibrosantes dans le poumon. L'adénovirus-TGF- β 1 est le plus utilisé car le TGF- β 1 est la cytokine qui semble la plus impliquée dans le processus de fibrose. La fibrose induite présente certaines similitudes avec celle retrouvée chez l'Homme avec une fibrose interstitielle et pleurale caractérisée par de nombreux dépôts de MEC et l'émergence de myofibroblastes [13]. Cependant, ces modèles ne sont pas très bien établis et ne reflètent pas complètement la complexité de la FPI puisqu'ils ciblent des voies de signalisation très spécifiques alors que la FPI se caractérise par tout un panel de voies de signalisation pro-fibrosantes.

Modèles génétiques

L'identification de variants génétiques liés à une plus grande susceptibilité de développer une FPI, comme les gènes

codant les protéines A et C du surfactant, de la *Telomerase reverse transcriptase* ou de la *telomerase RNA component* ou encore *Muc5b*, a été mise à profit dans des modèles avec la création d'animaux génétiquement modifiés [14–17]. De tous les polymorphismes identifiés à ce jour, celui présent dans le promoteur (rs35705950) du gène codant la mucine gélifiante *MUC5B* est celui qui confère la plus grande susceptibilité à développer une FPI. Cette mutation est associée à une plus forte expression du gène [18]. Une souris transgénique qui surexprime la mucine *Muc5b* dans les pneumocytes de type 2 a été créée par insertion non ciblée d'un transgène. La souris transgénique ne développe pas de FP spontanée. Après administration de BLM, la FP est plus sévère chez la souris transgénique que la souris non transgénique [19]. Ces modèles restent donc insuffisants et les interprétations des données qui en sont issues sont à prendre avec précaution, car les anomalies biologiques observées peuvent être dues à des perturbations d'un autre gène que *Muc5b* suite à l'intégration aléatoire du transgène.

Modèle de FPI humanisé

Le modèle de FPI humanisé consiste à instiller des fibroblastes pulmonaires de patients atteints de FPI (fibroblastes FPI) chez une souris immunodéficente NOD/SCID par voie intraveineuse [20]. La présence de fibroblastes FPI induit un remodelage interstitiel et sous-pleural du poumon qui persiste 148 jours après l'administration. Ce modèle permet d'analyser le trafic cellulaire à chaque stade de la fibrose et fournit des informations uniques sur les fibroblastes « FPI » directement liés à la pathogenèse de la maladie. De plus,

Tableau 1 Principales voies d'administrations, avantages et désavantages des protocoles qui utilisent la bléomycine chez le modèle murin.

Voies d'administrations [11]
Intra-trachéale unique/répétée
Intranasale unique/répétée
Intrapéritonéale répétée
Oropharyngée répétée
Intraveineuse unique/répétée
Sous-cutanée par implantation d'une mini pompe osmotique
Avantages
Signature moléculaire précoce chez la souris similaire à la phase fibrosante active de la FPI chez l'humain [7]
Activation de la voie TGF- β
Lésions des cellules épithéliales et de la membrane basale
Fibrose interstitielle et intra-alvéolaire
Facilité d'induction expérimentale de fibrose pulmonaire et bonne reproductibilité [5]
Désavantages
Diversité des protocoles
Réponse souche-dépendante : fond murin C57BL/6J plus susceptible que fond BALB/c
Réponse en fonction de l'âge des souris
Doses administrées très variables selon les études (de 1,25 à 4U/kg)
Nombres d'administrations variables [4]
Hétérogénéité de la fibrose induite
Aspect histologique différent de celui d'une FPI : fibrose massive et centrale (fibrose dans la FPI plutôt périphérique), absence de structures en rayons de miel
Fibrose réversible après 21 ou 28 jours

cette approche permet de tester des agents antifibrosants spécifiques à l'Homme [7]. Cependant, cette méthode a un coût élevé, elle est complexe et nécessite d'avoir du matériel très spécifique. De plus, l'accès à des échantillons biologiques humains est un obstacle, en particulier ceux issus de fœtus pour des raisons éthiques. Enfin, les cellules murines affectent négativement les cellules humaines greffées et il y a une mauvaise reproductibilité des résultats lorsque les donneurs sont différents pour chaque « lot » de souris [21].

Exposition à des radiations

L'irradiation induit une fibrose chez la souris avec des caractéristiques qui dépendent de la souche utilisée [22]. L'irradiation ciblée aux poumons reste techniquement complexe. La fibrose apparaît au bout de 24 semaines et est représentative d'une condition chronique. De plus, la fibrose est dépendante de l'inflammation induite par les radicaux libres dégradant l'ADN plutôt que par les voies de signalisation impliquées dans la FPI [23].

Conclusion

De nombreux modèles de FP chez l'animal sont disponibles mais aucun ne reflète complètement les caractéristiques de la FPI humaine, avec des procédures parfois onéreuses et des délais longs avant l'apparition de signes de fibrose. La recherche de nouveaux modèles précliniques reste donc une priorité afin de comprendre les mécanismes de la FPI, de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques et tester des traitements.

Soutiens

Nathan Hennion bénéficie d'une allocation doctorale du CHU de Lille/région Hauts-de-France.

Déclaration de liens d'intérêts

Au cours des 5 dernières années, C. Chenivresse a été investigatrice principale pour des contrats de recherche de AstraZeneca, Glaxo-Smith-Klein, Novartis, Santelys. Au cours des 5 dernières années, S. Humez a perçu des honoraires ou financements pour participation à des congrès, communications, conseil, participation à des groupes d'experts, travaux de recherche, de la part des laboratoires : Boehringer-Ingelheim, Bristol Myers Squibb, et MSD. Les autres auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

- [1] Duchemann B, Annesi-Maesano I, Jacobe de Naurois C, et al. Prevalence and incidence of interstitial lung diseases in a multi-ethnic county of Greater Paris. *Eur Respir J* 2017;50:1602419.
- [2] Cottin V, Bonniaud P, Cadranel J, et al. [French practical guidelines for the diagnosis and management of IPF – 2021 update, full version]. *Rev Mal Respir* 2022;39:e35–106.
- [3] Hennion N, Desseyn J-L, Gottrand F, et al. [Idiopathic pulmonary fibrosis]. *Med Sci (Paris)* 2022;38:579–84.
- [4] Kolb P, Upagupta C, Vierhout M, et al. The importance of interventional timing in the bleomycin model of pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2020;55:1901105.
- [5] Tashiro J, Rubio GA, Limper AH, et al. Exploring animal models that resemble idiopathic pulmonary fibrosis. *Front Med (Lausanne)* 2017;4:118.
- [6] Liu T, De Los Santos FG, Phan SH. The bleomycin model of pulmonary fibrosis. *Methods Mol Biol* 2017;1627:27–42.
- [7] Yanagihara T, Chong SG, Vierhout M, et al. Current models of pulmonary fibrosis for future drug discovery efforts. *Expert Opin Drug Discov* 2020;15:931–41.
- [8] Peng R, Sridhar S, Tyagi G, et al. Bleomycin induces molecular changes directly relevant to idiopathic pulmonary fibrosis: a model for "active" disease. *PLoS One* 2013;8:e59348.
- [9] Izbicki G, Segel MJ, Christensen TG, et al. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int J Exp Pathol* 2002;83:111–9.
- [10] Redente EF, Black BP, Backos DS, et al. Persistent, progressive pulmonary fibrosis and epithelial remodeling in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2021;64:669–76.
- [11] Carrington R, Jordan S, Pitchford SC, et al. Use of animal models in IPF research. *Pulm Pharmacol Ther* 2018;51:73–8.
- [12] Naik PN, Horowitz JC, Moore TA, et al. Pulmonary fibrosis induced by γ -herpesvirus in aged mice is associated with increased

- fibroblast responsiveness to transforming growth factor- β . *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2012;67:714–25.
- [13] Sime PJ, Xing Z, Graham FL, et al. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J Clin Invest* 1997;100:768–76.
- [14] Nureki S-I, Tomer Y, Venosa A, et al. Expression of mutant Sftpc in murine alveolar epithelia drives spontaneous lung fibrosis. *J Clin Invest* 2018;128:4008–24.
- [15] Takezaki A, Tsukumo S-I, Setoguchi Y, et al. A homozygous SFTPA1 mutation drives necroptosis of type II alveolar epithelial cells in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Exp Med* 2019;216:2724–35.
- [16] Povedano JM, Martinez P, Flores JM, et al. Mice with pulmonary fibrosis driven by telomere dysfunction. *Cell Rep* 2015;12:286–99.
- [17] Naikawadi RP, Disayabutr S, Mallavia B, et al. Telomere dysfunction in alveolar epithelial cells causes lung remodeling and fibrosis. *JCI Insight* 2016;1:e86704.
- [18] Evans MA, Wise AL, Speer MC, et al. A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2011;364:1503–12.
- [19] Hancock LA, Hennessy CE, Solomon GM, et al. Muc5b overexpression causes mucociliary dysfunction and enhances lung fibrosis in mice. *Nat Commun* 2018;9:5363.
- [20] Habiels DM, Espindola MS, Coelho AL, et al. Modeling idiopathic pulmonary fibrosis in humanized severe combined immunodeficient mice. *Am J Pathol* 2018;188:891–903.
- [21] Chen J, Liao S, Xiao Z, et al. The development and improvement of immunodeficient mice and humanized immune system mouse models. *Front Immunol* 2022;13:1007579.
- [22] Paun A, Haston CK. Genomic and genome-wide association of susceptibility to radiation-induced fibrotic lung disease in mice. *Radiother Oncol* 2012;105:350–7.
- [23] Haston CK, Travis EL. Murine susceptibility to radiation-induced pulmonary fibrosis is influenced by a genetic factor implicated in susceptibility to bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Cancer Res* 1997;57:5286–91.

Annexe 3 : Hennion, N., Bedart, C., Vandomber, L., Gottrand, F., Humez, S., Chenivesse, C., Desseyn, J.-L., & Gouyer, V. (2025). Identification of early genes in the pathophysiology of fibrotic interstitial lung disease in a new model of pulmonary fibrosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 82(1), 115. <https://doi.org/10.1007/s00018-025-05620-0>



Identification of early genes in the pathophysiology of fibrotic interstitial lung disease in a new model of pulmonary fibrosis

Nathan Hennion¹ · Corentin Bedart¹ · Léonie Vandomber¹ · Frédéric Gottrand¹ · Sarah Humez^{2,3} · Cécile Chenivresse⁴ · Jean-Luc Desseyn¹ · Valérie Gouyer¹

Received: 19 September 2024 / Revised: 5 February 2025 / Accepted: 10 February 2025
© The Author(s) 2025

Abstract

Some interstitial lung diseases involve pulmonary fibrosis, which is a process that is characterized by the excessive and abnormal accumulation of extracellular matrix in the pulmonary interalveolar space. Although the current anti-fibrotic therapy aims at slowing down the progression of pulmonary fibrosis, it does not reverse it, and many of the drugs that were identified in basic-research studies failed in clinical phases, mainly because of the lack of a model that can recapitulate the pathophysiological mechanisms of human pulmonary fibrosis. We developed a novel experimental model of pulmonary fibrosis induced by a cocktail of molecules on an air/liquid interface culture of mouse embryonic lung explants. Histological analyses revealed a pattern of usual interstitial pneumonia, the worst-prognosis form of pulmonary fibrosis. We performed a transcriptomics analysis at the single-cell level after the induction of fibrosis and before any histological signs of fibrosis could be observed. The results revealed increased expression of several gene families that are involved in early inflammation, fibrosis and iron homeostasis, as well as potential new genetic targets.

Keywords Mouse · Embryo · Lung · Explant · Single-cell RNA-sequencing

Introduction

The interstitial lung disease (ILD) family encompasses disorders that affect the interalveolar interstitium. ILDs are generally classified into idiopathic, autoimmune-related, exposure-related, interstitial lung diseases with cysts or

airspace filling, sarcoidosis and orphan diseases [1]. Epidemiological studies have found major differences in the incidence of ILDs according to age, sex, ethnic origin and geographical region, which are caused by disparities in environmental exposure and inequalities in healthcare resources. A study published in 2022 estimated that the overall incidence (mean for six European countries) of ILDs ranged from 20.0 to 42.5 cases per 100,000 person-years, whereas the prevalence ranged from 33.6 to 247.4 per 100,000 person-years [2].

In the early stages of some ILDs, the accumulation of immune cells in the interstitium triggers inflammation. When this inflammation persists, aberrant scarring of the lesions can progressively replace the lung parenchyma, leading to pulmonary fibrosis (PF) and irreversible loss of lung function. Importantly, the inflammatory component of ILDs is reversible, whereas the fibrotic one is irreversible and can progress with rapid deterioration of the lung, as in the case of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) [3]. Fibrosing ILDs characterized by progressive and irreversible PF are defined as progressive PF (PPF) [4]. When known, the etiological agent that is responsible for the development of PF may be environmental, inflammatory or genetic. Some

Jean-Luc Desseyn and Valérie Gouyer contributed equally to this work.

✉ Jean-Luc Desseyn
jean-luc.desseyn@inserm.fr

- ¹ Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Infinite U1286, Lille F-59000, France
- ² Univ. Lille, Department of Pathology, CHU Lille, Lille F-59000, France
- ³ Univ. Lille, CHU Lille, CNRS, Inserm, Institut Pasteur de Lille, UMR9020, UMR1277, Canther, Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, Lille F-59000, France
- ⁴ Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Centre de référence constitutif des maladies pulmonaires rares, U1019, UMR 9017, CILL, Center for Infection and Immunity of Lille, Lille F- 59000, France

environmental factors, such as tobacco smoke, occupational exposures, air pollution and viral infections, have been implicated in repeated damage to alveolar epithelial cells and stimulate the early processes of PF [5, 6]. Some patients with ILD associated with fibrosing autoimmune diseases, including rheumatoid arthritis or systemic sclerosis, develop a PPF phenotype [7]. Genetic variants are also associated with the risk of developing fibrotic ILDs [8, 9].

PF can be classified into distinct patterns according to morphological aspects. In particular, the usual interstitial pneumonia (UIP) pattern is associated with a poorer prognosis. UIP is preferably identified by high-resolution thoracic computed tomography. When possible, histological analyses of lung biopsies should be performed. In this case, fibrosis is subpleural and localized in the pulmonary periphery. Moreover, PF is temporally and spatially heterogeneous. Fibroblastic foci, which are characterized by the accumulation of fibroblasts/myofibroblasts and extensive fibrosis forming a honeycomb structure that is responsible for severe destruction of the lung architecture, are also observed [10, 11].

The mesenchymal component that produces connective tissue is critical for the repair of injured lung tissue. Fibroblasts have been identified as the major mesenchymal cell type in the connective tissue response, especially its activated form and its differentiated form as a myofibroblast, which is an important producer of extracellular matrix (ECM) and inflammatory and fibrogenic cytokines. The transformation of fibroblasts into myofibroblasts can be monitored based on the expression of mesenchymal cell markers, such as α -smooth muscle actin (α -SMA) [12]. Myofibroblast persistence at sites of injury leads to the formation of active zones of fibrosis, and lung epithelial damage and/or repair abnormalities trigger the recruitment of inflammatory cells into the lungs [13]. The combination of epithelial damage, abnormal wound healing and recruitment of inflammatory cells stimulates the synthesis of pro-fibrosing mediators, such as the transforming growth factor (TGF)- β 1, interleukin (IL)-13 or the connective tissue growth factor thus promoting the differentiation of fibroblasts into myofibroblasts, which then actively proliferate and secrete excessive amounts of ECM, growth factors and metalloproteinases [14]. The accumulation of ECM degrades the epithelium, stimulates the recruitment of inflammatory cells and activates myofibroblasts, leading to a vicious cycle that magnifies fibrosis.

Currently, there is lack of satisfactory treatments for improving fibrotic ILDs. This is largely attributable to the lack of experimental models that can mimic the pathophysiological mechanisms of PF with progressive fibrosis. In this context, we report here a novel model of experimentally induced PF mimicking UIP features using mouse

embryonic lung explants (MELEs) in an air/liquid interface (ALI) culture. Fibrosis was induced by a fibrosis cocktail consisting of a mixture of cytokines, a growth factor and an irritant, all of which have been described in the literature to be involved in the development of PF. This induced fibrosis was characterized, followed by the identification of genes that were upregulated and downregulated at the early stages of fibrosis.

Materials and methods

Organotypic culture of mouse embryonic lung explants

Reporter Acta2-Rfp (B6.FVB-Tg(Acta2-DsRed)1Rkl, RRID: IMSR_JAX:031159) transgenic mice that were bred hemizygotously in-house at our institute and express DsRed RFP under the *aSMA* gene promoter (*Acta2*) and wild-type (WT) mice in the C57BL/6 genetic background aged between 2 and 6 months and between 2 and 8 months for females and males, respectively, were maintained and housed in an accredited specific pathogen-free animal facility. The mice were fed with a chow diet *ad libitum*. MELEs were harvested under a stereomicroscope (as described by Del Moral and Warburton [15] from 12.5-day-old embryos (E12.5) and placed on a porous polycarbonate filter (1000M25/511M801, it4ip, Belgium) that was floated in 4-well plates containing 500 μ L of serum-free DMEM/F12 with antibiotics (penicillin and streptomycin). The MELEs were then cultured in ALI at 37 °C with 5% CO₂. MELE growth and Rfp fluorescence were monitored daily under a Leica M205 FA LasX epifluorescence stereomicroscope equipped with a 16-bit Hamamatsu camera (sCMOS ORCA-Flash4.0) at 30 magnification. Images of MELEs were captured every day from day 0 (day of dissection) to the last day of culture. Images were acquired at an exposure of 100ms for bright field and 1s for Acta2-Rfp fluorescence. The fluorescence intensity was quantified using FIJI free-ware (RRID: SCR_002285) and was normalized to the surface area of the MELE.

Induction of fibrosis by fibrotic cocktail

The design of the fibrotic cocktail (FC) used here was adapted from the literature [16–18] and comprised cytokines (Merck, Darmstadt, Germany) TGF- β 1, platelet-derived growth factor (PDGF)-AB, IL-1 β , IL-13 and tumour necrosis factor (TNF)- α as well as lysophosphatidic acid (LPA, Cayman Chemical) and cadmium chloride (CdCl₂, Merck, Darmstadt, Germany), an irritant factor. Final concentrations were 10ng/mL TGF- β 1, 10 μ M PDGF-AB, 20ng/mL

TNF- α , 10 μ M LPA, 20 ng/mL IL-1 β , 20 ng/mL IL-13 and 4 μ M CdCl₂. FC or phosphate-buffered saline (PBS; as a control) was administered daily from day 2 of MELE culture to a maximum of 4 days of culture in 300 μ L of serum-free DMEM/F12 with antibiotics. Once the MELE culture was stopped, the MELEs were fixed with 4% paraformaldehyde for 18 h, then embedded in paraffin for histological and immunohistochemistry studies. Tissues that were collected for RT-qPCR were placed directly in RNAlater (Sigma-Aldrich) for 24 h at 4 °C, then stored at -80 °C until use.

Quantification of RFP

The Acta2-Rfp-positive areas were quantified and normalized with respect to the whole tissue area for each sample. For each day of MELE culture, the change in Acta2-Rfp production is given as a percentage change compared to day 0.

Histology and immunofluorescence

Haematoxylin/eosin (HE), Sirius Red (SR) and Masson Trichrome (MT) histological staining of MELE sections, as well as immunohistochemical assays were performed as described previously [19, 20] using dual labelling for anti- α -Sma (Abcam ab7817, RRID: AB_262054) and anti-vimentin (Abcam ab137321, RRID: AB_2921312) antibodies. Subsequently, staining with secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch labs; rhodamine-conjugated anti-mouse 315-026-00, RRID: AB_23400583 and fluorescein-conjugated anti-rabbit 111-095-047, RRID: AB_2337977 antibodies) was carried out. The sections were observed under a Leica DM5500B epifluorescence microscope and analysed using the FIJI freeware.

Histopathological evaluation of lung fibrosis

Fibrosis on HE and SR histological sections was scored blindly by two team members. The obtained score was the sum of the Ashcroft score [21], which ranges from 0 to 8, and a peripheral PF score ranging from 0 (no fibrosis) to 3, as follows: 0, no area of fibrosis; 1, area of fibrosis accounting for 0–20%; 2, area of fibrosis accounting for 20–40%; 3, area of fibrosis accounting for >40% of the area that was assessed. The severity of the fibrotic changes in each section was assessed as the mean score of the severity on sections from 10 MELEs treated with PBS and 12 MELEs treated with FC after 3 days of culture; 11 MELEs treated with PBS and 14 MELEs treated with FC after 4 days of culture; and 12 MELEs treated with PBS and 15 MELEs treated with FC after 5 days of culture. The pattern of PF was determined

by an expert pathologist in human ILDs from the Lille University Hospital Reference Centre for Rare Pulmonary Diseases (SH). Macros for ImageJ/FIJI were used to quantify fibrosis and airspace in whole slices stained with SR as described by others [22].

Quantitative real-time RT-PCR

Total RNA extraction was performed on MELEs using an innuPREP RNA Mini Kit 2.0 (Innoscree GmbH, Germany), and reverse transcription was carried out as described previously [23]. Duplex PCR amplifications using 18S rRNA as an internal control (TaqMan Ribosomal RNA Control Reagents, Applied Biosystems) were performed as described previously [24]. Semi-quantitative PCR for the detection of specific genes was performed using the following primer set and probe (5'→3') designed using Primer3 (RRID: SCR_003139): mouse *Tgf- β 1* (ENSMUSG00000002603), AGGAGACGGAATACAGGGCT (Fwd), TCATGTCATG GATGGTGCCC (Rev) and GCGCTCACTGCTCTTGTC ACAGCA (probe); *Coll1a1* (ENSMUSG00000001506), CT GCTGGCTCTCCTGGTAC (Fwd), GAAGACCAGGGAA GCCTCTT (Rev) and ACGTGGTGTGGTCGGTCTTCCC (probe); *Acta2* (ENSMUSG000000035783), TCCCTGGAG AAGAGCTACGA (Fwd), CCGCTGACTCCATCCCAAT G (Rev) and ACGAACGCTTCCGCTGCCCA (probe). To avoid the amplification of contaminating genomic DNA, the primers and/or the probes were designed on different exons or overlapping exon–exon junctions. Amplifications were performed in triplicate on a 7500 Applied System (Applied Biosystems). For each sample, the ratio of amplification was calculated as $2^{-(Ct_{\text{mean target gene}} - Ct_{\text{mean 18S}})}$.

Single-cell RNA-sequencing 3' (10 \times genomics)

WT MELEs were treated at day 3 of culture for 18 h with either PBS ($n=6$) or FC ($n=6$). The trachea was then removed under a stereomicroscope using microdissection forceps. Six MELEs per group were then pooled. Cell dissociation was performed in DMEM/F12 containing 5% liberase (05989132001, Roche, Germany), 1% DNase I (09852093103, Roche, Germany) and 5% foetal bovine serum (FBS, 10270106, Thermo Fisher Scientific) for 2 h at 37 °C. During this step, mechanical dissociation of MELEs was performed every 15 min using a large orifice tip. Ten minutes before the end of the reaction, 0.05% trypsin EDTA was added to each pool. Dissociation was stopped by adding 2 volumes of 10% FBS. A final mechanical dissociation using large-orifice tips was performed. To remove cell aggregates, the cells were filtered through a 70 μ m filter and then centrifuged for 15 min at 1400 rpm. Dead cells were removed using a Dead Cell Removal kit according to the

manufacturer's instructions (Miltenyi Biotech, Germany). Cells were then pelleted by centrifugation for 10 min at 1400 rpm and the pellets were resuspended in 100 μ L of PBS containing 0.04% bovine serum albumin (BSA). Cells were counted on a Malassez counting chamber and diluted to 800 cells/ μ L in PBS containing 0.04% BSA. A single-cell RNA-sequencing 3' (scRNAseq3') analysis was performed using the Chromium Next GEM Single Cell 3' Kit (10x genomics, v3.1) technology at our genomics core facility. Sequencing was calibrated on the *Mus musculus* organism using an Illumina NovaSeq 6000 sequencer. The primary analysis after sequencing was performed using the Cell Ranger tool (version 5.0, RRID: SCR_017344). For quality control, we used the scDblFinder tool (RRID: SCR_022700) [25] to exclude cells expressing more than 7716 or less than 200 genes, cells potentially undergoing apoptosis with >10% mitochondria and cell doublets. Bioinformatics data were then analysed using the R freeware environment (RRID: SCR_001905) and the Seurat package (RRID: SCR_007322). Sequencing data from cells treated with PBS or FC were merged to retain only the genes in common. The measured genes were normalized using NormalizeData (LogNormalize method) and a scale factor of 10,000. Data were transformed using the Seurat scale.data tool. A principal component analysis was then performed. The ElbowPlot method identified 30 principal components. A resolution of 0.8 was applied via the shared nearest-neighbour function from the first 30 principal components to design uniform manifold approximation and projection (UMAP) maps of cell clusters. Cell types were assigned to clusters using the source file <https://github.com/IanevskiAleksandr/sc-type> [26]. The ggplot2 function of R (RRID: SCR_014601) was used to design the figures, and the plotly tool (RRID: SCR_013991) was employed to generate the interactive links. The ToppFun tool from the Toppgene website (RRID: SCR_005726) was used to identify the various biological processes that were associated with under- or overexpressed genes. The STRING website (RRID: SCR_005223) was used to model the interactions between the proteins expressed from genes that were overexpressed in the FC condition. The GOrilla (RRID: SCR_006848) website was used for gene ontology analysis. The original datasets of scRNAseq3', analysis R scripts and code for the interactive 3D representations of the UMAP superposition have been deposited in a free and open digital archive, Zenodo (RRID: SCR_004129), which is available at <https://doi.org/10.5281/zenodo.13285840>.

Statistical analysis

Nonparametric tests were performed for all statistical analyses using the R software environment, version 3.6.3. Wilcoxon-Mann-Whitney two-sided test and Kruskal-Wallis

test were used for analysis as appropriate for all experiments, with the exception of the analysis presented in Fig. 5C, in which a two-sided two-proportion Z-test was performed. The volcano plot was established with a *P*-value limit adjusted to 0.05% and a log₂-fold change cut-off of $-2.0/2.0$. Significance was set at $P < 0.05$.

Results

Set up of the optimal parameters for the induced fibrosis model

Pilot studies were first carried out to determine the best FC for the induction of fibrosis in our MELE model in an ALI culture. The selected compounds and their concentrations were as described in the literature. These studies enabled us to select the FC that induced the greatest PF according to the results obtained after the histological and immunofluorescence analyses (not shown).

Next, we measured its pro-fibrotic effect on the development of fibrosis in embryonic lungs using the *Acta2-Rfp* reporter transgene driven by the α -*SMA* promoter, according to the experimental scheme displayed in Fig. 1a. Explant areas increased daily with no significant difference for each day between the two conditions tested, i.e. PBS vs. FC (Suppl. Figure 1). The myofibroblast reporter allowed the daily semi-quantification of each MELE using stereomicroscopy. Repeated administration of the FC altered the apparent structure of the MELEs, which became increasingly dense in white light, with thickening of the lung parenchyma (Fig. 1b). These morphological changes were associated with a significant overall increase in the expression of the *Acta2-Rfp* reporter gene in FC-treated MELEs (Fig. 1c).

Characterization of the induced fibrosis

We then examined the induction of fibrosis. All the following results were obtained using the experimental scheme mentioned as above (Fig. 1a), with the exception of the use of WT mice exclusively for mating, to avoid the introduction of any possible bias by the *Acta2-Rfp* transgene. Histological analysis via HE and SR staining revealed the progressive appearance of structural changes, signs of fibrosis and fibroblastic foci, which were visible at day 4 after 2 days of treatment. Numerous collapsed alveoli were observed in FC-treated MELEs, accompanied by the thickening of the alveolar septa. An accumulation of ECM, as reflected by SR staining, in bundle form, and the presence of interstitial fusiform cells in the basal and subpleural regions were also detected, as illustrated in Fig. 2a, and were confirmed

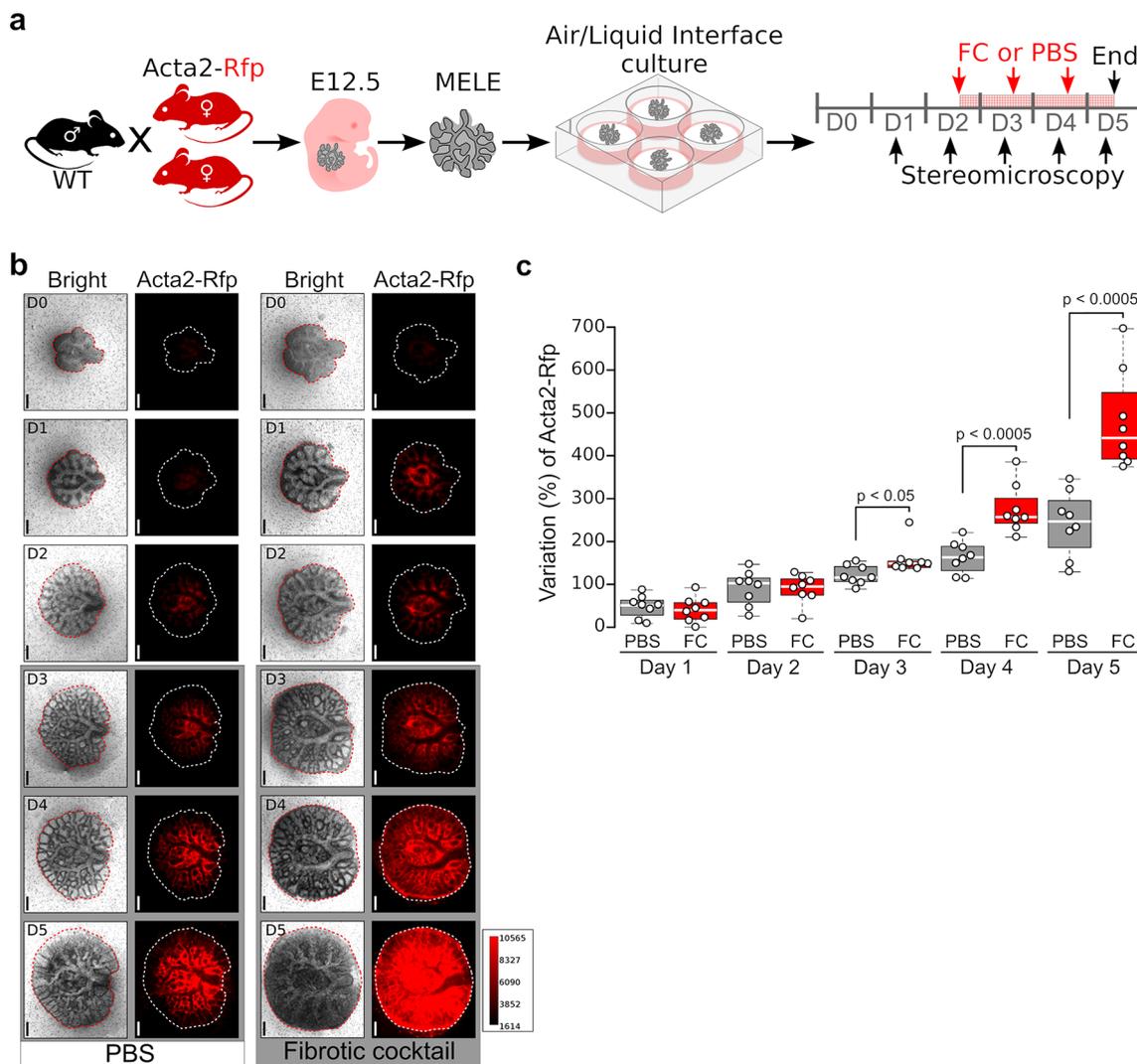


Fig. 1 The fibrotic cocktail enhanced the expression of the *Acta2* reporter transgene. **(a)** Schematic representation of the protocol used here for obtaining and culturing mouse embryonic lung explants (MELEs). After 2 days (D) of culture, PBS or the fibrotic cocktail (FC) was added to the culture medium. MELEs were observed daily under white light and epifluorescence for the Rfp transgene reporter tag. **(b)**

using MT staining (Suppl. Figure 2). These more-marked abnormalities in FC-treated MELEs are characteristic of fibrosis, which was found to be heterogeneous. All of these histological features are present in the UIP pattern. Next, we assessed the fibrosis using our fibrosis scale, to quantify the severity of fibrosis considering the extent of fibrosis in the lung periphery from day 3 to day 5 of treatment. Our results revealed that the fibrosis scores were significantly higher for FC-treated MELEs, with an increase in fibrosis observed daily (Fig. 2b). This was further supported by the quantification of the induced-fibrosis using SR staining sections after removing the trachea for the analysis showing a significant increase in fibrosis over time, and this only in FC-treated MELEs (Fig. 2c,d).

Images at 5 days of culture of representative MELEs treated with PBS or FC, showing an increase in their density (bright light) and a thickening of the lung parenchyma. Scale bar: 500 μ m. **(c)** Quantification of the variation in the fluorescence intensity emitted by Acta2-Rfp from the total surface of MELEs ($n=8$ /group), from day 1 to day 5

The expression of genes associated with inflammation (*Tgf- β 1*, Fig. 3a) and fibrosis (*Colla1* and *Acta2*, Fig. 3b,c) was assessed by RT-qPCR. No difference between the two treatments was observed at days 3 and 4 for *Tgf- β 1*, whereas its expression level was higher at day 5 in FC-treated MELEs. The expression levels of *Colla1* and *Acta2* showed a trend toward upregulation at day 3 in FC-treated MELEs, and significant upregulation at day 4 and at days 4 and 5, respectively. We then used immunofluorescence staining to examine the production and localization of α -Sma and vimentin (the latter being a component of the intermediate filaments of cells of mesenchymal origin, including fibroblasts and myofibroblasts) (Fig. 4, Suppl. Figure 3c, d). We observed a progressive accumulation of the two

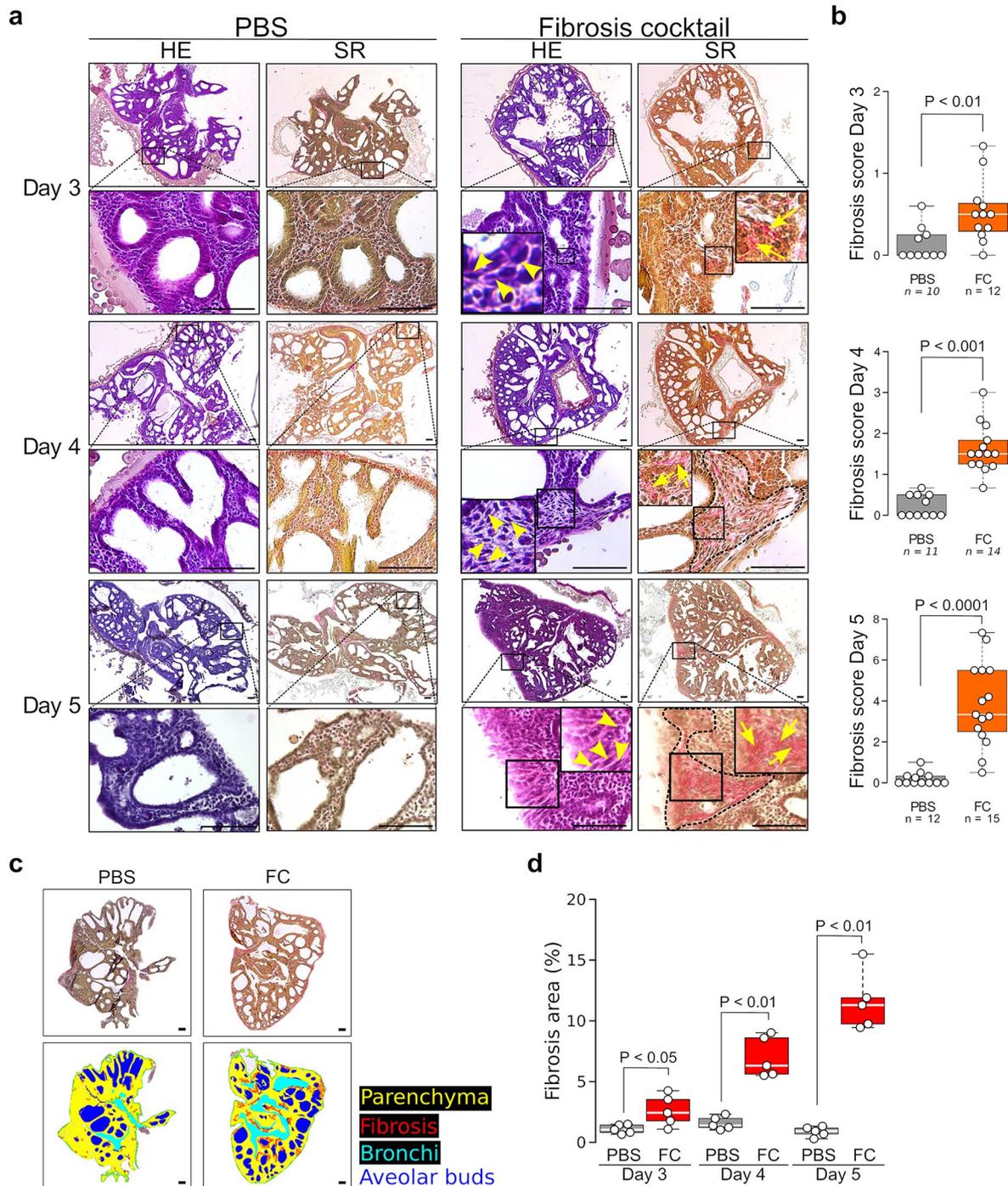
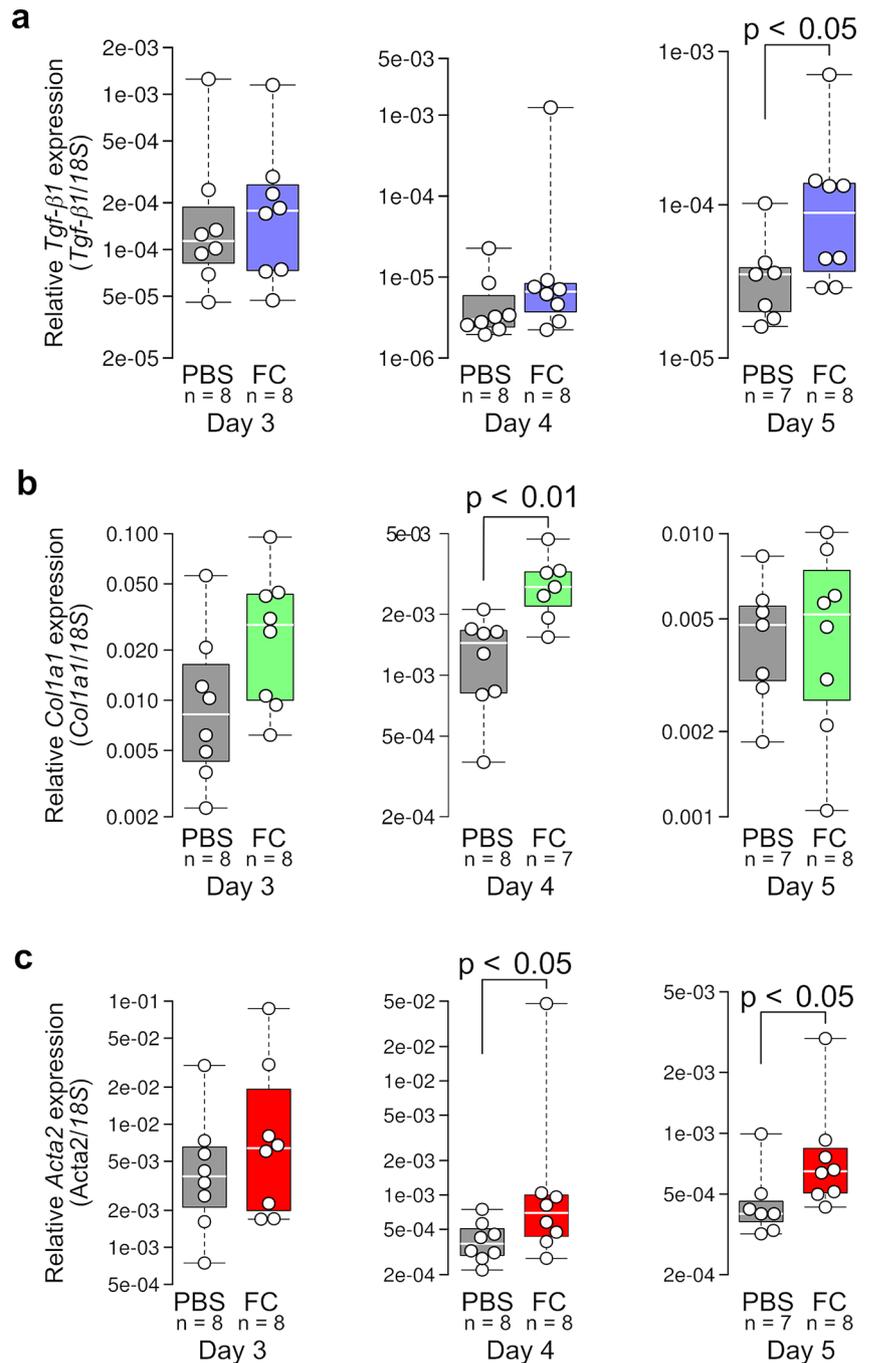


Fig. 2 Histological analysis revealing induced fibrosis in the lung periphery, similar to a UIP pattern. **(a)** Illustrative images of haematoxylin/eosin (HE)- and Sirius Red (SR)-stained sections at days 3–5 from mouse embryonic lung explants (MELEs) treated with PBS or the fibrotic cocktail (FC), indicating a reduction in the alveolar bud lumen and a progressive and peripheral accumulation of spindle cells associated with collagen densification. The yellow arrowheads indicate spindle cells. The yellow arrows denote collagen fibre deposits. The area surrounded by black dotted lines indicates fibroblastic foci with dense regions of collagen. The images are representative of 10–15 MELEs/day/group. Scale bar: 100 μ m. **(b)** Severity of fibrosis after

FC administration, as evaluated using a modified Ashcroft scale. Data were obtained from $n = 10$ –15 MELEs/group. **(c)** Illustrative pictures of the follow-up of collagen accumulation on MELE sections in SR staining at day 4 of culture. A plug-in for ImageJ/FIJI software automatically identified lung parenchyma (yellow), fibrosis (red) and alveolar buds (blue). Bronchi (cyan) were traced by the user. Scale: 100 μ m. **(d)** Graph showing the fibrosis area (%) for each MELE depending of the type of treatment and the day on which culture was stopped. $N = 5$ /treatment/day. P -value from the Kruskal-Wallis test was $P = 0.002$ for FC in **(d)** and not significant for the PBS group

Fig. 3 *Tgf-β1* (a), *Col1a1* (b) and *Acta2* (c) mRNA quantification in mouse embryonic lung explants treated with PBS or the fibrotic cocktail (FC) was performed using RT-qPCR in triplicate (n=7–8 explants/group)

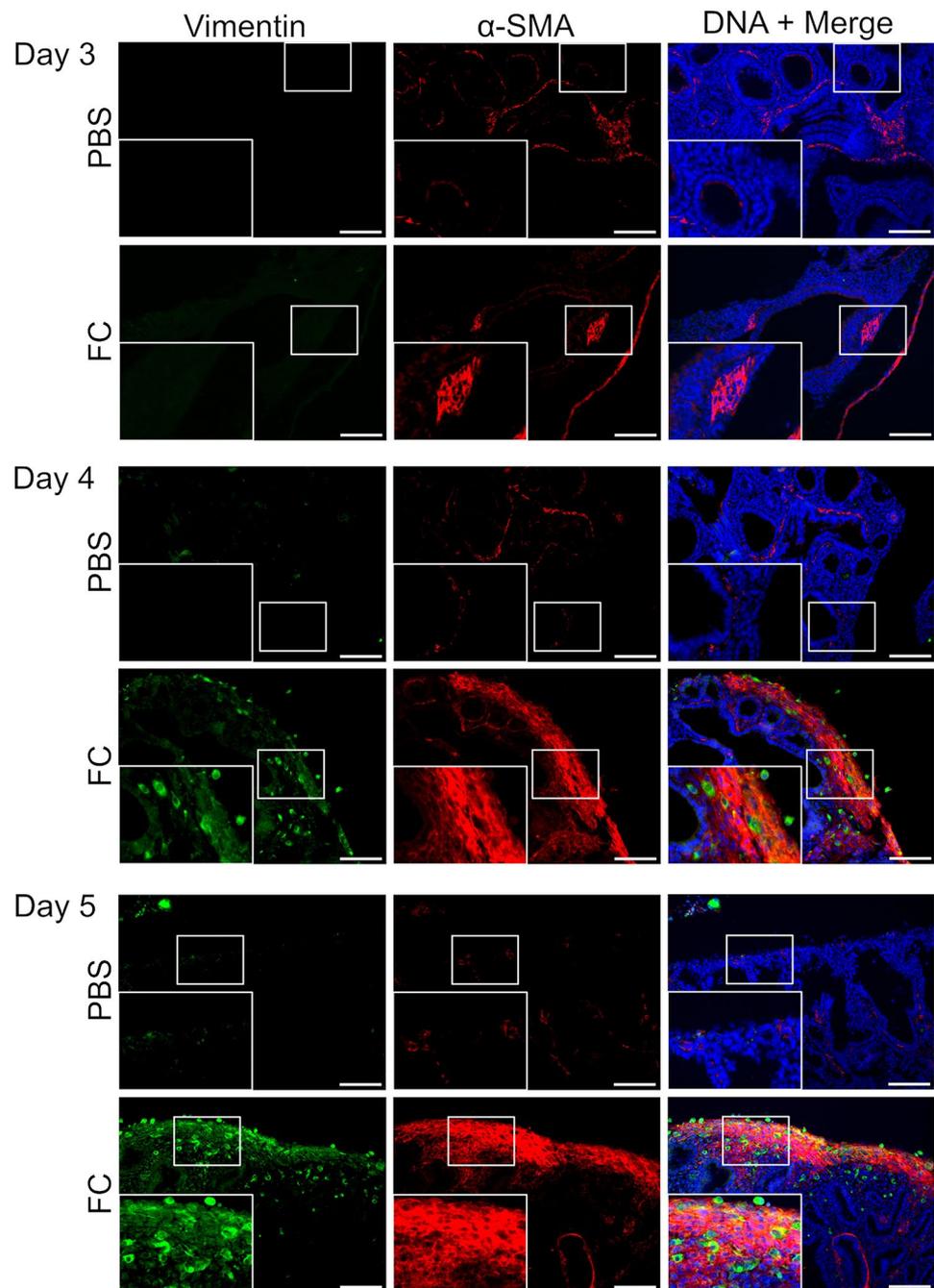


biomarkers of fibrosis in the lung periphery in FC-treated MELEs, reflecting the increased proliferation and activity of peripheral myofibroblasts. Taken together, these data demonstrated that the repeated administration of FC stimulated the proliferation and activity of myofibroblasts in the pulmonary periphery, leading to the overexpression of markers of inflammation and fibrosis.

Early modifications of gene expression

Next, we used our new PF model to determine the pattern of the early changes in gene expression via scRNAseq³, to identify target candidate genes in lung fibrosis. For this purpose, cells were isolated after a mere 18 h of treatment with either PBS or our FC. Analyses were performed by comparing two pools corresponding to the two treatments, each comprising six treated MELEs (Fig. 5a). All data were analysed using 12,893 and 8,471 curated cells for the PBS

Fig. 4 Immunofluorescence analysis of parenchyma from PBS (control)- and fibrotic cocktail (FC)-treated lung explants at days 3–5. Immunofluorescence staining for vimentin (green) and α -Sma (red) showing the progressive accumulation of mesenchymal cells and fibrosis labelled by α -Sma in the lung periphery of the mouse embryonic lung explants. Nuclei are counterstained with the Hoechst 33,258 dye (blue). Scale bar: 100 μ m



and FC-treated MELEs, respectively. The assignment of cell types to clusters was based on a source file of assigned human data. Therefore, we decided to carry out a preliminary compatibility check between human and mouse embryonic lung genes, to limit any interpretation biases, using the reference atlas of mouse embryonic lung development published in 2021 [27]. Using cell-type gene signatures, we identified 12 major cell types. UMAPs from the differentially expressed gene analysis between clusters to outline cell subsets with unique molecular signatures, revealed the presence of not only overlaps between the two groups,

but also enriched cell clusters (Fig. 5b, Suppl. Figure 4a). Interactive 3D representations of the UMAP superposition for the two conditions, without or with cell clustering, are available at the following URLs: https://cbedart.github.io/scRNAseq/Hennion2024/UMAP_Conditions/ and https://cbedart.github.io/scRNAseq/Hennion2024/UMAP_Celltypes/, respectively. A 3D UMAP representation grouping both conditions and cell types is available at the following URL: https://cbedart.github.io/scRNAseq/Hennion2024/UMAP_Celltypes_Conditions/. Comparison of the two conditions revealed a very high number of myofibroblasts in the FC

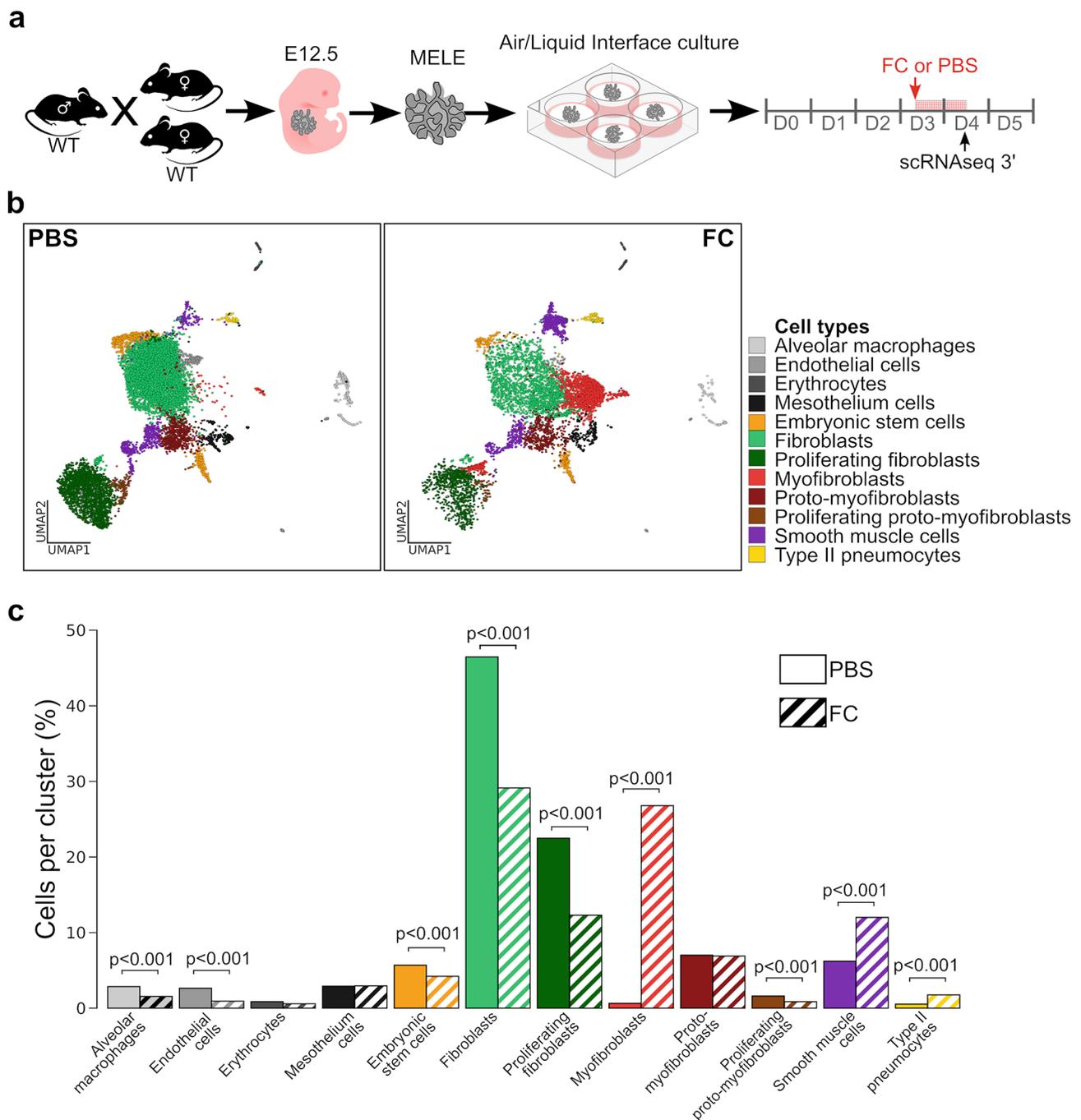


Fig. 5 Single-cell RNA-sequencing 3' analysis of early fibrosis. **(a)** Schematic representation of the protocol used here for the scRNAseq3' analysis of mouse embryonic lung explants (MELEs). MELEs were treated with PBS or the fibrotic cocktail (FC) from day 3 of culture, then analysed the following day. WT=wild type. **(b)** Dimensional reduction of data generated from control (PBS)- and fibrotic cocktail

(FC)-treated mouse embryonic lung explants (MELEs), as visualized by uniform manifold approximation and projection (UMAP), with each distinct cell type defined by a specific colour (as indicated in the key). **(c)** Bar charts of the relative abundance (%) of each cell type in the control (PBS)- and FC-treated MELEs. Significant *P*-values (*Z*-test) are indicated

condition (26.8%) compared with the PBS control (0.7%) and a 2-fold higher relative proportion of smooth muscle cells (12% for FC vs. 6.2% for PBS). This was accompanied by a 2-fold higher proportion of fibroblasts in the PBS condition (46.4%) compared with the FC condition (29.1%),

and of proliferating fibroblasts (22.5% and 12.3% for PBS and FC, respectively) (Fig. 5c, Suppl. Figure 4b).

The scRNAseq3' analysis allowed the comparison of gene expression profiles in an unbiased manner between PBS-treated control MELEs and the FC-treated MELEs.

This analysis revealed that 25 genes were downregulated and 112 genes were upregulated in cells from FC-treated MELEs (Fig. 6a, Suppl. Tables 1 and 2). The corresponding interactive volcano plot can be accessed via URL: <https://cbedart.github.io/scRNAseq/Hennion2024/VolcanoPlot/>. Most of the overexpressed genes detected here were known to be involved in the inflammatory response. Genes linked to the acute inflammatory response, such as *Saal*, *Hp* or *Cp*, or to chronic inflammation, such as *Cxcl13*, *Cxcl1* and *Ccl11*, were overexpressed in the fibrosis-induced condition. In a concomitant response to inflammation, genes encoding ECM proteins, such as *Coll8a1*, *Col22a1* and *Postn*, were overexpressed (suggesting early activation of genes involved in fibrosis), as were wound-healing genes, such as *Ccl2* and *Mmp9* (Fig. 6b). A broader analysis of gene expression illustrated by the Heatmap using the 50 most differentially expressed genes, based on adjusted *P*-values and Log₂ fold changes, highlighted many genes that are involved in inflammation and fibrosis. In addition, although these genes were overexpressed in all cell types, they were over-represented in the myofibroblasts of FC-treated MELEs (Fig. 6c). The *Ccl2*, *Cxcl1*, *Ccl7* and *Cxcl5* inflammatory genes were overexpressed in mesothelial and mesenchymal cells, with myofibroblasts predominating in the FC condition (Fig. 7a). The identification of interactions of the proteins encoded by the genes that were overexpressed after FC treatment revealed numerous inflammatory mediators that interacted with each other. Most of these inflammatory proteins were part of the acute phase of inflammation, including Saa- and Serpina-family proteins. Moreover, numerous cytokines and mediators of the complement system linked to inflammation interacted with each other (Fig. 7b). In addition to inflammation-associated genes, genes related to fibrosis were also upregulated in MELEs with induced fibrosis (Fig. 8a). The *Postn*, *Coll8a1* and *Ccn1* fibrosis genes were upregulated in myofibroblasts, with *Ccn1* also being upregulated in type II pneumocytes and endothelial cells. To gain further insights into the set of genes that were upregulated in the induced vs. not-induced fibrosis conditions, we performed a GOrilla gene ontology analysis (Fig. 8b). This revealed a pathway associated with metal and ion homeostasis, as indicated by the upregulation of genes encoding *Mt2*, *Steap4*, *Cp*, *Lcn2* and *Sod2* (Fig. 8c).

Discussion

PF affects a considerable number of individuals worldwide. To identify therapeutic solutions for this condition, a wide variety of pre-clinical models have been developed. However, the current treatment strategies remain unsatisfactory in many cases, likely because no experimental model can

accurately recapitulate the pathophysiological mechanisms of human PF [28]. Therefore, we developed a novel model based on the experimental induction of PF in MELEs. This mammalian model can be considered as being “integrated”, albeit incomplete, as it is embryonic; nevertheless, it has the advantage of being able to allow transcriptomics analyses without a priori studies by scRNAseq3' of the whole lung, as illustrated by the present study. This approach avoids the majority of the immune component and the host response to microbial colonization of the lung tissue, which pollute the transcriptome. This is crucial for gaining a more comprehensive understanding of gene expression within lung cells. Another advantage of this model is the relative ease with which the development of fibrosis can be monitored daily using microscopy of the whole organ, with detection of morphological and expression changes in fibrosis biomarkers being performed using genetically modified reporter mice for these markers. Finally, the use of a whole organ in culture should guarantee reproducible and heterogeneous fibrosis between explants compared with fibrosis induced on whole animals.

A plethora of experimental protocols for inducing PF have been published to date. Among them, intratracheal instillation of bleomycin into mice remains the most widely used approach, albeit with limitations, as it induces histopathological patterns that are not sufficiently consistent with those identified in patients with PF [29, 30]. Therefore, we relied on the use of a cocktail to induce fibrosis in our explant model. Its composition was adapted from literature data [16–18]. Our preliminary studies suggested, according to the *Acta2*-RFP reporter, that the cytokine concentrations often used by others (10ng/mL) on primary cell cultures, higher than the physiological concentrations found in patients with pulmonary fibrosis [31], did not seem satisfactory in contrast to our results by doubling the concentrations. Because cadmium is a recognized cause of lung fibrosis in humans, we also added this heavy metal at 4μM, i.e. at twice the concentration found in smokers [17]. The agents used here were all known to be upregulated and involved in the pathophysiology of PF by promoting, among other events, the proliferation and differentiation of fibroblasts into myofibroblasts, the overexpression of α -SMA and the overproduction of ECM [32–34]. In our model, induced fibrosis progressed well and was characterized by the presence of spindle cells and dense collagen fibres in basal and subpleural regions. These features were very similar to those of subpleural interstitial fibrosis, which is characterized by the accumulation of fibroblasts/myofibroblasts forming fibroblastic foci that is typically observed in histopathological analyses of patients with the UIP pattern [35]. The expression of fibrosis biomarker genes, such as *Acta2* and *Colla1*, was clearly upregulated, accompanied

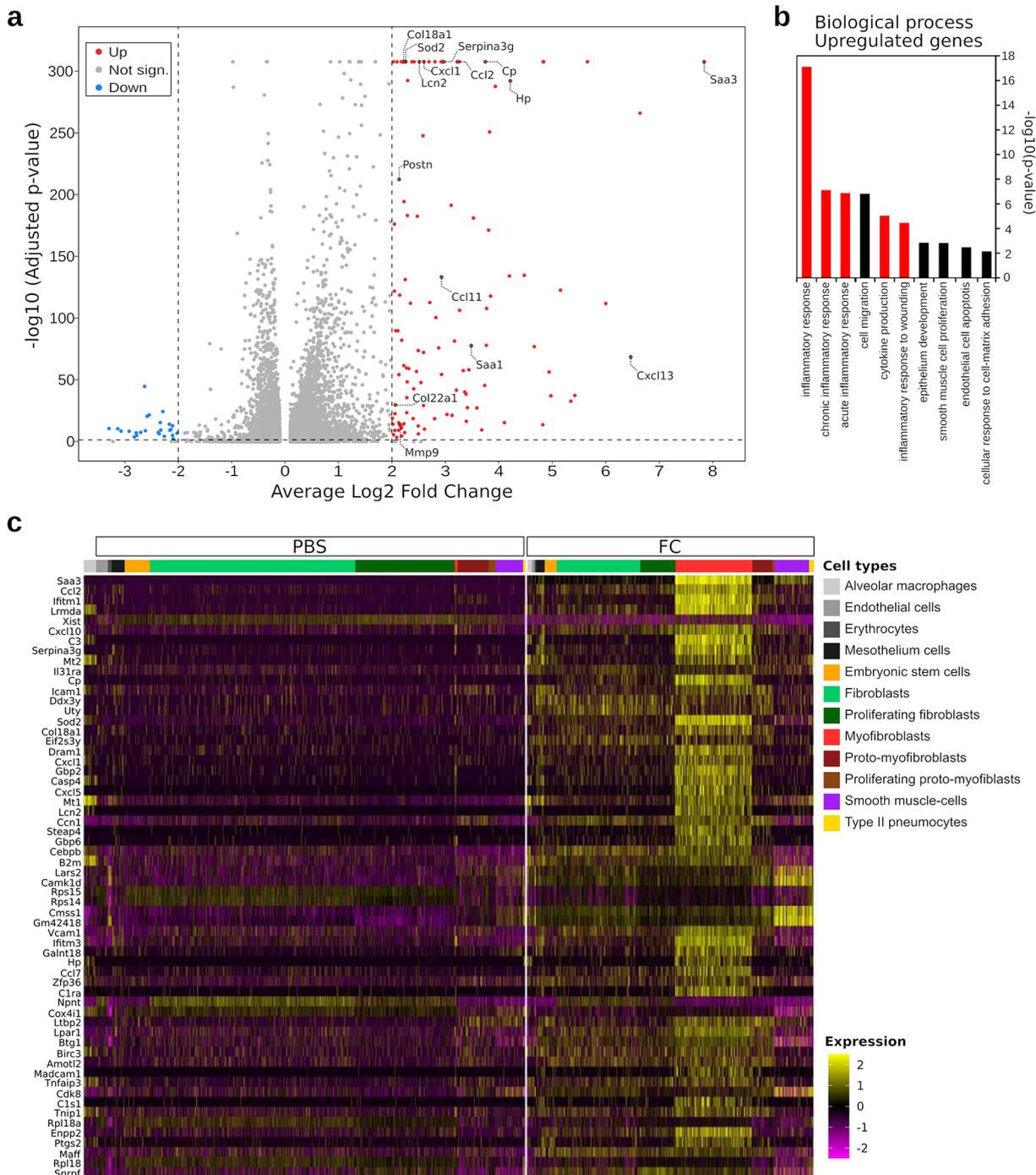


Fig. 6 The fibrotic cocktail upregulated genes involved in inflammation. **(a)** Volcano plot showing adjusted P -values and \log_2 fold change of expression in all cell clusters. The blue dots ($n=25$) correspond to downregulated genes, the red dots ($n=112$) correspond to upregulated genes and the grey dots ($n=11,766$) indicate an absence of significant differences compared with the control condition. The adjusted P -value cut-off was set at 0.05, and the \log_2 -fold change mean cut-offs were

set at -2 and 2 . **(b)** Biological processes identified for the genes that were overexpressed after treatment with the fibrotic cocktail (FC), as assessed based on the ToppFun tool from the ToppGene Suite. The red bars indicate biological processes involved in inflammation. **(c)** Heat map visualizing the expression of the 50 most differentially expressed genes according to cell type after treatment with FC compared with the PBS control

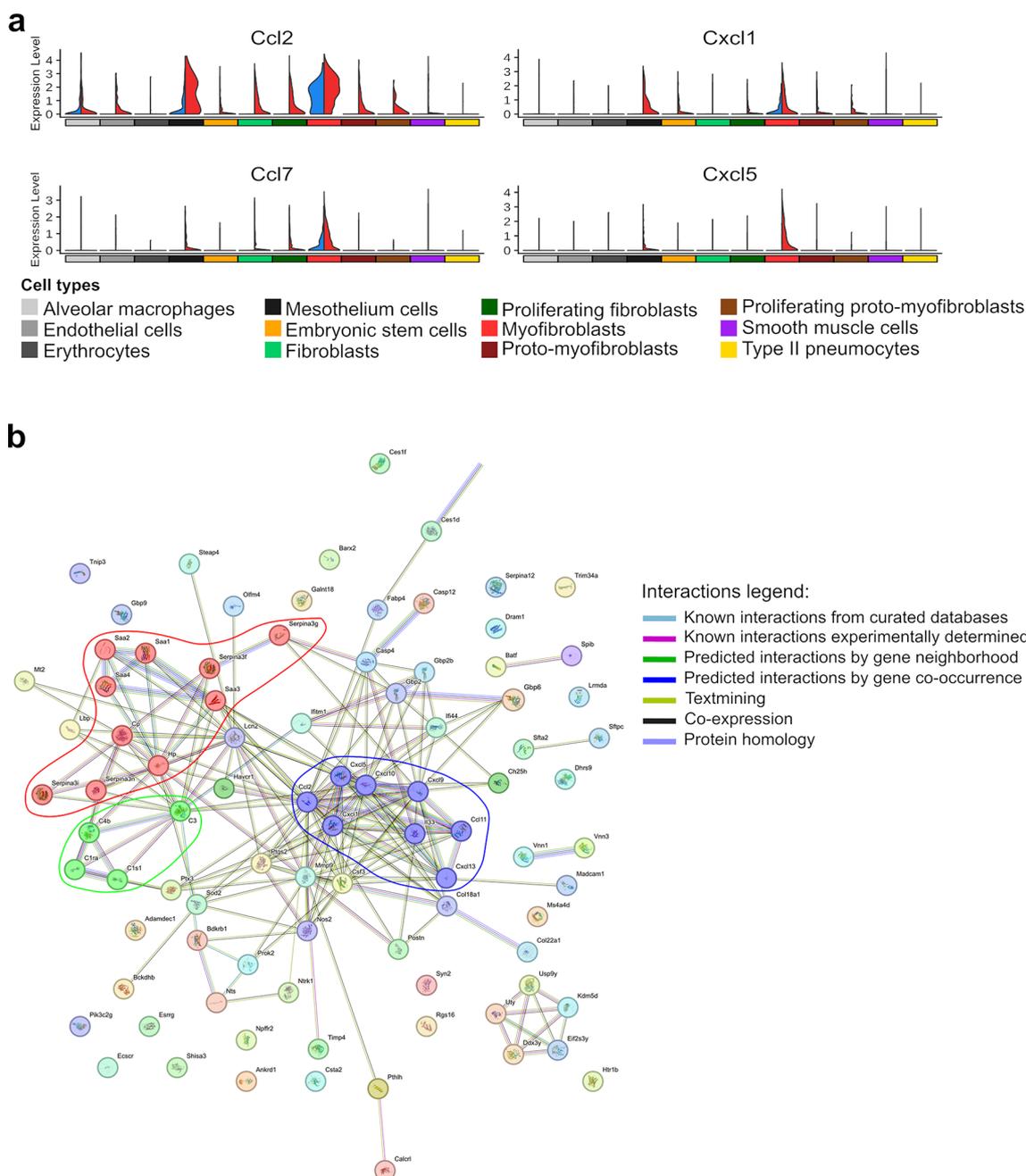


Fig. 7 Upregulation of genes associated with inflammation. **(a)** Violin plots showing the overexpression of genes associated with inflammation in mouse embryonic lung explants treated with the fibrotic cocktail (red) compared with the PBS-treated controls (blue). Cell types are indicated by specific colours, as shown in the key. **(b)** Protein interac-

tion network based on the genes that were overexpressed in lungs with induced fibrosis. The three families of proteins associated with inflammation are circled in red, green or blue for mediators of the acute phase of inflammation, complement system proteins and cytokines, respectively. The results were obtained using the STRING application

by significant accumulation of fibrosis markers (α -Sma) and mesenchymal cell markers (vimentin). Remarkably, these same markers have been found to be upregulated in patients with IPF and in some experimental models of PF [36, 37]. Obviously, the nature, frequency, kinetics and concentrations of the molecules included in our cocktail remain

empirical, and other compounds and experimental conditions warrant tested in the future.

As described above, FC administration to the MELE model induced a heterogeneous PF that was marked by subpleural invasion of fibroblasts and myofibroblasts, forming fibroblastic foci that triggered ECM production and accumulation. This is a typical feature of the UIP pattern, and

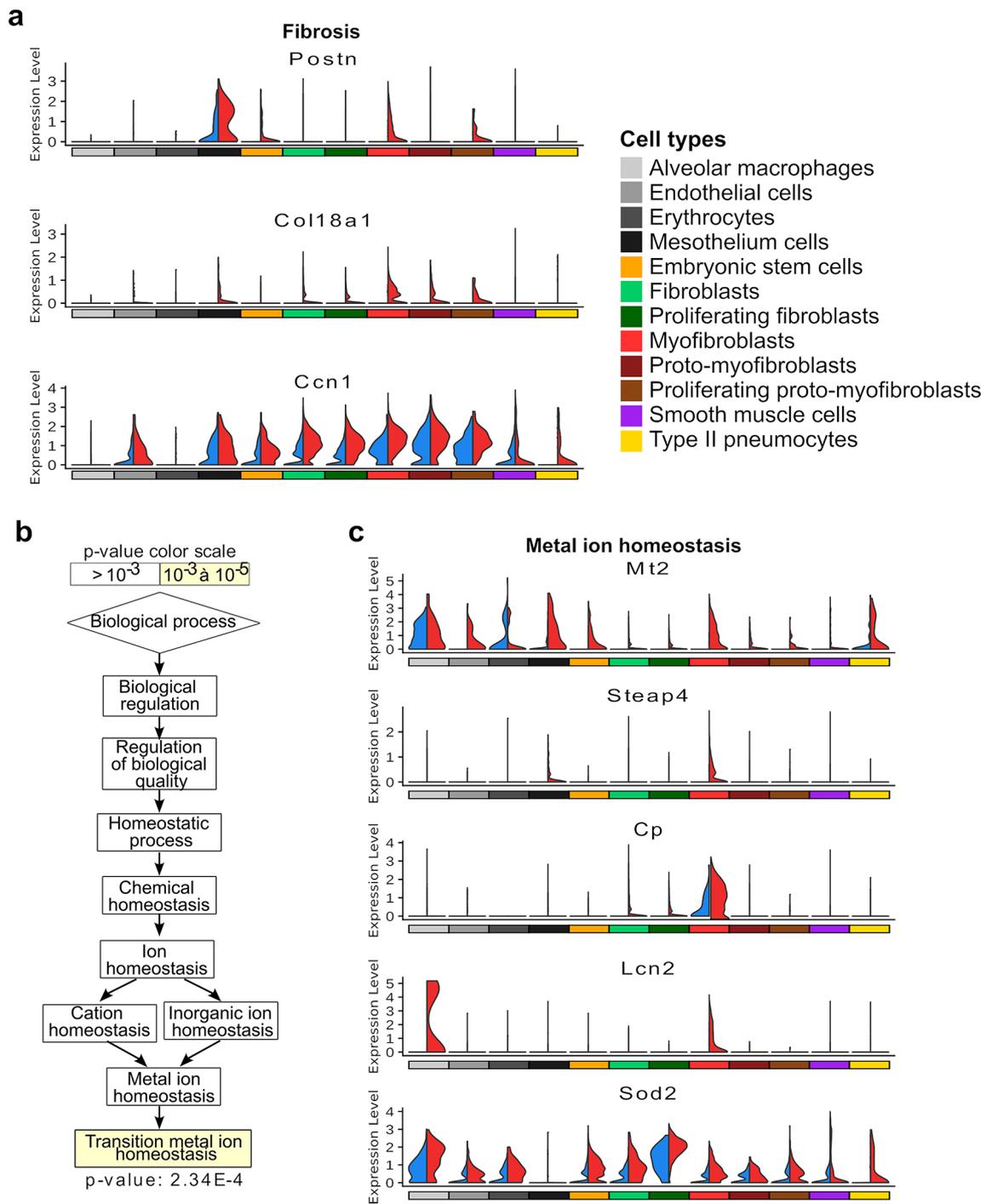


Fig. 8 Genes associated with fibrosis and metal ion homeostasis after treatment with the fibrotic cocktail. **(a)** Violin plots revealing the over-expression of genes associated with fibrosis in mouse embryonic lung explants (MELEs) treated with the fibrotic cocktail (red) compared with control MELEs treated with PBS (blue). **(b)** Graph of the biological

process by the GOrilla analysis outlining metal ion homeostasis in the process of induced pulmonary fibrosis. **(c)** Violin plots reveal overexpression of genes linked to metal ion homeostasis for MELEs with induced fibrosis (red) compared to PBS-treated controls (blue)

few experimental models are capable of reproducing it. However, the UIP pattern is characterized by the formation of a honeycomb structure, which is a sign of advanced-stage PF; we did not observe this type of structure in our model.

This can be explained by the fact that our model mimics an early stage of PF, before the potential formation of the honeycomb structure. More specifically, our model is similar to a probable UIP [38].

As our model developed a fibrotic profile of interest after several days of induction, we conducted a transcriptomics study using single-cell RNA-sequencing after a mere 18 h of induction, i.e., before histological signs were visible, to identify a very early signature of induced fibrosis. This transcriptomics study highlighted the quantitative differences in the nature of cell types between lungs without induced fibrosis and lungs with induced fibrosis, with a significant increase in the number of myofibroblasts, which are key cells in the development of fibrosis, smooth muscle cells and type II pneumocytes, as well as a relative decrease in the number of endothelial cells. These results are perfectly in agreement with the observations reported for several models of experimental PF [39–41].

The early genetic signature of our model remained closely linked to inflammation and fibrosis, whereas the phenotypic manifestations of fibrosis were not yet visible. The expression levels of the genes identified here were similar to those found in other atlases derived from lung tissue from mouse models with induced PF or from patients with ILD. In fact, the upregulation of the *Lcn2*, *Serpina3g* and *Cp* observed here was also present in the Curras-Alonso atlas, which is based on a mouse model of PF induced by radiation [42]. Regarding the expression of *Ccl2*, *Postn* and *Coll8a1* in our analysis, they are overexpressed in the ILD atlas [43]. These data support the interest and relevance of our induced fibrosis model.

Several gene families that were upregulated in the pro-fibrotic condition have been well documented as being involved in the pathophysiology of PF. Among the gene families identified in our model, we found inflammation-related genes encoding proteins that are involved in the acute phase of inflammation, such as the serum amyloid A (SAA) family. In fact, the serum SAA levels are higher in patients with IPF, with an inverse relationship existing between SAA concentrations and lung capacity [44]. We also highlighted the *Serpina3* family, ceruloplasmin (Cp) and haptoglobin (Hp), which are all involved in the acute phase of inflammation and are upregulated in PF [45–47]. Similar results were obtained for cytokines, such as the chemoattractant *Ccl2*, which promotes the differentiation of fibrocytes into fibroblasts, thus inducing excessive collagen production [48]. Other chemo-attractants, such as *Cxcl1* and *Cxcl13*, stimulate the recruitment of immune cells to the lung parenchyma [49]. Lastly, several genes encoding complement proteins were also upregulated in our condition with induced fibrosis. The complement system is an integral part of the innate immune system and plays an important role in inflammation and tissue regeneration; moreover, it has been reported that the depletion of serum complement in a bleomycin-induced PF mouse model was highly effective in inhibiting lung collagen deposition [50]. Therefore, our transcriptomics data

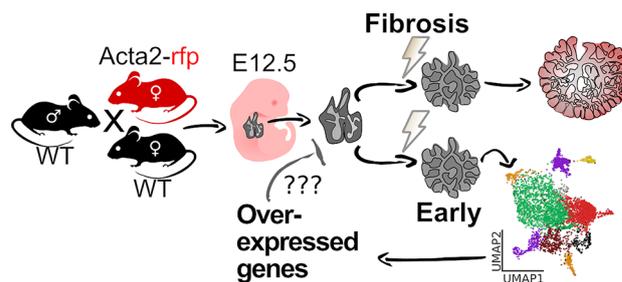


Fig. 9 Schematic overview of the study. Mouse embryonic lung explant culture can be used to mimic fibrosis and identify target genes for new therapeutic approaches among all of the early upregulated genes

demonstrated that our model of induced fibrosis recapitulates many of the characteristic pathways of PF.

Interestingly, the transcriptomics analysis revealed that, among the 112 genes that were most upregulated in the pro-fibrotic condition, five are associated with metal ion homeostasis. These genes were *Mt2*, *Lcn2*, *Steap4*, *Cp* and *Sod2*, all of which are involved in iron metabolism. Studies highlighting the link between ferroptosis, which defines a dysfunction of iron metabolism, and PF are abundant in the scientific literature. This deregulation of iron metabolism induces an increase in the level of reactive oxygen derivatives, which promotes the development of PF [51].

In conclusion, we presented here a novel and original experimental model of PF. The administration of a pro-fibrotic cocktail triggered fibrosis, as manifested by the histological evidence of fibrosis at several days after treatment. This model should offer an easy way of testing fibrosis inhibitors with inhibitors of gene overexpression, using anti-sense oligonucleotides or anti-sense RNA, for example, or with antibodies or drugs (Fig. 9). An early transcriptomics analysis revealed the overexpression of genes and gene families associated with inflammation, fibrosis and ferroptosis. Several of the genes identified here have not previously been linked to the development of PF. These genes could emerge as potential new therapeutic targets, by decreasing their expression levels. These targets could be validated upstream on a model of induced fibrosis, using thick sections from cultured adult mouse, pig or human lungs.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00018-025-05620-0>.

Acknowledgements We thank J. Devassine (Animal Core Facility, UMS 2014 – US 41 – PLBS/Plateformes Lilloise en Biologie et Santé), and M-H. Gevaert (UMS 2014 – US 41 – PLBS) for the histological sections, M. Tardivel and A. Bongiovanni for cell imaging (BICeL, UMS 2014 – US 41 – PLBS), J-P Meneboo and M. Figeac for scRNAseq3' (Go@L-GFS, UMS 2014 – US 41 – PLBS).

Author contributions Conceptualization: N.H., V.G. and J.-L.D. Experiments: N.H., V.G. and L.V. Analysis: N.H., V.G., J.-L.D. S.H. and

C.C. scRNAseq3' analysis, C.B. Writing: N.H., V.G. F.G. and J.-L.D. Review & Editing: all authors.

Funding This work was supported by the «1000 days for health» program (FHU from Univ. Lille) and the CHU of Lille and the Région Hauts de France (NH PhD fellowship).

Data availability Original datasets of single-cell RNA-sequencing, analysis R scripts and code for the interactive 3D representations of the UMAP superposition are available in the Zenodo repository, <https://doi.org/10.5281/zenodo.13285840>. Interactive 3D representations of the UMAP superposition for the two conditions PBS vs. fibrosis cocktail, without or with cell clustering are available at https://cbedart.github.io/scRNAseq/Hennion2024/UMAP_Conditions/ and https://cbedart.github.io/scRNAseq/Hennion2024/UMAP_Celltypes/, respectively. A 3D UMAP representation grouping both conditions and cell types is available at https://cbedart.github.io/scRNAseq/Hennion2024/UMAP_Celltypes_Conditions/. The interactive volcano plot can be accessed via the URL: <https://cbedart.github.io/scRNAseq/Hennion2024/VolcanoPlot/>. Other data are available within the article or are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval The animal protocols were in accordance with the French Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and with the guidelines of the European Union. Animal housing and all experimental procedures were approved by and performed according to the National Institutional Animal Ethics Committees and institutional guidelines (APAFIS#25481-2020050415255797 v4).

Competing interests Author SH and CC declare they have no financial interests. SH declares personal fees from Boehringer-Ingelheim, Merck & Co, Bristol Myers Squibb. CC declares grants from AstraZeneca, GSK, Novartis, Santelys, personal fees from ALK-Abello, AstraZeneca, Boehringer-Ingelheim, Chiesi, GSK, Sanofi and congress support from AstraZeneca, Boehringer-Ingelheim, Chiesi, Novartis, Sanofi. Other authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

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

References

- Travis WD, Costabel U, Hansell DM et al (2013) An official American thoracic society/European respiratory society statement: update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 188:733–748. <https://doi.org/10.1164/rccm.201308-1483ST>
- Hilberg O, Hoffmann-Vold A-M, Smith V et al (2022) Epidemiology of interstitial lung diseases and their progressive-fibrosing behaviour in six European countries. *ERJ Open Res* 8:00597–02021. <https://doi.org/10.1183/23120541.00597-2021>
- Martinez FJ, Collard HR, Pardo A et al (2017) Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat Rev Dis Primer* 3:17074. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.74>
- Kang HK, Song JW (2024) Progressive pulmonary fibrosis: where are we now?? *Tuberc Respir Dis* 87:123–133. <https://doi.org/10.4046/trd.2023.0119>
- Copeland CR, Collins BF, Salisbury ML (2021) Identification and remediation of environmental exposures in patients with interstitial lung disease: evidence review and practical considerations. *Chest* 160:219–230. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2021.02.021>
- Blanc PD, Annesi-Maesano I, Balmes JR et al (2019) The occupational burden of nonmalignant respiratory diseases. An official American thoracic society and European respiratory society statement. *Am J Respir Crit Care Med* 199:1312–1334. <https://doi.org/10.1164/rccm.201904-0717ST>
- Dsouza KG, Alexander AS, Watts JR, Kulkarni T (2023) Management of interstitial lung disease in patients with autoimmune disease-related interstitial lung disease. *Multidiscip Respir Med* 18:890. <https://doi.org/10.4081/mrm.2023.890>
- Borie R, Le Guen P, Ghanem M et al (2019) The genetics of interstitial lung diseases. *Eur Respir Rev Off J Eur Respir Soc* 28:190053. <https://doi.org/10.1183/16000617.0053-2019>
- Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ et al (2007) Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:7552–7557. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701009104>
- Torres PPTES, Rabahi MF, Moreira MAC et al (2017) Usual interstitial pneumonia: typical, possible, and inconsistent patterns. *J Bras Pneumol* 43:393–398. <https://doi.org/10.1590/S1806-37562016000000368>
- de Lauretis A, Veeraraghavan S, Renzoni E (2011) Review series: aspects of interstitial lung disease: connective tissue disease-associated interstitial lung disease: how does it differ from IPF? How should the clinical approach differ? *Chron Respir Dis* 8:53–82. <https://doi.org/10.1177/1479972310393758>
- Phan SH (2012) Genesis of the myofibroblast in lung injury and fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 9:148–152. <https://doi.org/10.1513/pats.201201-011AW>
- Suga M, Iyonaga K, Ichiyasu H et al (1999) Clinical significance of MCP-1 levels in BALF and serum in patients with interstitial lung diseases. *Eur Respir J* 14:376–382. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.1999.14b23.x>
- Kolahian S, Fernandez IE, Eickelberg O, Hartl D (2016) Immune mechanisms in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 55:309–322. <https://doi.org/10.1165/rmb.2016-0121TR>
- Del Moral PM, Warburton D (2010) Explant culture of mouse embryonic whole lung, isolated epithelium, or mesenchyme under chemically defined conditions as a system to evaluate the molecular mechanism of branching morphogenesis and cellular differentiation. *Methods Mol Biol* 633:71–79. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-019-5_5
- Alsafadi HN, Staab-Weijnitz CA, Lehmann M et al (2017) An ex vivo model to induce early fibrosis-like changes in human precision-cut lung slices. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 312:L896–L902. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00084.2017>
- Hu X, Fernandes J, Jones DP, Go Y-M (2017) Cadmium stimulates myofibroblast differentiation and mouse lung fibrosis. *Toxicology* 383:50–56. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.03.018>
- Lee CG, Homer RJ, Zhu Z et al (2001) Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming

- growth factor beta(1). *J Exp Med* 194:809–821. <https://doi.org/10.1084/jem.194.6.809>
19. Gouyer V, Leir S-H, Tetaert D et al (2010) The characterization of the first anti-mouse Muc6 antibody shows an increased expression of the mucin in pancreatic tissue of Cfr-knockout mice. *Histochem Cell Biol* 133:517–525. <https://doi.org/10.1007/s00418-010-0688-8>
 20. Valque H, Gouyer V, Husson M-O et al (2011) Abnormal expression of Muc5b in Cfr-null mice and in mammary tumors of MMTV-ras mice. *Histochem Cell Biol* 136:699–708. <https://doi.org/10.1007/s00418-011-0872-5>
 21. Asheroft T, Simpson JM, Timbrell V (1988) Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol* 41:467–470. <https://doi.org/10.1136/jcp.41.4.467>
 22. Ségard B-D, Kimura K, Matsuoka Y et al (2024) Quantification of fibrosis extend and airspace availability in lung: A semi-automatic ImageJ/Fiji toolbox. *PLoS ONE* 19:e0298015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0298015>
 23. Portal C, Gouyer V, Gottrand F, Desseyn J-L (2017) Preclinical mouse model to monitor live Muc5b-producing conjunctival goblet cell density under Pharmacological treatments. *PLoS ONE* 12:e0174764. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174764>
 24. Lacroix G, Gouyer V, Rocher M et al (2022) A porous cervical mucus plug leads to preterm birth induced by experimental vaginal infection in mice. *iScience* 25:104526. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104526>
 25. Germain P-L, Lun A, Garcia Meixide C et al (2021) Doublet identification in single-cell sequencing data using ScDbIFinder. *F1000Research* 10:979. <https://doi.org/10.12688/f1000research.73600.2>
 26. Ianevski A, Giri AK, Aittokallio T (2022) Fully-automated and ultra-fast cell-type identification using specific marker combinations from single-cell transcriptomic data. *Nat Commun* 13:1246. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28803-w>
 27. Negretti NM, Plosa EJ, Benjamin JT et al (2021) A single-cell atlas of mouse lung development. *Dev Camb Engl* 148:dev199512. <https://doi.org/10.1242/dev.199512>
 28. Kolanko E, Cargnoni A, Papat A et al (2024) The evolution of in vitro models of lung fibrosis: promising prospects for drug discovery. *Eur Respir Rev* 33:230127. <https://doi.org/10.1183/16000617.0127-2023>
 29. Yanagihara T, Chong SG, Vierhout M et al (2020) Current models of pulmonary fibrosis for future drug discovery efforts. *Expert Opin Drug Discov* 15:931–941. <https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1755252>
 30. Carrington R, Jordan S, Pitchford SC, Page CP (2018) Use of animal models in IPF research. *Pulm Pharmacol Ther* 51:73–78. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2018.07.002>
 31. Schruf E, Schroeder V, Le HQ et al (2020) Recapitulating idiopathic pulmonary fibrosis related alveolar epithelial dysfunction in a human iPSC-derived air-liquid interface model. *FASEB J* 34:7825–7846. <https://doi.org/10.1096/fj.201902926R>
 32. Gauldie J, Sime PJ, Xing Z et al (1999) Transforming growth factor-beta gene transfer to the lung induces myofibroblast presence and pulmonary fibrosis. *Curr Top Pathol Ergeb Pathol* 93:35–45. https://doi.org/10.1007/978-3-642-58456-5_5
 33. Bonner JC (2004) Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 15:255–273. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2004.03.006>
 34. Kolb M, Margetts PJ, Anthony DC et al (2001) Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 107:1529–1536. <https://doi.org/10.1172/JCI12568>
 35. Yi ES, Wawryko P, Ryu JH (2024) Diagnosis of interstitial lung diseases: from Averill A. Liebow to artificial intelligence. *J Pathol Transl Med* 58:1–11. <https://doi.org/10.4132/jptm.2023.11.17>
 36. Marchal-Duval E, Homps-LeGrand M, Froidure A et al (2023) Identification of Paired-related homeobox protein 1 as a key mesenchymal transcription factor in pulmonary fibrosis. *eLife* 12:e79840. <https://doi.org/10.7554/eLife.79840>
 37. Chen L-J, Ye H, Zhang Q et al (2015) Bleomycin induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in pleural mesothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 283:75–82. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.01.004>
 38. Shih AR, Nitiwarangkul C, Little BP et al (2021) Practical application and validation of the 2018 ATS/ERS/JRS/ALAT and Fleischner society guidelines for the diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res* 22:124. <https://doi.org/10.1186/s12931-021-01670-7>
 39. Carmo-Fernandes A, Puschkarow M, Peters K et al (2021) The pathogenic role of smooth muscle Cell-Derived Wnt5a in a murine model of lung fibrosis. *Pharm Basel Switz* 14:755. <https://doi.org/10.3390/ph14080755>
 40. Wiesemann A, Ketteler J, Slama A et al (2019) Inhibition of Radiation-Induced Ccl2 signaling protects lungs from vascular dysfunction and endothelial cell loss. *Antioxid Redox Signal* 30:213–231. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7458>
 41. Costa PM, Gosens I, Williams A et al (2018) Transcriptional profiling reveals gene expression changes associated with inflammation and cell proliferation following short-term inhalation exposure to copper oxide nanoparticles. *J Appl Toxicol* 38:385–397. <https://doi.org/10.1002/jat.3548>
 42. Curras-Alonso S, Soulier J, Defard T et al (2023) An interactive murine single-cell atlas of the lung responses to radiation injury. *Nat Commun* 14:2445. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38134-z>
 43. Habermann AC, Gutierrez AJ, Bui LT et al (2020) Single-cell RNA sequencing reveals profibrotic roles of distinct epithelial and mesenchymal lineages in pulmonary fibrosis. *Sci Adv* 6:eaba1972. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba1972>
 44. Vietri L, Bennett D, Cameli P et al (2019) Serum amyloid A in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Investig* 57:430–434. <https://doi.org/10.1016/j.resinv.2019.03.010>
 45. Gong G-C, Song S-R, Xu X et al (2020) Serpina3n is closely associated with fibrotic procession and knockdown ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 532:598–604. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.08.094>
 46. Carleo A, Bargagli E, Landi C et al (2016) Comparative proteomic analysis of Bronchoalveolar lavage of Familial and sporadic cases of idiopathic pulmonary fibrosis. *J Breath Res* 10:026007. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/10/2/026007>
 47. Saraswat M, Joenväärä S, Tohmola T et al (2020) Label-free plasma proteomics identifies haptoglobin-related protein as candidate marker of idiopathic pulmonary fibrosis and dysregulation of complement and oxidative pathways. *Sci Rep* 10:7787. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64759-x>
 48. Moore BB, Kolodnick JE, Thannickal VJ et al (2005) CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury. *Am J Pathol* 166:675–684. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62289-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62289-4)
 49. Komolafe K, Pacurari M (2022) CXC Chemokines in the Pathogenesis of Pulmonary Disease and Pharmacological Relevance. *Int J Inflamm* 2022:4558159. <https://doi.org/10.1155/2022/4558159>
 50. Phan SH, Thrall RS (1982) Inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by Cobra venom factor. *Am J Pathol* 107:25–28

51. Huang X, Song Y, Wei L et al (2023) The emerging roles of ferroptosis in organ fibrosis and its potential therapeutic effect. *Int Immunopharmacol* 116:109812. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.109812>

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

Identification of early genes in the pathophysiology of fibrotic interstitial lung disease in a new model of pulmonary fibrosis

Nathan Hennion¹, Corentin Bedart¹, Léonie Vandomber¹, Frédéric Gottrand¹, Sarah Humez^{2,3},
Cécile Chenivresse⁴, Jean-Luc Desseyn^{1#}, Valérie Gouyer^{1#}

1, Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Infinite U1286, F-59000 Lille, France

2, Univ. Lille, Department of Pathology, CHU Lille, F-59000 Lille, France

3, Univ. Lille, CHU Lille, CNRS, Inserm, Institut Pasteur de Lille, UMR9020, UMR1277, Canther, Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France

4, Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Centre de référence constitutif des maladies pulmonaires rares, U1019, UMR 9017, CIIL, Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000 Lille, France

These authors contributed equally to this work

Corresponding author:

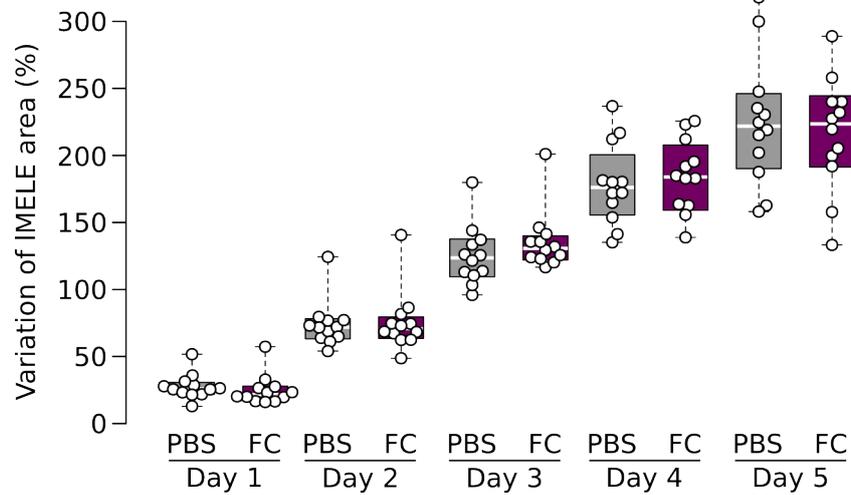
Jean-Luc Desseyn, PhD

Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Infinite U1286, F-59000 Lille, France

jean-luc.desseyn@inserm.fr

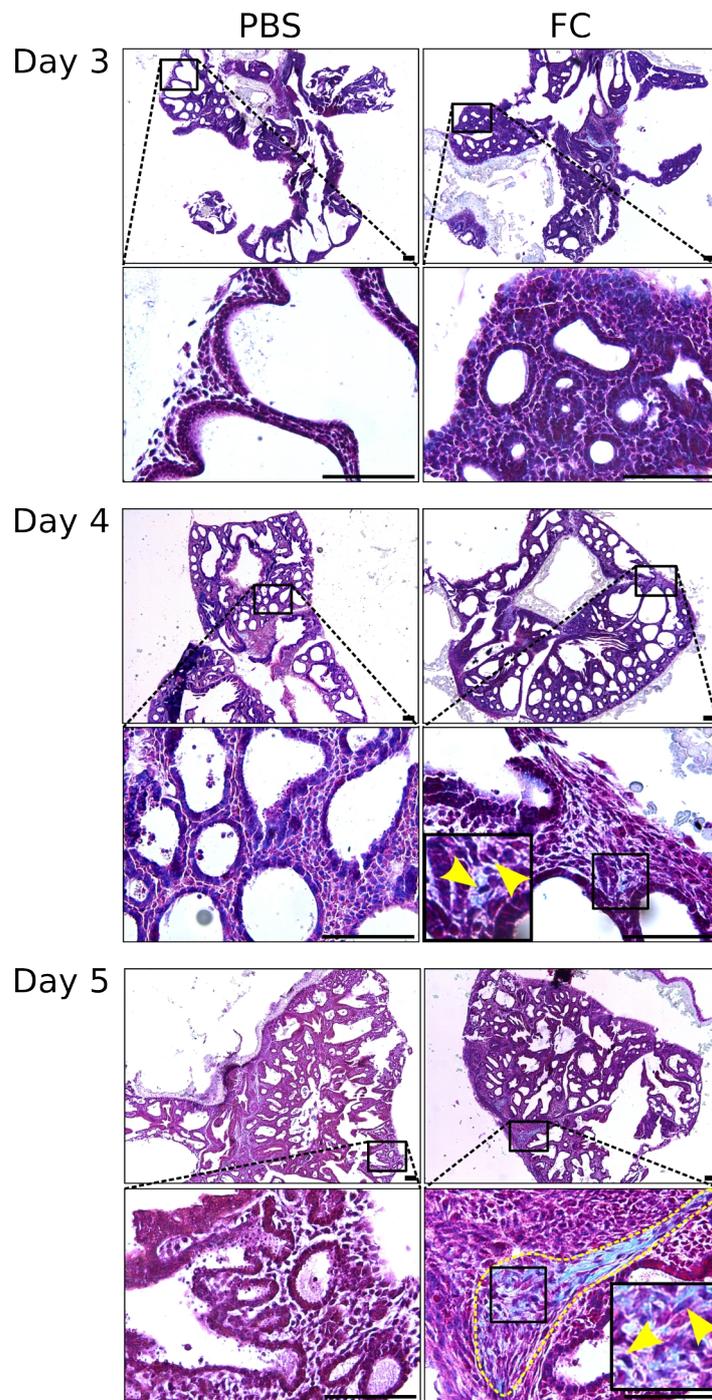
tel.: (+33) 320 627 789

Supplemental Material : 4 Figures and 2 Tables



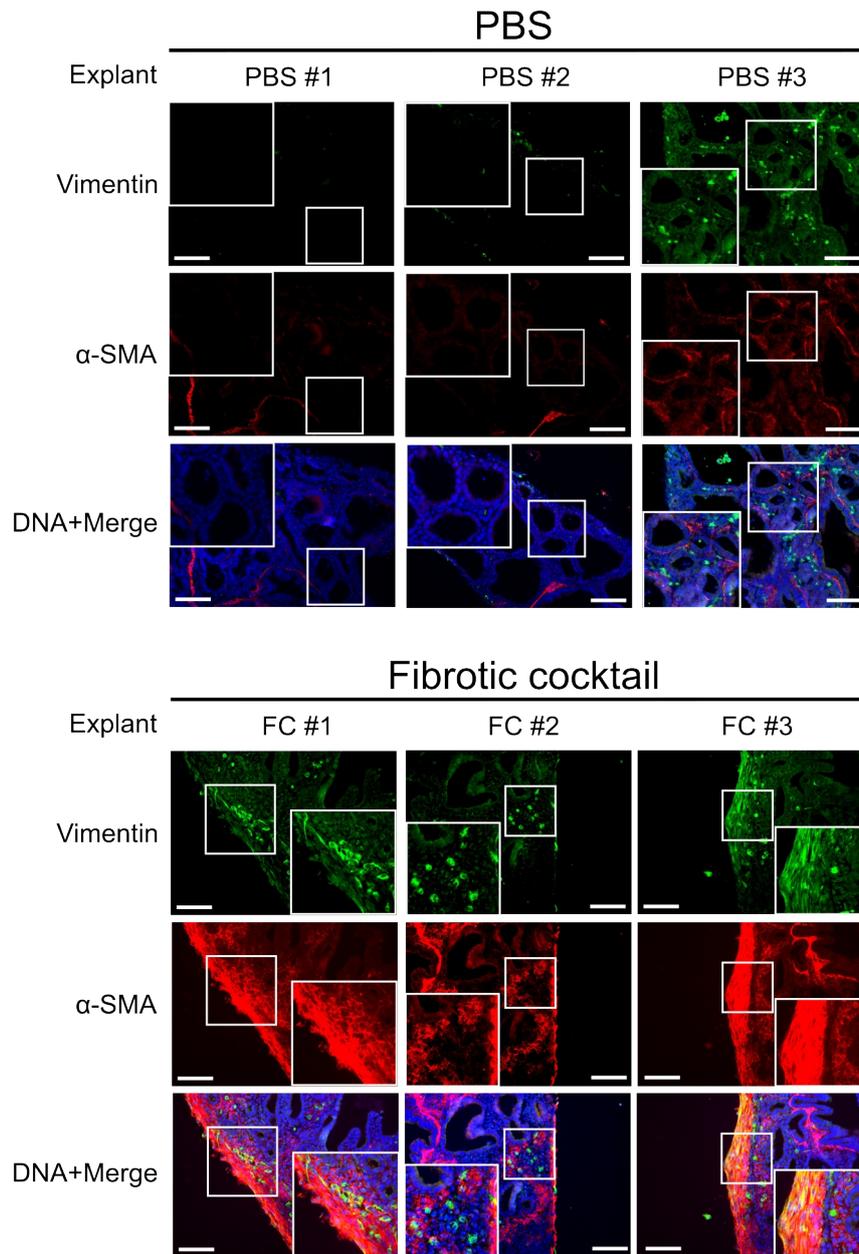
Suppl. Fig. 1 The fibrotic cocktail did not alter the surface of the explants

Variation in the surface area (%) of mouse embryonic lung explants (MELEs) on days 1–5 of culture, as calculated in relation to the surface area values obtained on day 0 of culture. PBS, phosphate-buffered saline; FC, fibrotic cocktail. N = 12/group. The statistical analysis was performed using the nonparametric Wilcoxon–Mann–Whitney test.



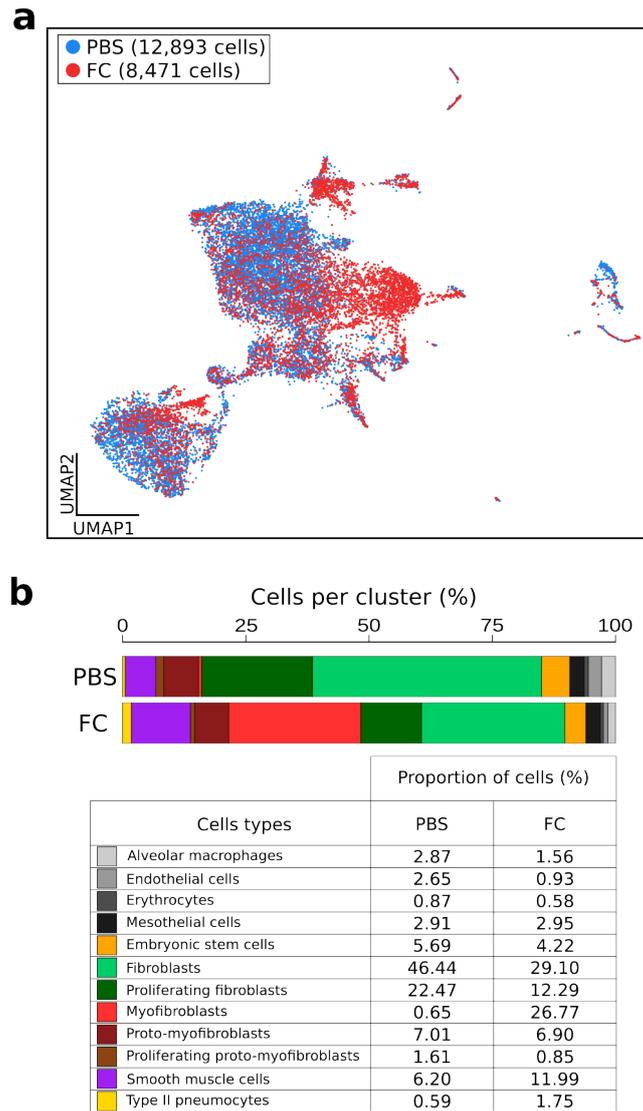
Suppl. Fig. 2 Masson trichrome analysis of the induced fibrosis

Images collected after 3–5 days of culture of representative mouse embryonic lung explants treated with either PBS or the fibrotic cocktail (FC), showing spindle cells located in the subpleural regions (arrowheads) within a collagen-dense zone (outlined in yellow). Scale bar: 100 μ m.



Suppl. Fig. 3 Immunofluorescence analysis of parenchyma from PBS (control) and fibrotic cocktail (FC)-treated lung explants at day 5

Immunofluorescence staining for vimentin (green) and α -Sma (red) showing the accumulation of mesenchymal cells and fibrosis labelled by α -Sma in the lung periphery of the mouse embryonic lung explants for explants treated with the fibrotic cocktail (N = 3) compared to PBS treatment (N = 3). Nuclei are counterstained with the Hoechst 33258 dye (blue). Scale bar: 100 μ m.



Suppl. Fig. 4 Single-cell RNA-sequencing 3' analysis of control MELEs (treated with PBS) and MELEs treated with the fibrotic cocktail (FC) for 18 h

(a) Uniform manifold approximation and projections (UMAPs) without clustering of expressed gene analysis between control mouse embryonic lung explants (MELEs) treated with PBS and MELEs treated with the FC. An interactive 3D representation of the UMAP superposition for the two conditions is available at the following URL:

https://cbedart.github.io/scRNAseq/Hennion2024/UMAP_Celltypes_Conditions/. (b) Cumulative

bar plot of the percentage of cells per cluster relative to the total number of cells between the PBS and FC conditions, and distribution table.

Suppl. Table 1. List of upregulated genes from the mouse embryonic lung explants treated with the fibrotic cocktail.

Gene	Log2-fold change	Adjusted p-value
Saa3	7.84	0
Madcam1	6.64	9.91E-267
Cxcl13	6.47	3.50E-69
Saa4	6.00	1.54E-112
Cxcl5	5.66	0
Vnn3	5.42	5.66E-38
Nts	5.35	2.47E-33
Ms4a4d	5.15	2.39E-123
Gm36107	4.97	1.08E-37
Gm48427	4.94	5.09E-57
C3	4.84	0
Steap4	4.83	0
AC106834.1	4.82	3.07E-14
Serpina3i	4.66	1.60E-77
Gm14275	4.47	2.29E-135
Hp	4.21	6.19E-293
C4b	4.20	9.71E-135
Serpina12	4.10	5.69E-16
C1ra	3.93	2.39E-288
Tnip3	3.85	1.80E-118
C1s1	3.83	1.57E-251
Serpina3f	3.81	5.83E-172
4930405A10Rik	3.77	1.75E-108
Il33	3.77	1.42E-78
Cp	3.75	0
Saa2	3.73	4.67E-46
Usp9y	3.68	4.49E-10
Spib	3.59	6.90E-28
Rgs16	3.52	9.78E-182
Saa1	3.48	2.32E-78

Gm7480	3.44	8.59E-59
Vnn1	3.41	4.17E-28
Gm11588	3.39	5.38E-17
Serpina3n	3.39	4.32E-39
Gm33782	3.36	8.75E-41
Gm10248	3.33	3.42E-58
AW112010	3.27	6.21E-107
Lrmda	3.26	0
Ccl2	3.22	0
Ptgs2os2	3.21	2.75E-42
Adamdec1	3.17	4.27E-82
Gm21123	3.12	7.32E-22
Lbp	3.11	5.08E-192
Cxcl9	3.03	1.35E-22
Serpina3g	2.97	0
Ifitm1	2.94	0
Ccl11	2.93	6.14E-134
Timp4	2.93	4.81E-55
Gbp6	2.92	0
Ecsr	2.87	1.48E-76
Gm46124	2.82	3.61E-101
Mt2	2.80	0
Npffr2	2.80	3.80E-19
Ch25h	2.71	2.81E-113
Casp4	2.69	0
Gm5084	2.61	1.18E-10
Cxcl1	2.60	0
Gbp9	2.59	7.11E-73
Csf3	2.59	7.51E-30
Ptgs2	2.58	1.98E-248
Ptx3	2.54	1.99E-48
Lcn2	2.51	0
Fabp4	2.49	7.30E-07

Gbp2b	2.49	2.61E-74
Nos2	2.49	2.84E-13
Gm12840	2.48	3.50E-183
Ntrk1	2.46	1.87E-57
Gbp2	2.42	0
Sftpc	2.41	2.15E-43
Gm21860	2.40	2.96E-19
Eif2s3y	2.37	0
Gm16685	2.35	1.13E-112
Pik3c2g	2.31	8.23E-60
Galnt18	2.29	4.30E-293
Calcr1	2.29	9.54E-184
Ces1f	2.28	5.14E-49
6720468P15Rik	2.28	3.32E-36
Ifi44	2.28	4.73E-24
Bdkrb1	2.27	2.81E-60
Sod2	2.26	0
Ces1d	2.25	6.66E-132
Trim34a	2.24	6.69E-08
Kdm5d	2.23	4.45E-195
Gm5149	2.22	4.49E-15
Gm47601	2.22	3.47E-62
Col18a1	2.22	0
Ddx3y	2.20	0
Csta2	2.18	4.23E-05
Pthlh	2.18	9.27E-83
1700121C08Rik	2.18	2.16E-11
Htr1b	2.18	3.77E-13
Dram1	2.17	0
Mmp9	2.15	8.16E-14
Batf	2.15	2.91E-119
Dhrs9	2.14	6.02E-15
Postn	2.13	5.02E-213

Casp12	2.13	6.84E-55
Havcr1	2.13	7.59E-16
Ankrd1	2.12	8.76E-10
Shisa3	2.11	1.93E-90
Uty	2.09	0
Sfta2	2.09	5.07E-04
Esrrg	2.07	1.82E-90
Col22a1	2.06	2.42E-30
Gm47520	2.06	2.81E-23
Prok2	2.05	1.07E-09
Syn2	2.05	1.44E-122
Bckdhb	2.05	7.49E-177
Olfm4	2.03	3.73E-06
Cxcl10	2.02	0
Barx2	2.02	1.15E-14
Gm14249	2.01	1.54E-19

Suppl. Table 2. List of down regulated genes in the mouse embryonic lung explants treated with the fibrotic cocktail.

Gene	Log2-fold change	Adjusted p-value
Ms4a7	-3.30	3.03E-11
C3ar1	-3.13	5.29E-11
Cd84	-3.07	4.52E-09
Fcrls	-2.92	5.34E-09
Ms4a6c	-2.82	2.23E-04
Mpeg1	-2.79	1.04E-07
Ltc4s	-2.78	1.33E-05
Tnf	-2.70	4.40E-08
Tpm3-rs7	-2.63	2.63E-45
Apoc2	-2.61	2.17E-09
Trem2	-2.58	3.73E-21
C1qa	-2.54	3.21E-22
Pld4	-2.37	3.98E-08
Cd300c2	-2.35	6.10E-07
Ccl4	-2.34	4.61E-16
Galnt6	-2.33	6.30E-10
C1qb	-2.29	6.67E-25
AU022793	-2.26	7.07E-05
C1qc	-2.17	1.03E-14
Cd86	-2.16	9.20E-10
Ifi207	-2.14	1.79E-10
Syng1	-2.11	9.87E-06
Ctss	-2.11	2.25E-13
Rapsn	-2.09	4.96E-03
Fcgr1	-2.02	1.82E-07