UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires (CEPR) – Inserm U1100

THÈSE présentée par :

Coralie MERGAULT

soutenue le : **13 Janvier 2022**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé – Technologie pour la Santé

Ciblage de régulateurs du cytosquelette d'actine pour le traitement de la fibrose pulmonaire

THÈSE dirigée par :

M PLANTIER Laurent	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Université de Tours

RAPPORTEURS :

Mme BONCOEUR Emilie	Professeure des Universités, Université Sorbonne Paris Nord
M JOUNEAU Stéphane	Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Université de Rennes 1

PRESIDENT DU JURY :

M MARCHAND-ADAM Sylvain	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Université de Tours

JURY :

Mme ALLARD-VANNIER Emilie	Maîtresse de conférences des Universités, HDR, Université de Tours
Mme BONCOEUR Emilie	Professeure des Universités, Université Sorbonne Paris Nord
Mme VANBEVER Rita	Directrice de Recherche FNRS, Professeure des Universités, Université Catholique de Louvain, Belgique
M JOUNEAU Stéphane	Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Université de Rennes 1
M MAILLEUX Arnaud	Chargé de Recherche, INSERM Paris
M MARCHAND-ADAM Sylvain	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Université de Tours
M PLANTIER Laurent	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Université de Tours

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier M Mustapha SI-TAHAR, de m'avoir permis d'intégrer le CEPR pour la réalisation de cette thèse et pour ces discussions de fin de journée et vos conseils, me rassurant dans certains de mes choix de thèse.

Je remercie Mme Emilie BONCOEUR et M Stéphane JOUNEAU, d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse en tant que rapporteurs. Merci également à Mme Emilie ALLARD-VANNIER, Mme Rita VANBEVER, M Arnaud MAILLEUX et M Sylvain MARCHAND-ADAM d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

Merci Laurent d'avoir repris contact avec moi quelques jours seulement avant le concours de thèse qui m'a permis d'intégrer le labo ! Merci de m'avoir apporté, durant ces 3 années, votre savoir et savoir-faire, qui je dois l'avouer, m'impressionnent encore ! Merci également de votre soutien dans la réalisation de mes projets, tant professionnels que personnels.
Nathalie, je te remercie d'avoir été et d'être une cheffe exceptionnelle, à l'écoute et toujours là lorsque l'on a besoin : merci, merci, merci !

Pendant ces 3 ans, j'ai eu la chance de rencontrer des personnes formidables que je considère comme étant plus que de simples collègues mais comme de véritables amis. Alors merci à tout ce p'tit groupe génial, Christelle, Julien, Woodys, Cathy, Mylène, Paul, Thibault, Seda, Roxane. Vous avez permis de faire de cette thèse, une thèse riche en émotions (de toutes sortes évidemment entre les pleurs, les fous rires, la désillusion, l'espoir etc.). Merci pour les « on va boire un coup ? » après les journées interminables, merci d'être vous ! Merci pour vos conseils et votre soutien dans les moments difficiles !
Mention particulière à Woodys ou mon « acolyte de thèse » ! Ton départ du labo m'a fait tout drôle mais merci pour toutes ces discussions pendant ces longues heures de manip au sous-sol ! Merci à Lise, ma copine de danse latine, on n'oubliera pas les bonnes soirées SBK de la Pachanga et de la Guinguette, c'était vraiment une période fun !

Merci également à mes collègues de bureau, Alexie, Marion F, Timothée, pour les discussions parfois décalées mais bien marrantes surtout lorsque Timothée prend son air détaché et zen !
Merci à Chloé pour tous ses conseils et ses anecdotes !

Laurine, merci pour ta patience pour les manips de neb et bien d'autres…Tout le monde sait que les lavages sont longs, très longs… Je te remercie de tout le travail fourni car sans ça la thèse aurait été vraiment plus difficile et merci d'avoir fait équipe avec moi pendant ces trois ans, j'espère que tu en garderas un bon souvenir ! Merci également au bâtiment M, Sandrine, Déborah, Joeffrey pour tes chantages aux gâteaux et Maria, pour ta recherche de potins en venant au 47C, pas toujours efficace on doit bien se l'avouer… !

De manière général, merci à l'ensemble des membres du CEPR pour ces trois ans en votre compagnie ! Croiser le chemin de chacun d'entre vous m'a permis d'élargir ma perception du travail en laboratoire et de la vie en collectivité.

Merci à mes supers copines, Esther, Pauline, Aurore, Julie, Maureen et Andréa, pour tous ces moments de grandes discussions et de grosses marrades, qui m'ont permis de m'évader un peu !

Pour finir, je tiens évidemment à remercier ma famille. Papa, maman, petit frère (qui mesure une tête de plus, bien sûr…) merci de m'avoir toujours soutenu, peu importe mes choix !
Rémy, tout n'a pas toujours été rose, mais ces obstacles de la vie m'ont fait grandir et m'ont conforté dans mes choix. Merci de faire partie de ma vie et de m'avoir offert cette belle petite famille à un moment où je pense, j'en avais le plus besoin pour m'épanouir pleinement dans la finalisation de la thèse. Merci pour tout ♥.

A mon petit Loïs, pour ces 265 jours de bonheur et tant d'autres à venir…

Résumé

La fibrose est un processus pathologique caractérisé par l'accumulation de matrice extracellulaire conduisant à la déformation physique et à la perte de la fonctionnalité d'un tissu. La différenciation des cellules mésenchymateuses du poumon, incluant l'expression accrue du collagène-1 (COL1) et de l'α–actine du muscle lisse (ACTA2) est un mécanisme majeur de la fibrose pulmonaire. Notre hypothèse est que le cytosquelette d'actine joue un rôle important dans la différenciation des cellules mésenchymateuses au cours de la fibrose pulmonaire, et que ces régulateurs moléculaires représentent une cible thérapeutique accessible.

Pour explorer cette hypothèse, trois axes de recherche ont été étudiés. Tout d'abord, nous avons montré 1) que le complexe Arp2/3, acteur de la polymérisation branchée de l'actine, était surexprimé par les fibroblastes pulmonaires exposés au TGFβ1 et dans le poumon de souris exposées à la bléomycine, 2) que l'inhibition du complexe Arp2/3 par la petite molécule CK666 et des siRNA ciblant ses sous-unités *ARP2* et *ARP3* prévenait l'expression de COL1 et ACTA2 dans les fibroblastes pulmonaires *in vitro,* à l'état basal et après stimulation par le TGFβ1 et 3) que le CK666 prévenait la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris.

Ensuite, nous avons montré que la répression de LIMCH1, un composant des fibres de stress du cytosquelette d'actine, réduisait l'expression basale de COL1 et ACTA2 dans les fibroblastes pulmonaires. L'expression de LIMCH1 par les fibroblastes n'était pas modulée *in vitro* par des agents profibrosants ou antifibrosants. Enfin, nous avons montré la faisabilité de l'administration trachéale d'oligonucléotides antisens de 3^{e} génération (ASO) pour réprimer l'expression de l'ARNm *Limch1* dans le poumon des souris exposées à la bléomycine. L'index thérapeutique des ASO était étroit.

Mots clés : Fibrose pulmonaire, cytosquelette d'actine, oligonucléotides antisens.

Résumé en anglais

Fibrosis is a disease process characterized by buildup of extracellular matrix leading to physical deformation and loss of function of tissue. Profibrotic differentiation of lung mesenchymal cells, including increased expression of collagen-1 (COL1) and α-smooth muscle actin (ACTA2) is a major mechanism of pulmonary fibrosis. Our hypothesis is that the actin cytoskeleton plays an important role driving differentiation of mesenchymal cells during pulmonary fibrosis, and that its molecular regulators can be targeted therapeutically. We focused on the Arp2/3 complex, the main driver of branched actin polymerization, and LIMCH1, a component of actin stress fibers.

First, we showed 1) that the Arp2 / 3 complex was overexpressed by pulmonary fibroblasts treated with TGFβ1 and in the lungs of bleomycin-exposed mice, 2) that inhibition of the Arp2/3 complex with the small molecule CK666 and with siRNAs targeting the *ARP2* and *ARP3* subunits reduced the expression of COL1 and ACTA2 in pulmonary fibroblasts *in vitro*, at baseline and after stimulation with TGFβ1 and 3) that CK666 prevented bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice.

Next, we showed that repression of LIMCH1 reduced basal expression of COL1 and ACTA2 in lung fibroblasts. LIMCH1 expression by fibroblasts was not modulated *in vitro* by profibrotic or antifibrotic agents. Finally, we showed that tracheal delivery of 3rd generation antisense oligonucleotides (ASO) repressed *Limch1* mRNA expression in the lungs of bleomycin-treated mice. The therapeutic index of airway-delivered ASOs was narrow.

Key words : Pulmonary fibrosis, actin cytoskeleton, antisens oligonucleotides.

Table des matières

REMERCIEMENTS 3

RESUME 5

RÉSUMÉ EN ANGLAIS 6

TABLE DES MATIERES 7

LISTE DES TABLEAUX 10

LISTE DES FIGURES 11

LISTE DES ABRÉVIATIONS 13

PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE ET CONTEXTE GENERAL DU TRAVAIL DE RECHERCHE 17

I. INTRODUCTION GENERALE 19

I.1. LA FIBROSE 19
I.1.1. DEFINITION 19
I.1.2. POIDS EN PATHOLOGIE HUMAINE 19
I.1.2.1. La fibrose est un mécanisme physiopathologique fréquent au cours des maladies chroniques extrapulmonaires 19
I.1.2.2. Fibrose pulmonaire 21
I.1.2.2.1. Cadre nosologique 21
I.1.2.2.2. Traitement antifibrosants 22
I.1.2.2.2.1. Nintedanib 22
I.1.2.2.2.2. Pirfenidone 22
I.1.3. PRINCIPAUX MECANISMES DE LA FPI 23
I.1.3.1. Les étapes de la fibrogenèse pulmonaire 23
I.1.3.2. Principales voies de signalisation impliquées dans la différenciation des cellules mésenchymateuses au cours de la fibrogenèse pulmonaire 25
I.1.3.2.1. Facteurs de croissance 26
I.1.3.2.2. Voies de mécanotransduction 28
I.2. HYPOTHESE GENERALE DE LA THESE : PARTICIPATION A LA FIBROGENESE PULMONAIRE DE REGULATEURS DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE 29

II. LE CYTOSQUELETTE D'ACTINE 30

II.1. ORGANISATION GENERALE DU CYTOSQUELETTE 30
II.2. ORGANISATION DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE 31
II.2.1. ORGANISATION DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE A L'ECHELLE CELLULAIRE 31
II.2.2. ORGANISATION DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE A L'ECHELLE MOLECULAIRE 33
II.3. DYNAMIQUE DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE ET SES MECANISMES MOLECULAIRES 34
II.3.1. POLYMERISATION DE L'ACTINE 34
II.3.1.1. Polymérisation linéaire de l'actine 36
II.3.1.1.1. Facteurs de nucléation 36
II.3.1.1.2. Facteurs d'élongation 36
II.3.1.2. Polymérisation branchée de l'actine, rôle du complexe Actin related protein 2/3 (Arp2/3). 37
II.3.1.2.1. Présentation du complexe Arp2/3 37
II.3.1.2.2. Activation du complexe Arp2/3 38
II.3.1.2.2.1. NPF type 1 38
II.3.1.2.2.2. NPF type 2 39

II.3.1.2.3. Inhibition du complexe Arp2/3 41
II.3.2. DEPOLYMERISATION 41
II.3.2.1. Famille ADF/Cofiline 41
II.3.2.1.1. Régulation de la cofiline 42
II.4. PRINCIPAUX PARTENAIRES MOLECULAIRES DE L'ACTINE DANS LES STRUCTURES DU CYTOSQUELETTE 43
II.4.1. ACTINE CORTICALE 43
II.4.2. FILAMENTS D'ACTINE 44
II.4.3. FIBRES DE STRESS 44
II.4.4. JONCTIONS INTERCELLULAIRES 45
II.4.4.1. Jonctions adhérentes 45
II.4.4.2. Jonctions serrées 46
II.4.5. ADHERENCES FOCALES 47
II.5. REGULATION DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE PAR LA FAMILLE DES RHO-GTPASES 48

III. REGULATION DU PHENOTYPE CELLULAIRE PAR LE CYTOSQUELETTE D'ACTINE 50

III.1. PROLIFERATION ET MORT CELLULAIRE 50
III.1.1. PROLIFERATION 50
III.1.2. MORT CELLULAIRE 51
III.2. INTERACTION AVEC L'ENVIRONNEMENT : MECANOTRANSDUCTION 52
III.2.1. ACTIVATION DE FACTEURS DE CROISSANCE LIES A LA MATRICE : CAS DU TGFβ1 52
III.2.2. MECANOTRANSDUCTION 53
III.2.2.1. Principe général 53
III.2.2.2. Voie FAK 54
III.2.2.3. Activation des Rho-GTPases 55
III.2.2.4. Voie MRTF/SRF 55
III.2.2.5. Voie YAP et TAZ 56

IV. PARTICIPATION DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE A LA FIBROGENESE 57

IV.1. REMODELAGE DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE DANS LES CELLULES MESENCHYMATEUSES : DESCRIPTION 57
IV.2. IMPLICATION DE LA VOIE DU TGFβ 59
IV.3. IMPLICATION DE LA VOIE FAK/RHO/ROCK 59
IV.4. IMPLICATION DE LA VOIE MRTF 60
IV.5. IMPLICATION DE LA VOIE YAP ET TAZ 61

V. DONNEES PRELIMINAIRES 61

V.1. COMPLEXE ARP2/3 62
V.2. LIMCH1 62
V.2.1. DONNEES PROTEOMIQUES 62
V.2.2. DONNEES FONCTIONNELLES : ESIRNA 64

VI. HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE LA THESE 65

VI.1. PREMIERE PARTIE : COMPLEXE ARP2/3 *IN VITRO* ET *IN VIVO* 66
VI.2. DEUXIEME PARTIE : ROLE DE LIMCH1 DANS LA FIBROGENESE *IN VITRO* 66
VI.3. TROISIEME PARTIE : APPROCHE THERAPEUTIQUE VIA DES OLIGONUCLEOTIDES ANTISENS PAR VOIE AERIENNE 66

PARTIE II : INHIBITION DU COMPLEXE ARP2/3 REPRIME LA DIFFERENCIATION DES MYOFIBROBLASTES PULMONAIRES HUMAINS ET ATTENUE LA FIBROSE PULMONAIRE INDUITE PAR LA BLEOMYCINE CHEZ LA SOURIS. 67

I. INTRODUCTION 69

II. ARTICLE PUBLIE DANS BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY 71

III. EXPERIENCES COMPLEMENTAIRES 101

III.1. EXPRESSION D'ARP2 ET ARP3 DANS LES POUMONS HUMAINS ATTEINTS DE FPI 101
III.1.1. MATERIELS ET METHODES 101
III.1.2. RESULTATS 101
III.2. *IN VITRO* : TRANSFECTION SIMULTANEES PAR *SIARP2* ET *SIARP3* 102
III.2.1. MATERIELS ET METHODES 103
III.2.2. RESULTATS 103
III.3. *IN VITRO* : PHOSPHORYLATION DE SMAD3 105
III.3.1. MATERIELS ET METHODES 105
III.3.2. RESULTATS 106
III.4. *IN VIVO* : TRAITEMENT PAR BENPROPERINE DES SOURIS EXPOSEES A LA BLEOMYCINE 106
III.4.1. MATERIELS ET METHODES 106
III.4.2. RESULTATS 107
IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES 110
V. CONCLUSION 115

PARTIE III : ROLE DE LIMCH1 *IN VITRO* 117

I. INTRODUCTION 119

II. MATERIELS ET METHODES 121

II.1. EXPERIENCES SUR CELLULES HUMAINES 121
II.1.1. EXPRESSION DE LIMCH1 DANS LES FIBROBLASTES PULMONAIRES 121
II.1.1.1. Fibroblastes de patients atteints de FPI 121
II.1.1.2. Fibroblastes CCD16Lu exposés à des agents profibrosants 121
II.2. EFFET DE LA REPRESSION DE LIMCH1 SUR LE PHENOTYPE CELLULAIRE *IN VITRO* 121
II.2.1. REPRESSION STABLE PAR TRANSDUCTION DE PARTICULES LENTIVIRALES 121
II.2.2. REPRESSION TRANSITOIRE PAR TRANSFECTION D'OLIGONUCLEOTIDES ANTISENS 122
II.3. CRITERES DE JUGEMENT 123
II.3.1. EXPRESSION DE LIMCH1 123
II.3.2. CROISSANCE CELLULAIRE ET EXPRESSIONS D'ACTA2 ET COL1 124

III. RESULTATS 124

III.1. LIMCH1 ETAIT EXPRIMEE DANS LES FIBROBLASTES PULMONAIRES 124
III.2. L'EXPRESSION DE LIMCH1 DANS LES FIBROBLASTES CCD16LU N'ETAIT PAS INDUITE PAR DES AGENTS PROFIBROSANTS 125
III.3. REPRESSION DE LIMCH1 PAR SHRNA ET ASO 125
III.3.1. LA REPRESSION DE LIMCH1 NE MODIFIAIT PAS LA CROISSANCE CELLULAIRE 127
III.3.2. LA REPRESSION DE LIMCH1 DIMINUAIT L'EXPRESSION BASALE D'ACTA2 ET COL1 128

IV. DISCUSSION 131

V. CONCLUSION 133

PARTIE IV : FAISABILITE DE L'ADMINISTRATION REPETEE D'OLIGONUCLEOTIDES ANTISENS PAR VOIE AERIENNE POUR LE TRAITEMENT DE LA FIBROSE PULMONAIRE. 135

I. INTRODUCTION 137

II. MATERIELS ET METHODES 138

II.1. REPRESSION DE LIMCH1 CHEZ LA SOURIS 138
II.1.1. REPRESSION DE LIMCH1 DANS LES CELLULES MURINES LL/2 PAR L'ASO 138
II.1.2. INSTILLATION D'ASO CHEZ LA SOURIS NAÏVE 138
II.1.2.1. Expérience de dose réponse chez la souris saine 139
II.1.2.2. Cinétique de répression de LIMCH1 chez la souris saine 139
II.2. CINETIQUE DE REPRESSION DE LIMCH1 CHEZ LA SOURIS EXPOSEE A LA BLEOMYCINE 140
II.3. CRITERES DE JUGEMENT 140
II.4. ANALYSE STATISTIQUE 141

III. RESULTATS 141

III.1. EFFET DE MLIMCH1-ASO *IN VITRO* 141
III.2. EXPERIENCE DE DOSE REPONSE CHEZ LA SOURIS NAÏVE 142
III.3. ETUDE CINETIQUE CHEZ LA SOURIS NAÏVE 142
III.4. EFFICACITE DE L'ASO DANS UN MODELE MURIN DE FIBROSE PULMONAIRE 143

IV.EXPERIENCES COMPLEMENTAIRES : UTILISATION DE NANOVECTEURS PEPTIDIQUES POUR L'ADMINISTRATION D'ASO 145

IV.1. REPRESSION DE LIMCH1 PAR DES NANOASO *IN VITRO* 146
IV.1.1. MATERIELS ET METHODES 146
IV.1.2. RESULTATS 146
IV.2. ABSENCE DE REPRESSION DE *LIMCH1* PAR DES NANOASO *IN VIVO* 147
IV.2.1. MATERIELS ET METHODES 147
IV.2.2. RESULTATS 147

V. DISCUSSION 149

VI. CONCLUSION 151

PARTIE V : DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION GENERALES 153

I. DISCUSSION GENERALE 155

II. CONCLUSION ET PERSPECTIVES 157

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 159

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition du cytosquelette au sein de la cellule. *31*
Tableau 2: Principaux acteurs de la polymérisation et dépolymérisation de l'actine. *43*
Tableau 3:Sélection des protéines candidates pour l'analyse fonctionnelle in vitro. *63*
Tableau 4 : shRNA utilisés pour l'étude. *122*
Tableau 5 : Amorces utilisés *141*

Liste des figures

Figure 1 : Histologie du poumon sain et du poumon atteint de FPI. 22
Figure 2 : Mécanismes généraux de la fibrose pulmonaire idiopathique. 25
Figure 3 : Différents types de fibres de stress. 32
Figure 4: Structure du monomère et du filament d'actine. 33
Figure 5 : Régulation de la polymérisation/dépolymérisation de l'actine. 35
Figure 6 : Schéma de filaments d'actine suite à la polymérisation branchée ou linéaire. 35
Figure 7 : Organisation du complexe Arp2/3. 38
Figure 8 : Activation du complexe Arp2/3 par les NPFs. 40
Figure 9 : Composition et organisation spatiale des jonctions cellule-cellule dans les cellules épithéliales. 46
Figure 10 : Mécanismes d'activation et voies des Rho-GTPases. 49
Figure 11 : Mécanisme d'activation de FAK au niveau des plaques d'adhérence focale, médiée par les interactions membranaires et les forces de traction. 54
Figure 12 : Microscopie électronique montrant les caractéristiques cellulaires typiques des cellules provenant du lavage broncho-alvéolaire (LBA) de patients atteints de différentes maladies pulmonaires. 58
Figure 13 : La matrice rigide induit des changements dans la dynamique de l'actine en faveur de la polymérisation de l'actine F et de la formation de fibres de stress riche en α-SMA. 58
Figure 14 : Le siRNA ciblant ARPC2 réprime l'expression de COL1 et la proliferation des fibroblastes pulmonaires CCL-210. 62
Figure 15 : Expression et répression de LIMCH1 dans les fibroblastes pulmonaires humains. 65
Figure 16 : Expression des sous-unités ARP2, ARP3 et ARPC2 dans les cellules de patients atteints ou indemnes de FPI. 70
Figure 17 : Immunohistochimie pour ARP2 et ARP3 dans le poumon humain. 102
Figure 18 : Effet de la double transfection par siARP2 et siARP3 sur la croissance des fibroblastes pulmonaires humains CCD16lu. 103
Figure 19 : Absence de régulation de l'expression d'ACTA2 par les siRNAs ciblant simultanément ARP2 et ARP3 avec ou sans stimulation par le TGFβ1 dans les cellules CCD16lu. 104
Figure 20 : Expression du collagène 1 dans les CCD16lu stimulées ou non par le TGFβ1 et traitées ou non par les siRNAs ciblant ARP2 et ARP3. 105
Figure 21 : Le CK666 ne modulait pas la phosphorylation de SMAD3 induite par la TGFβ1. 106
Figure 22 : Poids corporel des souris exposées ou non à la bléomycine et traitées ou non avec la benpropérine 108
Figure 23 : Courbe de survie des souris exposées ou non à la bléomycine et traitées ou non avec la benpropérine 109
Figure 24 : Quantité de collagène insoluble dans le poumon gauche des souris exposées ou non à la bléomycine et traitées ou non avec la benpropérine. 109
Figure 25 : Proposition d'un modèle d'interactions entre les voies de signalisation ERK1/2, SMAD et PI3K/Akt. 112
Figure 26 : Proposition d'un modèle d'interaction entre les voies de signalisation GSK3β/β-caténine et MRTF-A. 114
Figure 27 : Localisation de LIMCH1 au sein du cytosquelette d'actine et composition de LIMCH1. 119
Figure 28 : Mécanisme d'action des oligonucléotides antisens. 123
Figure 29 : Expression de LIMCH1 dans les fibroblastes pulmonaires humains de patients atteints de FPI ou patients indemnes de FPI. 124
Figure 30 : Expression de LIMCH1 dans les fibroblastes pulmonaires humains CCD16lu traités ou non par des agents profibrosants, TGFβ1, PDGF, CTGF, WISP1 ou antifibrosant, PGE2. 125
Figure 31 : Mise au point de la transduction des shRNAs. 126
Figure 32 : Inhibition de LIMCH1 par les shRNAs ou les ASOs dans les fibroblastes pulmonaires humains CCD16lu.. 127
Figure 33 : Absence d'effet de l'inhibition de LIMCH1 par les shRNA ou l'oligonucléotide antisens ciblant LIMCH1 (LIMCH1-ASO) sur la viabilité cellulaire des fibroblastes pulmonaires humains CCD16lu 128
Figure 34 : Régulation de l'expression d'ACTA2 par les shRNA ou l'oligonucléotide antisens ciblant LIMCH1 dans les cellules CCD16lu stimulées ou non par le TGFβ1. 129
Figure 35 : Expression de COL1 dans les CCD16lu stimulées ou non par le TGFβ1 et traitées ou non par les shRNA ou l'oligonucléotide antisens ciblant LIMCH1. 130
Figure 36 : Schéma d'administration de l'ASO - Expérience dose réponse. 139
Figure 37 : Schéma d'administration de l'ASO - Expérience cinétique. 139

Figure 38 : Schéma d'administration de l'ASO - Modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine. . 140
Figure 39 : Expression de LIMCH1 dans les cellules épithéliales murines LL/2.. 141
Figure 40 : Expression de LIMCH1 dans les poumons de souris saines C57Bl6, 3 jours après l'instillation trachéale de 5% sucrose et/ou une dose de 2, 10, 50 ou 100 µg d'ASO. 142
Figure 41 : Cinétique de mLimch1-ASO dans les poumons de souris saines C57Bl6 à partir de 3 jours après l'instillation jusqu'au 12ème jour. 143
Figure 42 : Dosage du contenu pulmonaire des souris exposées à la bléomycine, en collagène insoluble. ... 144
Figure 43 : Effet de mLimch1-ASO dans le modèle murin de fibrose pulmonaire. 145
Figure 44 : Répression de LIMCH1 par les nanoASOs in vitro. 146
Figure 45 : Dose réponse des nanoASO chez la souris naïve. Les souris ont été sacrifiées trois jours après l'instillation intratrachéale de nanoASOs. 148
Figure 46 : Les nanoASO ciblant LIMCH1 ne répriment pas l'expression de LIMCH1 après 3, 7, 10, 14 et 21 jours. 148

Liste des abréviations

α-SMA : alpha- Smooth Muscle Actin

A
ADF : Actin Depolymerization Factor
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ACTA2 : Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta
Actine-F : Actine filamenteuse ou polymérisée
Actine-G : Actine globulaire
APC : adenomatous polyposis coli protein
ARN : Acide Ribonucléique
ARP2/3 : Actin Related Protein 2/3
ARPC1-5 : Actin-Related Protein Complex subunit 1-5
ASOs : Antisense oligonucleotides
ATP : Adenosine Tri-Phosphate

C
CAF : cancer associated fibroblasts
CAM : cell adhesion molecule
CAP : cyclase-associated protein
Cdc42 : Cell division cycle 42
Cdk : Cell cycle kinase
CFL1/2 : Cofilin 1/2
CK1 : casein kinase 1
COL1 : collagène type 1
CRIB : Cdc42 and Rac Interactive Binding Domain
CTD : C-terminal domain
CTGF : Connective-Tissue Growth Factor

D
DDL1 : Delta-like 1
Dia : Diaphanous
DID : Dia Inhibitory Domain
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DVL : Disheveled

E
Ena/VASP : enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein family (of actin polymerases)
ERK1/2 : Extracellular signal regulated kinase 1/2
ERM : Ezrin, radixin, moesin
EVH1 : Ena/VASP homology 1

F
FAK : Focal Adhesion Kinase
FAT : Focal Adhesion Targeting

FERM : protein 4.1, ezrin, radixin, moesin homology
FGF : Fibroblast Growth Factor
FH1 : Formin Homology 1
FH2 : Formin Homoly 2
FNX : Fibronexus
FOXF1 : Forkhead Box F1
FPI : Fibrose Pulmonaire Idiopathique

G
GAPDH : Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogenase
GBD : GTPase Binding Domain
GDP : Guanine Di Phosphate
GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor
GFP : Green Fluorescent Protein
GMF : Glial maturation factor
GRP78 : Glucose-Regulated Protein, 78 kDa (aussi connue sous le nom de Heat Shock protein 70 (HSP70)
GSK3β : glycogen synthase kinase 3β
GTP : Guanine Tri Phosphate

H
H2B : Histone 2B
HH : Hedgehog

I
IC50 : concentration inhibitrice médiane
IL-6 : Interleukine-6
INAT : Inhaled Nanocarrier for Aerosol Therapy
IRSp53 : insulin receptor tyrosine kinase substrate p53

J
JAK : Janus kinases

K
KD : Knock down
KO : Knockout

L
LAP : Latency associated peptide
LBA : Lavage broncho-alvéolaire
LEF : Lymphocyte enhancer factor
LINC : Linker of Nucloskeleton and Cytoskeleton
LIMCH1 : LIM Calponin Homologous domain 1
LIMK : Lim11, Isl-1, Mec-3 Kinase
LLC : Large Latent Complex
LNA : Locked Nucleic Acid
LOXL2 : lysyl oxidase like 2
LRP : Lipoprotein-related-receptor protein

LT : Lymphocyte T
LTBP: Latent TGFβ binding protein

M
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
MEC : Matrice Extracellulaire
MET : Microscopie électronique à transmission
MICAL2 : Molecule Interacting with CasL2
MKL1 : Megakaryoblastic leukemia 1
MLC : Myosin Light Chain
MLCK : Myosin Light Chain Kinase
MLCP : Myosin Light Phosphatase
MMP : Matrix Metalloproteinase
MRTF-A : Myocardin-Related Transcription Factor A

N
NMII : Non muscular myosin II
NOD : Non obeses diabetic
NPF : Nucleation Promoting Factor
NSG : NOD SCID Gamma

P
PAK : p21-activated kinase
PCNA : Proferating cell nuclear antigen
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PDZ : PSD-95/discs-large/zonula occludens-1
PGE2 : Prostaglandine E2
PI3K : Phosphatidyl-Inositol 3-kinase
PIC : Pneumopathie interstitielle commune
PID : Pneumopathies interstitielles diffuses
PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P2)
PIP3 : phosphatidylinositol-3,4,5-bisphosphate (PtdIns(3,4,5)P3)
PVDF : polyvinylidene fluoride

R
RBD : Rho Binding Domain
RE : Réticulum endoplasmique
Rho : Rhodopsin
ROCK : Rho-associated protein kinase
ROS : Reactive oxygen species
RT-PCR : Reverse transcription and polymerase chain reaction

S
Scar : Suppressor of cAR
SCID : severe combined immunodeficiency
SH3 : Src Homology 3
SHD : SCAR homology domain
shRNA : short hairpin RNA
siRNA : small interfering RNA

SMIFH2 : Small molecular inhibitor FH2
SRF : Serum Response Factor
STAT : Signal transducers and activators of transcription

T
TAZ : Tafazzin
TCF : T cell factor
TEAD : Transcriptional Enhanced Associate Domain
TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TGFβ : Transforming Growth Factor beta
TGFR1/2 : Transforming Growth Factor Receptor 1/2

U
UBC : Ubiquitine C
UPR : Unfolded Protein Response

V
VCA (verprolin homology, central/cofilin homology, acidic region)
VEGF : Vascular-Endothelial Growth Factor

W
WASP : Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
WAVE : WASP-family verprolin-homologous protein
WCA : WH2, Connecting Region, Acidic domain, aussi appelé « VCA »
WH1 : WASP-homology 1
WH2 : WASP-homolgy 2
WHD : WAVE Homology Domain
WISP-1 : WNT1-inducible signaling pathway protein 1, aussi connu comme « CCN4 »

Y
YAP : Yes-associated protein

Z
ZO-1/2/3 : Zonula Occludens 1/2/3

Partie I : Revue bibliographique et contexte général du travail de recherche

I. Introduction générale

I.1. La fibrose

I.1.1. Définition

La fibrose est un processus pathologique caractérisé par l'accumulation de matrice extracellulaire conduisant à la déformation physique et à la perte de la fonctionnalité d'un organe (Maria et al. 2020). La fibrose correspond à la cicatrisation anormale de lésions aboutissant à un dépôt en excès de matrice extracellulaire (MEC). Le développement de la fibrose (ou fibrogénèse) est médié par de nombreux acteurs moléculaires et cellulaires. La fibrose participe au développement de nombreuses maladies chroniques (Montesi et al. 2019).

I.1.2. Poids en pathologie humaine

Les maladies fibrosantes humaines constituent un problème de santé majeur dans le monde en raison du grand nombre de personnes touchées, du manque de connaissance sur la pathogénèse du processus fibrosant, de l'absence de biomarqueurs spécifiques, et surtout de l'absence d'agents thérapeutiques interrompant la fibrogénèse (Rosenbloom et al. 2017).

I.1.2.1. La fibrose est un mécanisme physiopathologique fréquent au cours des maladies chroniques extrapulmonaires

La fibrogenèse participe à de nombreuses maladies chroniques atteignant le poumon, la peau, le cœur, le foie, les intestins, le pancréas et les reins. Les types cellulaires impliqués et les conséquences de la fibrogenèse sont dépendants du tissu (Steen et al. 2020; Maria et al. 2020).

La **fibrose cardiaque** joue un rôle important dans l'apparition d'une insuffisance cardiaque. La fibrose cardiaque survient lors de l'adaptation du cœur à une agression induite par une ischémie, l'infarctus du myocarde ou encore une hypertension artérielle. Au cours de ces pathologies, l'accumulation de lésions et la perte de cardiomyocytes aboutissent à un dépôt excessif de MEC par les fibroblastes cardiaques différenciés en myofibroblastes (Kyselovič et Leddy 2017), qui constituent la principale source de matrice dans ce contexte. En plus des fibroblastes cardiaques, les monocytes et les macrophages contribuent également au remodelage du tissu (de Boer et al. 2019).

La **fibrose hépatique** est observée au cours de nombreuses maladies chroniques du foie causées par les infections virales (hépatite B et C), l'obésité ou la consommation d'alcool (Y. Huang, Deng, et Liang 2017; Altamirano-Barrera, Barranco-Fragoso, et Méndez-Sánchez 2017). A l'extrême, la fibrose hépatique aboutit à la cirrhose et à l'insuffisance hépatique terminale. Dans le foie, les cellules stellaires hépatiques semblent jouer un rôle central dans la fibrogénèse (Hou et Syn 2018; Shan et al. 2019). Les cellules stellaires hépatiques sont des cellules mésenchymateuses localisées dans l'espace péri-capillaire (Y. Huang, Deng, et Liang 2017).

Dans le **tube digestif**, la fibrose se développe dans le contexte des entéropathies inflammatoires chroniques telles que la maladie de Crohn (Bettenworth et Rieder 2017). La fibrogénèse intestinale semble être initiée par la perte de cellules épithéliales conduisant dans un premier temps à des ulcères (Hünerwadel et al. 2018). Les cellules jouant un rôle important sont les fibroblastes intestinaux mais également les macrophages qui produisent des médiateurs profibrosants (Bos et Laukens 2020).

La **fibrose rénale** est une caractéristique quasi-constante des pathologies chroniques rénales évoluées. Elle implique un dépôt excessif de MEC au niveau des glomérules et de l'interstitium rénal (Y. B. Y. Sun et al. 2016; Leaf et Duffield 2017). L'inflammation, le stress oxydatif, la production de cytokines profibrosantes ainsi que l'activation des fibroblastes rénaux contribuent à la progression de la fibrose rénale (Jing et al. 2020).

Dans le **pancréas**, la fibrose résulte, le plus souvent, d'une pancréatite chronique alcoolique et peut conduire à une insuffisance pancréatique exocrine et à l'apparition d'un diabète. Les cellules stellaires sont les principales cellules fibroblastiques du pancréas. Suite à l'accumulation de lésions, les cellules stellaires vont acquérir une morphologie de type myofibroblastique. Ces cellules ont la capacité de proliférer et de synthétiser des protéines de la MEC (L. Sun et al. 2020; 2018).

I.1.2.2. Fibrose pulmonaire

I.1.2.2.1. Cadre nosologique

La fibrose pulmonaire représente un problème non résolu en médecine respiratoire. La fibrose pulmonaire est une caractéristique centrale des pneumopathies interstitielles diffuses fibrosantes (PID), un ensemble de pathologies pulmonaires chroniques rares. Au cours des PID, la fibrose pulmonaire entraîne des altérations majeures de la fonction pulmonaire dont une réduction de la compliance et des échanges gazeux pulmonaires (Plantier et al. 2018). Sur le plan clinique, les principaux symptômes sont un essoufflement anormal, ou dyspnée, et la toux (Schafer et al. 2017). Ces pathologies évoluent couramment vers une insuffisance respiratoire terminale.

Les PID les plus couramment à l'origine du développement de lésions extensives de fibrose pulmonaire sont les PID associées aux connectivites auto-immunes telles que la sclérodermie, la pneumopathie chronique d'hypersensibilité, et les PID idiopathiques telles que la pneumopathie interstitielle non spécifique idiopathique et la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI).

La sclérodermie est une maladie auto-immune caractérisée par une fibrose de la peau et des viscères tels que le cœur et les poumons (Almaaitah, Highland, et Tonelli 2020; van Caam et al. 2020). Les patients atteints de sclérodermie peuvent bénéficier de traitements anti-inflammatoires ou immunodépresseurs (Churg, Bilawich, et Wright 2018). La pneumonie d'hypersensibilité chronique (PHS) est causée par l'inhalation chronique d'antigènes auxquels l'individu est sensibilisé (P. Spagnolo et al. 2015). Le bénéfice des traitements anti-inflammatoires ou immunodépresseurs dans la PHS chroniques n'est pas démontré.

La FPI est un archétype des PID et en est le modèle d'étude principal. La FPI est une maladie chronique rare de mauvais pronostic. Sa prévalence augmente avec l'âge (Waisberg et al. 2010). Il s'agit de la plus sévère des PID idiopathiques (Upagupta et al. 2018). A ce jour, la survie médiane des patients est de 4 à 5 ans après le diagnostic (Ballester, Milara, et Cortijo 2019; Barratt et al. 2018). La FPI se présente histologiquement par le motif de « pneumonie interstitielle commune » (PIC) **(Figure 1)**, qui se caractérise par une alternance de zones pulmonaires d'aspect normal, de foyers fibroblastiques, de fibrose extensive et de dilatations kystiques dites en « rayon de miel » (Waisberg et al. 2010; Schafer et al. 2017). Des lésions des vaisseaux pulmonaires sont fréquemment observées.

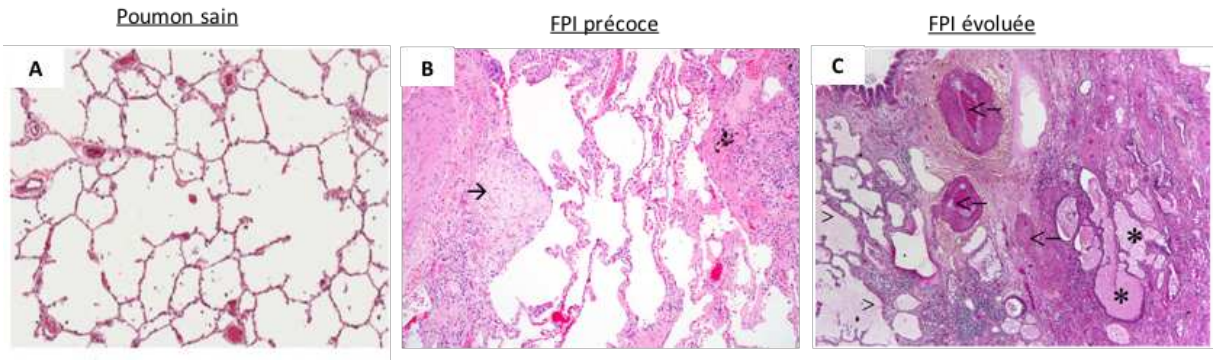


Figure 1- Histologie du poumon sain et du poumon atteint de FPI. **(A) Poumon sain. (B) Poumon de patient FPI précoce comportant des foyers fibroblastiques (→). (C) Poumon de patient FPI évoluée, caractérisé par une fibrose dense, des modifications alvéolaires en rayon de miel (*) ainsi que des lésions vasculaires (<-).**

I.1.2.2.2. Traitement antifibrosants

Il existe actuellement deux molécules antifibrosantes utilisées pour le traitement de la FPI et d'autres PID, le nintedanib et la pirfenidone.

I.1.2.2.2.1. Nintedanib

Le nintedanib est une petite molécule inhibitrice des récepteurs à tyrosine kinase, qui bloque les sites de liaison à l'ATP des récepteurs au VEGF, FGF et PDGF (Wollin et al. 2015). Dans les fibroblastes pulmonaires de patients atteints de FPI, le nintedanib inhibe la prolifération dépendante de ces trois facteurs de croissance, ainsi que la sécrétion de collagène induite par le TGFβ1, (X. Lin et al. 2018; Wollin et al. 2014; Hostettler et al. 2014). En 2021, le Nintedanib possède l'autorisation de mise sur le marché pour le traitement de la FPI et des PID progressives.

I.1.2.2.2.2. Pirfenidone

La pirfenidone est une petite molécule initialement développée comme immunosuppresseur (H. Huang et al. 2019). Les mécanismes d'action de la pirfenidone ne sont pas complètement connus. La pirfenidone exerce des effets anti-fibrosants et anti-inflammatoires en inhibant l'expression de cytokines inflammatoires induites par le TGFβ et la production de cytokines profibrosantes dans les modèles animaux de fibrose pulmonaire (Maher 2010; S. N. Iyer,

Gurujeyalakshmi, et Giri 1999; Y. Liu et al. 2017). La pirfenidone induit la dégradation de la β-caténine à travers l'inhibition de la Glycogen Synthase Kinase 3-beta (GSK3β), et régule la voie canonique du TGFβ1 en bloquant l'activation de SMAD2/3 dans les fibroblastes pulmonaires fœtaux humains (Lv et al. 2020). La prifenidone a également des propriétés anti-oxydantes (Ruwanpura, Thomas, et Bardin 2020) et possède l'autorisation de mise sur le marché pour le traitement de la FPI.

Le nintedanib et la pirfenidone apportent aux patients un gain de survie d'environ 2 ans, mais ne font que ralentir la progression de la fibrose, qui reste inexorable. Il existe un besoin pour de nouveaux traitements permettant de ralentir davantage, stopper la progression, voire de corriger la fibrose pulmonaire. Le développement de nouveaux traitements anti-fibrosants nécessite de progresser dans la compréhension de la fibrogénèse. Les connaissances actuelles sur la fibrogénèse pulmonaire ont été acquises pour l'essentiel dans le contexte de la FPI.

I.1.3. Principaux mécanismes de la FPI

I.1.3.1. Les étapes de la fibrogenèse pulmonaire

La fibrogénèse pulmonaire est décrite au cours de la FPI comme la succession de 3 phases **(Wolters et al. 2018)** (**Figure 2**).

La **phase de prédisposition** est caractérisée par la répétition et/ou l'accumulation d'agressions de l'épithélium alvéolaire, favorisées par l'âge, l'exposition à des toxiques tels que le tabac, les infections, le reflux gastro-œsophagien, une prédisposition génétique, et la répétition de cycles d'hypoxie-ré oxygénation, comme observée au cours du syndrome d'apnées du sommeil. Ces agressions aboutissent à un stress du réticulum endoplasmique (RE) et au renouvellement accéléré des cellules épithéliales alvéolaires, à leur apoptose ou à leur sénescence.

Au cours de la **phase d'activation**, les cellules épithéliales alvéolaires acquièrent un phénotype anormal incluant des traits mésenchymateux, ou sont remplacées par des cellules anormales basaloïdes dont le phénotype est proche des cellules basales de l'épithélium bronchique. Les cellules épithéliales sécrètent des facteurs solubles, dont le TGFβ1, ciblant les cellules mésenchymateuses. Parmi les cellules mésenchymateuses pulmonaires, les fibroblastes alvéolaires semblent particulièrement impliqués dans la fibrogénèse (Habiel et Hogaboam 2017). Les macrophages alvéolaires, les monocytes, les péricytes et les cellules mésothéliales

contribuent aussi à la modification du mésenchyme pulmonaire par la sécrétion de cytokines (Paolo Spagnolo et al. 2021). Les cellules mésenchymateuses acquièrent un phénotype profibrosant incluant l'expression de marqueurs myofibroblastiques tels que l'alpha-actine du muscle lisse (ACTA2) et produisent en excès des composants de la MEC tels que le collagène-1 (COL1). De plus, la sécrétion par les cellules mésenchymateuses de facteurs solubles favorisant la survie et la différenciation de l'épithélium est diminuée, ce qui amplifie les lésions épithéliales. Plusieurs types cellulaires mésenchymateux sont impliqués dans la fibrogénèse pulmonaire. Outre les fibroblastes alvéolaires, les cellules musculaires lisses, les péricytes et des sous-types de fibroblastes ayant une localisation, des profils d'expression génique et un potentiel fibrogénique distincts semblent impliqués (Tsukui et al. 2020; Xie et al. 2018).

Au cours de la **phase de progression**, les lésions de fibrose sont constituées. Les altérations de la MEC pulmonaire sont elles-mêmes le stimulus de la production de matrice par les cellules mésenchymateuses, dans une boucle d'auto-amplification indépendante des lésions épithéliales. Au cours de cette phase, les voies de mécanotransduction (voir plus loin) semblent jouer un rôle important dans le maintien du phénotype profibrosant des cellules mésenchymateuses. Par ailleurs, des modifications de nature épigénétique participent à activer de façon pérenne les voies de signalisation profibrosantes et à maintenir le phénotype profibrosant des cellules mésenchymateuses pulmonaires (Hanmandlu et al. 2021).

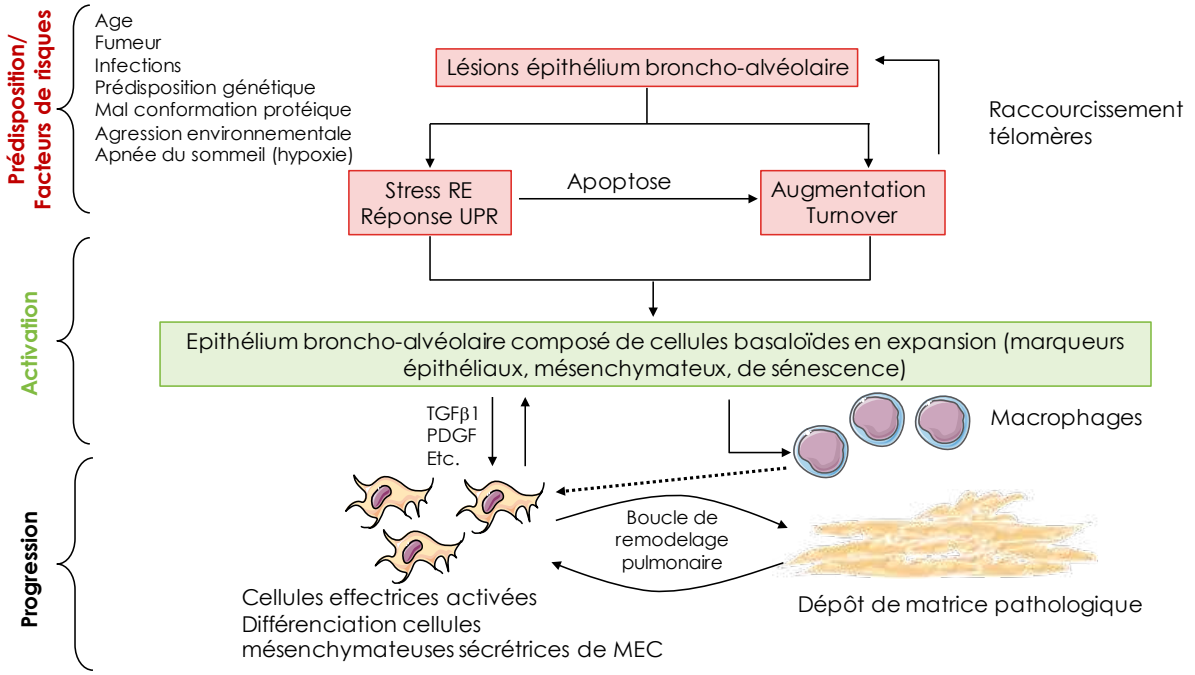


Figure 2- Mécanismes généraux de la fibrose pulmonaire idiopathique. **Au stade de la prédisposition, les agressions environnementales récurrentes conduisent chez les individus génétiquement prédisposés, à une augmentation du renouvellement des cellules alvéolaires de type II mais aussi à l'activation de la réponse UPR (Unfolded Protein Response) par le stress du Réticulum Endoplasmique (RE), à l'apoptose ainsi qu'au raccourcissement progressif des télomères. Dans la phase d'activation, l'accumulation d'agression à long terme entraine des altérations pathologiques de l'épithélium pulmonaire et la libération de médiateurs profibrosants. Ces médiateurs activent la différenciation des cellules mésenchymateuses sécrétant de la matrice extracellulaire pathologique. Dans la phase de progression, la matrice pathologique favorise une différenciation supplémentaire des cellules qui déposent davantage de matrice (boucle de remodelage pulmonaire). Adapté de (Wolters et al. 2018).**

Le collagène de type 1 (COL1)

Le **collagène** de type I (COL1) est la forme de collagène fibrillaire la plus retrouvée dans le poumon. COL1 est une protéine structurale composée de trois chaines de pro-collagène comprenant des répétitions d'acides aminés Glycine-X-Y où X est généralement la proline et Y, la 4-hydroxyproline (Ricard-Blum 2011), organisée en triple hélice. Les chaines alpha de procollagène s'alignent à partir de leur extrémité C-terminale où elles vont s'enrouler de manière hélicoïdale (Sorushanova et al. 2019; Gelse, Pöschl, et Aigner 2003). La triple hélice est par la suite sécrétée du RE vers le cytoplasme, induisant alors le clivage des extrémités N- et C-terminales non enroulées par les protéinases respectives, procollagène N-protéinase et C-protéinase. La structure est stabilisée par l'enzyme lysyl oxydase-like 2 (LOXL2) qui permet la réticulation covalente du collagène dans la MEC (Kagan et Li 2003; Shao et al. 2018). Au niveau de sa triple hélice, COL1 est capable de se lier à la sous-unité alpha des intégrines (intégrines $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha11\beta1$) qui interagit avec la séquence de 6 acides aminées GFOGER (Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg) (Knight et al. 2000; Barczyk, Carracedo, et Gullberg 2010)

I.1.3.2. Principales voies de signalisation impliquées dans la différenciation des cellules mésenchymateuses au cours de la fibrogenèse pulmonaire

Au cours de la fibrogénèse pulmonaire, les voies de signalisation conduisant l'activation et la différenciation des cellules mésenchymateuses pulmonaires jouent un rôle de premier plan. En effet, ces cellules sont les principales cellules effectrices de la fibrogénèse dans la mesure où

elles sont la principale source des protéines de matrice extracellulaire, dont l'accumulation définit la fibrose. De façon schématique, on peut décrire les voies liées à des facteurs de croissances solubles, et les voies liées à la signalisation mécanique (mécanotransdution) activées par la rigidité de la MEC.

I.1.3.2.1. Facteurs de croissance

Parmi les facteurs de croissance participant à la fibrogénèse pulmonaire, le TGFβ1 joue un rôle de premier plan.

Le **Facteur de croissance transformant beta (Transforming Growth Factor β, TGFβ)** joue un rôle central dans de nombreux processus essentiels à la cellule. L'activation de son récepteur suffit à induire une différenciation profibrosante des cellules mésenchymateuses. La surexpression dans le poumon de la forme active du TGFβ suffit à induire une fibrose pulmonaire chez le rongeur (Habiel et Hogaboam 2017).

Trois isoformes du TGFβ ont été identifiés chez les mammifères : le TGFβ1, 2 et 3. Ces trois isoformes partagent entre 70 et 82% d'homologie au niveau de leurs acides aminés (X.-M. Meng, Nikolic-Paterson, et Lan 2016). Le TGFβ est sécrété sous la forme d'un complexe latent qui se lie à la matrice extracellulaire. L'activation du TGFβ nécessite qu'une force de traction, générée par la contraction du cytosquelette d'actine de la cellule cible, soit exercée sur le complexe latent. Une fois lié à son récepteur, le TGFβ est capable d'induire des voies de signalisation dites canonique et non canonique. La voie canonique du TGFβ est induite lorsque les protéines SMAD2 et SMAD3 sont phosphorylées. Ces deux protéines vont ensuite se complexer à SMAD4 et sont alors transloquées dans le noyau, afin d'induire la transcription de gènes codant des protéines profibrosantes tels que les collagènes, la fibronectine, l'α-actine du muscle lisse et les inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases (X.-M. Meng, Nikolic-Paterson, et Lan 2016). Le TGFβ peut également activer des voies non canoniques comme la voie des MAP kinases dont la kinase de réponse extracellulaire 1/2 (ERK1/2) mais aussi les voies Rho-like GTPases et PI3K/AKT. Ces voies non canoniques sont impliquées dans le désassemblage des jonctions adhérentes et la motilité cellulaire (Zavadil et al. 2001), la réorganisation du cytosquelette d'actine, notamment par la formation de fibres de stress (Bishop et Hall 2000), et la survie et prolifération cellulaire (Y. E. Zhang 2017; 2009). Les voies non canoniques agissent comme des co-facteurs de la voie canonique.

En dehors du TGFβ1, d'autres facteurs de croissance participent à la fibrogénèse, bien que leur rôle soit moins bien démontré et/ou équivoque.

Le **Facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF)** ou CCN2, fait partie de la famille des protéines du réseau de communication cellulaire (CCN). Ces protéines sont des protéines de liaison à l'héparine associées à la MEC. Le CTGF est une protéine sécrétée de 36-38 kDa, riche en cystéine. L'expression du CTGF est induite dans les fibroblastes stimulés par le TGFβ1 (Noguchi et al. 2017). Dans le modèle murin de fibrose de la peau, la répression du CTGF diminue l'expression du collagène de type I et III induite par le TGFβ1 (Kang et al. 2020), montrant un rôle du CTGF comme médiateur de l'activité du TGFβ1 lors de la fibrogenèse.

Les **Facteurs de croissance des fibroblastes (FGF)** sont une famille de protéines composée de 22 ligands activant 4 récepteurs. Les FGFs se lient aux récepteurs des FGF (FGFR) pour réguler la prolifération, la différenciation, la migration et la survie cellulaire (Boilly et al. 2000). Les membres de la famille du FGF exercent différents effets pro- et anti-fibrosants en fonction de la cellule réceptrice et du contexte moléculaire. Notamment, le FGF-2 induit la synthèse de collagène dans les fibroblastes pulmonaires (Y. Chen et al. 2003).

La famille du **Facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF)** est connue pour son rôle important dans la perméabilité vasculaire et l'angiogenèse (Melincovici et al. 2018). Il existe plusieurs glycoprotéines sécrétées structurellement homologues, le VEGF-A, B, C et D. Le VEGF est exprimé dans de nombreux types cellulaires dont les cellules épithéliales alvéolaires, les macrophages et les fibroblastes (A. K. V. Iyer et al. 2015). Le VEGF se lie aux récepteurs VEGFR1 et 2 entrainant l'activation des voies de signalisation impliquées dans la prolifération, la migration, la survie cellulaire et l'angiogenèse (Koch et al. 2011; Koch et Claesson-Welsh 2012; Melincovici et al. 2018). Le rôle du VEGF dans la fibrogénèse a été mis en évidence dans le modèle de fibrose induite par la bléomycine. Le knockout (KO) du récepteur à tyrosine kinase VEGFR1, réduit la fibrogenèse à travers la diminution de l'expression de COL1 et du TGFβ1 chez les souris exposées à la bléomycine (Amano et al. 2019).

Le **Facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF)** est une protéine dimérique capable d'interagir avec les récepteurs au PDGF alpha et beta (PDGFRα et β). Il existe cinq isoformes, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC et PDGF-DD (Lindblom et al. 2003; X. Li et al. 2000; Bergsten et al. 2001). Dans le poumon, le PDGF est produit principalement dans les

cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires (Antoniades et al. 1990). L'inhibition pharmacologique des récepteurs au PDGF réduit la fibrose pulmonaire induite par radiation chez la souris, suggérant un rôle du PDGF dans la fibrogenèse pulmonaire (Abdollahi et al. 2005).

La **voie WNT** est impliquée dans le développement pulmonaire (Lako et al. 1998; Weidenfeld et al. 2002) et joue un rôle dans la pathogenèse de maladies fibrosantes chez l'Homme (Morali et al. 2001). Les ligands WNT se lient à leur récepteur Frizzled et forment un complexe avec le co-récepteur Lipoprotein-related-receptor protein (LRP). Cela induit l'inhibition du complexe de destruction composé d'Axin, Disheveled (DVL), de l'Adenomatous polyposis coli (APC), de la glycogène synthase kinase 3 (GSK3) et de la caséine kinase 1 (CK1). Ce complexe de destruction ne peut alors plus induire l'ubiquitination de la β-caténine, qui s'accumule dans le cytoplasme (Piersma, Bank, et Boersema 2015) et est transloquée au noyau pour interagir avec les facteurs d'amplification des lymphocytes (LEF)/ des cellules T (TCF). L'interaction de la β-caténine avec les facteurs LEF/TCF induit la transcription des gènes codant des protéines telles que la fibronectine, des métalloprotéinases, la serpine-1, et des facteurs de transcription induisant l'acquisition de traits mésenchymateux par les cellules épithéliales comme Twist et Snail (Guo et al. 2012). La répression de la voie WNT/β-caténine à travers l'inhibition de l'interaction β-caténine /CREB Binding Protein (CBP) permet d'atténuer la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (W. R. Henderson et al. 2010).

La **voie Hedgehog** (HH) joue un rôle clé dans le développement pulmonaire et est impliquée dans le processus de fibrogenèse. L'augmentation de l'expression de plusieurs facteurs de la voie HH a été rapporté dans les cellules épithéliales alvéolaires de type II de patients atteints de FPI (Bolaños et al. 2012). L'activation de la voie HH est nécessaire à la différenciation myofibroblastique induite par le TGFβ1 dans les fibroblastes de patients normaux et atteints de FPI (Cigna et al. 2012).

I.1.3.2.2. Voies de mécanotransduction

La mécanotransduction permet aux cellules de percevoir des forces externes, des contraintes physiques et de s'y adapter (Vogel et Sheetz 2006). Dans le contexte de la fibrogénèse pulmonaire, les voies de mécanotransduction sont activées par la rigidité excessive de la matrice extracellulaire, par l'intermédiaire du cytosquelette d'actine (détaillé plus bas), et participent à maintenir le phénotype profibrosant des cellules mésenchymateuses. Les voies de

mécanotransduction aboutissent à l'activation des facteurs de transcription YAP/TAZ et MRTF/SRF.

Yes-associated protein (YAP) et **Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ)** sont des facteurs de transcription décrits initialement dans le cadre de la voie Hippo qui contrôle l'inhibition de contact cellulaire au cours du développement (Santucci et al. 2015). La phosphorylation de YAP/TAZ entraine leur translocation nucléaire, contribuant à l'expression de nombreux transcrits tel que le CTGF (B. Zhao et al. 2008). Au cours de la fibrogénèse, ces facteurs jouent un rôle central dans la synthèse de matrice induite par des contraintes mécaniques (F. Liu et al. 2015), indépendamment de la voie Hippo.

Myocardin related transcription factor (MRTF) est un facteur de transcription essentiellement localisé dans le noyau des cellules, qui peut être séquestré dans le cytoplasme par les monomères d'actine G (Miralles et al. 2003a). Il existe deux isoformes, MRTF-A aussi connu sous le nom de Megakaryoblastic leukemia 1 (MKL1), et MRTF-B aussi connu sous le nom de MKL2 (Pipes, Creemers, et Olson 2006). Serum response factor (SRF) est un facteur de transcription exclusivement localisé dans le noyau où il forme un complexe avec MRTF, afin d'induire la transcription de gènes impliqués dans le phénotype des myofibroblastes tel que ACTA2, un composant des fibres de stress (Velasquez et al. 2013). L'inhibition de MRTF-A réduit la fibrose pulmonaire chez la souris exposée à la bléomycine et bloque la différenciation myofibroblastique induite par le TGFβ1. L'inhibition de MRTF-A augmente l'apoptose des cellules mésenchymateuses en présence de TGFβ1 (Sisson et al. 2015).

I.2. Hypothèse générale de la thèse : participation à la fibrogenèse pulmonaire de régulateurs du cytosquelette d'actine

Comme nous avons pu le voir précédemment, la fibrogénèse pulmonaire implique l'acquisition par les cellules mésenchymateuses d'un phénotype profibrosant incluant l'expression d'ACTA2 et de composants de la matrice extracellulaire comme COL1. L'identification d'agents capables de bloquer la différenciation profibrosante de ces cellules représente un objectif important de l'effort de recherche sur la FPI.

L'acquisition d'un phénotype profibrosant découle en partie de perturbations des interactions des cellules mésenchymateuses pulmonaires avec leur environnement via 1) des voies de signalisation activées par des facteurs de croissance sécrétés par d'autres types cellulaires et 2)

des voies de signalisation associées à la mécanotransduction, activées par la rigidité anormale de la matrice du tissu fibrosé.

Au niveau cellulaire, l'organisation du cytosquelette d'actine est à la fois un marqueur important de la différenciation myofibroblastique pro-fibrosante des cellules mésenchymateuses (expression d'ACTA2 et formation de fibres de stress) et un déterminant de celle-ci, du fait notamment de son rôle central dans la mécanotransduction et l'activation de la voie du TGFβ. L'organisation du cytosquelette d'actine est sous la dépendance de nombreuses protéines associées.

L'hypothèse générale de ce travail de thèse est que les protéines associées au cytosquelette d'actine jouent un rôle dans le processus de fibrogénèse pulmonaire, et que des agents ciblant ces protéines possèdent un potentiel effet thérapeutique anti-fibrosant.

II. Le cytosquelette d'actine

II.1. Organisation générale du cytosquelette

Le cytosquelette est à l'origine de l'organisation spatiale et des propriétés mécaniques de la cellule (Pegoraro, Janmey, et Weitz 2017; Farhadi et al. 2020). Le cytosquelette est composé de trois types de filaments : les microtubules, les filaments d'actine et les filaments intermédiaires. Ils sont tous les trois indispensables à la survie de la cellule (X. Zhang et al. 2020). Les principales caractéristiques des microtubules, des filaments d'actine et des filaments intermédiaires sont résumées dans le **Tableau 1**. Pour chacun de ces polymères, interviennent des familles de protéines motrices : dynéine, kinésine pour les microtubules et myosine pour les filaments d'actine (Pollard et Goldman 2018).

Les microtubules ont pour fonction principale le transport intracellulaire de molécules et sont indispensables à la division cellulaire. Pour exercer leur fonction au sein de la cellule, les microtubules sont associés à des protéines motrices telles que les dynéines et les kinésines (Farhadi et al. 2020; Brenner et al. 2020).

Le cytosquelette d'actine assure de multiples fonctions. L'association des filaments d'actine aux molécules de myosine permet la contraction cellulaire, le transport de molécules, de vésicules ou d'organites mais également la mise en place d'extensions cytoplasmiques telles que les lamellipodes, filopodes et les pseudopodes notamment impliqués dans l'adhérence et l'invasion (Pocaterra et al. 2019; Klemens Rottner et al. 2017; Anderson, Vaughan, et Cramer

2008). L'association des filaments d'actine à des filaments de myosine réalise des filaments d'actomyosine contractiles.

Les filaments intermédiaires permettent la liaison des membranes nucléaire et cellulaire, aux microtubules et filaments d'actine (Goldmann 2018), à travers leur association avec la spectrine, les cadhérines et les intégrines.

Tableau 1 : Composition du cytosquelette au sein de la cellule.

	Microtubules	**Filaments intermédiaires**	**Filaments d'actine**
Composition	Dimères de tubulines α et β (protéines globulaires de 55 kDa)	Monomères de vimentine (Jiu et al. 2017), kératine (Lee et al. 2020) ou lamine (Goldmann 2018) suivant le type cellulaire	Monomère d'actine globulaire (G, 42 kDa)
Forme	Structure cylindrique creuse de diamètre 25nm	Structure tétramérique antiparallèle de diamètre entre 8 et 12 nm (Herrmann et Aebi 2016)	Structure hélicoïdale de diamètre 8 nm (S. Kumar et Mansson 2017; Dominguez et Holmes 2011).
Fonction	Transport intracellulaire et division cellulaire (mitose avec séparation des chromosomes, centrioles)	Intégrité structurelle, jonctions d'ancrage, interaction cellule-lame basale	Intégrité structurelle de la cellule, adhérence, migration, contraction cellulaire, cytodiérèse, transport intracellulaire

II.2. Organisation du cytosquelette d'actine

II.2.1. Organisation du cytosquelette d'actine à l'échelle cellulaire

L'actine est trouvée de façon ubiquitaire au sein de la cellule. Au niveau cytoplasmique, l'actine participe à l'interaction des cellules avec leur environnement, et à la génération du mouvement à l'échelle de la molécule (transport moléculaire) et de la cellule (migration). Au niveau nucléaire, le cytosquelette d'actine participe à la régulation de l'activité transcriptionnelle et à la progression du cycle cellulaire. Le cytosquelette d'actine réalise des structures stables (actine corticale), ou transitoires (fibres de stress, anneau contractile).

L'**actine corticale** est un fin réseau de fibres d'actine situé sous la membrane plasmique. L'actine corticale donne sa forme à la cellule et lui permet de résister aux contraintes mécaniques.

Les **fibres de stress** (ou fibres de tension) sont des structures transitoires impliquées dans l'adhérence et la contraction cellulaires. Les fibres de stress permettent les interactions cellule-matrice à travers leur ancrage au niveau des adhérences focales, qui lient la membrane plasmique et la MEC (Tojkander, Gateva, et Lappalainen 2012). Les fibres de stress ont été particulièrement décrites dans le contexte de la migration cellulaire. Dans ce contexte, elles sont classées en trois catégories en fonction de leur composition et de leur mécanisme d'assemblage (**Figure 3**). Les **fibres de stress dorsales** sont constituées de faisceaux d'actine non contractiles, connectées à une adhérence focale à une de leurs extrémités. Les fibres de stress dorsales sont impliquées dans la transmission des forces mécaniques. Les **arcs transversaux** sont des faisceaux d'actomyosine contractiles, générés à partir du réseau de filaments d'actine et de molécules de myosine non musculaire II (NMII). Les fibres de stress dorsales et les arcs transversaux sont les précurseurs des **fibres de stress ventrales,** composées de faisceaux d'actomyosine mécano-sensibles et contractiles, liés à des adhérences focales à leurs deux extrémités (Jiu et al. 2017).

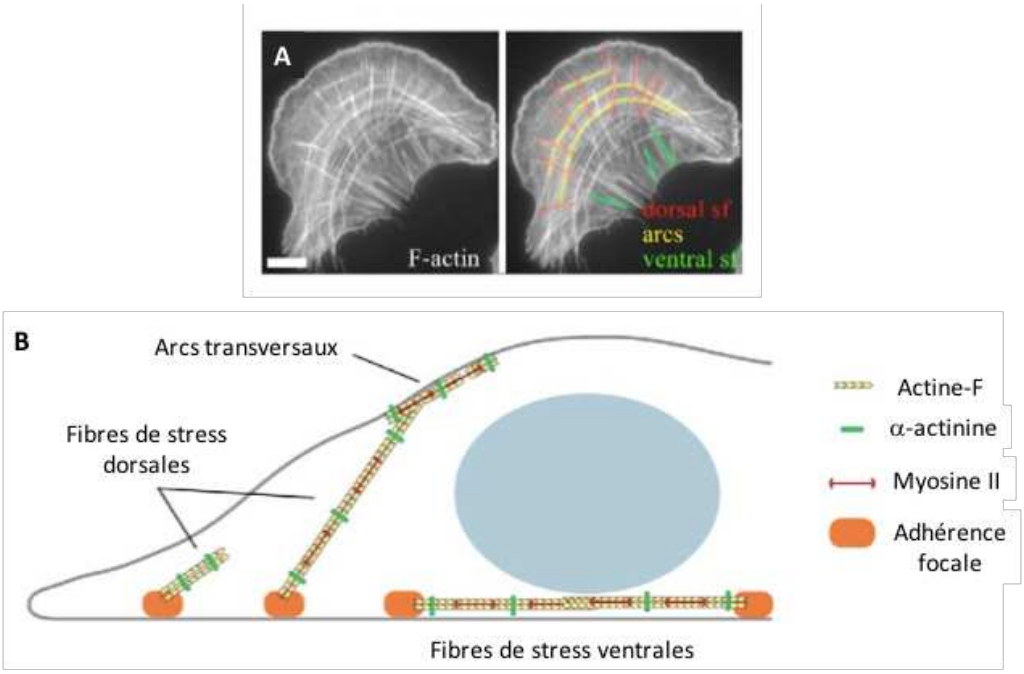


Figure 3 : Différents types de fibres de stress. **A) Coloration de l'actine-F et représentation des trois catégories de fibres de stress (dorsale, en rouge ; arcs, en jaune ; ventrale, en vert) dans les cellules d'ostéosarcome U2OS. B) Modèle schématique des différentes fibres**

de stress. Les fibres de stress dorsales naissent à partir des adhérences focales à la périphérie de la cellule afin de rejoindre les arcs transversaux situés à la surface de la cellule. Deux fibres de stress dorsales peuvent s'étirer vers le bas de la cellule pour former les fibres de stress ventrales (Adapté de (Pellegrin et Mellor 2007)).

Les **anneaux contractiles** sont des structures transitoires mises en place notamment lors de la cytodiérèse (Addi, Bai, et Echard 2018). L'anneau contractile est constitué de filaments d'actomyosine similaires aux fibres de stress des arcs transversaux (Svitkina 2018b).

II.2.2. Organisation du cytosquelette d'actine à l'échelle moléculaire

La structure élémentaire du cytosquelette d'actine est le filament d'actine fibrillaire (actine-F) qui sont des polymères d'actine globulaire (G). L'actine-G est une protéine de 42 kDa. Le monomère d'actine-G est constitué de deux domaines similaires reliés par une région charnière. Chaque domaine appelé petit et grand domaine, est divisé en deux sous-domaines. Les sous-domaines 1 et 2 forment le petit domaine, et les sous-domaines 3 et 4 forment le grand domaine (S. Kumar et Mansson 2017). Deux sillons sont présents entre les domaines. Le premier sillon est situé entre les sous-domaines 2 et 4 et permet la liaison à un nucléotide comme l'Adenosine tri-phosphate (ATP) ou l'Adenosine di-phosphate (ADP) ainsi qu'un cation divalent. L'autre sillon, situé entre les domaines 1 et 3, permet l'interaction avec d'autres monomères ou des protéines de liaison à l'actine (ABP, Actin Binding Protein) (Dominguez et Holmes 2011) **(Figure 4A).**

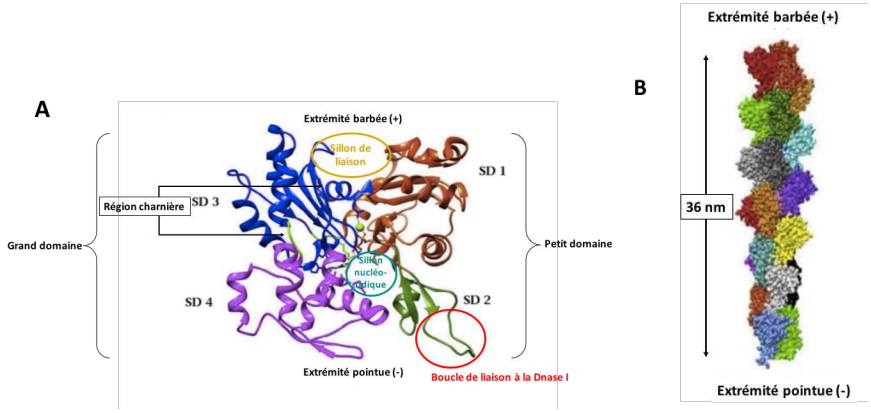


Figure 4: Structure du monomère et du filament d'actine. **A) Structure cristallographique du monomère d'actine globulaire (actine G) composé de sous-domaines de 1 à 4 (SD 1-4) séparés par des régions charnières et deux sillons. Le sillon entre les SD 1 et 3 permet la liaison d'autres monomères d'actine G ou de protéines ABPs (marqué en jaune) tandis**

que le sillon séparant les SD 2 et 4 permet la liaison de l'ATP ou ADP et des cations bivalents (marqué en cyan). B) Structure du filament d'actine F composé de plusieurs monomères d'actine G (Adapté de (S. Kumar et Mansson 2017; Dominguez et Holmes 2011)).

Les filaments d'actine-F sont des polymères d'actine-G. Chaque filament est constitué de deux chaines d'environ 13 molécules sur une distance axiale de 36nm, se répétant tous les six tours. Ces deux chaines tournent progressivement l'une autour de l'autre de manière à former une longue double hélice (Dominguez et Holmes 2011) **(Figure 4B)**. L'orientation des monomères d'actine-G est toujours la même au sein d'un filament d'actine, qui possède ainsi une polarité structurale. Un filament d'actine possède une extrémité « pointue » chargée négativement, et une extrémité « barbée » chargée positivement, constituée des domaines 1 et 3.

Les fonctions du cytosquelette d'actine nécessitent son remodelage permanent, par la formation de nouveaux filaments et la dégradation d'autres filaments. Le cytosquelette d'actine est une structure dynamique.

II.3. Dynamique du cytosquelette d'actine et ses mécanismes moléculaires

La formation et la dégradation du cytosquelette d'actine sont régulées par des protéines de liaisons à l'actine (actin binding proteins – ABP). Ces protéines comprennent des facteurs favorisant ou inhibant la polymérisation de nouveaux filaments, et des facteurs de dépolymérisation (**Tableau 2**) (Wioland et al. 2020; Narita 2020).

II.3.1. Polymérisation de l'actine

Lors de l'élongation du filament, l'addition de monomères d'actine-G s'effectue au niveau de son extrémité barbée (S. Kumar et Mansson 2017). La polymérisation de l'actine est facilitée par l'interaction de la profiline aux monomères d'actine-G/ATP. La profiline accélère l'échange ADP/ATP sur les monomères d'actine-G permettant aux monomères d'être polymérisés au niveau des extrémités barbées du filament d'actine (**Figure 5**).

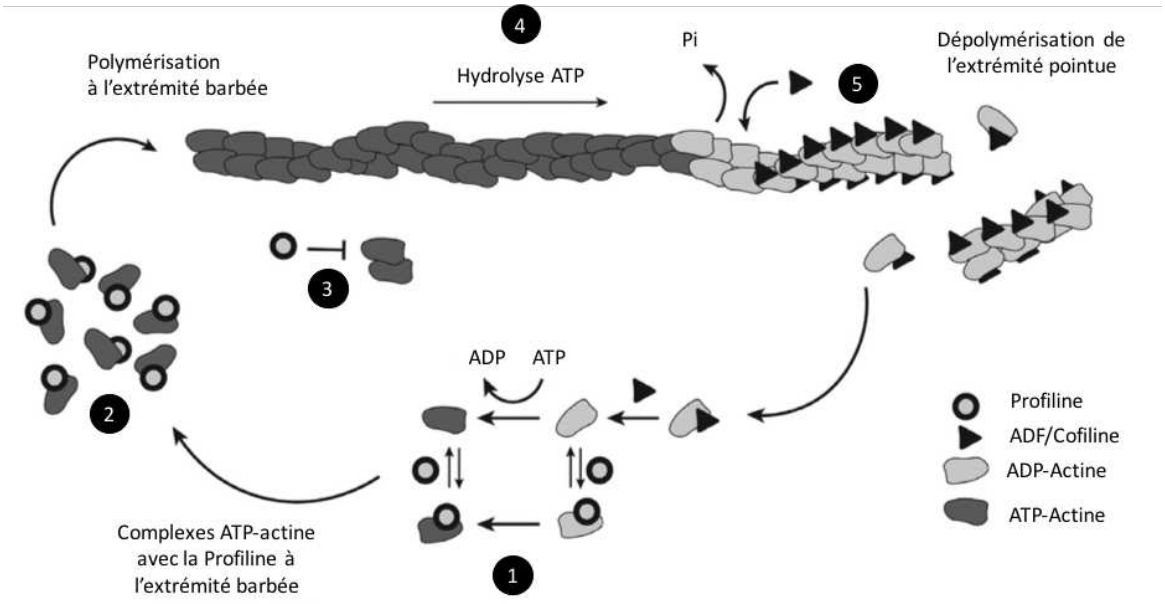


Figure 5 : Régulation de la polymérisation/dépolymérisation de l'actine. **(1) La profiline (protéine de liaison à l'actine, ABP) accélère l'échange ADP/ ATP sur les monomères d'actine G, (2) produisant un pool de sous-unités d'actine liées à l'ATP et polymérisables, qui s'ajoute facilement aux extrémités barbées (3). L'hydrolyse de l'ATP en ADP (4), permet aux protéines de dépolymérisation ADF/cofiline de se lier aux monomères d'actine G-ADP (5) (Adapté de (Pinto-Costa et Sousa 2020)).**

La formation de nouveaux filaments d'actine débute par une étape de nucléation. Quand la nucléation se réalise directement à partir de monomère d'actine-G, la polymérisation est dite « linéaire ». Quand la nucléation se réalise sur un filament mère préexistant, la polymérisation est dite « branchée » (**Figure 6**).

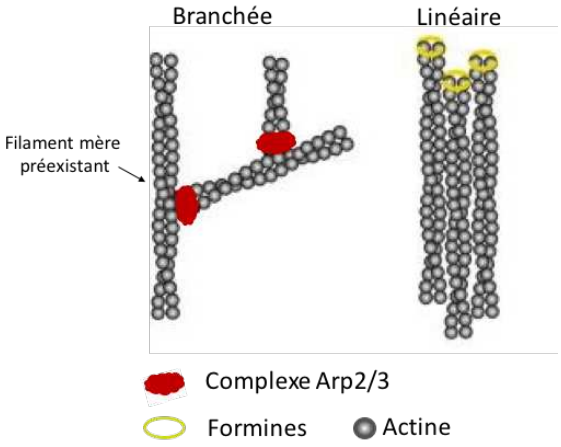


Figure 6 : Schéma de filaments d'actine suite à la polymérisation branchée ou linéaire. Adapté de (Boiero Sanders, Antkowiak, et Michelot 2020)

II.3.1.1. Polymérisation linéaire de l'actine

La polymérisation linéaire de l'actine permet la formation d'un nouveau filament, distinct du cytosquelette déjà organisé. Elle est induite par des facteurs de nucléation et favorisée par des facteurs d'élongation.

II.3.1.1.1. Facteurs de nucléation

Les protéines de la famille des formines permettent la nucléation linéaire des filaments d'actine. Les formines sont de grosses protéines dimériques (120-220 kDa). Il en existe 15, réparties en 7 sous-familles. Les plus étudiées sont les formines de la famille Diaphanous (Dia) (Fernández-Barrera et Alonso 2018). Au niveau N-terminal de ces protéines, se trouve un domaine de liaison aux Rho-GTPases (RBD), un domaine inhibiteur (DID) ainsi qu'un domaine de dimérisation. Au niveau C-terminal, se trouvent les domaines homologues des formines FH1 et FH2 (Formin Homology 1/2) caractéristiques des formines (Zuidscherwoude, Green, et Thomas 2018; Fernández-Barrera et Alonso 2018). La formine Dia induit la nucléation des filaments d'actine grâce à ses domaines FH1 et FH2.

II.3.1.1.2. Facteurs d'élongation

Il existe plusieurs facteurs d'élongation des filaments d'actine. Ces facteurs se lient aux extrémités des filaments. Parmi ceux-ci, on trouve la profiline, les formines et les protéines Enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein (Ena/VASP) (Svitkina 2018a).

Lorsque la concentration en ATP augmente au sein de la cellule, la vitesse de polymérisation est augmentée par le recrutement de **profiline** **(Figure 5)**, une protéine de liaison aux monomères d'actine (ABP), qui catalyse la formation d'actine-G-ATP (Selden et al. 1999; Pollard et Borisy 2003). D'autre part, la profiline interagit avec le domaine FH1 de Dia. En plus de la nucléation, Dia induit l'élongation des filaments d'actine. Le domaine FH2 de Dia se lie aux extrémités barbées du filament d'actine, stabilise les dimères d'actine-G nouvellement formés afin de promouvoir l'élongation du filament (Deng, Bothe, et Baylies 2015). La répression de Dia par la petite molécule inhibitrice des domaines FH2 (SMIFH2), inhibe la polymérisation de l'actine médiée par les formines (Green et al. 2020).

Les protéines **Ena/VASP** entrent en compétition pour la liaison aux monomères d'actine avec la machinerie moléculaire responsable de la polymérisation branchée de l'actine, le complexe Arp2/3. Ceci favorise la polymérisation linéaire de l'actine (Skoble et al. 2001). Les protéines de la famille Ena/VASP sont composées d'un domaine homologue Ena/VASP 1 (EVH1) riche en proline au niveau N-terminal, servant de site de liaison aux protéines cytosquelettiques et adaptatrices telles que la vinculine et la protéine de syndrome de Wiskott-Aldrich (WASP). Les protéines Ena/VASP sont également composées d'un domaine homologue Ena/VASP 2 (EVH2) essentiel pour leur interaction avec l'actine F (Sechi 2004; Bear et Gertler 2009).

II.3.1.2. Polymérisation branchée de l'actine, rôle du complexe Actin related protein 2/3 (Arp2/3)

La polymérisation branchée de l'actine permet la formation d'un filament fille d'actine-F branché à un filament mère, à un angle de 70°. La polymérisation branchée de l'actine est sous la dépendance du complexe Actin related protein 2/3 (Arp2/3). Les ramifications des filaments d'actine sont observées au sein de plusieurs structures intracellulaires telles que les lamellipodes et les podosomes permettant l'adhérence (via les jonctions serrées ou adhérentes) et l'invasion ainsi que les vésicules endocytiques, lysosomales et autophagosomes nécessaires aux recyclages intracellulaires.

II.3.1.2.1. Présentation du complexe Arp2/3

Le complexe Arp2/3 est présent de façon ubiquitaire dans les cellules eucaryotes et est essentiel à la survie des organismes multicellulaires (Kahr et al. 2017). Il est composé de 2 sous-unités principales nommées ARP2 et ARP3 codées respectivement par les gènes *ACTR2* et *ACTR3,* servant de point de départ pour le nouveau filament d'actine (Swaney et Li 2016). Il existe 5 sous-unités supplémentaires nommées ARPC1 (p41), ARPC2 (p34), ARPC3 (p21), ARPC4 (p20) et ARPC5 (p16) (**Figure 7A**) (Freeman et Grinstein 2014). L'hétérodimère ARPC2-ARPC4 fournit la surface nécessaire pour l'interaction du complexe avec le filament mère d'actine et permet d'ancrer ARP3. La sous-unité ARPC3 forme un pont avec un dimère d'actine du filament mère. ARPC5 contribue à fournir des contacts avec le filament mère et aider l'attachement d'ARP2 au reste du complexe. ARPC1 n'a que très peu d'interactions avec le filament mère (Rouiller et al. 2008)(**Figure 7B**).

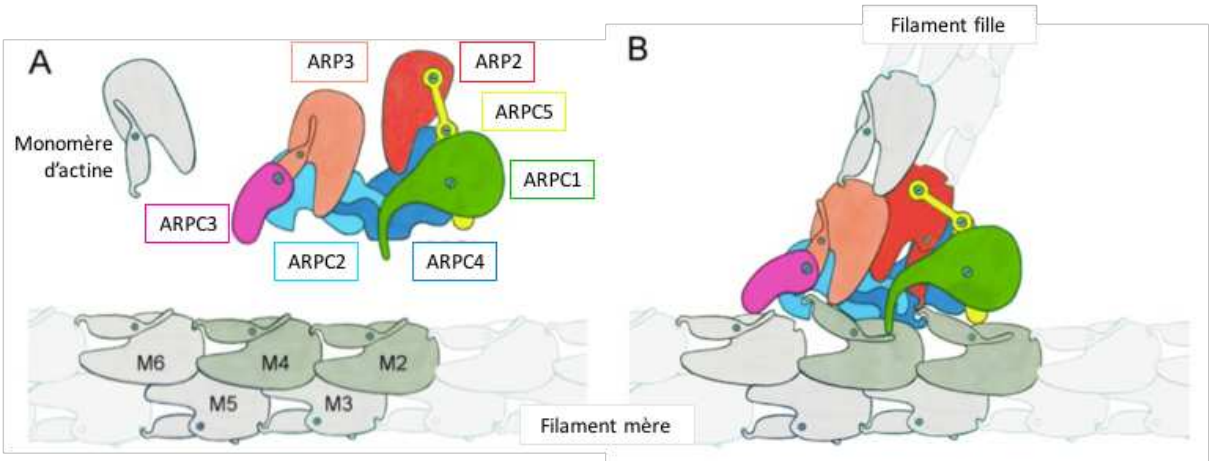


Figure 7- Organisation du complexe Arp2/3. **A) Conformation ouverte/inactive du complexe Arp2/3. M2-M6 sont des monomères d'actine appartenant au filament d'actine mère. B) Conformation fermée/active du complexe Arp2/3 interagissant avec le filament mère et permettant la nucléation du filament fille (Adapté de (Rouiller et al. 2008)).**

II.3.1.2.2. Activation du complexe Arp2/3

La nucléation de l'actine par le complexe Arp2/3 est induite principalement par un groupe de facteurs favorisant la nucléation (Nucleation Promoting Factor – NPF), dont il existe deux types (NPF de type 1 et NPF de type 2).

II.3.1.2.2.1. NPF type 1

Les NPFs de type 1 permettent l'activation du complexe Arp2/3 en interagissant avec les monomères d'actine-G et les GTPases Rac et Cdc42.

Les NPF de type 1 sont composés de plusieurs familles de protéines, comprenant les Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP) et les WASP family Verproline Homologous Protein (WAVE).

Les protéines de la famille WASP et WAVE possèdent une séquence C-terminale homologue, la région Verprolin homology, Cofilin/center homology, Acidic region (VCA). Le domaine V, aussi appelé domaine homologue WASP 2 (WH2), permet l'interaction avec les monomères d'actine. La région CA se lie à deux sites du complexe Arp2/3 afin de l'activer. Le premier site se trouve sur la sous-unité ARP3 tandis que le second se situe sur les sous-unité ARP2 et

ARPC1, formant alors un hétéro-oligomère avec l'actine, afin de mimer un noyau de filament stable (Padrick et al. 2011).

Les **protéines WASP** sont caractérisées par leur domaine homologue WASP 1 (WH1) similaire au domaine EVH1 des protéines Ena/VASP (Zettl et Way 2002). Les protéines WASPs sont composées d'un domaine basique (B) et d'un domaine de liaison interactif des GTPases Rac et Cdc42 (CRIB). La liaison du PIP2 sur le domaine B et la liaison de Cdc42 ou Rac sur le domaine CRIB, permet l'activation des protéines WASPs suivie de l'activation du complexe Arp2/3 (Kunda et al. 2003). Lorsque le domaine CRIB est lié à la région VCA des protéines WASPs, les protéines WASPs sont inactives (Kurisu et Takenawa 2009).

Les **protéines WAVE** sont caractérisées par leur domaine homologue de WAVE (WHD)/ domaine homologue de Scar (SHD). Les protéines WAVE sont constituées d'un domaine basique (B) liant le PIP3 et permettant l'activation de WAVE. L'activation de WAVE est également possible grâce à la liaison de WAVE à la Rho-GTPase Rac. L'interaction WAVE/Rac stimule la polymérisation de l'actine induite par le complexe Arp2/3 (Innocenti et al. 2004; Eden et al. 2002; Kurisu et Takenawa 2009).

II.3.1.2.2.2. NPF type 2

A la différence des NPF de type 1, les NPFs de type 2 permettent l'activation du complexe Arp2/3 en interagissant directement avec les filaments d'actine préexistants. Les NPF de type 2 sont la cortactine, l'Actin-Binding Protein 1 (ABP1), et la coronine.

La **cortactine** contient des séquences répétées de liaison au filament d'actine, ainsi qu'un domaine SH3 à son extrémité C-terminale. La cortactine est également composée d'une région acide à son extrémité N-terminale (NtA), ressemblant à la région CA du domaine VCA des NPFs de type 1, qui interagit avec le complexe Arp2/3 (**Figure 8B**) (Weed et al. 2000).
ABP1 contient un domaine d'homologie au facteur de dépolymérisation de l'actine (ADF-H) à son extrémité N-terminale, lui permettant de se lier au filament d'actine. ABP1 se dimérise et inhibe via son domaine ADF-H le facteur de maturation gliale (GMF), un inhibiteur endogène du complexe Arp2/3.
La **coronine** est une protéine considérée comme un NPF de type 2 dans des conditions particulières. En effet, les coronines sont décrites en tant qu'inhibiteurs du complexe Arp2/3.

Or, il a été montré qu'une faible concentration de coronine active le complexe Arp2/3 (S.-L. Liu et al. 2011). Comme la cortactine et ABP1, les coronines sont composées d'un domaine de liaison aux filaments d'actine au niveau N-terminal, ainsi qu'une région CA, similaire à la région VCA des NPF de type 1 (Gandhi, Jangi, et Goode 2010).

Les NPF de type 1 et de type 2 sont capables d'activer séparément le complexe Arp2/3 et peuvent exercer une action synergique. L'action synergique des WASPs et de la cortactine permet d'accélérer l'élongation du filament ramifié (**Figure 8C**) (Helgeson et Nolen 2013). Lorsque les deux classes de NPF interagissent avec le complexe Arp2/3, les WASPs recrutent les monomères d'actine tandis que la cortactine rapproche le filament d'actine mère, ce qui augmente la polymérisation de l'actine. (Kinley et al. 2003).

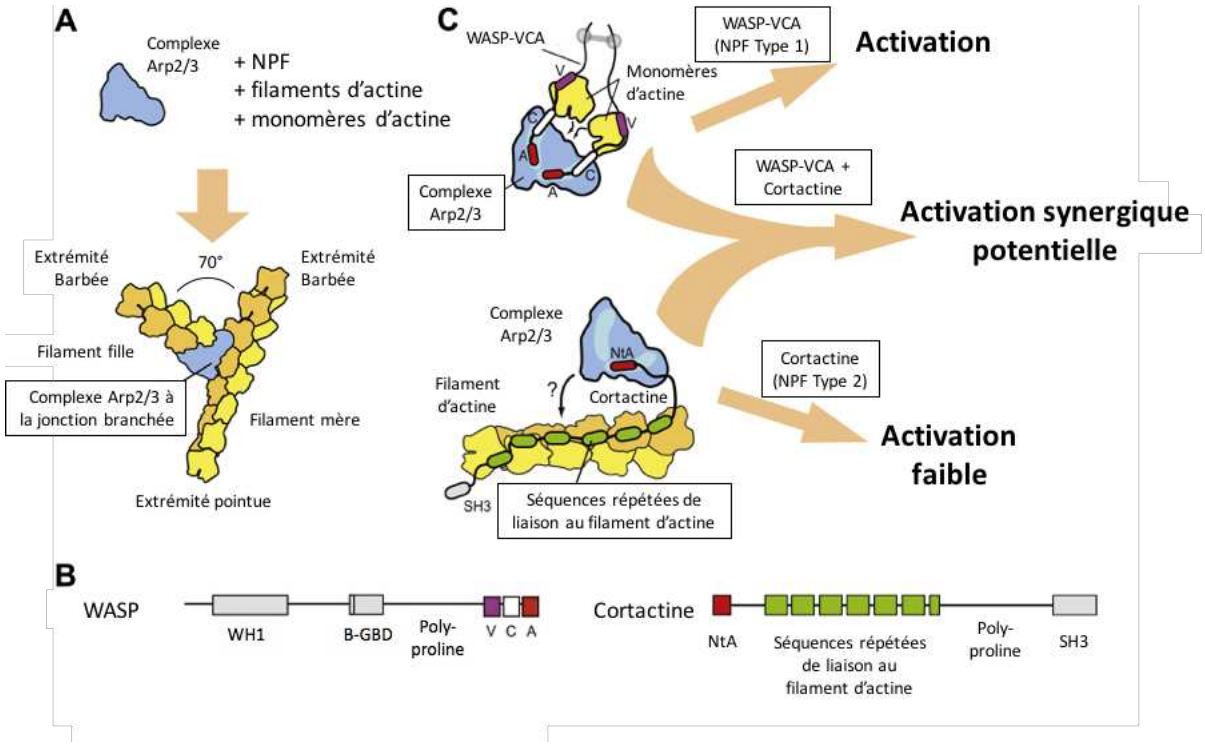


Figure 8- Activation du complexe Arp2/3 par les NPFs. **(A) Vue d'ensemble de la nucléation ramifiée schématisant les composants réactionnels nécessaires (complexe Arp2/3, NPF, monomères d'actine et filaments d'actine) et les ramifications « Y » qui en résultent. (B) Organisation des domaines des NPFs de type I (WASP) et de type II (Cortactine). WH1, WASP homology 1; B-GBD, Basic region and GTPase binding domain; V, verprolin homology (aussi connue sous le nom de WH2, WASP homology 2); C, central; A, acidic; NtA, N-terminal acidic region; SH3, Src Homology 3. (C) Modélisation de l'activation du complexe Arp2/3 par deux classes de facteurs favorisant la nucléation. La barre grise**

indique un mécanisme générique de dimérisation de WASP. De petites flèches noires indiquent soit le recrutement de monomères d'actine au complexe Arp2/3 par le domaine VCA, soit le recrutement du complexe Arp2/3 aux filaments d'actine par la cortactine. Les zones bleues claires sur le complexe Arp2/3 indiquent les deux sites de liaison des domaines VCA. (Adapté de (Helgeson et Nolen 2013)).

II.3.1.2.3. Inhibition du complexe Arp2/3

Les protéines de la famille des coronines inhibent le complexe Arp2/3 en interagissant, par compétition, avec l'actine F (Freeman et Grinstein 2014; Klemens Rottner et al. 2017).
Le facteur de maturation gliale (GMF) est une petite protéine de 18 kDa. Le GMF inhibe le complexe Arp2/3 en se liant aux sous-unités ARP2 et ARPC1, induisant une conformation ouverte et inactive du complexe (Luan et Nolen 2013).
Arpin, ou « Arp2/3 inhibitor », inhibe le complexe Arp2/3 grâce à un motif acide (A) qui va rentrer en compétition avec le domaine VCA des NPFs, induisant une conformation ouverte et inactive du complexe Arp2/3 et bloquant son effet stimulateur sur l'élongation du filament d'actine (Sokolova et al. 2017; Dang et al. 2013).

II.3.2. Dépolymérisation

La dépolymérisation de l'actine permet le renouvellement des diverses structures d'actine au sein de la cellule. La dépolymérisation de l'actine est essentielle aux fonctions de la cellule, par exemple la motilité cellulaire (Wioland et al. 2017; Pollard et Borisy 2003). Le principal acteur moléculaire de la dépolymérisation des filaments d'actine est la famille de protéines Actin Depolymerization Factor (ADF) / cofiline.

II.3.2.1. Famille ADF/Cofiline

La famille ADF/Cofiline est constituée de 3 protéines, le facteur de dépolymérisation de l'actine (ADF), la cofiline-1 (CFL1) et la cofiline-2 (CFL2) (Wioland et al. 2020; Narita 2020). Ce sont de petites protéines de 18 kDa qui favorisent la fragmentation et la dépolymérisation des filaments d'actine. Les protéines ADF/Cofiline se lient à l'actine-G-ADP dans les filaments, ce qui induit une modification de l'enroulement hélicoïdal du filament. A travers la section des filaments d'actine, la cofiline augmente la disponibilité des extrémités des « vieux » filaments

ainsi que la réserve en monomère d'actine, ce qui favorise la nucléation et/ou l'élongation des filaments d'actine (Kanellos et Frame 2016).

II.3.2.1.1. Régulation de la cofiline

Les protéines ADF/cofiline sont régulées par leur phosphorylation, les changements de pH et les Cyclase Associated Proteins (CAP) (Narita 2020).

Les principaux inhibiteurs des cofilines sont les Rho-GTPases. Les Rho-GTPases phosphorylent la protéine kinase Lim11/Isl-1/Mec3 (LIMK1) qui, à son tour phosphoryle la cofiline sur son résidu Serine 3, empêchant sa liaison au filament d'actine (Kanellos et Frame 2016; Liang et al. 2019). La cofiline peut être activée par les phosphatases de la famille « slingshot » (SSH1-3) (Niwa et al. 2002) et chronophine (Gohla, Birkenfeld, et Bokoch 2005). Un pH intracellulaire faible est capable d'inhiber la cofiline, d'une part en facilitant son interaction avec la cortactine, et d'autre part en augmentant le pool de PIP2 membranaire (H. Zhao, Hakala, et Lappalainen 2010). PIP2 se lie aux protéines de la famille ADF/Cofiline avec une meilleure affinité que l'actine (Kanellos et Frame 2016). L'augmentation du pH intracellulaire induit l'hydrolyse du PIP2 et réprime l'interaction cortactine/cofiline, permettant la libération de la cofiline et favorisant la dépolymérisation de l'actine (Kanellos et Frame 2016).

Les CAP sont des protéines multi-domaines capables de catalyser l'échange de nucléotide sur les monomères d'actine. Au niveau de leur extrémité N-terminale, les CAP peuvent lier les complexes ADF/cofiline-actine accélérant le désassemblage des filaments d'actine médié par les ADF/cofiline (Kotila et al. 2018).

Tableau 2: Principaux acteurs de la polymérisation et dépolymérisation de l'actine.

	Acteurs de la polymérisation	**Acteurs de la dépolymérisation**
Linéaire	Activateurs : Formines, Rho-GTPase, Ena/VASP, Profiline Inhibiteurs : SMIFH2	Activateurs : ADF/Cofiline, Slingshot (SSH1-3), Chronophine, CAP Inhibiteurs : pH acide, Rho-GTPases
Branchée	Activateurs : Formines, Complexe Arp2/3, NPF type 1 (WASP, WAVE), NPF type 2 (cortactine, Apb, coronines), Rho-GTPases Inhibiteurs : Arpin, GMF, Coronines, SMIFH2	Activateurs : ADF/Cofiline, Slingshot (SSH1-3), Chronophine, CAP Inhibiteurs : pH acide, Rho-GTPases

II.4. Principaux partenaires moléculaires de l'actine dans les structures du cytosquelette

Le cytosquelette d'actine assure de multiples fonctions dans la cellule à travers la mise en place de différentes structures. De nombreuses protéines interagissent avec les filaments d'actine pour réaliser les différentes structures du cytosquelette d'actine.

II.4.1. Actine corticale

L'actine corticale donne la forme à la cellule grâce à sa localisation sous-membranaire et lui permet de s'adapter et de résister aux contraintes mécaniques. Pour remplir ce rôle, les protéines de la famille Ezrin/radaxine/moesine (ERM), qui assurent sa liaison avec la membrane plasmique, sont recrutées lors de la polymérisation de l'actine corticale (Klemens Rottner et al. 2017).

Les protéines ERM sont composées d'un domaine N-terminal Protein 4.1, ezrin, radixin, moesin (FERM), d'un domaine hélice-alpha central et un domaine C-terminal (CTD), dans lequel se trouve le site de liaison à l'actine-F. Lorsque les protéines ne sont pas phosphorylées, les domaines FERM et CTD sont liés entre eux, masquant le site de liaison à l'actine F du CTD (Q. Li et al. 2007). La phosphorylation des protéines ERM, est augmentée par l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt dans plusieurs types cellulaires (W. Y. Kim et al. 2020; Suda, Rockey, et Karvar 2016).

II.4.2. Filaments d'actine

Les filaments d'actine peuvent s'organiser en faisceaux parallèles distants les uns des autres grâce à leur liaison avec des protéines intercalaires. Il existe de nombreuses protéines intercalaires dont les principales sont la fimbrine, la villine, l'espine et la fascine.

La **fimbrine** est constituée de deux domaines d'homologie de la calponine pouvant lier un filament d'actine (Friedberg et Rivero 2010). La fimbrine permet la formation de plaque d'actine en rattachent les filaments d'actine entre eux (Christensen et al. 2017).

La **villine** est constituée de six répétitions de type gélatine suivies d'une coiffe C-terminale pouvant lier l'actine F. La villine est également composée d'un site de liaison au PIP2, permettant l'inhibition de son substrat, la phospholipase C qui est impliquée dans l'activité de séparation des filaments d'actine (N. Kumar et al. 2004).

L'espine est capable de lier les monomères d'actine G grâce à son domaine WH2 interne (Sauvanet et al. 2015) et participe à la réticulation des filaments d'actine (Lieleg et al. 2009).

La **fascine** est une petite protéine globulaire qui présente deux sites de liaison à l'actine, lui permettant de se lier étroitement aux filaments d'actine parallèles. La fascine contribue à l'élasticité cellulaire en contrôlant l'orientation de l'actine (Pan et al. 2020). La fascine joue un rôle important dans la propagation des métastases des cancers en stabilisant les faisceaux d'actine dans les invadopodes (S. Lin et al. 2019).

II.4.3. Fibres de stress

Les fibres de stress sont des structures contractiles composées de filaments d'actine riche en alpha-actine du muscle lisse (α-SMA), de filaments de myosine, et protéines associées.

L' α-SMA, codée par le gène *ACTA2*, est un isoforme de l'actine. La formation de fibres de stress est induite par des cytokines profibrosantes telles que le TGFβ (Yu Wang, Li, et Wang 2002) mais également par des facteurs de croissances comme le PDGF, FGF et le CTGF (Mattyasovszky et al. 2010; Weng et al. 2014).

Les myosines font parties d'une grande famille de 35 classes de mécano-enzymes générant de multiples activités mécaniques grâce à leur liaison avec le cytosquelette d'actine (Walklate, Ujfalusi, et Geeves 2016). La myosine non musculaire de classe II (NMII) est la myosine la

plus représentée dans les fibres de stress. NMII se lie à l'actine afin d'engendrer une force mécanique aboutissant à une contraction du filament (Anderson, Vaughan, et Cramer 2008; Svitkina 2018a). Les myosines non musculaires de classe III, V, VI, VII et X sont capables de se lier à l'actine afin de transporter des organites et vésicules entre différents compartiments cellulaires (Heissler et Sellers 2016).

L'activité de NMII au sein des fibres de stress est régulée par la protéine LIM calponin homology domain 1 (LIMCH1) dans les cellules HeLa. Dans ces cellules, la déplétion de LIMCH1, entraine la phosphorylation de la MRLC diminuant le nombre de fibres de stress, et induit l'augmentation de la phosphorylation de FAK, réduisant l'adhérence focale des cellules et augmentant la migration cellulaire (Y.-H. Lin et al. 2017).

II.4.4. Jonctions intercellulaires

II.4.4.1. Jonctions adhérentes

Les **jonctions adhérentes** (ou jonctions d'adhérences) sont principalement composées de protéines transmembranaires de la famille des cadhérines. Les cadhérines font partie de la famille des molécules d'adhérence cellulaire (CAM) dépendantes du calcium. Au niveau des jonctions adhérentes des cellules épithéliales, la E-cadhérine interagit avec des protéines adaptatrices de la famille des caténines comme la β-caténine et l'α-caténine (van Roy et Berx 2008).

Dans un premier temps, l'E-cadhérine forme, grâce à son domaine cytoplasmique, un complexe avec la β-caténine (Choi, Huber, et Weis 2006). Ensuite, l'α-caténine recrute la β-caténine au niveau des filaments d'actine, induisant la formation d'un complexe ternaire E-cadhérine/β-caténine/α-caténine, lié à l'actine-F (**Figure 9**) (Lampugnani et al. 1995; Sabine Pokutta et al. 2008; S. Pokutta et Weis 2000). Les jonctions adhérentes sont stabilisées par la force contractile, générée par la myosine non musculaire II (NMII), présente au sein des faisceaux d'actine insérés dans les régions riches en cadhérines (Efimova et Svitkina 2018). L'α-caténine permet la formation de réseaux d'actine linéaire médiés par les formines. Lors de la maturation des jonctions adhérentes, une forte concentration d'α-caténine inhibe le complexe Arp2/3, stoppant la polymérisation branchée de l'actine. La polymérisation branchée est nécessaire à l'activité lamellipodiale lors de la migration cellulaire et son inhibition déstabilise l'interaction cellule-cellule (Sabine Pokutta et al. 2008; Drees et al. 2005).

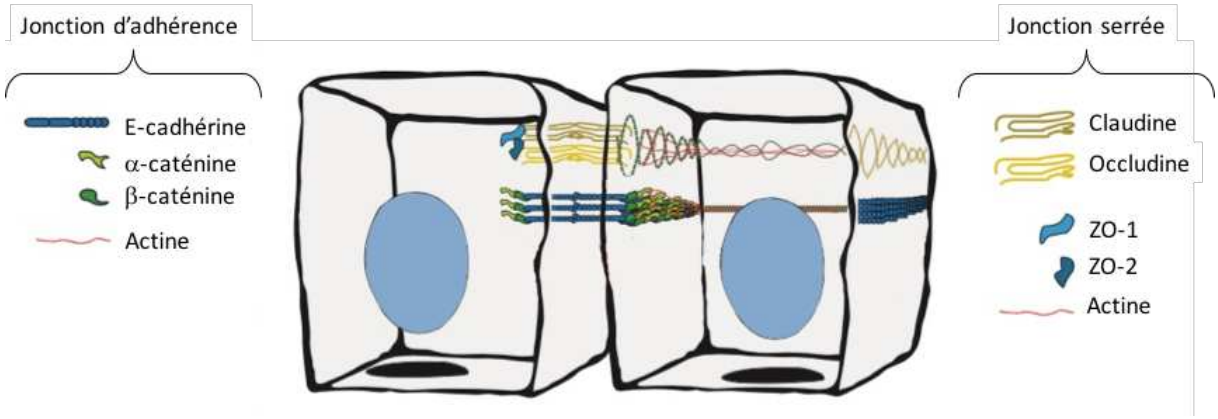


Figure 9 : Composition et organisation spatiale des jonctions cellule-cellule dans les cellules épithéliales. **La jonction serrée est localisée dans la région la plus apicale de la cellule et se compose de protéines transmembranaires (claudine, occludine) et de protéines adaptatrices (ZO-1 et ZO-2), qui sont liées au cytosquelette d'actine sous-jacent. La jonction d'adhérence est localisée sur la membrane latérale et se compose principalement de la protéine transmembranaire E-cadhérine et des protéines adaptatrices β-caténine et α-caténine, qui sont liées au cytosquelette d'actine sous-jacent. Adapté de** (Garcia, Nelson, et Chavez 2018)**.**

II.4.4.2. Jonctions serrées

Les **jonctions serrées** se localisent dans la région cellulaire la plus apicale, et encerclent la cellule en formant un joint protéique, permettant la régulation de la diffusion des ions et des solutés à entre les cellules (Zihni et al. 2016). Les jonctions serrées sont composées de deux familles de protéines transmembranaires, les claudines et les occludines. Ces protéines forment des complexes homotypiques claudine-claudine et occludine-occludine entre les cellules. La claudine et l'occludine interagissent avec des protéines cytoplasmiques adaptatrices liées au cytosquelette d'actine (**Figure 9**) (Cerutti et Ridley 2017). Ces protéines adaptatrices comprennent les protéines Zonula occludens (ZO-1, 2, 3) et la cinguline, composées d'un domaine PSD-95/discs-large/zonula occludens-1 (PDZ) (Van Itallie et Anderson 2014). Le domaine PDZ1, situé à l'extrémité N-terminal, permet l'interaction des protéines adaptatrices à la claudine et l'occludine, tandis que la région riche en proline situé à l'extrémité C-terminal, permet l'interaction des protéines ZO avec l'actine F (Fanning et al. 1998; Rodgers et al. 2013).

II.4.5. Adhérences focales

Les sites d'adhérence focale sont constitués d'un assemblage d'intégrines, regroupées en amas et reliées aux filaments d'actine par des protéines d'ancrage telles que la vinculine, la paxiline, l'α-actinine, la taline et la tensine (Galbraith, Yamada, et Sheetz 2002). La taline est capable de se lier simultanément avec l'intégrine β et l'actine F (Horwitz et al. 1986; Case et Waterman 2015). La vinculine se lie à la taline et l'actine F afin de renforcer l'interaction mécanique entre la taline et les filaments d'actine (**Figure 11, cf Voie FAK**) (H. Chen, Choudhury, et Craig 2006).

Les intégrines jouent un rôle majeur et servent de point d'ancrage reliant la matrice extracellulaire au cytosquelette d'actine (Ridley et al. 2003; Lauffenburger et Horwitz 1996). Les intégrines sont des protéines transmembranaires permettant la liaison du cytosquelette d'actine à la MEC (Taniguchi et al. 2010). Les intégrines sont composées de deux sous-unités, une sous-unité alpha et une sous-unité beta, capables d'interagir spécifiquement, au niveau de leur domaine extracellulaire, avec les protéines de la MEC comme la fibronectine et le collagène (Hynes 2002).

Au niveau de ces sites d'adhérence focale, viennent s'ancrer les filaments d'actine liés à la myosine II, qui produisent des forces de traction permettant la contraction cellulaire (Gupton et Waterman-Storer 2006).

Le complexe d'adhérence focale est associé à des protéines kinases capables d'activer des voies de signalisation intracellulaires, comme la voie de la Focal Adhesion Kinase (FAK)/ Src (Tapial Martínez, López Navajas, et Lietha 2020) et la voie de l'Intergrin Linked Kinase (ILK)/Akt (Blattner et Kretzler 2005). Ces voies de signalisation participent à la mécanotransduction (voir plus bas).

L'organisation du cytosquelette d'actine dans ses différentes structures est contrôlée par l'association des contraintes mécaniques et de l'activation de voies de signalisation intracellulaires.

II.5. Régulation du cytosquelette d'actine par la famille des Rho-GTPases

Parmi les voies de signalisation impliquées dans la réorganisation et la dynamique du cytosquelette d'actine, la voie des Rho-GTPases et des protéines kinases associées à Rho (ROCK) joue un rôle central.

La famille des Rho-GTPases comprend RhoA, B, C ainsi que Rac1a/b, Rac2, Rac3, et Cdc42 (Wherlock et Mellor 2002). Les Rho-GTPases sont inactives lorsqu'elles sont liées au GDP. Des signaux extracellulaires, tels que la phosphorylation du PIP2 en PIP3 par la PI3K, activent les protéines Guanine nucleotide Exchange Factors (GEF) catalysant le remplacement du GDP par le GTP. Liées au GTP, les Rho-GTPases activent de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la synthèse d'ADN, l'activation de la transcription tel que la voie YAP et TAZ (Dupont et al. 2011), la dynamique des microtubules à travers la voie actine/MRTF/SRF (Fernández-Barrera et Alonso 2018; Fernández-Barrera et al. 2018), le transport vésiculaire (Kage et al. 2017) mais également la réorganisation du cytosquelette d'actine (D. K. Kim et al. 2019; S. W. Kim et al. 2019).

Trois Rho-GTPases sont particulièrement impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine.

RhoA induit la formation de fibres de stress (R et al. 2005) en activant les kinases ROCK pour la régulation d'importantes fonctions cellulaires comme la prolifération, la migration, l'adhérence et la balance apoptose/survie (Y. Zhou et al. 2013b). La famille ROCK est composée de ROCK1 (aussi connu sous le nom de ROKβ ou p160ROCK) et de ROCK2 (aussi nommé ROKα) (Y. Zhou et al. 2013b). Il s'agit de protéines kinases à sérine/thréonine, directement activées par RhoA. ROCK est capable de phosphoryler LIMK, favorisant la polymérisation de l'actine (Z. Wang et al. 2019). ROCK inhibe la phosphatase de la chaine légère de myosine (MLCP) (You et al. 2019), ce qui augmente la phosphorylation de la chaine légère de myosine (MLC) et la formation de filaments d'actomyosine (**Figure 10**) (Qi et al. 2015; Chunguo et al. 2014). L'inhibition de la voie ROCK induit l'arrêt des réarrangements cytosquelettiques par le blocage de l'activité motrice de la myosine (Colin-York et al. 2019; Kunitomi et al. 2020).

Rac-GTP permet le recrutement du complexe WAVE à la membrane plasmique, initiant la formation d'un réseau d'actine branchée médiée par le complexe Arp2/3, pour la formation des lamellipodes au cours de la migration. Rac permet la formation de nouvelles adhérences focales à l'avant de la cellule et antagonise Rho, permettant le désassemblage des adhérences à l'arrière de la cellule (K. Rottner, Hall, et Small 1999) et la dépolymérisation des filaments d'actine par la cofiline (Kanellos et Frame 2016; Liang et al. 2019).

Cdc42 active N-WASP, permettant l'action du complexe Arp2/3 au niveau du filament d'actine (Houy et al. 2020) et induit la formation de filopodes (Nobes et Hall 1995). Cdc42 active, au même titre que Rac, la protéine kinase activée par p21 (PAK) induisant la phosphorylation de LIMK, bloquant l'activité de dépolymérisation de la cofiline au profit de la polymérisation de l'actine (**Figure 10**).

Les Rho-GTPase induisent la polymérisation de l'actine par le complexe Arp2/3, mais également le recrutement de Spire 1/2 et des formines mDia, qui vont coopérer pour la nucléation des filaments d'actine linéaires (**Figure 10**) (Pollard et O'Shaughnessy 2019)

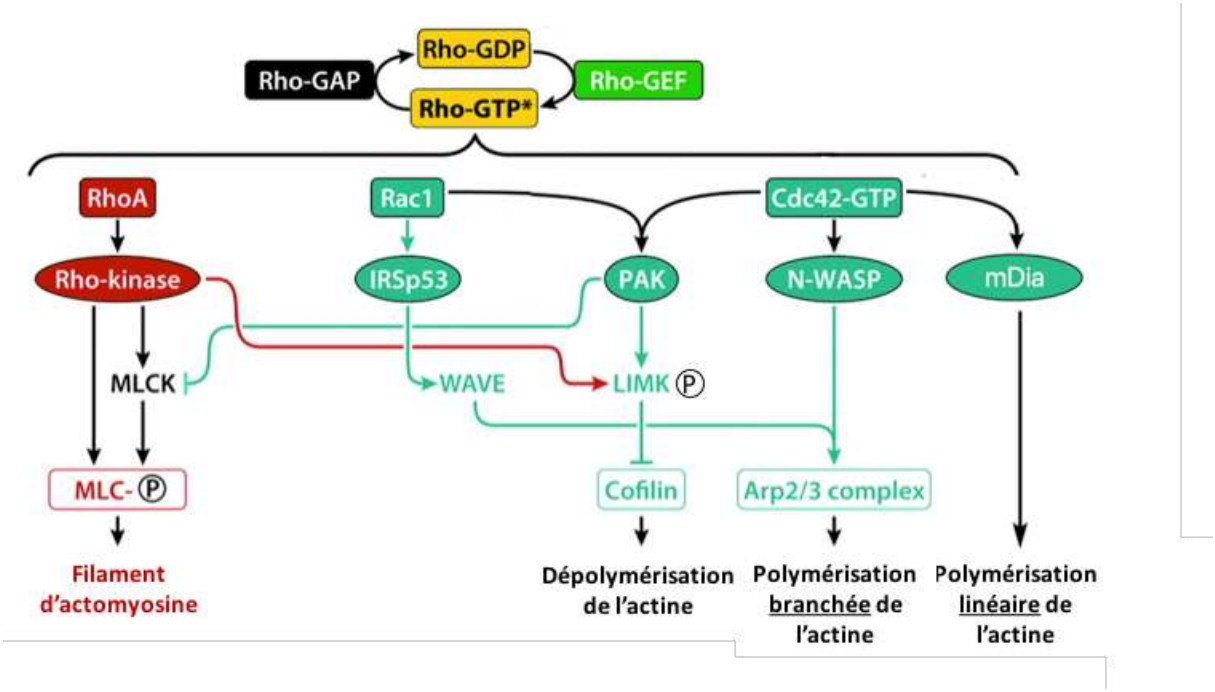


Figure 10 : Mécanismes d'activation et voies des Rho-GTPases. **Les Rho GTPases sont activées par des facteurs d'échange de guanine (GEF) et inhibées par des protéines d'activation de la GTPase (GAP). Les Rho-GTPases comprennent RhoA (Ras homologous member A), Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate1), et Cdc42 (cell division cycle 42), qui déclenchent plusieurs voies régulant la dynamique du cytosquelette d'actine.**

RhoA active la Rho kinase (ROCK), qui phosphoryle et active la chaîne légère de myosine (MLC) et sa kinase (MCLK). La phosphorylation de la myosine favorise la formation de filaments d'actomyosine. Rac1 et Cdc42 facilitent tous deux la polymérisation branchée de l'actine. Celles-ci comprennent la PAK (p21 kinase) qui, par l'intermédiaire de LIMK (Lin-11, Isl-2, Mec-3 kinase), inactive la cofiline, protéine de séparation de l'actine. Rac1 et Cdc42 activent le complexe Arp2/3, favorisant la nucléation et la polymérisation de l'actine. Le complexe Arp2/3 est activé par Cdc42 via N-WASP (protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich) et par Rac1 via IRSp53/WAVE (substrat du récepteur d'insuline de 53 kd / protéine homologue de la famille WASP). Cdc42 active la formine mDia favorisant la polymérisation linéaire de l'actine. Adapté de (Ridley 2015; Benarroch 2007)

III. Régulation du phénotype cellulaire par le cytosquelette d'actine

Le cytosquelette d'actine participe à la régulation de nombreuses fonctions cellulaires essentielles, dont la prolifération et la mort cellulaire, et l'interaction des cellules avec leur environnement. En particulier, le cytosquelette d'actine joue un rôle central dans la perception des stimuli mécaniques, ou mécanotransduction.

III.1. Prolifération et mort cellulaire

III.1.1. Prolifération

La prolifération cellulaire nécessite la division d'une cellule mère en deux cellules filles, afin de distribuer le matériel génétique équitablement au sein des deux cellules générées. Pour que la cellule puisque proliférer, il est nécessaire qu'elle suive les différentes phases du cycle cellulaire : G1, S, G2, Mitose. Ces phases sont régulées par l'ensemble du cytosquelette et plus particulièrement par le cytosquelette d'actine. La régulation des changements de la forme des cellules en coordination avec la progression du cycle cellulaire, suggère une interaction étroite entre la signalisation du cytosquelette, les adhérences cellule-cellule/matrice et les événements mitotiques (Jones, Zha, et Humphries 2019; Heng et Koh 2010).

La phase G1 du cycle cellulaire est la phase de croissance et de préparation à la réplication de l'ADN. Au cours de cette phase, les niveaux d'actine nucléaire doivent être augmentés. Pour cela, les monomères d'actine cytoplasmique sont transloqués dans le noyau grâce à des protéines d'importation nucléaire comme l'importine (Dopie et al. 2012). Une fois dans le

noyau, l'actine est polymérisée, ce qui augmente le volume du noyau et prépare l'expansion de la chromatine après la sortie de la mitose (Baarlink et al. 2017). La polymérisation de l'actine est principalement médiée par les formines, qui sont nécessaires à l'entrée des cellules en phase G1 mais également à leur entrée en phase S, ou phase de réplication de l'ADN. La formine mDia2 induit la polymérisation de l'actine pour stabiliser les centromères et facilite la liaison de facteurs de réplication sur la chromatine (C. Liu, Zhu, et Mao 2018). De plus, mDia2 permet l'initiation de la réplication et l'élongation de l'ADN en induisant l'expression de l'antigène nucléaire des cellules en prolifération (PCNA) et des kinases dépendantes des cyclines (CDK) (Parisis et al. 2017).

Les CDK sont des protéines indispensables à la progression du cycle cellulaire. Lors de la transition de la phase S à la phase G2, l'activation de la CDK-1 par la cycline A est nécessaire. Une fois que la cellule est entrée en phase G2, CDK-1 est liée par la cycline B (Pines et Hunter 1991). Dans des lignées cellulaires de cancer du sein (MDA-MB-231 et MCF-7), la déplétion de β-actine dans le noyau induit une augmentation des niveaux protéiques des cyclines A2 et B1, provoquant un retard dans la progression de la phase G2/M (Dugina et al. 2018).

Lorsque la cellule entre en mitose, elle subit des changements morphologiques importants initiés par la réorganisation du cytosquelette d'actine, notamment par la formation d'amas de filaments d'actine. Ces amas d'actine génèrent des mouvements de rotation du cortex cellulaire et des plaques d'adhérences au niveau desquels une forte activité de polymérisation de l'actine est observée. Ces amas d'actine requièrent l'activité de la CDK1 mais également du complexe Arp2/3. En effet, dans les cellules HeLa, l'inhibition pharmacologique de CDK1 induit la disparition des amas de filaments d'actine, et le knockdown (KD) du complexe Arp2/3 inhibe la formation de ces amas au cours de la mitose (Mitsushima et al. 2010). En sortie de mitose, les filaments d'actine sont dépolymérisés par la cofiline, permettant aux nouvelles cellules filles d'entrer dans la phase G1 du cycle cellulaire (Baarlink et al. 2017).

III.1.2. Mort cellulaire

Le cytosquelette d'actine joue un rôle central dans la mort cellulaire programmée par apoptose. Lorsque le cytosquelette d'actine est mis en tension de manière répétée, cela induit des forces d'étirements appliquées aux organites intracellulaires comme les mitochondries. Dans ce contexte, la mitochondrie libère le cytochrome c (Bartolák-Suki et al. 2017). La libération du cytochrome c permet l'activation de la caspase-3 et induit l'apoptose (Mendivil-Perez, Velez-Pardo, et Jimenez-Del-Rio 2012). Face au stress mécanique appliqué à la mitochondrie,

l'organite produit en plus grande quantité des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Gourlay et al. 2004). L'augmentation des ROS induit un stress oxydatif, ce qui active des protéases à cystéine de la famille des caspases, médiateurs de l'apoptose (D. Li et al. 2019).

III.2. Interaction avec l'environnement : Mécanotransduction

Les cellules sont capables d'interagir physiquement entre elles et avec leur environnement à travers la mise en place, respectivement, de jonctions intercellulaires et de plaques d'adhérences focales. Le cytosquelette d'actine participe à ces processus par la mise en place de ces structures et la génération et/ou la transmission de forces mécaniques qui y sont appliquées. Le cytosquelette d'actine participe à générer des signaux intercellulaires en réponse à sa mise en tension, soit en co-activant des voies de signalisation telles que celle du TGFβ1, soit par L'intermédiaire de voies de signalisation spécifiques (mécanotransduction).

En plus de jouer un rôle indirect dans l'adaptation des cellules à leur environnement en permettant l'établissement des jonctions intercellulaires et cellule-matrice, le cytosquelette d'actine y joue un rôle direct, d'une part en exerçant des forces mécaniques permettant le démasquage de ligands tels que le TGFβ, et d'autre part en permettant la perception par la cellule des forces mécaniques (mécanotransduction).

III.2.1. Activation de facteurs de croissance liés à la matrice : Cas du TGFβ1

Le cytosquelette d'actine joue un rôle essentiel dans l'activation de la voie du TGFβ1. Le TGFβ est sécrété sous la forme d'un complexe latent qui se lie à la MEC. Le TGFβ est synthétisé sous la forme d'un précurseur clivé et assemblé dans le réticulum endoplasmique (RE) sous la forme d'un complexe non covalent appelé petit complexe latent (LLC). Ce complexe LLC est constitué d'un homodimère de TGFβ mature, à l'extrémité C-terminale et d'un homodimère constitué du peptide associé à la latence (LAP), lié par liaison disulfure à la protéine de liaison au TGFβ latent (LTBP), à l'extrémité N-terminale (Robertson et al. 2015). L'homodimère LAP/LTBP empêche le fragment C-terminal de la cytokine mature, de se lier à ses récepteurs. Le TGFβ synthétisé sous forme latente est stocké à la MEC (Robertson et Rifkin 2013).

L'activation du TGFβ nécessite l'interaction de l'intégrine αvβ6 au niveau de la séquence RGD (Arginine – Glycine – Acide aspartique) présente sur le peptide LAP de la cytokine (Munger et

al. 1999; Annes, Rifkin, et Munger 2002), mais également l'interaction de l'intégrine αvβ6 avec le cytosquelette d'actine, via la phosphorylation de FAK et de la paxiline, au niveau des adhérences focales (Munger et al. 1999).

L'activation du TGFβ nécessite qu'une force de traction, générée par la contraction du cytosquelette d'actine de la cellule cible, soit exercée sur le complexe latent afin de démasquer le ligand.

III.2.2. Mécanotransduction

La mise en tension du cytosquelette d'actine active des voies de signalisation spécifiques dites de mécanotransduction.

III.2.2.1. Principe général

La mécanotransduction est un processus permettant à une cellule de percevoir une information mécanique au niveau de ses récepteurs (mécano-réception), de la transmettre (mécano-transmission) et d'apporter une réponse cellulaire proportionnelle à l'information perçue (mécano-activation) (Vogel et Sheetz 2006). Ce processus est essentiel à la cellule, lui permettant de s'adapter à son environnement. Parmi les acteurs indispensables à ce mécanisme, se trouve le cytosquelette d'actine, mais également des facteurs de transcription (Moreno-Vicente et al. 2018; B. Zhao et al. 2008).

Lorsqu'une tension mécanique est appliquée à la cellule, celle-ci est directement transmise à l'ensemble du cytosquelette d'actine via les intégrines présentes au niveau des adhérences focales, ce qui déclenche une cascade d'activation de voies intracellulaires. L'activation de ces voies de signalisation permet d'induire la transcription de gênes cibles en réponse au stimulus mécanique. En parallèle, le cytosquelette d'actine lié à la membrane par les plaques d'adhérence focale, va transmettre cette tension mécanique directement aux organites intracellulaires, telles que les mitochondries (Taniguchi et al. 2010).

III.2.2.2. Voie FAK

FAK est localisée au niveau des adhérences focales. Les protéines d'échafaudage interagissent avec la queue cytoplasmique de l'intégrine β, ce qui permet le recrutement de FAK au niveau des adhérences focales (Calderwood et al. 1999; Kanchanawong et al. 2010). FAK est composée d'un domaine FERM à son extrémité N-terminale, impliqué dans son auto-inhibition, suivi d'une région riche en proline et d'un domaine de ciblage d'adhérence focale (FAT) à son extrémité C-terminale (Tapial Martínez, López Navajas, et Lietha 2020). Lorsque la MEC est rigide, le domaine FERM de FAK se lie à l'intégrine, entraînant l'autophosphorylation de FAK (Cooper, Shen, et Guan 2003). La kinase FAK pleinement activée, induit le recrutement des protéines Src (**Figure 11**) et Grb2 au niveau de la région riche en proline de FAK. Le recrutement de Grb2 permet l'activation de la voie Ras/MAP kinase (Ras/MAPK) impliquée dans la migration cellulaire (Schlaepfer et al. 1994). Toujours dans le contexte d'une MEC rigide, FAK activée induit l'activation de la voie Rho-GTPase, impliquée dans la contraction cellulaire par la formation de filaments d'actomyosine. Ainsi, l'activation de FAK permet la transmission de signaux mécaniques de la MEC vers le cytosquelette d'actine (Wozniak et al. 2004).

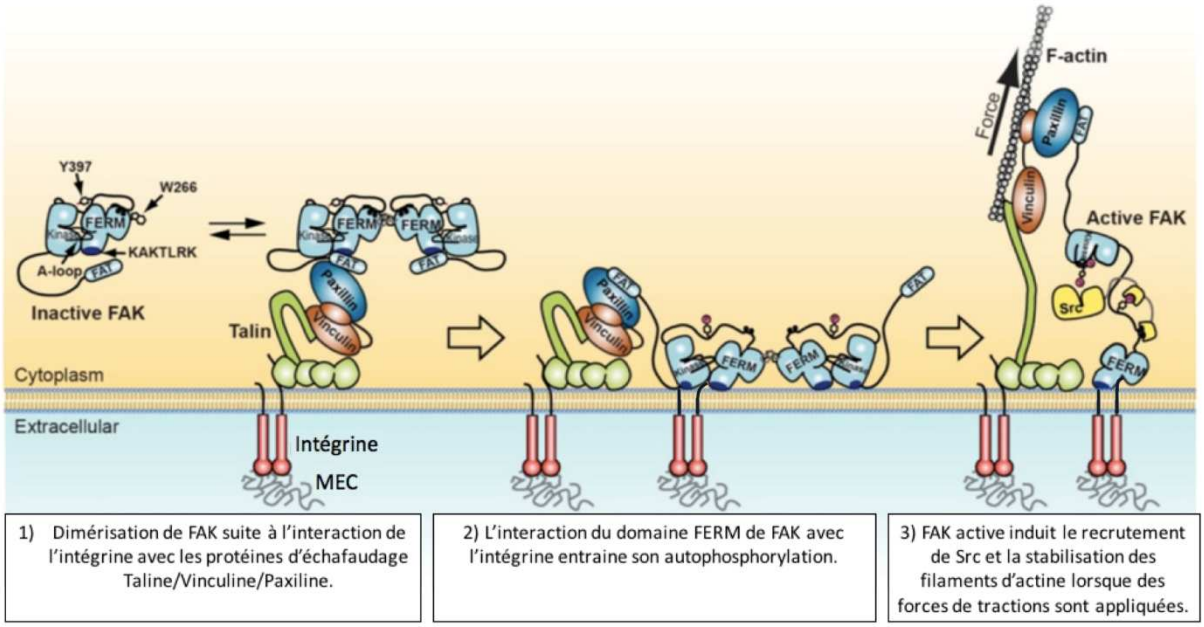


Figure 11 : Mécanisme d'activation de FAK au niveau des plaques d'adhérence focale, médiée par les interactions membranaires et les forces de traction. **(1) FAK se dimérise suite à son recrutement par les protéines d'échafaudage tel que la paxilline, au niveau de son domaine FAT. La paxiline est elle-même lié au complexe Vinculine/Taline qui interagit avec l'intégrine β. (2) FAK interagit avec l'intégrine grâce à son domaine FERM. Les**

interactions membranaires de FAK avec l'intégrine, induisent des changements de conformation permettant l'autophosphorylation de FAK. (3) Une fois active, FAK recrute la protéine Src via son domaine SH2. L'interaction de FAK avec Src permet la stabilisation des filaments d'actine face aux forces d'étirement appliquées par une matrice rigide. Adapté de (Tapial Martínez, López Navajas, et Lietha 2020)**.**

III.2.2.3. Activation des Rho-GTPases

Les forces externes appliquées aux cellules entraînent le regroupement des intégrines pour former les plaques d'adhérences focales. Au niveau de ces plaques, les intégrines induisent la phosphorylation de FAK. FAK activée est capable de se lier directement aux facteurs d'échanges (GEF) de Rho permettant l'activation de la voie Rho/Rho-kinase (ROCK) (Knipe, Tager, et Liao 2015; Wozniak et al. 2004). ROCK induit ensuite l'activation de la chaîne légère de myosine (MLC) ainsi que l'inhibition de la phosphatase MLC, ce qui augmente l'activité de la myosine-II et la contractilité de l'actomyosine (Kimura et al. 1996; Lessey, Guilluy, et Burridge 2012; You et al. 2019).

III.2.2.4. Voie MRTF/SRF

Parmi les voies de mécanotransduction médiées par le cytosquelette d'actine, on note l'axe MRTF/SRF activé par la voie Rho-GTPase et impliqué dans le contrôle de la dynamique de l'actine à travers la contractilité, l'adhérence cellulaire mais également via la dégradation de la MEC et le contrôle des microtubules (Gau et Roy 2018; Fernández-Barrera et al. 2018).

La mise en tension du cytosquelette d'actine entraine la translocation nucléaire de facteurs de transcription tels que MRTF. Cette mise en tension induit la polymérisation de l'actine via l'activation des Rho-GTPases. Cela engendre le recrutement de monomères d'actine G et leur dissociation au facteur MRTF dans le cytoplasme (Vartiainen et al. 2007). La dissociation du complexe MRTF/actine G est facilitée par les protéines de liaison à l'actine (ABP) telles que la moésine. La phosphorylation de la moésine permet sa liaison à l'actine et par conséquent, augmente la translocation nucléaire de MRTF-A (Karvar et al. 2019). Dans les fibroblastes embryonnaires de souris (NIH3T3), la dissociation du complexe MRTF/actine-G est également facilitée par la phosphorylation du résidu Sérine 98 de MRTF-A par ERK (Panayiotou et al. s. d.). MRTF-A est ainsi transloqué dans le noyau pour se lier à SRF, afin d'induire la transcription de gènes cibles tel que *ACTA2* (Miralles et al. 2003b).

La localisation nucléaire de MRTF-A est aussi induite par un régulateur de l'actine nucléaire, nommé Molecule Interacting with CasL2 (MICAL2), enrichi dans le noyau (Hung et Terman 2011). En effet, dans les cellules embryonnaires humaines de rein (HEK293), MICAL2 induit l'exclusion des monomères d'actine-G du noyau à travers l'oxydation de leur résidu Méthionine 44, induisant la dissociation du complexe MRTF-A/actine-G et permettant l'association MRTF-A/SRF (Lundquist et al. 2014).

En revanche, la phosphorylation de la Serine 33 de MRTF-A, permet à l'actine-G nucléaire de se lier au facteur de transcription, ce qui induit son exportation dans le cytoplasme et la diminution de la transcription des gènes cibles de SRF (Panayiotou et al. s. d.).

III.2.2.5. Voie YAP et TAZ

L'état du cytosquelette d'actine est un élément important régulant la translocation nucléaire des facteurs de transcription YAP et TAZ. YAP et TAZ ont été décrits initialement dans le cadre de la voie Hippo (Pfleger 2017). La polymérisation de l'actine suite à l'activation de la GTPase Rho, entraine la translocation nucléaire de YAP et TAZ à travers des mécanismes indépendants de la voie Hippo (Z. Wang et al. 2019; Dupont et al. 2011). Le complexe de liaison du cytosquelette et du nucléosquelette (LINC), permet l'interaction des fibres de stress au noyau cellulaire (Lombardi et al. 2011). L'application de forces mécaniques par le cytosquelette d'actine entraine la déformation des pores nucléaires, ce qui augmente leur perméabilité aux molécules cytoplasmiques et notamment l'importation nucléaire de YAP (Noguchi, Saito, et Nagase 2018; Elosegui-Artola et al. 2017) (Miranda et al. 2017; Mana-Capelli et al. 2014; Dupont 2016).

Les fibroblastes pulmonaires humains cultivés sur un substrat souple, présentent de faibles niveaux et une coloration cytoplasmique diffuse de YAP/TAZ. Les mêmes cellules fixées à un substrat rigide présentent des niveaux plus élevés de YAP/TAZ nucléaire (F. Liu et al. 2015).

IV. Participation du cytosquelette d'actine à la fibrogénèse

La fibrose est définie par une accumulation de matrice extracellulaire, notamment de collagène fibrillaire de type 1 dans le poumon. Les cellules mésenchymateuses pulmonaires sont la principale source de protéines de matrice dans le contexte de la fibrogénèse pulmonaire.
Le remodelage du cytosquelette d'actine est une caractéristique centrale des cellules mésenchymateuses pulmonaires au cours de la fibrogénèse. D'une part, il définit le phénotype myofibroblastique de cellules mésenchymateuses. D'autre part, le cytosquelette d'actine joue un rôle de premier plan dans l'activation des voies de signalisation aboutissant à la différenciation profibrosante, en permettant la perception par la cellule des propriétés mécaniques de l'environnement. Dans les maladies fibrosantes, la rigidité des tissus est augmentée. La différenciation myofibroblastique induite par une matrice rigide a largement été rapportée dans les fibroblastes isolés du cœur (Galie, Westfall, et Stegemann 2011), du foie (Olsen et al. 2011; Z. Li et al. 2007) mais aussi des poumons (Goffin et al. 2006; Wipff et al. 2007; F. Liu et al. 2010).

IV.1. Remodelage du cytosquelette d'actine dans les cellules mésenchymateuses : Description

La différenciation myofibroblastique des cellules mésenchymateuses pulmonaires joue un rôle essentiel dans la fibrogénèse (Maria et al. 2020). La différenciation myofibroblastique est définie par le remodelage du cytosquelette d'actine, notamment à travers la formation de fibres de stress (Sandbo et Dulin 2011).
A l'échelle ultra structurale, les myofibroblastes sont caractérisés par une structure particulière appelée fibronexus (FNX). FNX est un marqueur caractéristique des myofibroblastes lorsque les cellules sont observées en microscopie électronique à transmission (MET). Le FNX est composé de filaments d'actines intracellulaires positifs à l'α-SMA (ACTA2) étroitement associés aux faisceaux de fibronectine extracellulaires orientés longitudinalement (**Figure 12**) (Karvonen et al. 2012).

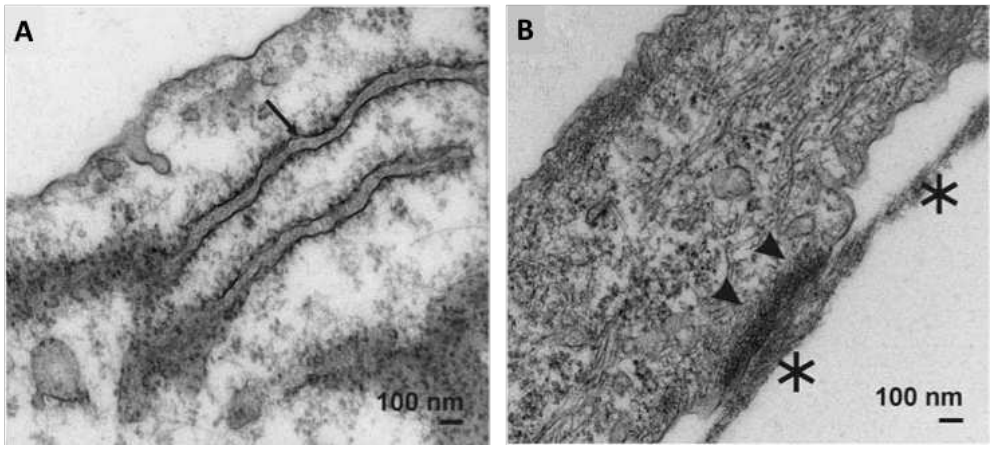


Figure 12: Microscopie électronique montrant les caractéristiques cellulaires typiques des cellules provenant du lavage broncho-alvéolaire (LBA) de patients atteints de différentes maladies pulmonaires (Karvonen et al. 2012)**. (A) Un fibroblaste normal provenant d'un patient atteint de sarcoïdose. Le réticulum endoplasmique rugueux (flèche) n'est pas dilaté et la ceinture d'actine n'est pas visible. (B) Fibronexus (en forme de piste) d'un patient atteint de FPI, dans lequel le long faisceau de fibronectine (astérisque) suit longitudinalement la membrane cellulaire. Le myofibroblaste contient également une ceinture d'actine (tête de flèche) à la périphérie de la cellule.**

Dans les fibroblastes pulmonaires, la différenciation myofibroblastique induite par la culture sur substrat rigide, est caractérisée par l'augmentation du ratio actine-F/actine-G (**Figure 13A**) et la formation de fibres de stress positives à l'α-SMA (ACTA2) (**Figure 13B**) (X. Huang et al. 2012; Hinz et al. 2007).

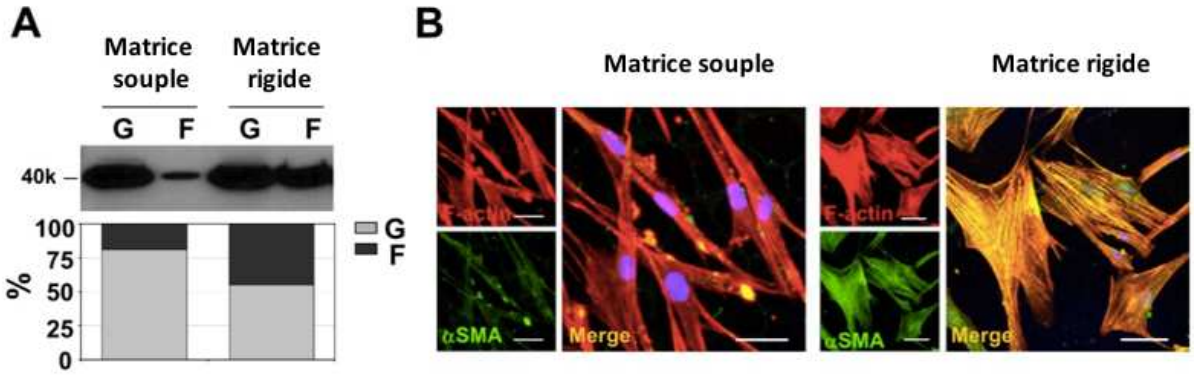


Figure 13 : La matrice rigide induit des changements dans la dynamique de l'actine en faveur de la polymérisation de l'actine F et de la formation de fibres de stress riche en α-SMA. **Les cellules CCL-210 ont été cultivées sur des gels de polyacrylamide souples et rigides pendant 48 heures. A) Les changements dans la dynamique de l'actine ont été déterminés par des mesures de la teneur en actine F/G à l'aide d'analyses immunoblot et**

densitométriques. B) Les cellules ont été fixées et colorées pour l'α-SMA avec un anticorps anti-α-SMA conjugué au FITC (vert) et pour l'actine F avec de la phalloïdine conjuguée à la rhodamine (rouge). Des images immunofluorescentes confocales ont été prises et superposées pour colocaliser l'expression d'α-SMA et l'actine F (jaune). Les noyaux ont été colorés avec du DAPI. Barres d'échelle : 50 mm (D'après (X. Huang et al. 2012)**).**

IV.2. Implication de la voie du TGFβ

Le TGFβ1 est une cytokine profibrosante majeure et un régulateur clé de la fibrose dans de multiples organes (Leask et Abraham 2004). La mise en tension du cytosquelette d'actine est nécessaire à l'activation de cette voie via l'intégrine αvβ6.

Dans le poumon non lésé, l'intégrine αvβ6 est faiblement exprimée. L'expression de l'intégrine αvβ6 est induite après une lésion pulmonaire (Breuss et al. 1993; X. Z. Huang et al. 1996). Chez les souris KO de l'intégrine β6, la réponse inflammatoire pulmonaire après instillation intratrachéale de bléomycine est exagérée dans les poumons et la peau, rappelant l'inflammation exagérée observée chez les souris homozygotes dépourvues de TGFβ1-/-. En revanche, les souris β6-/- sont protégées de la fibrose pulmonaire (Munger et al. 1999). L'inhibition de l'intégrine β6 (à la fois par KO génétique et par des anticorps anti-αvβ6) protège de la fibrose pulmonaire radio-induite (Puthawala et al. 2008). L'analyse par microarray des poumons de souris de type sauvages ou β6-/- a permis d'identifier un groupe de gènes inductibles par le TGFβ qui sont induits à des niveaux plus faibles chez les souris β6-/- (Kaminski et al. 2000). L'inhibition de Rho et de l'intégrine αvβ6 réprime la phosphorylation de SMAD2/3 induite par l'étirement mécanique (Froese et al. 2016).
L'activation mécanique du TGFβ1 nécessite son interaction avec l'intégrine αvβ6 et montre le rôle majeur du cytosquelette d'actine au cours de la fibrose pulmonaire (N. C. Henderson et Sheppard 2013; Munger et al. 1999).

IV.3. Implication de la voie FAK/Rho/ROCK

Dans les fibroblastes pulmonaires et dermaux de patients atteints de fibrose, l'activation de FAK et de la voie Rho/ROCK suite à la rigidification de la MEC, se traduit par des changements phénotypiques profibrosants notamment par leur différenciation en myofibroblastes exprimant ACTA2 (Greenberg et al. 2006; Akhmetshina et al. 2008).

Au cours de la fibrose pulmonaire, FAK est majoritairement retrouvée sous sa forme phosphorylée capable d'activer la voie Rho-ROCK (Lagares et Kapoor 2013; Shimizu et al. 2001). L'inhibition pharmacologique (TAE226) de FAK réprime la prolifération des fibroblastes pulmonaires induite par les facteurs de croissance, mais également la production de COL1 et ACTA2 induite par le TGFβ (Kinoshita et al. 2013). Dans le modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, l'inhibition pharmacologique de FAK réduit le nombre de cellules pulmonaires mésenchymateuses et la production de collagène dans les poumons (Kinoshita et al. 2013).

L'inhibition pharmacologique de ROCK par le fasudil a montré son effet thérapeutique pour la fibrose pulmonaire chez l'animal (Y. Zhou et al. 2013b). Le fasudil est une petite molécule qui entre en compétition avec l'ATP sur ROCK. L'inhibition de ROCK par le fasudil réprime la différenciation myofibroblastique et la résistance à l'apoptose des myofibroblastes pulmonaires (Y. Zhou et al. 2013b). De plus, le fasudil permet le blocage du développement des lésions pulmonaires induites par une hypoxie chez le rat néonatal (Qi et al. 2015) mais également l'atténuation de la fibrose pulmonaire dans le modèle murin induit par la bléomycine, à travers la diminution de la production de facteurs de croissance tels que le TGFβ et CTGF, et la diminution de l'expression d'ACTA2 (Jiang et al. 2012).

IV.4. Implication de la voie MRTF

Dans les fibroblastes pulmonaires de patients atteints de FPI, la localisation nucléaire de MRTF est augmentée par rapport aux fibroblastes pulmonaires normaux (Y. Zhou et al. 2013b). La rigidité de la MEC régule le cytosquelette d'actine mais aussi la voie de mécanotransduction MRTF/SRF. Lorsque les fibroblastes pulmonaires sont cultivés sur une matrice rigide, le ratio actine-F/actine-G augmente en faveur de la polymérisation des filaments d'actine. Les complexes actine-G/MRTF sont alors dissociés, induisant la translocation nucléaire de MRTF et sa liaison au facteur de transcription SRF. Le complexe nucléaire MRTF/SRF interagit avec le promoteur du gène de l'α-SMA afin d'induire sa transcription (X. Huang et al. 2012). La différenciation myofibroblastique induite par une matrice rigide est diminuée dans les fibroblastes pulmonaires isolés de souris KO pour *MRTF*. Le niveau d'expression d'ACTA2 est retourné à l'état basal (équivalent à une matrice souple) dans les fibroblastes pulmonaires de souris KO pour *MRTF* cultivés sur une matrice rigide (X. Huang et al. 2012) .

L'inhibition pharmacologique de la voie MRTF/SRF par le CCG-203971 ou le KO de *MRTF* chez les souris exposées à la bléomycine, attenue l'expression d'α-SMA et la synthèse de collagène, diminue la résistance à l'apoptose des myofibroblastes, et diminue la fibrose pulmonaire (Sisson et al. 2015; Luchsinger et al. 2011; Y. Zhou et al. 2013a).

IV.5. Implication de la voie YAP et TAZ

La rigidité de la MEC induit la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes notamment à travers la translocation nucléaire de YAP et TAZ. L'inhibition de *YAP* par un siRNA, diminue l'expression d'ACTA2 et du TGFβ1 ainsi que la libération de TGFβ1 dans les myofibroblastes préadipocytes 3T3-L1 et myoblastes C2C12 murins cultivés sur une matrice de collagène fibrillaire (rigide) (X. Liu et al. 2018).

Dans les poumons de patients atteints de FPI, les facteurs YAP et TAZ sont fortement exprimés dans les foyers fibroblastiques, particulièrement au niveau nucléaire. Dans les fibroblastes pulmonaires cultivés *in vitro*, la répression de *TAZ* par un ARN interférent inhibe la différenciation myofibroblastique induite par le culture sur un substrat rigide, ainsi que l'expression du CTGF (Noguchi et al. 2017).

Lorsque les fibroblastes sont transduits avec des constructions mutantes de *YAP* et *TAZ* constitutivement actives, les cellules surmontent les limitations de croissance de la matrice molle et présentent une synthèse matricielle accrue. De plus, le transfert de ces fibroblastes par voie intraveineuse chez la souris mâle immunodéprimée (NSG, Non Obeses Diabetic (NOD) SCID Gamma), entraîne un remodelage et une fibrose profonde dans les poumons, ce qui démontre que l'activation de YAP/TAZ est suffisante pour induire un phénotype fibrogène (F. Liu et al. 2015).

V. Données préliminaires

Notre hypothèse générale est que le cytosquelette d'actine joue un rôle important dans la fibrogénèse et qu'il représente une cible thérapeutique accessible. Les données préliminaires indiquent un rôle potentiel du complexe Arp2/3, un acteur majeur de la polymérisation branchée, et de LIMCH1, un constituant des fibres de stress, dans l'expression d'ACTA2 et de COL1.

V.1. Complexe Arp2/3

L'implication du complexe Arp2/3 a été suggérée dans les travaux réalisés sur Forkhead Box F1 (FOXF1). FOXF1 est une protéine de liaison à l'ADN qui exerce une activité antifibrosante *in vitro* et *ex vivo*. Dans les fibroblastes pulmonaires normaux, FOXF1 réprime la croissance cellulaire, l'expression de COL1 et la sous-unité ARPC2 du complexe Arp2/3.

L'inhibition d'ARPC2 par siRNA réprime l'expression de COL1 (**Figure 14A**) et la croissance cellulaire (**Figure 14B**) ce qui suggère que FOXF1 agit en partie par la répression d'ARPC2 (Melboucy-Belkhir et al. 2014).

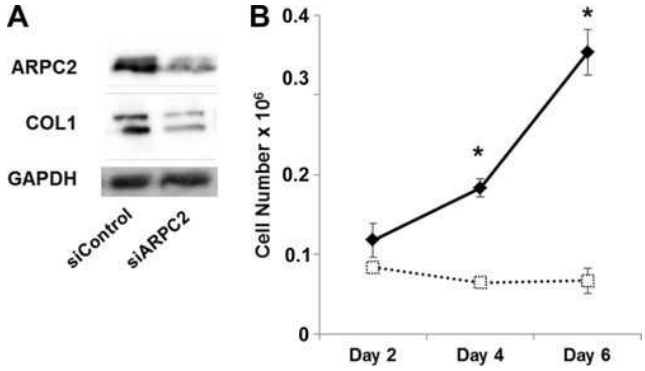


Figure 14 : Le siRNA ciblant ARPC2 réprime l'expression de COL1 et la proliferation des fibroblastes pulmonaires CCL-210 (Melboucy-Belkhir et al. 2014)**. A) Western blot (n = 3), *siARPC2* diminue l'expression d'ARPC2 et de COL1 dans les fibroblastes pulmonaires CCL-210, 5 jours après la transfection, comparé au *siContrôle*. B) La transfection du siRNA ciblant *ARPC2* (ligne pointillée) bloque la proliferation en comparaison au *siContrôle* (ligne pleine) (n = 4). Moyenne ± Ecart-type. *$p < 0.05$ comparé au *siContrôle*.**

V.2. LIMCH1

L'implication de LIMCH1 a été suggérée par les données recueillies dans un travail de criblage protéomique. LIMCH1 était surexprimée dans le cytosol des fibroblastes de patients atteints de FPI comparés aux fibroblastes de patients indemnes de FPI. La répression de LIMCH1 par des petits ARN interférents réduisait l'expression d'ACTA2 et COL1 induite par le TGFβ1.

V.2.1. Données protéomiques

Une analyse protéomique des fractions cellulaires a comparé les fibroblastes pulmonaires de 5 patients atteints de FPI aux fibroblastes pulmonaires de 5 patients contrôles et 3 patients atteints

de PID associée à la sclérodermie. Par fractionnement subcellulaire, 2251 protéines nucléaires, 4374 protéines cytosoliques et 4699 protéines membranaires ont été identifiées.

L'hypothèse que de nouveaux régulateurs de la fibrogenèse pourraient être identifiés parmi les protéines régulées dans les fibroblastes de FPI, a été émise. Sur un total de 231 protéines régulées dans les différentes fractions des fibroblastes de FPI, 41 protéines ont été identifiées comme régulateurs potentiels du phénotype fibroblastique. Sur la base de leur expression dans la même fraction de fibroblastes de sclérodermie, de leur expression au niveau de l'ARNm dans une méta-analyse de puces à ADN chez les patients atteints de FPI (Plantier et al. 2016), et par une recherche documentaire (**Tableau 3** – données non publiées). LIMCH1 était surexprimée dans le cytosol des fibroblastes de patients atteints de FPI comparés aux fibroblastes de patients indemnes de FPI (**Figure 15A**).

Tableau 3:Sélection des protéines candidates pour l'analyse fonctionnelle in vitro.

Uniprot ID	Gene symbol	Full name	Cell fraction	Up in SSc	Up at mRNA	Literature search
HDGR3_HUMAN	HDGFRP3	Hepatoma-derived growth factor-related protein 3	Cytosol		X	
AKA12_HUMAN	AKAP12	A-kinase anchor protein 12	Cytosol	X		
PGS1_HUMAN	BGN	Biglycan	Cytosol		X	(Shimizu-Hirota et al. 2004)
PMGE_HUMAN	BPGM	Bisphosphoglycerate mutase	Cytosol		X	
CN166_HUMAN	C14orf166	UPF0568 protein C14orf166	Membrane		X	
APLF_HUMAN	C2orf13	Aprataxin and PNK-like factor	Nucleus	X		
CD5R1_HUMAN	CDK5R1	Cyclin-dependent kinase 5 activator 1	Nucleus	X		
TETN_HUMAN	CLEC3B	Tetranectin	Membrane	X		
DAG1_HUMAN	DAG1	Dystroglycan	Membrane	X		(Bedossa et al. 2002)
FANCB_HUMAN	FANCB	Fanconi anemia group B protein	Membrane	X		
FMN1_HUMAN	FMN1	Formin-1	Cytosol	X		
GFPT1_HUMAN	GFPT1	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1	Cytosol	X	X	
NOG2_HUMAN	GNL2	Nucleolar GTP-binding protein 2	Nucleus	X		
GNA1_HUMAN	GNPNAT1	Glucosamine 6-phosphate N-acetyltransferase	Membrane	X		
GRB2_HUMAN	GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2	Nucleus		X	(S. Zhang et al. 2003, 2)
I2BP1_HUMAN	IRF2BP1	Interferon regulatory factor 2-binding protein 1	Membrane	X		
KI13B_HUMAN	KIF13B	Kinesin-like protein KIF13B	Membrane	X		
LIMC1_HUMAN	LIMCH1	LIM and calponin homology domains-containing protein 1	Cytosol	X		
LSAMP_HUMAN	LSAMP	Limbic system-associated membrane protein	Nucleus	X		
MAP1B_HUMAN	MAP1B	Microtubule-associated protein 1B	Cytosol	X		

NBEA_HUMAN	NBEA	Neurobeachin	Nucleus	X		
PCY1A_HUMAN	PCYT1A	Choline-phosphate cytidylyltransferase A	Membrane	X		
MYOME_HUMAN	PDE4DIP	Myomegalin	Nucleus	X		
PLA2R_HUMAN	PLA2R1	Secretory phospholipase A2 receptor	Cytosol	X		
PPCE_HUMAN	PREP	Prolyl endopeptidase	Cytosol	X		(Macconi et al. 2012)
PTPRU_HUMAN	PTPRU	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase U	Nucleus	X		
RMXL2_HUMAN	RBMXL2	RNA-binding motif protein, X-linked-like-2	Cytosol	X		
RN213_HUMAN	RNF213	E3 ubiquitin-protein ligase RNF213	Cytosol	X		
ROCK1_HUMAN	ROCK1	Rho-associated protein kinase 1	Cytosol		X	(Y. Zhou et al. 2013c)
RUNX1_HUMAN	RUNX1	Runt-related transcription factor 1	Nucleus		X	(W. Kim et al. 2014, 1)
SHLB1_HUMAN	SH3GLB1	Endophilin-B1	Nucleus	X		
SNX2_HUMAN	SNX2	Sorting nexin-2	Nucleus	X		
SSU72_HUMAN	SSU72	RNA polymerase II subunit A C-terminal domain phosphatase SSU72	Cytosol	X		
STON2_HUMAN	STON2	Stonin-2	Nucleus	X		
ELOB_HUMAN	TCEB2	Transcription elongation factor B polypeptide 2	Membrane	X		
TLN1_HUMAN	TLN1	Talin-1	Cytosol	X		(Manso et al. 2013)
TM192_HUMAN	TMEM192	Transmembrane protein 192	Cytosol	X		
TNFL8_HUMAN	TNFSF8	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 8	Nucleus	X		(Zhu et al. 2015)
TBA1C_HUMAN	TUBA1C	Tubulin alpha-1C chain	Cytosol	X	X	
USP9X_HUMAN	USP9X	Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X	Cytosol	X		
VP13C_HUMAN	VPS13C	Vacuolar protein sorting-associated protein 13C	Cytosol	X		

V.2.2. Données fonctionnelles : esiRNA

La participation à la différenciation profibrosante des 41 protéines candidates a été évaluée dans une étape de criblage fonctionnel. Des fibroblastes pulmonaires humains (CCD16Lu, ATCC) ont été transfectés par 41 petits ARN interférents (endoribonuclease prepared siRNA – esiRNA) ciblant chacune de ces protéines. L'expression d'ACTA2 et COL1 a été évaluée. La répression de LIMCH1 entrainait une diminution de l'expression de COL1 (**Figure 15B**) et d'ACTA2 (**Figure 15C**) dans les fibroblastes CCD16Lu stimulés par le TGFβ1.

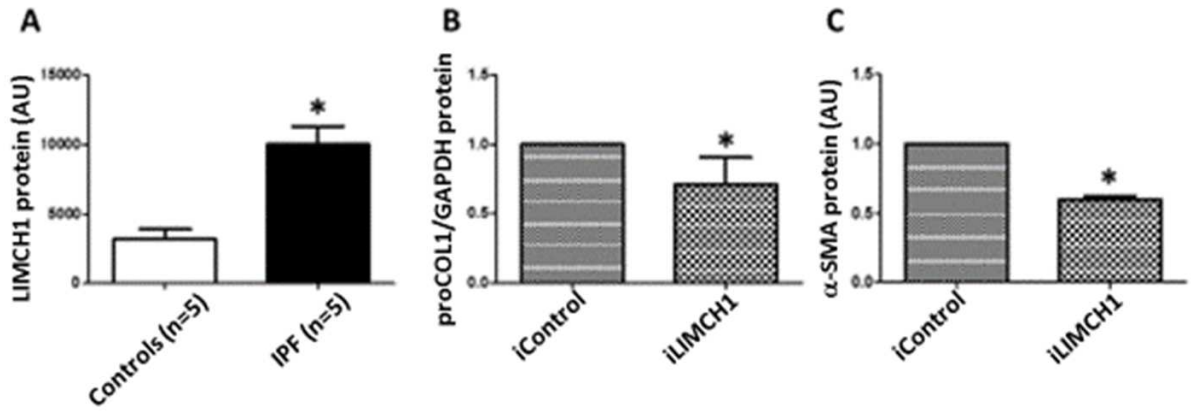


Figure 15 : Expression et répression de LIMCH1 dans les fibroblastes pulmonaires humains.

A) LIMCH1 était surexprimé dans le cytosol des fibroblastes pulmonaires de patients FPI (n = 5). B) Le esiRNA LIMCH1 réprimait l'expression de COL1 dans les fibroblastes pulmonaires CCD16-Lu stimulés par le TGFβ1. C) Le esiRNA LIMCH1 réprimait l'expression d'ACTA2 dans les fibroblastes pulmonaires CCD16-Lu stimulés par le TGFβ1. Moyenne ± SE. *p < 0.05 comparé aux fibroblastes contrôles ou esiContrôle.

VI. Hypothèses et objectifs de la thèse

Les traitements administrés aux patients atteints de PID, ne parviennent pas à stopper la progression de la fibrose mais seulement à la ralentir. Il existe un besoin pour de nouveaux traitements des PID. Notre hypothèse était que le cytosquelette d'actine joue un rôle important dans la différenciation des cellules mésenchymateuses au cours de la fibrogénèse, représentant une cible thérapeutique accessible.

La première partie de ma thèse a été consacrée à l'étude de l'inhibition du complexe Arp2/3 *in vitro* et *in vivo*.

La deuxième partie s'est focalisée sur le rôle d'une nouvelle cible thérapeutique potentiellement impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine, LIMCH1.

La troisième partie a évalué la faisabilité d'une thérapie ciblant le cytosquelette d'actine, basée sur l'administration d'oligonucléotides antisens (ASOs) administrés par voie aérienne.

VI.1. Première partie : Complexe Arp2/3 *in vitro* et *in vivo*

L'implication de la polymérisation linéaire de l'actine, dans la pathogénicité de la fibrose, est bien décrite dans la littérature. Aucune donnée n'a été rapportée concernant l'implication de la polymérisation branchée de l'actine induite par le complexe Arp2/3 dans la fibrogenèse. La première hypothèse était que le complexe Arp2/3 joue un rôle dans le processus de fibrogénèse.

Dans un premier temps, nous avons voulu décrire le niveau d'expression du complexe Arp2/3 dans le poumon humain sain et atteint de FPI. Dans un deuxième temps, nous avons évalué les effets biologiques de l'inhibition du complexe Arp2/3 ou de ces sous-unités, dans des fibroblastes pulmonaires humains, dans un contexte profibrosant (stimulation au TGFβ1), ainsi que leurs mécanismes. Dans un troisième temps, nous avons voulu montrer que l'inhibition du complexe Arp2/3 prévenait la fibrogenèse dans le modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine.

VI.2. Deuxième partie : Rôle de LIMCH1 dans la fibrogenèse *in vitro*

LIMCH1 est un composant des fibres de stress. La deuxième hypothèse est que LIMCH1 jouerait un rôle dans la modulation du phénotype profibrosant des fibroblastes pulmonaires au cours de la FPI. Les fonctions biologiques de LIMCH1 sont mal connues. Nous avons étudié l'expression de LIMCH1 dans des fibroblastes pulmonaires de patients FPI. L'expression de LIMCH1 dans les fibroblastes pulmonaires humains a été réprimée de façon transitoire et de façon pérenne à l'aide d'oligonucléotides antisens (ASO) et de short hairpin RNAs (shRNA), afin de déterminer si LIMCH1 était nécessaire à l'expression d'ACTA2 et COL1 à l'état basal et en présence de TGFβ1.

VI.3. Troisième partie : Approche thérapeutique via des oligonucléotides antisens par voie aérienne

La troisième hypothèse était que l'administration d'ASO par voie aérienne serait une approche thérapeutique applicable au traitement de la fibrose pulmonaire induite par le bléomycine. Nous nous sommes focalisés sur la mise en place d'une thérapie locale basée sur des oligonucléotides antisens (ASOs) administrés par voie aérienne, pour le traitement de la fibrose pulmonaire. L'ARNm *Limch1* a été ciblé comme modèle d'étude, dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine.

Partie II : Inhibition du complexe Arp2/3 réprime la différenciation des myofibroblastes pulmonaires humains et atténue la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris.

I. Introduction

La réorganisation du cytosquelette d'actine est une caractéristique morphologique majeure des cellules mésenchymateuses au cours de la fibrogénèse (Hinz et al. 2012; X. Huang et al. 2012). Le rôle joué dans la transformation phénotypique des cellules mésenchymateuses par les voies contrôlant la polymérisation linéaire du cytosquelette d'actine, telles que Rho/ROCK et FAK, (Knipe, Tager, et Liao 2015; Greenberg et al. 2006; Akhmetshina et al. 2008), est bien démontré. Par contre, le rôle joué par les voies contrôlant la polymérisation branchée de l'actine est mal connu.

L'hypothèse de ce travail était que le complexe Arp2/3, qui est le régulateur principal de la polymérisation branchée du cytosquelette d'actine, joue un rôle dans le changement phénotypique des cellules mésenchymateuses et le processus de fibrogenèse. Les données issues des études de microarray et de scRNAseq soutiennent cette hypothèse.

Données issues des bases de données transcriptomiques.

L'hypothèse d'une implication du complexe Arp2/3 dans le fibrogénèse pulmonaire est soutenue par les données transcriptomiques disponibles en ligne.

Données de microarray. La sous-unité ARP3 est nécessaire à l'expression de fibres de stress induite par le TGFβ1 dans les fibroblastes pulmonaires de souris (Cai et al. 2012). Les bases de données de microarrays GDS5078 et GDS4902 rapportent une expression accrue des ARNm de la sous-unité APRC2 dans les poumons de souris présentant une fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (Rajasekaran et al. 2013; T. Liu et al. 2011), et une expression accrue de l'ARNm *ARPC2* dans le poumon atteint de FPI est rapportée dans la base de données GDS4279 (Meltzer et al. 2011).

Données de séquençage en cellule unique (scRNAseq). Les bases de données de séquençage en cellule unique provenant de l'IPF cell atlas (http://ipfcellatlas.com/), rapportent que les sous-unités ARP2, ARP3 et ARPC2 sont exprimées dans les fibroblastes de patients atteints de FPI, au même niveau que chez les sujets sains (**Figure 16**).

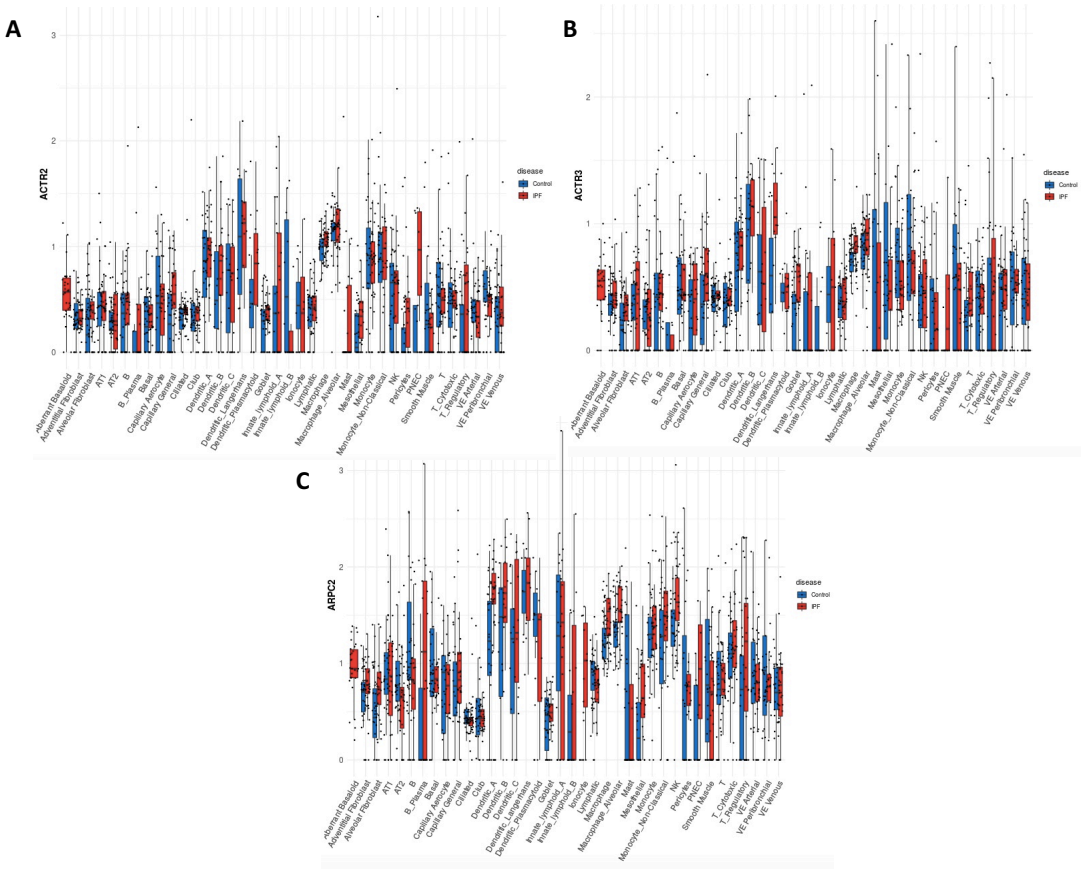


Figure 16: Expression des sous-unités ARP2, ARP3 et ARPC2 dans les cellules de patients atteints ou indemnes de FPI.

Les objectifs de ce travail étaient 1) d'évaluer l'expression du complexe Arp2/3 dans les cellules mésenchymateuses pulmonaires de patients atteints de FPI *in vitro* et *in vivo*, 2) d'étudier les effets de l'inhibition du complexe Arp2/3 *in vitro* dans les fibroblastes pulmonaires humains par des siRNAs ciblant ARPC2, ARP2, ARP3 ou un inhibiteur pharmacologique du complexe Arp2/3, le CK666, et 3) d'observer l'impact de l'inhibition du complexe Arp2/3 par le CK666 *in vivo*, dans les poumons de souris exposées à la bléomycine.

II. Article publié dans British Journal of Pharmacology (IF : 8,739)

Traduction partielle de l'article (Mergault et al. 2021)

L'Inhibition du complexe Arp2/3 réprime la différenciation des myofibroblastes pulmonaires humains et atténue la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine.

Coralie Mergault[1,2], Fanny Lisée[1,2], Victor Tiroille[1,2], Mélia Magnien[1,2], Christelle Parent[1], Woodys Lenga Mabonda[1,2], Damien Sizaret[1,2,3], Madeleine Jaillet[4], Bruno Crestani[4,5], Sylvain Marchand-Adam[1,2,6], Laurent Plantier[1,2,6]

Affiliations

[1]Centre d'Etudes des Pathologies Respiratoires / Inserm UMR1100, Tours, France

[2]Université de Tours, Tours, France

[3]CHRU de Tours, Service d'Anatomie Pathologique, Tours, France

[4]Université Paris, Inserm U1152, F-7518, Paris, France

[5]Service de Pneumologie Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, F-75018, Paris, France

[6]CHRU de Tours, Service de Pneumologie et Explorations Fonctionnelles Respiratoires, Tours, France

Introduction **:** Les pneumopathies interstitielles diffuses fibrosantes (PID) constituent un groupe de maladies pulmonaires chroniques où la fibrose progressive des régions alvéolaires entraîne une insuffisance respiratoire. Les PID ont un mauvais pronostic, et les options thérapeutiques font défaut. Les PID comprennent des maladies liées à des processus inflammatoires ou auto-immuns, comme la sclérose systémique ou la pneumonie d'hypersensibilité chronique, ainsi que des maladies attribuées à l'activation directe de voies fibrogéniques, comme la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI). Les patients atteints d'une PID inflammatoire ou auto-immune bénéficient d'un traitement anti-inflammatoire ou immunosuppresseur, tandis que ces médicaments sont préjudiciables aux patients atteints de FPI (Adegunsoye & Strek, 2016). Deux médicaments, la pirfénidone et le nintedanib, ralentissent le déclin de la fonction pulmonaire et réduisent le risque de décès dans la FPI (Noble

et al., 2011 ; Richeldi et al., 2014) et d'autres PID (Flaherty et al., 2019 ; Maher et al., 2020), mais aucun n'arrête la progression de la maladie.

La différenciation de plusieurs types de cellules mésenchymateuses pulmonaires en cellules sécrétant du collagène et/ou exprimant l'actine des muscles lisses (ACTA2) est un événement pathogénique clé dans les PID fibrosantes, comme le montrent les études de scRNAseq (Tsukui et al., 2020 ; Xie et al., 2018). Les mécanismes d'activation des cellules mésenchymateuses pulmonaires comprennent des modifications épigénétiques de la chromatine (S. K. Huang et al., 2010), l'expression d'ARN non codants profibrotiques (Savary et al., 2019), et une perturbation des interactions épithélium-mésenchyme (Selman & Pardo, 2006). Les interactions épithélium-mésenchyme sont liées à des changements du phénotype des cellules épithéliales bronchiolaires et alvéolaires secondaires à des lésions répétées de l'épithélium. Ces changements incluent l'expansion d'une population de cellules basaloïdes qui expriment des marqueurs épithéliaux, mésenchymateux et des marqueurs de sénescence (Adams et al., 2020 ; Valenzi et al., 2021). Les interactions épithélium-mésenchyme impliquent de multiples médiateurs parmi lesquels le facteur de croissance transformant-β1 (TGFβ1) occupe une place prépondérante (Khalil et al., 1991). Le TGFβ1 active la voie canonique SMAD ainsi que de multiples voies non canoniques, notamment les MAP Kinases et la voie AKT/GSKβ/β-caténine (Lu et al., 2019).

En plus des modifications intrinsèques des cellules mésenchymateuses et des interactions cellule-cellule, les interactions matrice-mésenchyme contribuent à l'activation des fibroblastes pulmonaires au cours des PID. Les interactions entre la matrice et le mésenchyme comprennent à la fois des signaux indirects, tels que l'activation de médiateurs liés à la membrane, notamment le TGFβ1 (Munger et al., 1999) et des peptides de dégradation de la matrice ayant une activité de signalisation (Shiratsuchi et al., 2010), et une mécanotransduction directe où la rigidité de la matrice entraîne des changements dans le phénotype cellulaire. Le cytosquelette d'actine est au cœur des interactions matrice-mésenchyme et de la différenciation du mésenchyme.

Le cytosquelette d'actine permet la transmission des signaux mécaniques depuis les adhésions focales liées à la matrice jusqu'au nucléosquelette (Simon & Wilson, 2011), et participe ainsi à contrôler l'expression du génome. Lors de la tension du cytosquelette d'actine, les facteurs de transcription Yes-Associated Protein 1 (YAP1) et le complexe Myocardin Related Transcription Factor A/Serum Response Factor (MRTF-A/SRF) se transloquent dans le noyau et entraînent l'expression de gènes associés aux myofibroblastes tels que ACTA2 dans les

fibroblastes du poumon et de la peau (Simon & Wilson, 2011), ce qui favorise la fibrogenèse (F. Liu et al., 2015a).

De multiples protéines régulent et organisent le cytosquelette d'actine, parmi lesquelles les facteurs de nucléation sont essentiels. Les formines, qui sont activées par les petites GTPases Rho, dirigent la nucléation et l'élongation linéaire des filaments d'actine. Le rôle fibrogènique de la voie RhoGTPase-formine est démontré par l'effet bénéfique du fasudil, un inhibiteur de la protéine kinase ROCK (Rho-associated coiled-coil forming protein kinase) 1, dans le modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris (Zhou et al., 2013).

Le complexe protéique lié à l'actine (Arp)2/3, qui comprend 7 protéines (ARP2, ARP3, p41/ARPC1, p34/ARPC2, p21/ARPC3, p20/ARPC4 et p16/ARPC5), catalyse la nucléation de l'actine pour conduire la polymérisation ramifiée des monomères d'actine. Le complexe Arp2/3 est exprimé de manière ubiquitaire et régule des fonctions essentielles telles que la prolifération (Tang et al., 2016) et la migration (Suraneni et al., 2012) des cellules.

Le complexe Arp2/3 peut également participer à la mécanotransduction (Wu et al., 2012, p. 3). La sous-unité ARP3 est nécessaire à l'expression de fibres de stress induite par le TGFβ1 dans les fibroblastes pulmonaires de souris (G.-Q. Cai et al., 2012). Les bases de données de microarrays GDS5078 et GDS4902 rapportent une expression accrue des ARNm de la sous-unité Arp2/3 dans les poumons de souris présentant une fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (T. Liu et al., 2011, p. 2 ; Rajasekaran et al., 2013), tandis qu'une expression accrue de l'ARNm *ARPC2* dans le poumon atteint de FPI est rapportée dans la base de données GDS4279 (Meltzer et al., 2011).

A la lumière de ces éléments, nous avons émis l'hypothèse 1) que le complexe Arp2/3 est exprimé dans les cellules mésenchymateuses pulmonaires de patients FPI et dans les poumons de souris au cours de la fibrogenèse, 2) que l'inhibition du complexe Arp2/3 réprime la différenciation profibrotique des fibroblastes pulmonaires humains *in vitro*, et 3) que l'inhibition d'Arp2/3 prévient le développement de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris.

Résumé des résultats : L'expression des ARNm des sous-unités du complexe Arp2/3 est détectable dans les fibroblastes de patients atteints de FPI, à des niveaux similaires à ceux des fibroblastes de patients indemnes de FPI. Elle est augmentée dans les fibroblastes traités par le TGFβ1 et dans les poumons des souris traitées à la bléomycine par rapport aux contrôles. *In vitro*, le CK666 et *siARPC2* inhibent la croissance cellulaire et l'expression de l'actine des muscles lisses (ACTA2) et du collagène-1 (COL1) induite par le TGFβ1. Le CK666 diminue

également l'expression d'ACTA2 et du COL1 dans les cellules non stimulées. Le CK666 réduit la phosphorylation d'AKT et réprime les niveaux de phospho-GSK3β, de β-caténine et de MRTF-A dans les fibroblastes non stimulés. *In vivo*, le CK666 réduit les niveaux de procollagène-1 et de collagène insoluble chez les souris traitées à la bléomycine.

Conclusion : Le complexe Arp2/3 est surexprimé dans les contextes profibrotiques *in vitro* et *in vivo*. L'inhibition du complexe Arp2/3 réprime l'expression d'ACTA2 et COL1, et réprime la voie AKT/phospho-GSK3β/β-caténine/MRTF-A dans les fibroblastes pulmonaires humains. Le CK666 exerce des propriétés antifibrotiques dans le poumon après exposition à la bléomycine *in vivo*. L'inhibition du complexe Arp2/3 pourrait représenter une nouvelle voie thérapeutique pour le traitement de la FPI et d'autres PID.

Received: 1 October 2020 | Revised: 20 May 2021 | Accepted: 5 August 2021

DOI: 10.1111/bph.15675

RESEARCH PAPER

Inhibition of the Arp2/3 complex represses human lung myofibroblast differentiation and attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis

Coralie Mergault[1,2] | Fanny Lisée[1,2] | Victor Tiroille[1,2] | Mélia Magnien[1,2] | Christelle Parent[1] | Woodys Lenga Mabonda[1,2] | Damien Sizaret[3] | Madeleine Jaillet[4] | Bruno Crestani[4,5] | Sylvain Marchand-Adam[1,2,6] | Laurent Plantier[1,2,6]

[1]Centre d'Etudes des Pathologies Respiratoires, Inserm UMR1100, Tours, France

[2]Université de Tours, Tours, France

[3]CHRU de Tours, Service d'Anatomie Pathologique, Tours, France

[4]Université de Paris, Inserm UMR1152, Labex Inflamex, Paris, France

[5]Service de Pneumologie A, Assistance Publique—Hôpitaux de Paris, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, France

[6]CHRU de Tours, Service de Pneumologie et Explorations Fonctionnelles Respiratoires, Tours, France

Correspondence
Laurent Plantier, CEPR/Inserm UMR1100, 10 Bd Tonnellé, 37032 Tours Cedex, France.
Email: laurent.plantier@univ-tours.fr

Funding information
Isis Médical; Arair; Humanair Médical; LVL Medical; CHRU de Tours; Université François-Rabelais

Background and Purpose: The Arp2/3 multiprotein complex regulates branched polymerisation of the actin cytoskeleton and may contribute to collagen synthesis and fibrogenesis in the lung.

Experimental Approach: Expression of Arp2/3 components was assessed in human lung fibroblasts and in the bleomycin-induced pulmonary fibrosis model in mice. The Arp2/3 complex was repressed with the allosteric inhibitor CK666 and with interfering RNAs targeting the ARP2, ARP3 and ARPC2 subunits (*siARP2*, *siARP3* and *siARPC2*) in CCD-16Lu human lung fibroblasts in vitro. Mice received daily intraperitoneal injections of CK666 from the 7th to the 14th day after tracheal bleomycin instillation.

Key Results: Expression of Arp2/3 complex subunits mRNAs was increased in fibroblasts treated with TGF-β1 and in the lungs of bleomycin-treated mice compared with controls. In vitro, CK666 and *siARPC2* inhibited cell growth and TGF-β1-induced α-smooth muscle actin (ACTA2) and collagen-1 (COL1) expression. CK666 also decreased ACTA2 and COL1 expression in unstimulated cells. CK666 reduced Akt phosphorylation and repressed phospho-GSK3β, β-catenin and MRTF-A levels in unstimulated fibroblasts. In vivo, CK666 reduced levels of both procollagen-1 and insoluble collagen in bleomycin-treated mice.

Conclusion and Implications: Expression of the Arp2/3 complex was increased in profibrotic environments in vitro and in vivo. Inhibition of the Arp2/3 complex repressed ACTA2 and COL1 expression and repressed an Akt/phospho-GSK3β/β-catenin/MRTF-A pathway in lung fibroblasts. CK666 exerted antifibrotic properties in the lung in vivo. Inhibition of the Arp2/3 complex could represent an interesting new therapy for idiopathic pulmonary fibrosis and other fibrotic interstitial lung diseases.

KEYWORDS
actin, CK666, cytoskeleton, fibrosis

Abbreviations: Arp2/3, actin-related protein 2/3; ARPC2, actin related protein 2/3 complex subunit 2; CK666, 2-fluoro-*N*-[2-(2-methyl-1*H*-indol-3-yl)ethyl]benzamide); COL1, collagen-1; IPF, idiopathic pulmonary fibrosis; MRTF-A, myocardin-related transcription factor A; phospho-GSK3β, phospho-glycogen synthase kinase 3β.

 © 2021 The British Pharmacological Society

1 | INTRODUCTION

Fibrotic interstitial lung diseases (ILDs) are a group of chronic lung diseases where fibrosis of alveolar regions leads to respiratory failure. ILDs carry a poor prognosis, and therapeutic options are lacking. ILDs comprise diseases related to inflammatory or autoimmune processes, such as systemic sclerosis or chronic hypersensitivity pneumonitis, as well as diseases driven by direct activation of fibrogenic pathways, such as idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). Patients with inflammatory or autoimmune ILDs benefit from anti-inflammatory or immunosuppressive therapy, whereas such drugs are detrimental to patients with IPF (Adegunsoye & Strek, 2016). Two drugs, **pirfenidone** and **nintedanib**, slow the decline of lung function and reduce the risk of death in IPF (Noble et al., 2011; Richeldi et al., 2014) and other ILDs (Flaherty et al., 2019; Maher et al., 2020), although halts the progress of disease.

Differentiation of multiple resident lung mesenchymal cell types into collagen-secreting and/or α-smooth muscle actin (ACTA2)-expressing cells is a key pathogenic event in fibrotic ILDs as shown by single-cell RNA-Seq studies (Tsukui et al., 2020; Xie et al., 2018). The mechanisms driving activation of lung mesenchymal cells include cell-autonomous determinants such as epigenetic chromatin alterations (Huang et al., 2010), expression of profibrotic non-coding RNAs (Savary et al., 2019) and epithelium–mesenchyme interactions (Selman & Pardo, 2006). Epithelium–mesenchyme interactions relate to changes in the phenotype of bronchiolar and alveolar epithelial cells. These changes include the expansion of a basaloid cell population that expresses epithelial, mesenchymal, senescence and developmental markers (Adams et al., 2020; Valenzi et al., 2021) and may be related to repeated injury to the epithelium. Epithelium–mesenchyme interactions involve multiple mediators among which **TGF-β1** is prominent (Khalil et al., 1991). TGF-β1 activates the canonical SMAD pathway as well as multiple non-canonical pathways including **MAP kinases** and the **Akt/GSKβ/β-catenin** pathway (Lu et al., 2019).

In addition to cell-autonomous mechanisms and cell–cell interactions, matrix–mesenchyme interactions contribute to lung fibroblast activation. Matrix–mesenchyme interactions comprise both indirect signals, such as activation of membrane-bound mediators including TGF-β1 (Munger et al., 1999) and matrix degradation peptides with signalling activity (Shiratsuchi et al., 2010), and direct mechanotransduction where matrix stiffness drives changes in cell phenotype. The actin cytoskeleton is central to matrix–mesenchyme interactions and mesenchyme differentiation. The actin cytoskeleton connects matrix-bound focal adhesions with the nucleoskeleton and transmits mechanical cues to the nucleus (Simon & Wilson, 2011). Upon tension of the actin cytoskeleton, the transcription factors yes-associated protein 1 (YAP1) and the myocardin-related transcription factor A/serum response factor complex (MRTF-A/**SRF**) translocate to the nucleus and drive expression of myofibroblast-associated genes such as *ACTA2* in lung and skin fibroblasts (Simon & Wilson, 2011), thus driving fibrogenesis (Liu et al., 2015).

What is already known

- Differentiation of mesenchymal cells into COL1-secreting and/or ACTA2-expressing cells plays key roles in fibrotic ILD.
- The actin cytoskeleton is central to matrix–mesenchyme interactions and mesenchyme differentiation.

What this study adds

- CK666, an Arp2/3 inhibitor, represses an Akt/pGSK3β/β-catenin/MRTF-A pathway *in vitro*
- Arp2/3 inhibition represses COL1 and ACTA2 expression by lung fibroblasts and lung fibrosis in mice

What is the clinical significance?

- Inhibition of the Arp2/3 complex may be a new treatment avenue for fibrotic ILD.

Many proteins regulate and organise the actin cytoskeleton, among which nucleating factors are key. Formins, which are activated by the Rho small GTPases, drive tip nucleation and linear elongation of actin filaments. The fibrogenic role of the RhoGTPase–formin pathway is demonstrated by the beneficial effect of **fasudil**, an inhibitor of **Rho-associated coiled-coil forming protein kinase (ROCK) 1**, in the bleomycin-induced lung fibrosis model in mice (Zhou et al., 2013).

The actin-related protein (Arp)2/3 complex, which comprises seven proteins (ARP2, ARP3, p41/ARPC1, p34/ARPC2, p21/ARPC3, p20/ARPC4 and p16/ARPC5), catalyses actin nucleation to drive branched polymerisation of actin monomers. The Arp2/3 complex is expressed ubiquitously and regulates core functions such as proliferation (Tang et al., 2016) and migration (Suraneni et al., 2012). The Arp2/3 complex may also participate in mechanotransduction (Wu et al., 2012, p. 3). The ARP3 subunit is required for TGF-β1-induced expression of ACTA2-positive stress fibres in mouse lung fibroblasts (Cai et al., 2012). The GDS5078 and GDS4902 microarray databases report increased expression of Arp2/3 subunit mRNAs in the lungs of mice with bleomycin-induced lung fibrosis (Rajasekaran et al., 2013; Liu et al., 2011, p. 2), whereas increased expression of ARPC2 is reported in the GDS4279 IPF database (Meltzer et al., 2011).

In light of these elements, we hypothesised (i) that the Arp2/3 complex is expressed in IPF lung mesenchymal cells and in mouse lungs during fibrogenesis, (ii) that inhibition of the Arp2/3 complex represses profibrotic differentiation of human lung fibroblasts in vitro and (iii) that Arp2/3 inhibition prevents the development of bleomycin-induced lung fibrosis in mice.

2 | METHODS

2.1 | Expression of the Arp2/3 complex in human lung fibroblasts

Expression of Arp2/3 subunits was assessed by RT-PCR in lung fibroblasts cultured from patients with IPF ($n = 10$) and patients without chronic parenchymal lung disease ($n = 10$). Informed consent was obtained from all patients before lung samples were obtained. The protocol was approved by the Ethical Committee of Paris-Ile de France 1. All experiments were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. The characteristics of donor patients are shown in Table S1. Lung biopsies from patients with IPF were obtained at the time of lung transplantation and samples of normal lung were obtained from lung cancer surgery specimens, distant from the tumour.

Pulmonary fibroblasts were cultured from lung explants as previously described (Marchand-Adam et al., 2003). Lung explants were minced in ≈1 mm^3 fragments and kept under glass coverslips in DMEM culture medium with 20% fetal calf serum (FCS, Fetalclone 2, Hyclone, Logan, UT), 100 IU/ml penicillin G, 100 μg/ml streptomycin sulfate, and 0.25 μg/ml amphotericin B (GIBCO/Invitrogen), at 37°C with 5% CO_2. Fibroblasts were amplified for 2 passages and stored in liquid nitrogen. For analysis, fibroblasts were thawed and cultured at passage 5 with 10% FCS. In other experiments, commercial primary human normal lung fibroblasts (CCD-16Lu cells, ATCC, Manassas, USA) were treated for 48 h with either 5-ng·ml^{-1} recombinant human TGF-β1 (R&D Systems, Lille, France) or diluent. ARP2, ARP3 and ARPC2 were quantified by immunoblotting of 20 μg cell proteins as described below. Antibodies are listed in Table 1. The immuno-related procedures used comply with the recommendations made by the *BJP*.

2.2 | Repression of Arp2/3 in CCD-16Lu lung fibroblasts in vitro

CCD-16Lu lung fibroblasts were grown in DMEM–GlutaMax medium supplemented with 10% FCS and penicillin/streptomycin (Thermo Fisher, Villebon-sur-Yvette, France), at 37°C with 5% CO_2. Experiments were performed between passages 7 and 12, when cells reached 70% confluency. In a first set of experiments, fibroblasts were treated with either 100-μM CK666 in DMSO (Sigma) or DMSO alone (1/1000 final dilution). CK666 is an indole-based, cell-permeable low MW compound that was identified as an inhibitor of Arp2/3 complex-stimulated actin polymerisation by high-throughput screening of drug libraries (Nolen et al., 2009). CK666 binds at the interface of ARP2 and ARP3 and prevents the transition of the Arp2/3 complex from a splayed/inactive conformation to a short-pitch/active conformation (Hetrick et al., 2013). For cell growth assays, 5 x 10^4 cells per well were plated in 12-well plates, grown for 4 days, detached with 5% trypsin and counted. For differentiation assays, 5 x 10^4 cells were plated in 12-well plates, starved of serum for 24 h and treated with either CK666 or DMSO 30 min before treatment with either 5-ng·ml^{-1} TGF-β1 or diluent.

In a second set of experiments, fibroblasts (10^5 cells per well) were grown in 6-well plates in 3 mL medium and were transfected with 4 nM of short-interfering RNAs (siRNAs) targeting *ARPC2*, *ARP2* or *ARP3* (*siARPC2*, *siARP2*, *siARP3*, Silencer Select s19671, s19644 and 127242, Thermo Fisher) or an inactive siRNA herein termed *siControl* (*Silencer Select* Negative Control #1 siRNA, #4390843, Thermo Fisher) 24 h before TGF-β1 or control was added. Transfections were carried out with 9 μl Lipofectamine RNAiMAX reagent (Thermo Fisher) according to the manufacturer's instructions. Cells were collected 48 h after control or TGF-β1 treatment. *In vitro* experiments were repeated until at least five independent observations were obtained.

2.3 | Protein extraction

Total proteins from 5 x 10^5 cells were recovered in 100-μl lysis buffer (50-mM Tris HCl pH 7.4, 150-mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate and 1% Triton X-100) with 1% protease and phosphatase inhibitor (PPC1010, Sigma) and quantitated by the bicinchoninic acid assay (Pierce, Thermo Fisher). Subcellular extracts enriched with cytoplasmic, membrane, nuclear soluble, chromatin-bound and cytoskeletal proteins were obtained from 3 x 10^5 cells using a commercial kit (Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells, #78840, Thermo Fisher). Protein samples were kept at -80°C for less than 12 months, without freeze-thaw cycles.

2.4 | Determination of ACTA2 and COL1 protein levels

For cell-based ACTA2 ELISA, cells were grown in 12-well plates, fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min, permeabilised with 0.5% Triton X-100 in PBS, blocked with 1% bovine albumin, incubated overnight at 4°C with an ACTA2 primary antibody (RRID:AB_476701) and sequentially incubated with an anti-mouse biotinylated antibody (Vector, dilution 1/400), streptavidin–HRP (R&D Systems) and tetramethylbenzidine substrate (Sigma). The reaction was stopped with H_2SO_4, and absorbance readings were taken at 450 with 570 nm. For immunofluorescence, cells were seeded on eight-well Lab-Tek slides, permeabilised, stained with the same antibody, incubated with 1/100 anti-mouse IgGκ CruzFluor 594 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) (RRID:AB_10986143) and counterstained with both 1/1000 Alexa Fluor 488 phalloidin and 1/1600 Hoechst 33342 reagent (Thermo Fisher). Images were acquired at ×20 magnification. Procollagen-1 (proCOL1) and GAPDH were quantified in cell lysates by ELISA (DY6220 and DYC5718, R&D Systems). Collagen-1 (COL1) was expressed relative to GAPDH.

2.5 | Activation of intracellular signalling pathways

Immunoblotting was used to explore the effect of Arp2/3 inhibitors on the activation of pathways driving fibroblast differentiation such as

TABLE 1 Antibodies used in the study

Protein	Manufacturer	ID / RRID	Epitope	Antibody isotype and species	Final dilution for western blot or ELISA (3 times re-used)
Phospho-SMAD2	Cell signaling (Danvers, MA, USA)	3108	Residues surrounding Ser465/467 of human Smad2	Rabbit IgG monoclonal	WB : 1/1000
SMAD2	Cell signaling	5339	Amino terminus of mouse Smad2 protein		WB : 1/1000
Phospho-Akt	Cell signaling	4060	Residues around Ser473 of human Akt		WB: 1/1000
Akt	Cell signaling	4691	Residues in the carboxy-terminal sequence of mouse Akt		WB: 1/1000
Phospho-GSK3β	Cell signaling	D85E12 #5558	Residues surrounding Ser9 of human GSK-3β		WB: 1/1000
β-catenin	Cell signaling	D10A8 #8480	Residues surrounding Pro714 of human β-catenin protein		WB: 1/1000
Phosho-ERK1/2	Cell signaling	4370	Residues surrounding Thr202/Tyr204 of human p44 MAP kinase		WB: 1/2000
ERK1/2	Abcam (Cambridge, UK)	Ab184699	Clone number EPR17526		WB: 1/1000
GRP78	R&D system (Minneapolis, MN, USA)	AF4846	E. coli-derived recombinant human GRP78/HSPA5 Met1-Leu654 Accession # P11021	Goat IgG polyclonal	WB: 1/500
GAPDH	R&D system	AF5718	E. coli-derived recombinant human GAPDH/G3PDH Met1-Ala150 Accession # P04406		WB: 1/500
H2B	Invitrogen (Illkirch, France)	GT387	Full length human Histone H2B recombinant protein	Mouse IgG2a monoclonal	WB: 1/2500
YAP	Cell signaling	D8H1X #14074	Pro435 of human YAP isoform 1	Rabbit IgG monoclonal	WB: 1/250
HDAC2	Cell signaling	2540	The carboxy terminus of the human HDAC2 protein	Rabbit IgG polyclonal	WB: 1/1000
ACTA2	R&D system	MAB1420/AB_476701	Residues EEEDSTALVC of the N-term of human alpha -smooth muscle actin (1)	Mouse IgG2A monoclonal – Clone 1A4	ELISA : 1/1000
β-actin	Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France)	A2228	slightly modified β-cytoplasmic actin N-terminal peptide, Ac-Asp-Asp-Asp-Ile-Ala-Ala-Leu-Val-Ile-Asp-Asn-Gly-Ser-Gly-Lys, conjugated to KLH	Mouse IgG2a monoclonal – Clone AC-74	WB: 1/2000
ARP2	Santa Cruz Biotechnology	Sc-166103	Amino acids 311-394 of human Arp2	Mouse IgG1 monoclonal	WB: 1/500

TABLE 1 (Continued)

Protein	Manufacturer	ID / RRID	Epitope	Antibody isotype and species	Final dilution for western blot or ELISA (3 times re-used)
ARP3	Santa Cruz Biotechnology	Sc-48344	Amino acids 1-110 of human Arp3	Mouse IgG2a monoclonal	WB: 1/1000
ARPC2	Sigma-Aldrich	07-227	amino acids 285-298 of human Arc	Rabbit IgG polyclonal	WB: 1/1000
Anti-rabbit IgG	Cell signaling	7074	goat anti-rabbit IgG (heavy and light chain) antibody	Goat IgG	WB : 1/2000
Anti-mouse IgG	Jackson Immuno Research (Philadelphia, PA, USA)	115-035-062 / AB_2338504	Whole IgG antibodies are isolated as intact molecules from antisera	Goat IgG (H+L)	WB: 1/2000

SMAD2, ERK1/2, Akt1/2 (Fagone et al., 2011) and the GSK-3β/β-catenin pathway (Baarsma et al., 2013). Immunoblotting for YAP and MRTF/A was also carried out on subcellular protein fractions. GAPDH and histone deacetylase 2 (HDAC2) were used as loading controls for the cytosolic and nuclear protein fractions, respectively. Immunoblotting was performed under denaturing and reducing conditions using 4–12% acrylamide gels (NuPAGE™ Bis-Tris Protein Gels, Thermo Fisher) and PVDF membranes. Antibodies (**Table 1**) were diluted in TBS with 0,1% Tween 20 and 5% w/v milk.

2.6 | RT-PCR

mRNAs were extracted using the GeneJET RNA Purification Kit. RNAs were reverse transcribed using the First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher). Transcripts were quantified by RT-PCR (SYBR Select Master Mix, Thermo Fisher) and expressed relative to *UBC* (human samples) or *Gapdh* (mouse samples) as an endogenous control using the $2^{-\Delta Ct}$ method. Primers are listed in Table S2.

2.7 | Bleomycin-induced lung fibrosis in mice

All animal care and experimental protocols complied with European guidelines for animal care/ housing (Directive 2010-63 UE) and were approved by the regional ethics board (APAFIS#5669-20 16061413402331). Animal studies are reported in compliance with the ARRIVE guidelines (Percie du Sert et al., 2020) and with the recommendations made by the *British Journal of Pharmacology* (Lilley et al., 2020).

Male, 8-week-old C57BL/6J mice (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) were kept in the Animal Facility in Tours, in plastic cages (5 animals per cage), under conditions of controlled temperature (22 ±2°C) and humidity (approximately 50%), and 12h/12h light/dark cycles. The bedding materials was poplar wood bedding (Anibed, Pontvallain, France). Mice had free access to rodent chow (Mucedola 4RF21, Settimo Milanese, Italy) and water. After acclimatisation (7 days), mice were randomly selected to receive orotracheal instillation of either 120-μg bleomycin or saline, under isoflurane anaesthesia, with the MicroSprayer device (Penn Century, Wyndmoor, USA). Mice were treated from the 7th to the 14th day after instillation with daily intraperitoneal injections of either 5-mg·kg^{-1} CK666 in 100 μl of 40% DMSO in saline (vehicle) or vehicle alone. CK666 was previously used in mice (Park et al., 2013). Mice were randomised by treatment group on a cage-by-cage (five animals) basis to receive either saline or bleomycin, and either vehicle or CK666.

Mice were monitored and weighed daily. Because mice with bleomycin-induced lung fibrosis are known to lose weight, the diet was supplemented with gel-based food (DietGel Recovery 72-06-5022, ClearH20, Westbrook, USA) for both both bleomycin- and saline-treated mice. On the 14th day following bleomycin, mice were anaesthetised with 300-mg·kg^{-1} ketamine and 30-mg·kg^{-1} xylazine and killed by exsanguination. Bronchoalveolar lavage was

carried out with 2 × 1-ml saline. Lungs were then either snap-frozen in liquid nitrogen for molecular studies, or inflation-fixed in 4% formaldehyde at 20 cmH_2O transpleural pressure through a 20-gauge tracheal cannula.

At the time of analysis, samples were blinded. Total insoluble collagen was quantified in left lung homogenates with the Sircol INSOLUBLE Collagen Assay (Biocolor, Carrickfergus, UK) (Simsa et al., 2019). In brief, the left lung was minced into 1-5 mm^3 fragments and was incubated for 3h in 1ml lysis buffer (provided by the manufacturer). Lung lysates (20 µl for control, saline-treated mice, 50 µl for bleomycin-treated mice) were then assayed for insoluble collagen, according to the manufacturer's instructions. ProCOL1 was quantified in homogenates of the right upper lung lobe by ELISA, as described above. RNAs were extracted with the GeneJET RNA Purification kit (K0731, Thermo Fisher). Briefly, the right middle lung lobe was homogenised with a T 20 Ultra Turrax homogeniser (IKA, Staufen, Germany) in 600 µl lysis buffer (provided in the kit) with 1% mercaptoethanol. RNA was extracted according to the manufacturer's instructions and eluted into 50 µl RNAse-free water. The activity of enzymes key to collagen polymerisation and degradation was measured in homogenates of the right lower lobe prepared in 300-µl ice-cold 0.9% NaCl. Assays for lysyl oxidase (Amplite Fluorimetric Lysyl Oxidase Assay, AAT Bioquest, Sunnyvale, USA) and collagenase (fluorimetric DQ collagen type 1, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) were used. Total BALF cells were counted under kova Glasstic slides (Thermofischer), and BALF cells were differentially counted with the May-Grunwald-Giemsa stain (RAL 555, RAL Diagnostics, Martillac, France). For histological analysis, 5-µm sections of paraffin-embedded lung were stained with Masson's trichrome stain.

2.8 | Data and statistical analysis

The data and statistical analysis comply with the recommendations of the *British Journal of Pharmacology* on experimental design and analysis in pharmacology (Curtis et al., 2018). Because most data were not normally distributed, individual data, medians and interquartile ranges were shown and non-parametric tests were used. Group sizes for the in vitro experiments were at least 5 independent assays and for the in vivo experiments, to show a 30-µg difference in total lung collagen with a 0.15 α-risk and a 0.05 β-risk, at least 10 mice per group were required. In the case of unpaired observations, data were shown as raw values and comparisons were done with the Kruskall–Wallis one-way ANOVA test followed, if significant, by two-by-two comparisons with Mann–Whitney *U*-test. In the case of paired observations, data were normalised to the control condition and comparisons were carried out with Friedman's non-parametric ANOVA followed, when significant, by two-by-two comparisons with Wilcoxon signed-rank test. The Holm–Bonferroni method was used to compensate for multiple comparisons. Analyses were performed with StatView 5.0 (SAS Institute, Cary, USA). A *P* value <0.05 was considered significant.

2.9 | Materials

CK 666 was supplied by Tocris (Lille, France), bleomycin by Bellon (Gentilly, France) and DMSO by Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France).

2.10 | Nomenclature of targets and ligands

Key protein targets and ligands in this article are hyperlinked to corresponding entries in http://www.guidetopharmacology.org and are permanently archived in the Concise Guide to PHARMACOLOGY 2019/20 (Alexander et al., 2019a, 2019b).

3 | RESULTS

3.1 | Expression of Arp2/3 complex mRNAs in human lung mesenchymal cells

TGF-β1 stimulation was used as a model to evaluate the effect of a profibrotic micro-environment on the expression of Arp2/3 subunits in CCD-16LU cells. Levels of *ARP2* and *ARP3* mRNAs were high in CCD-16Lu cells (of the order of 10^{-1} relative to *UBC* mRNA), whereas levels of *ARPC1–5* mRNAs were 2-log lower. TGF-β1 induced a 1.7-fold increase in *ARP2* mRNA and a 2.8-fold increase in *ARP3* mRNA (Figure 1).

Expression of *ARP2*, *ARP3*, *ARPC1*, *ARPC2* and *ARPC4* mRNAs was detected by RT-PCR in both control and IPF fibroblasts cultured on plastic at passage 5, although no difference was detected between control and IPF cells (Figure S1A). Likewise, ARP2, ARP3 and ARPC2 proteins were detected at similar levels in control and IPF fibroblasts (Figure S1B).

3.2 | CK666 and *siARPC2* inhibited lung fibroblast growth

The Arp2/3 complex regulates cell proliferation in multiple cell types (Tang et al., 2016). In line with this concept, CK666 reduced cell growth by 36% (Figure 2a). A similar effect was observed with *siARPC2* (Figure 2c). By contrast, *siARP2* and *siARP3* did not reduce serum-induced cell growth over 4 days (Figure 2b).

3.3 | CK666 repressed TGF-β1-induced myofibroblast differentiation

The effect of CK666 and Arp2/3 siRNAs on ACTA2 expression was assessed. CK666 reduced *ACTA2* mRNA in unstimulated cells (Figure 3a). TGF-β1 increased ACTA2 expression at both the mRNA and protein levels (Figure 3a,c,d) and induced formation of ACTA2-positive stress fibres (Figure S2). CK666 partly (mRNA) or

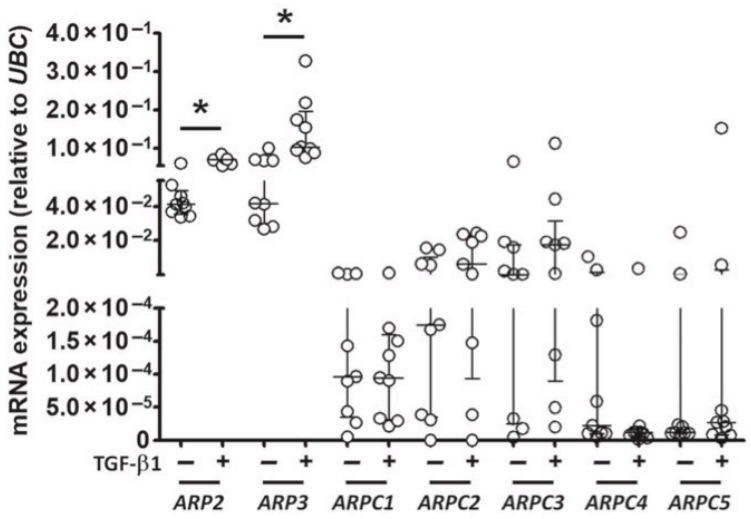


FIGURE 1 Expression of mRNAs for Arp2/3 subunits, in CCD-16Lu cells, following TGF-β1 stimulation. Results are shown as individual data, medians and interquartile range; n = 9 per group. *$P < 0.05$, significantly different as indicated

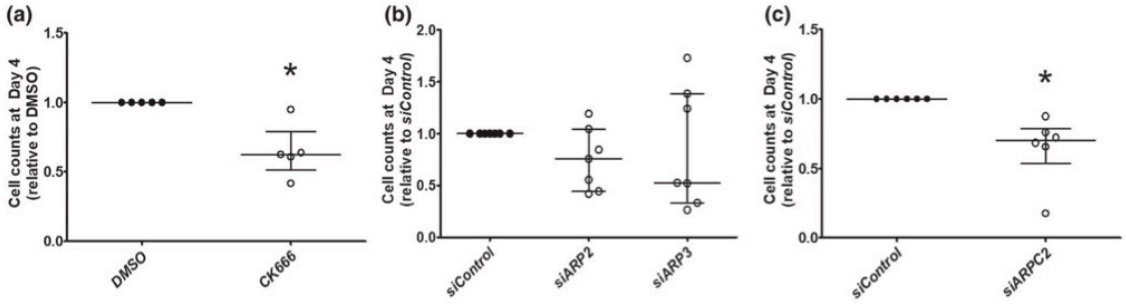


FIGURE 2 Effect of (a) CK666 ($n = 5$ per group), (b) *siARP2* and *siARP3* ($n = 7$ per group) and (c) *siARPC2* ($n = 5$ per group) on serum-induced growth of CCD-16Lu lung fibroblasts. Numbers were normalised to the control condition (DMSO or *siControl*). Results are shown as individual data, medians and interquartile range. *$P < 0.05$, significantly different from DMSO or *siControl*

totally (protein) inhibited TGF-β1-induced ACTA2 expression (Figures 3a,d and S2). Although *siARPC2* slightly repressed TGF-β1-induced *ACTA2* mRNA (Figure 3c), *siARP2* and *siARP3* had no effect (Figure 3b). Neither *siARPC2*, *siARP2* nor *siARP3* reduced ACTA2 protein in comparison with *siControl*-treated cells (Figure 4e,f).

3.4 | Inhibition of the Arp2/3 complex reduced expression of COL1 in lung fibroblasts

In unstimulated cells, CK666 repressed ***COL1A1*** mRNA (Figure 4a), *COL1A2* mRNA (Figure S3) and proCOL1 protein (Figure 4d). CK666 did not modulate the TGF-β1-induced increase in *COL1A1* mRNA (Figure 4a), *COL1A2* mRNA (Figure S3) and proCOL1 protein (Figure 4c). Although *siARP2* and *siARP3* had no effect on *COL1A1* mRNA (Figure 4b), *siARPC2* repressed the TGF-β1-induced increase in *COL1A1* mRNA (Figure 4c). SiARP2 repressed proCOL1 expression in unstimulated cells (Figure 4e).

3.5 | Inhibition of the Arp2/3 complex repressed the Akt/phosphorylated glycogen synthase kinase 3β/β-catenin pathway in vitro

Effort was made to explain the effect of Arp2/3 inhibition on basal and TGF-β1-induced ACTA2 and COL1 expression, focusing on both the TGF-β1-associated pathways SMAD, ERK and Akt, and the mechanotransduction-activated transcription factors YAP and MRTF-A.

Phosphorylation of activator SMAD proteins such as SMAD2 is a key driver of both COL1 and ACTA2 expression in fibroblasts and is the canonical target of TGF-β1 signalling (Wang et al., 2016). As expected, although phospho-SMAD2 was not detectable in unstimulated cells, TGF-β1 induced detectable levels of phospho-SMAD2. Neither CK666 nor siRNAs targeting ARPC2, ARP2 or ARP3 modulated basal or TGF-β1-induced SMAD2 phosphorylation (Figure S4A,B). In contrast to SMAD2, phosphorylation of the MAPK ERK1/2 was detected in unstimulated cells. TGF-β1 increased the phospho-ERK1/2 to total ERK1/2 ratio; neither CK666 nor Arp2/3 siRNAs had any significant effect (Figure S4C,D).

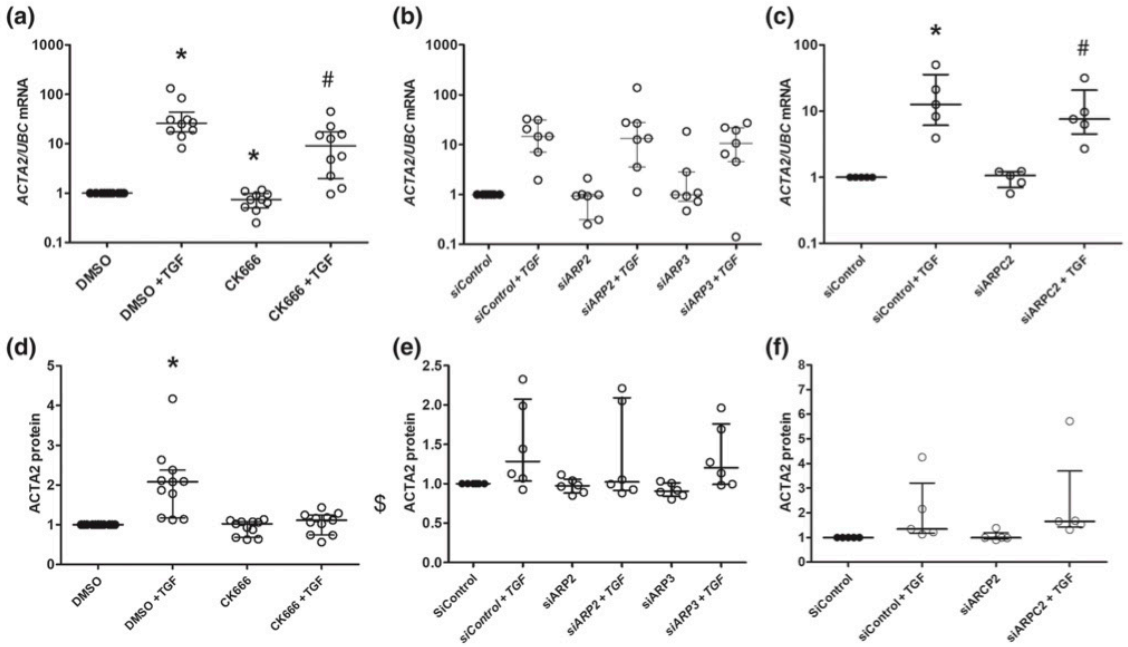


FIGURE 3 Regulation of ACTA2 expression by CK666 ($N = 10$) or siRNAs targeting ARPC2 ($N = 5$), ARP2 and ARP3 ($N = 7$) with or without TGF-β1 stimulation in CCD-16Lu cells. (a–c) *ACTA2* mRNA (RT-PCR). (d–f) ACTA2 protein (cell-based ELISA). Data were normalised to DMSO or *siControl*. Results are shown as individual data, medians and interquartile range. *$P < 0.05$, significantly different from DMSO or *siControl*. #$P < 0.05$, significantly different from DMSO + TGF-β1

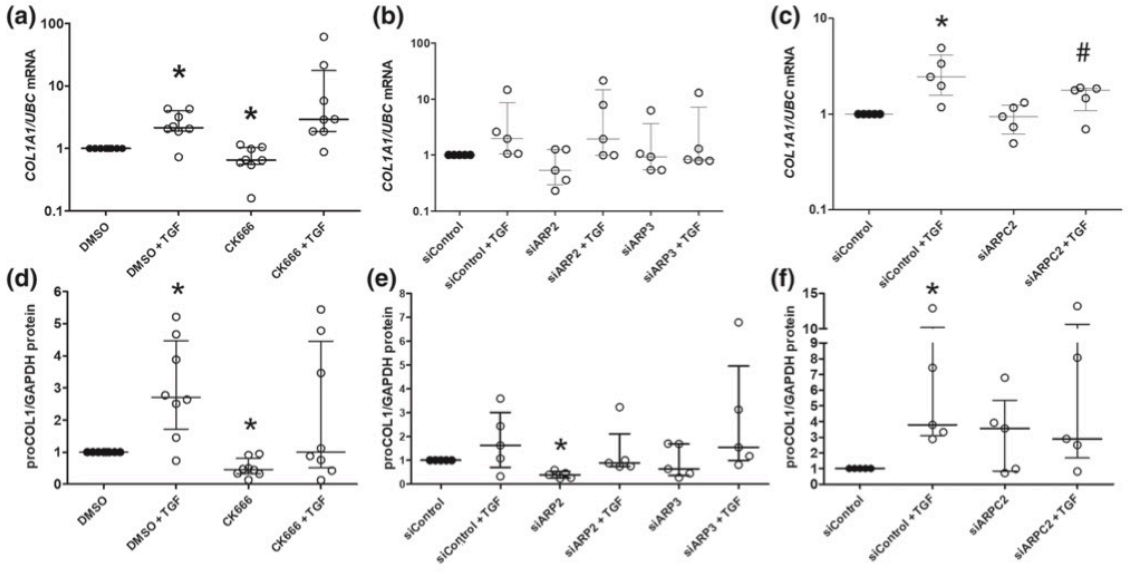


FIGURE 4 Baseline and TGF-β1-stimulated COL1 expression in CCD-16Lu cells treated with CK666 (a, d: $N = 8$) or siRNAs targeting ARP2 and ARP3 (b, e: $N = 5$), or ARPC2 (c, f: $N = 5$). (a–c) *COL1A1* mRNA (RT-PCR). (d–f) proCOL1/GAPDH protein ratio (ELISA). Data were normalised to the DMSO or *siControl*. Individual data, medians and interquartile ranges are shown. *$P < 0.05$ significantly different from DMSO or *siControl*. #$P < 0.05$, significantly different from *siControl* + TGF-β1

As expected, TGF-β1 increased Akt phosphorylation. As shown in Figure 5a, CK666 repressed levels of phospho-Akt in unstimulated cells. *ARP2*-targeting siRNA also appeared to reduce basal level of phospho-Akt in unstimulated cells (Figure 5b). To confirm whether Arp2/3 inhibition resulted in repression of the Akt pathway, downstream targets of Akt were assessed. As shown in Figure 5c, CK666 reduced the phospho-glycogen synthase kinase 3β (phospho-GSK3β) /total GSK3β ratio in unstimulated cells and reduced its induction by TGF-β-1. In line with this observation, CK666 also reduced levels of β-catenin (Figure 5d), a target of phospho-GSK3β, in unstimulated cells, with a trend for reduction in TGF-β-1 stimulated cells. These results were consistent with repression of the Akt/phospho-GSK3β/β-catenin pathway by Arp2/3 inhibitors.

3.6 | Mechanotransduction pathways

Under the hypothesis that Arp2/3 inhibitors modulate mechanotransduction pathways, nuclear translocation and whole-cell levels of both YAP and MRTF-A were determined by immunoblotting. CK666 did not influence YAP levels in cell lysates (Figure 6a) or basal and TGF-β1-driven nuclear translocation of YAP (Figure 6c). By contrast, CK666 induced a significant decrease of both basal and TGF-β1-stimulated MRTF-A levels in whole-cell lysates (Figure 6b), although the MRTF-A nuclear/cytosolic ratio was not decreased (Figure 6d).

3.7 | Expression of the Arp2/3 complex in the lungs of bleomycin-treated mice

Levels of *Arp2*, *Arp3*, *Arpc1*, *Arpc2*, *Arpc3* and *Arpc5* mRNAs were increased in the lungs of mice following bleomycin instillation (Figure S5). Expression of *Arp2*, *ArpC1a* and *Arpc3* was also increased by CK666 (Table S3).

3.8 | Inhibition of the Arp2/3 complex with CK666 prevented bleomycin-induced lung fibrosis in mice

The lungs of mice 14 days after intratracheal instillation of saline and daily intraperitoneal injections of vehicle from Day 7 onwards

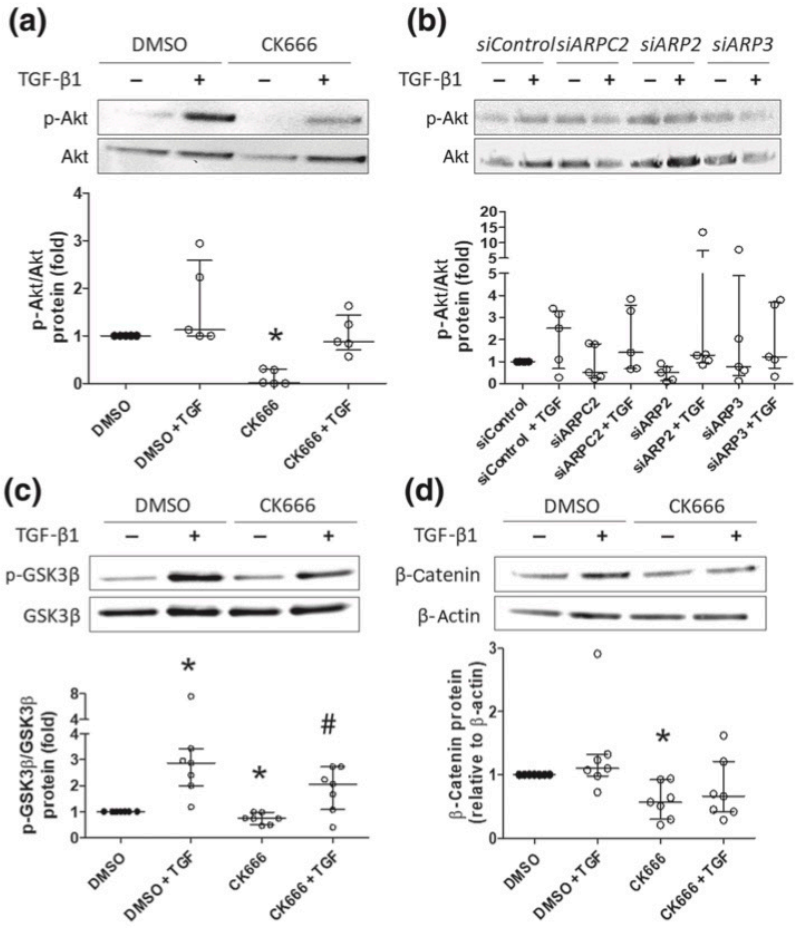


FIGURE 5 Activation of the Akt/GSK3β/β-catenin pathway in unstimulated and TGF-β1-stimulated CCD-16Lu cells treated with Arp2/3-targeting agents. (a) Phospho-Akt/total Akt ratio in cells treated with either DMSO or CK666 ($N = 5$). (b) Phospho-Akt/total Akt ratio in cells treated with either inactive siRNAs (*siControl*) or siRNAs targeting *ARPC2*, *ARP2* or *ARP3* ($N = 5$). (c) Phospho-GSK3β/total GSK3β ratio in cells treated with either DMSO or CK666 ($N = 7$). (d) β-Catenin protein expression in cells treated with DMSO or CK666 ($N = 7$). Representative experiments and densitometric analysis. Data were normalised to the DMSO or *siControl*. Individual data, medians and interquartile range are shown. $^{*}P < 0.05$ significantly different from DMSO. $^{\#}P < 0.05$, significantly different from DMSO + TGF-β1

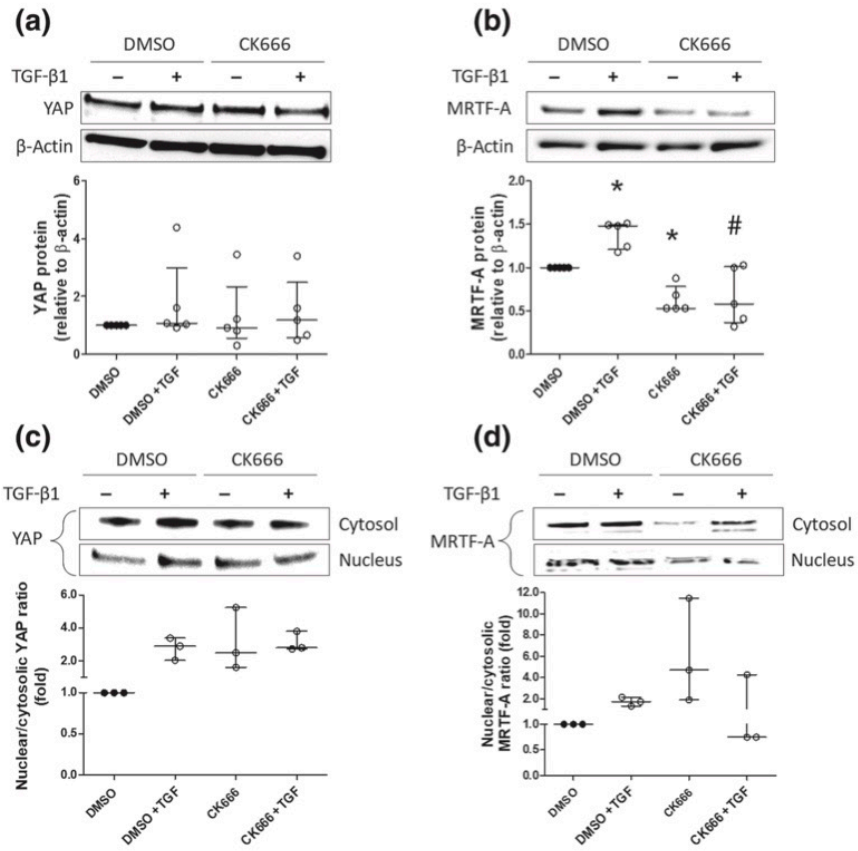


FIGURE 6 Effect of CK666 on TGF-β1-induced YAP (a) and MRTF-A protein expression ($N = 5$) (b) and nuclear translocation ($N = 3$) (c, d). Data were normalised to the DMSO or *siControl*. Representative experiments and densitometric analysis. Individual data, medians and interquartile range are shown. *$P < 0.05$, significantly different from DMSO. #$P < 0.05$, significantly different from DMSO + TGF-β1

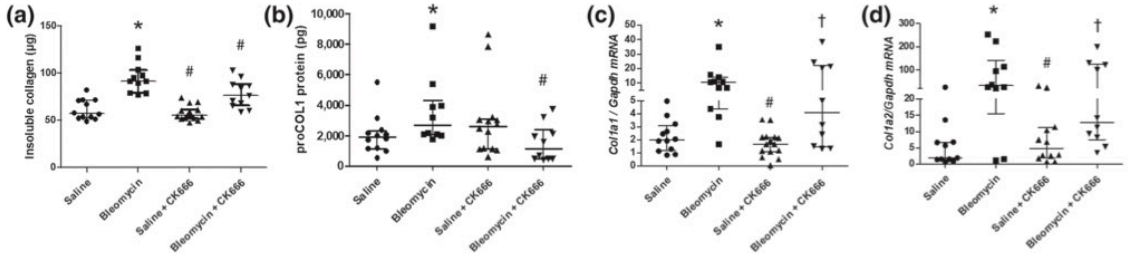


FIGURE 7 CK666 inhibited insoluble collagen deposition and soluble procollagen-1 levels in the lungs after bleomycin instillation in mice. (a) Lung collagen with the Sircol INSOLUBLE Collagen Assay. (b) proCOL1 protein. (c) *Col1a1* mRNA and (d) *Col1a2* mRNA reported to *Gapdh* mRNA. Individual data, medians and interquartile range are shown; $N = 10–14$ per group. *$P < 0.05$, significantly different from saline; #$P < 0.05$, significantly different from bleomycin; †$P < 0.05$, significantly different from saline + CK666

appeared normal by histological analysis (Figure S6A). Intraperitoneal CK666 alone did not result in modifications of lung histology (Figure S6B). In mice treated with bleomycin intra-tracheally and vehicle, focal lesions were observed (Figure S6C). These lesions comprised interstitial oedema, type 2 pneumocyte hyperplasia, interstitial lymphocyte infiltrates, accumulation of foamy macrophages in alveolar spaces, and destructive fibrosis as shown by distortion of the lung architecture and collagen deposition. In mice treated with CK666 following bleomycin, similar although less severe focal lesions were observed (Figure S6D).

Histological analysis does not allow the precise quantitation of lung fibrosis, and so the total content of left lungs in insoluble collagen was determined. As shown in Figure 7a, bleomycin induced a 60% increase in total insoluble lung collagen, consistent with lung

fibrosis. Lung insoluble collagen levels were reduced by 20% in bleomycin-instilled mice treated with CK666 in comparison with vehicle-treated animals, confirmative of an antifibrotic effect of CK666. The proCOL-1 lung content was reduced by 55% in CK666-treated mice in comparison with vehicle-treated mice following bleomycin instillation (Figure 7b). By contrast, CK666 did not reduce lung *Col1a1* (Figure 7c) and *Col1a2* mRNAs (Figure 7d). For a better understanding of the mechanisms by which CK666 reduced lung collagen deposition, the activity of collagenase and lysyl oxidase in the lung was determined in lung lysates. As shown in Figure S7, the bleomycin-induced twofold increase in lung lysyl oxidase activity was not modified by CK666. There was a slight reduction in collagenase activity in the lungs of bleomycin-instilled mice in comparison with saline-instilled mice. CK666 treatment did not modulate lung collagenase activity. CK666 did not reduce levels of *Lox*, *Loxl2* or *Tg2* mRNAs in the lungs of bleomycin-instilled mice (not shown).

3.9 | CK666 did not reduce bleomycin-induced weight loss or lung inflammation

The bleomycin-induced fibrosis model is associated with significant weight loss and inflammation, and anti-inflammatory compounds are known to repress fibrosis in this model. Over the course of the experiment, the variation of body weight compared with baseline was +6 [5; 9]% (median with interquartile range) in control mice and +5 [3; 8]% in CK666 mice. Significant and similar weight loss was observed in bleomycin-treated mice (−4 [−11; −2]%) and in mice treated with bleomycin and CK666 (−3 [−12; −1]%). CK666 did not reduce the increase in BALF total protein or BALF cells induced by bleomycin (data not shown).

4 | DISCUSSION

The key results of this study were (i) that expression of Arp2/3 subunits was increased in profibrotic conditions, such as TGF-β1 stimulation of lung fibroblasts in vitro and bleomycin-exposed lungs in vivo, (ii) that inhibition of the Arp2/3 complex by CK666 repressed an Akt/phospho-GSK3β/β-catenin/MRTF-A pathway and decreased COL1 expression and myofibroblast differentiation and in vitro, and (iii) that CK666 reduced bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice.

Expression of Arp2/3 complex subunit mRNAs was increased in fibrogenesis models. In vitro, TGF-β1 induced expression of *ARP2* and *ARP3*, in agreement with bioinformatics data (Rajasekaran et al., 2013; Liu et al., 2011, p. 2), but did not modulate expression of other subunits in CCD-16Lu cells, possibly owing to reduced expression of these subunits in this particular cell population. In vivo, mRNAs of all *Arp2/3* complex subunits, with the exception of *ARPC4*, were increased in the lungs of mice instilled with bleomycin compared with control mice. By contrast, there was no increase in Arp2/3 complex mRNAs in fibroblasts from patients with IPF, which were cultured for five passages before analysis. Together, these results suggest that the fibrosis-associated increase of Arp2/3 complex expression is determined by the micro-environment, rather than by heritable cell-autonomous mechanisms. Signalling pathways regulating expression of Arp2/3 complex subunit mRNAs are not known. Increased expression of Arp2/3 complex subunits is not specific to fibrotic disease because it is also observed in colorectal cancer stromal fibroblasts (Otsubo et al., 2004).

The second result is that Arp2/3 inhibition repressed fibrogenesis-associated phenotype traits in lung fibroblasts. CK666 decreased cell growth, ACTA2 and COL1 expression. These results were consistent with known roles of the Arp2/3 complex. The Arp2/3 complex is required for cell cycle progression in mammary epithelial cells and is inhibited by CK666 in this context (Molinie et al., 2019). ARP3 is required for expression of stress fibres in murine lung fibroblasts (Cai et al., 2012).

Repression of ARPC2 and ARP2 partly reproduced the effects of CK666 in vitro. *SiARPC2* repressed cell growth, consistent with the role of ARPC2 in cell cycle control in epithelial cells (Molinie et al., 2019), and repressed expression of both *ACTA2* and *COL1A1* mRNA. *SiARP2* reduced expression of proCOL1 protein in the absence of stimulation. Overall, these results support the hypothesis that the effects of CK666 were due to inhibition of the Arp2/3 complex rather than to off-target effects. This hypothesis is strengthened by the absence of a detectable effect of CK666 in murine embryonic fibroblasts lacking ARP2 and ARPC2 (Wu et al., 2012). These results suggest that the contribution of Arp2/3 complex subunits to the biological activity of the complex may depend on cell type and/or micro-environment and/or be redundant. These results also suggest that repression of a single subunit may not reliably reduce activity of the Arp2/3 complex as a whole.

Inhibition of the Arp2/3 complex was associated with repression of the Akt/phospho-GSK3β/β-catenin/MRTF-A pathway in vitro. To understand the mechanisms downstream of Arp2/3 complex inhibition in lung fibroblasts, we assessed the main signalling pathways associated with pro-fibrotic differentiation. TGF-β1, the archetypal driver of pro-fibrotic differentiation, activates multiple pathways including the canonical SMAD2/3 pathway (Meng et al., 2016) and non-canonical pathways such as the MAPKs ERK1/2 (Hu et al., 2006) and Akt (Kim et al., 2019). Mechanotransduction pathways involving the transcription factors YAP (Szeto et al., 2016) and MRTF-A (Small, 2012) are also critical for both TGF-β1-driven and TGF-β1-independent pro-fibrotic differentiation. In the present study, inhibition of the Arp2/3 complex did not modulate TGF-β1-induced SMAD2 phosphorylation. This observation was consistent with preservation of TGF-β1-induced SMAD phosphorylation in mesenchymal stem cells deficient in CDC42, an upstream regulator of the Arp2/3 complex (Ge et al., 2018), as well as in CK666-treated A549 lung epithelial cells (Rana et al., 2018).

The MAPK pathway and the Akt pathway regulate many cellular processes including adhesion, migration, survival and proliferation

(Fagone et al., 2011; Roskoski, 2012). In the present study, phosphorylation of ERK1/2 was not modulated by Arp2/3 complex inhibition. By contrast, CK666 reduced Akt phosphorylation by nearly 75%. These results were in agreement with inhibition, by both CK666 and Arp3 knockdown, of insulin-induced Akt plasma membrane translocation and activating phosphorylation in murine embryonic fibroblasts (Zhao et al., 2015).

To determine whether repression of Akt phosphorylation was relevant to the biological effects of Arp2/3 complex inhibitors, activation of known Akt downstream targets was determined. In mouse lung fibroblasts exposed to bacterial LPS, Akt participates in the expression of COL1 and ACTA2 via an inactivating phosphorylation of GSK3β on serine 9 in mouse lung fibroblasts (Z. He et al., 2014). GSK3-β plays a central role in the control of the pulmonary fibroblast phenotype by inducing the degradation of β-catenin. Inactivating phosphorylation of GSK3-β induces nuclear translocation of β-catenin followed by transcription of a pro-fibrotic programme including *ACTA2* and *COL1* in human neonatal lung mesenchymal stem cells and adult lung fibroblasts (Caraci et al., 2008; Popova et al., 2012). In agreement with the hypothesis that the Arp2/3 complex is required for activation of the Akt/phospho-GSK3 β/-β-catenin pathway, CK666 reduced GSK3-β phosphorylation and decreased β-catenin levels, both in the absence of stimulation and after TGF-β-1.

Mechanotransduction pathways play a key role in sustaining and amplifying fibrogenic responses (Liu et al., 2015). In line with current knowledge on reciprocal interactions between TGF-β1 and mechanotransduction pathways, TGF-β1 induced nuclear translocation of YAP and MRTF-A. CK666 did not change nucleocytoplasmic distribution of either YAP and MRTF-A, suggesting that the Arp2/3 complex is not required in these pathways, in contrast with formins (Huang et al., 2016; Rana et al., 2018). This result suggests that linear polymerisation and branched polymerisation pathways play distinct roles in cell phenotype determination. By contrast, CK666 decreased MRTF-A protein levels by nearly 50% in both unstimulated and TGF-β-1-stimulated lung fibroblasts. Interestingly, MRTF-A expression is induced by β-catenin in mammary tumour cells (Meng et al., 2018; He et al., 2018).

Repression of the Akt/phospho-GSK3-β/β-catenin/MRTF-A pathway probably mediated inhibition of pro-fibrotic differentiation by Arp2/3 complex antagonists. Indeed, Akt is known to drive proliferation and induce expression of ACTA2 (Abdalla et al., 2013) and COL1 at the transcriptional (Giménez et al., 2017) and post-transcriptional (Zhang & Stefanovic, 2016) level in pulmonary fibroblasts. MRTF-A is a key regulator of fibroblast differentiation. In particular, MRTF-A induces expression of COL1 (Luchsinger et al., 2011) and stress fibre formation (Velasquez et al., 2013).

In line with in vitro results, inhibition of the Arp2/3 complex by CK666 reduced bleomycin-induced proCOL1 levels and deposition of insoluble collagen in the lung in vivo. Tissue levels of fibrillary COL1 depend on (i) expression of *Col1a1* and *Col1a2* mRNAs, (ii) translation of *Col1a1* and *Col1a2* mRNAs, (iii) organisation of COL1A1 and COL1A2 into the proCOL1 tripeptide, (iv) polymerisation of proCOL1 catalysed by lysyl oxidases and transglutaminase 2, and (v) degradation of collagen fibres by collagenases. The mechanisms by which CK666 prevented collagen accumulation in mouse lung appeared directly linked to reduced collagen synthesis because no effect was observed relative to weight loss, pulmonary inflammation, or the activity of either collagen cross-linking or collagen-degrading enzymes. In contrast with in vitro fibroblast experiments, CK666 treatment did not reduce *Col1* mRNAs. A putative explanation for this finding is the confounding effect of the multiple cell types that are present in the lungs. Multiple cell types are responsible for collagen production in human and murine lungs including smooth muscle cells, pericytes, and fibroblast subsets with distinct location, gene expression profiles and fibrogenic potential (Tsukui et al., 2020; Xie et al., 2018). It is conceivable that regulation of collagen production is somewhat cell population specific and that the Arp2/3 complex may not drive *Col1a1* mRNA in some collagen-producing cells. Alternatively, CK666 may also have reduced proCOL1 levels by altering mRNA translation, in light of the requirement of actin-binding non-motor myosins for the nucleus–reticulum transfer of *COL1* mRNAs and subsequent translation (Cai et al., 2010). Although one may hypothesise that regulation of COL1 by Arp2/3 is species specific, this appears improbable given the high conservation of the Arp2/3 complex across species.

A limitation of the in vivo study is the use of a pharmacological agent to inhibit the Arp2/3 complex. The increased mRNA expression of Arp2/3 components under CK666 treatment suggests that the Arp2/3 represses its own level of expression in a negative feedback loop. This finding supports the notion that CK666 indeed inhibited Arp2/3 activity in the lung in vivo, but does not rule out whether CK666 exerted its antifibrotic effect through Arp2/3-independent effects. Although CK666 appears selective to the actin cytoskeleton in comparison with other Arp2/3 inhibitors (Yamagishi et al., 2018), the high doses of CK666 used both in vitro and in vivo, which are required by the low potency of CK666, may increase the risk of off-target effects. The choice of a pharmacological approach was compounded by the in vitro experiments, which showed that oligonucleotides targeting single Arp2/3 subunits failed to fully mimic CK666. Another limitation is the moderate size of the antifibrotic effect of CK666 in our experiments, which itself may have been related to the mild level of fibrosis that was obtained in bleomycin-treated animals. Whether CK666 or related compounds may represent a viable therapeutic avenue remains to be defined. In any case, we did not observe obvious toxicity of CK666 treatment, similar to other studies (Park et al., 2013).

In conclusion, the Arp2/3 complex is overexpressed in pro-fibrotic contexts. In vitro experiments showed that the Arp2/3 complex controls cell growth, COL1 and ACTA2 expression in lung fibroblasts consistent with a role in fibrogenesis, possibly through an Akt/phospho-GSK3-β/β-catenin/MRTF-A pathway. In vivo experiments using a pharmacological inhibitor suggested that the Arp2/3 complex drives fibrogenesis in the lung following bleomycin injury. These data support further research into the use of Arp2/3 complex inhibitors for the treatment of pulmonary fibrosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The study was made possible by scholarships from the University of Tours (Université François-Rabelais) (C.M.) and CHRU de Tours (F.L.) and investigator-initiated grants from LVL Medical, Humanair Médical, Arair and Isis Médical.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.M., F.L., C.P., M.M., D.S., W.L.M., M.J. and L.P. performed the experiments and analysed the results. F.L., B.C., S.M.-A. and L.P. designed the study. C.M., F.L. and L.P. prepared the draft of the manuscript. All authors reviewed and amended the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest. L.P. has filed a European patent application (#EP17306360.3) into the use of Arp2/3 inhibitors for the treatment of lung fibrosis.

DECLARATION OF TRANSPARENCY AND SCIENTIFIC RIGOUR

This Declaration acknowledges that this paper adheres to the principles for transparent reporting and scientific rigour of preclinical research as stated in the *BJP* guidelines for Design & Analysis, Immunoblotting and Immunochemistry, and Animal Experimentation and as recommended by funding agencies, publishers and other organisations engaged with supporting research.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All data generated or analysed during this study are included in this published article (and the supporting information).

ORCID

Coralie Mergault https://orcid.org/0000-0001-6958-599X
Laurent Plantier https://orcid.org/0000-0002-3426-2936

REFERENCES

Abdalla, M., Goc, A., Segar, L., & Somanath, P. R. (2013). Akt1 mediates α-smooth muscle actin expression and myofibroblast differentiation via myocardin and serum response factor. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(46), 33483–33493. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.504290

Adams, T. S., Schupp, J. C., Poli, S., Ayaub, E. A., Neumark, N., Ahangari, F., Chu, S. G., Raby, B. A., Deluliis, G., Januszyk, M., Duan, Q., Arnett, H. A., Siddiqui, A., Washko, G. R., Homer, R., Yan, X., Rosas, I. O., & Kaminski, N. (2020). Single-cell RNA-seq reveals ectopic and aberrant lung-resident cell populations in idiopathic pulmonary fibrosis. *Science Advances*, *6*(28), eaba1983. https://doi.org/10.1126/sciadv.aba1983

Adegunsoye, A., & Strek, M. E. (2016). Therapeutic approach to adult fibrotic lung diseases. *Chest*, *150*(*6*), 1371–1386. https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.07.027

Alexander, S. P. H., Fabbro, D., Kelly, E., Mathie, A., Peters, J. A., Veale, E. L., Armstrong, J. F., Faccenda, E., Harding, S. D., Pawson, A. J., Sharman, J. L., Southan, C., & Davies, J. A., & CGTP Collaborators. (2019a). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2019/20: Catalytic receptors. *British Journal of Pharmacology*, *176*, S247–S296. https://doi.org/10.1111/bph.14751

Alexander, S. P. H., Fabbro, D., Kelly, E., Mathie, A., Peters, J. A., Veale, E. L., Armstrong, J. F., Faccenda, E., Harding, S. D., Pawson, A. J., Sharman, J. L., Southan, C., & Davies, J. A., & CGTP Collaborators (2019b). The concise guide to PHARMACOLOGY 2019/20: Enzymes. *British Journal of Pharmacology*, *176*, S297–S396. https://doi.org/10.1111/bph.14752

Baarsma, H. A., Engelbertink, L. H. J. M., van Hees, L. J., Menzen, M. H., Meurs, H., Timens, W., Postma, D. S., Kerstjens, H. A. M., & Gosens, R. (2013). Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) regulates TGF-β_1-induced differentiation of pulmonary fibroblasts. *British Journal of Pharmacology*, *169*(3), 590–603. https://doi.org/10.1111/bph.12098

Cai, G.-Q., Chou, C.-F., Hu, M., Zheng, A., Reichardt, L. F., Guan, J.-L., Fang, H., Luckhardt, T. R., Zhou, Y., Thannickal, V. J., & Ding, Q. (2012). Neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) is critical for formation of α-smooth muscle actin filaments during myofibroblast differentiation. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, *303*(8), L692–L702. https://doi.org/10.1152/ajplung.00390.2011

Cai, L., Fritz, D., Stefanovic, L., & Stefanovic, B. (2010). Nonmuscle myosin-dependent synthesis of type I collagen. *Journal of Molecular Biology*, *401*(4), 564–578. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.06.057

Caraci, F., Gili, E., Calafiore, M., Failla, M., La Rosa, C., Crimi, N., Sortino, M. A., Nicoletti, F., Copani, A., & Vancheri, C. (2008). TGF-β1 targets the GSK-3β/β-catenin pathway via ERK activation in the transition of human lung fibroblasts into myofibroblasts. *Pharmacological Research*, *57*(4), 274–282. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2008.02.001

Curtis, M. J., Alexander, S., Cirino, G., Docherty, J. R., George, C. H., Giembycz, M. A., Hoyer, D., Insel, P. A., Izzo, A. A., Ji, Y., MacEwan, D. J., Sobey, C. G., Stanford, S. C., Teixeira, M. M., Wonnacott, S., & Ahluwalia, A. (2018). Experimental design and analysis and their reporting II: Updated and simplified guidance for authors and peer reviewers. *British Journal of Pharmacology*, *175*, 987–993. https://doi.org/10.1111/bph.14153

Fagone, E., Conte, E., Gili, E., Fruciano, M., Pistorio, M. P., Lo Furno, D., Giuffrida, R., Crimi, N., & Vancheri, C. (2011). Resveratrol inhibits transforming growth factor-β-induced proliferation and differentiation of ex vivo human lung fibroblasts into myofibroblasts through ERK/Akt inhibition and PTEN restoration. *Experimental Lung Research*, *37*(3), 162–174. https://doi.org/10.3109/01902148.2010.524722

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

Ge, J., Burnier, L., Adamopoulou, M., Kwa, M. Q., Schaks, M., Rottner, K., & Brakebusch, C. (2018). RhoA, Rac1, and Cdc42 differentially regulate αSMA and collagen I expression in mesenchymal stem cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *293*(24), 9358–9369. https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001113

Giménez, A., Duch, P., Puig, M., Gabasa, M., Xaubet, A., & Alcaraz, J. (2017). Dysregulated collagen homeostasis by matrix stiffening and TGF-β1 in fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis patients: Role of FAK/Akt. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(11), 2431. https://doi.org/10.3390/ijms18112431

He, H., Du, F., He, Y., Wei, Z., Meng, C., Xu, Y., Zhou, H., Wang, N., Luo, X.-G., Ma, W., & Zhang, T.-C. (2018). The Wnt-β-catenin signaling regulated MRTF-A transcription to activate migration-related genes in human breast cancer cells. *Oncotarget*, *9*(20), 15239–15251. https://doi.org/10.18632/oncotarget.23961

He, Z., Deng, Y., Li, W., Chen, Y., Xing, S., Zhao, X., Ding, J., Gao, Y., & Wang, X. (2014). Overexpression of PTEN suppresses lipopolysaccharide-induced lung fibroblast proliferation, differentiation and collagen secretion through inhibition of the PI3-K-Akt-GSK3beta pathway. *Cell & Bioscience*, *4*(1), 2. https://doi.org/10.1186/2045-3701-4-2

Hetrick, B., Han, M. S., Helgeson, L. A., & Nolen, B. J. (2013). Small molecules CK-666 and CK-869 inhibit actin-related protein 2/3 complex by blocking an activating conformational change. *Chemistry & Biology*, *20*(5), 701–712. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.03.019

Hu, Y., Peng, J., Feng, D., Chu, L., Li, X., Jin, Z., Lin, Z., & Zeng, Q. (2006). Role of extracellular signal-regulated kinase, p38 kinase, and activator protein-1 in transforming growth factor-β1-induced alpha smooth muscle actin expression in human fetal lung fibroblasts in vitro. *Lung*, *184*(1), 33–42. https://doi.org/10.1007/s00408-005-2560-5

Huang, S. K., Fisher, A. S., Scruggs, A. M., White, E. S., Hogaboam, C. M., Richardson, B. C., & Peters-Golden, M. (2010). Hypermethylation of *PTGER2* confers prostaglandin E_2 resistance in fibrotic fibroblasts from humans and mice. *The American Journal of Pathology*, *177*(5), 2245–2255. https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100446

Huang, Z., Zhang, L., Chen, Y., Zhang, H., Yu, C., Zhou, F., Zhang, Z., Jiang, L., Li, R., Ma, J., Li, Z., Lai, Y., Lin, T., Zhao, X., Zhang, Q., Zhang, B., Ye, Z., Liu, S., Wang, W., … Shi, W. (2016). RhoA deficiency disrupts podocyte cytoskeleton and induces podocyte apoptosis by inhibiting YAP/dendrin signal. *BMC Nephrology*, *17*(1), 66. https://doi.org/10.1186/s12882-016-0287-6

Khalil, N., O'Connor, R. N., Unruh, H. W., Warren, P. W., Flanders, K. C., Kemp, A., Bereznay, O. H., & Greenberg, A. H. (1991). Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor-β in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *5*(2), 155–162. https://doi.org/10.1165/ajrcmb/5.2.155

Kim, S. W., Kim, H.-I., Thapa, B., Nuwromegbe, S., & Lee, K. (2019). Critical role of mTORC2-Akt signaling in TGF-β1-induced myofibroblast differentiation of human pterygium fibroblasts. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *60*(1), 82–92. https://doi.org/10.1167/iovs.18-25376

Lilley, E., Stanford, S. C., Kendall, D. E., Alexander, S. P. H., Cirino, G., Docherty, J. R., George, C. H., Insel, P. A., Izzo, A. A., Ji, Y., Panettieri, R. A., Sobey, C. G., Stefanska, B., Stephens, G., Teixeira, M., & Ahluwalia, A. (2020). ARRIVE 2.0 and the British Journal of Pharmacology: Updated guidance for 2020. *British Journal of Pharmacology*, *177*, 3611–3616. https://doi.org/10.1111/bph.15178

Liu, F., Lagares, D., Choi, K. M., Stopfer, L., Marinković, A., Vrbanac, V., Probst, C. K., Hiemer, S. E., Sisson, T. H., Horowitz, J. C., Rosas, I. O., Fredenburgh, L. E., Feghali-Bostwick, C., Varelas, X., Tager, A. M., & Tschumperlin, D. J. (2015). Mechanosignaling through YAP and TAZ drives fibroblast activation and fibrosis. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, *308*(4), L344–L357. https://doi.org/10.1152/ajplung.00300.2014

Liu, T., Baek, H. A., Yu, H., Lee, H. J., Park, B.-H., Ullenbruch, M., Liu, J., Nakashima, T., Choi, Y. Y., Wu, G. D., Chung, M. J., & Phan, S. H. (2011). FIZZ2/RELM-β induction and role in pulmonary fibrosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *187*(1), 450–461. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000964

Lu, Y., Zhang, T., Shan, S., Wang, S., Bian, W., Ren, T., & Yang, D. (2019). MiR-124 regulates transforming growth factor-β1 induced differentiation of lung resident mesenchymal stem cells to myofibroblast by repressing Wnt/β-catenin signaling. *Developmental Biology*, *449*(2), 115–121. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.02.010

Luchsinger, L. L., Patenaude, C. A., Smith, B. D., & Layne, M. D. (2011). Myocardin-related transcription factor-A complexes activate type I collagen expression in lung fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(51), 44116–44125. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.276931

Maher, T. M., Corte, T. J., Fischer, A., Kreuter, M., Lederer, D. J., Molina-Molina, M., Axmann, J., Kirchgaessler, K.-U., Samara, K., Gilberg, F., & Cottin, V. (2020). Pirfenidone in patients with unclassifiable progressive fibrosing interstitial lung disease: A double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet. Respiratory Medicine*, *8*(2), 147–157. https://doi.org/10.1016/S2213-2600(19)30341-8

Marchand-Adam, S., Joëlle Marchal, J., Cohen, M., Soler, P., Gerard, B., Castier, Y., Lesèche, G., et al. (2003). Defect of hepatocyte growth factor secretion by fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *168*(10), 1156–1161. https://doi.org/10.1164/rccm.200212-1514OC

Meltzer, E. B., Barry, W. T., D'Amico, T. A., Davis, R. D., Lin, S. S., Onaitis, M. W., Morrison, L. D., Sporn, T. A., Steele, M. P., & Noble, P. W. (2011). Bayesian probit regression model for the diagnosis of pulmonary fibrosis: Proof-of-principle. *BMC Medical Genomics*, *4*, 70. https://doi.org/10.1186/1755-8794-4-70

Meng, C., He, Y., Wei, Z., Lu, Y., Du, F., Ou, G., Wang, N., Luo, X.-G., Ma, W., Zhang, T.-C., & He, H. (2018). MRTF-A mediates the activation of COL1A1 expression stimulated by multiple signaling pathways in human breast cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, *104*, 718–728. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.092

Meng, X.-M., Nikolic-Paterson, D. J., & Lan, H. Y. (2016). TGF-β: The master regulator of fibrosis. *Nature Reviews. Nephrology*, *12*(6), 325–338. https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.48

Molinie, N., Rubtsova, S. N., Fokin, A., Visweshwaran, S. P., Rocques, N., Polesskaya, A., Schnitzler, A., Vacher, S., Denisov, E. V., Tashireva, L. A., Perelmuter, V. M., Cherdyntseva, N. V., Bièche, I., & Gautreau, A. M. (2019). Cortical branched actin determines cell cycle progression. *Cell Research*, *29*(6), 432–445. https://doi.org/10.1038/s41422-019-0160-9

Munger, J. S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M. J., Dalton, S. L., Wu, J., Pittet, J. F., Kaminski, N., Garat, C., Matthay, M. A., Rifkin, D. B., & Sheppard, D. (1999). The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: A mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell*, *96*(3), 319–328. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80545-0

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

Nolen, B. J., Tomasevic, N., Russell, A., Pierce, D. W., Jia, Z., McCormick, C. D., Hartman, J., Sakowicz, R., & Pollard, T. D. (2009). Characterization of two classes of small molecule inhibitors of Arp2/3 complex. *Nature*, *460*(7258), 1031–1034. https://doi.org/10.1038/nature08231

Otsubo, T., Iwaya, K., Mukai, Y., Mizokami, Y., Serizawa, H., Matsuoka, T., & Mukai, K. (2004). Involvement of Arp2/3 complex in the process of colorectal carcinogenesis. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *17*(4), 461–467. https://doi.org/10.1038/modpathol.3800062

Park, M., Kim, H.-J., Lim, B., Wylegala, A., & Toborek, M. (2013). Methamphetamine-induced occludin endocytosis is mediated by the Arp2/3 complex-regulated actin rearrangement. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(46), 33324–33334. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.483487

Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne, W. J., Clark, A., Cuthill, I. C., Dirnagl, U., Emerson, M.,

Garner, P., Holgate, S. T., Howells, D. W., Karp, N. A., Lazic, S. E., Lidster, K., MacCallum, C. J., Macleod, M., … Würbel, H. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology*, *18*(7), e3000410. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410

Popova, A. P., Bentley, J. K., Anyanwu, A. C., Richardson, M. N., Linn, M. J., Lei, J., Wong, E. J., Goldsmith, A. M., Pryhuber, G. S., & Hershenson, M. B. (2012). Glycogen synthase kinase-3β/β-catenin signaling regulates neonatal lung mesenchymal stromal cell myofibroblastic differentiation. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, *303*(5), L439–L448. https://doi.org/10.1152/ajplung.00408.2011

Rajasekaran, S., Reddy, N. M., Zhang, W., & Reddy, S. P. (2013). Expression profiling of genes regulated by Fra-1/AP-1 transcription factor during bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *BMC Genomics*, *14*, 381. https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-381

Rana, M. K., Aloisio, F. M., Choi, C., & Barber, D. L (2018). Formin-dependent TGF-β signaling for epithelial to mesenchymal transition. *Molecular Biology of the Cell*, *29*(12), 1465–1475. https://doi.org/10.1091/mbc.E17-05-0325

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

Roskoski, R. (2012). ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research*, *66*(2), 105–143. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.04.005

Savary, G., Dewaeles, E., Diazzi, S., Buscot, M., Nottet, N., Fassy, J., Courcot, E., Henaoui, I.-S., Lemaire, J., Martis, N., Van der Hauwaert, C., Pons, N., Magnone, V., Leroy, S., Hofman, V., Plantier, L., Lebrigand, K., Paquet, A., Lino Cardenas, C. L., … Pottier, N. (2019). The long noncoding RNA DNM3OS is a reservoir of FibromiRs with major functions in lung fibroblast response to TGF-β and pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *200*(2), 184–198. https://doi.org/10.1164/rccm.201807-1237OC

Selman, M., & Pardo, A. (2006). Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: From innocent targets to serial killers. *Proceedings of the American Thoracic Society*, *3*(4), 364–372. https://doi.org/10.1513/pats.200601-003TK, https://doi.org/10.1513/pats.200601-003TK

Shiratsuchi, E., Ura, M., Nakaba, M., Maeda, I., & Okamoto, K. (2010). Elastin peptides prepared from piscine and mammalian elastic tissues inhibit collagen-induced platelet aggregation and stimulate migration and proliferation of human skin fibroblasts. *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society*, *16*(11), 652–658. https://doi.org/10.1002/psc.1277

Simon, D. N., & Wilson, K. L. (2011). The nucleoskeleton as a genome-associated dynamic 'network of networks'. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *12*(11), 695–708. https://doi.org/10.1038/nrm3207

Simsa, R., Vila, X. M., Salzer, E., Teuschl, A., Jenndahl, L., Bergh, N., & Fogelstrand, P. (2019). Effect of fluid dynamics on decellularization efficacy and mechanical properties of blood vessels. *PLoS ONE*, *14*(8), e0220743. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220743

Small, E. M. (2012). The actin–MRTF–SRF gene regulatory axis and myofibroblast differentiation. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, *5*(6), 794–804. https://doi.org/10.1007/s12265-012-9397-0

Suraneni, P., Rubinstein, B., Unruh, J. R., Durnin, M., Hanein, D., & Li, R. (2012). The Arp2/3 complex is required for lamellipodia extension and directional fibroblast cell migration. *The Journal of Cell Biology*, *197*(2), 239–251. https://doi.org/10.1083/jcb.201112113

Szeto, S. G., Narimatsu, M., Lu, M., He, X., Sidiqi, A. M., Tolosa, M. F., Chan, L., De Freitas, K., Bialik, J. F., Majumder, S., Boo, S., Hinz, B., Dan, Q., Advani, A., John, R., Wrana, J. L., Kapus, A., & Yuen, D. A. (2016). YAP/TAZ are mechanoregulators of TGF-β-Smad signaling and renal fibrogenesis. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, *27*(10), 3117–3128. https://doi.org/10.1681/ASN.2015050499

Tang, W., Cai, P., Huo, W., Li, H., Tang, J., Zhu, D., Xie, H., Chen, P., Hang, B., Wang, S., & Xia, Y. (2016). Suppressive action of miRNAs to ARP2/3 complex reduces cell migration and proliferation via RAC isoforms in Hirschsprung disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *20*(7), 1266–1275. https://doi.org/10.1111/jcmm.12799

Tsukui, T., Sun, K.-H., Wetter, J. B., Wilson-Kanamori, J. R., Hazelwood, L. A., Henderson, N. C., Adams, T. S., Schupp, J. C., Poli, S. D., Rosas, I. O., Kaminski, N., Matthay, M. A., Wolters, P. J., & Sheppard, D. (2020). Collagen-producing lung cell atlas identifies multiple subsets with distinct localization and relevance to fibrosis. *Nature Communications*, *11*(1), 1920. https://doi.org/10.1038/s41467-020-15647-5

Valenzi, E., Tabib, T., Papazoglou, A., Sembrat, J., Trejo Bittar, H. E., Rojas, M., & Lafyatis, R. (2021). Disparate interferon signaling and shared aberrant basaloid cells in single-cell profiling of idiopathic pulmonary fibrosis and systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *Frontiers in Immunology*, *12*, 595811. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.595811

Velasquez, L. S., Sutherland, L. B., Liu, Z., Grinnell, F., Kamm, K. E., Schneider, J. W., Olson, E. N., & Small, E. M. (2013). Activation of MRTF-A-dependent gene expression with a small molecule promotes myofibroblast differentiation and wound healing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(42), 16850–16855. https://doi.org/10.1073/pnas.1316764110

Wang, S., Meng, X.-M., Ng, Y.-Y., Ma, F. Y., Zhou, S., Zhang, Y., Yang, C., Huang, X.-R., Xiao, J., Wang, Y.-Y., Ka, S.-M., Tang, Y.-J., Chung, A. C. K., To, K.-F., Nikolic-Paterson, D. J., & Lan, H.-Y. (2016). TGF-β/Smad3 signalling regulates the transition of bone marrow-derived macrophages into myofibroblasts during tissue fibrosis. *Oncotarget*, *7*(8), 8809–8822. https://doi.org/10.18632/oncotarget.6604

Wu, C., Asokan, S. B., Berginski, M. E., Haynes, E. M., Sharpless, N. E., Griffith, J. D., Gomez, S. M., & Bear, J. E. (2012). Arp2/3 is critical for lamellipodia and response to extracellular matrix cues but is dispensable for chemotaxis. *Cell*, *148*(5), 973–987. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.034

Xie, T., Wang, Y., Deng, N., Huang, G., Taghavifar, F., Geng, Y., Liu, N., Kulur, V., Yao, C., Chen, P., Liu, Z., Stripp, B., Tang, J., Liang, J., Noble, P. W., & Jiang, D. (2018). Single-cell deconvolution of fibroblast heterogeneity in mouse pulmonary fibrosis. *Cell Reports*, *22*(13), 3625–3640. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.010

Yamagishi, Y., Oya, K., Matsuura, A., & Abe, H. (2018). Use of CK-548 and CK-869 as Arp2/3 complex inhibitors directly suppresses microtubule assembly both in vitro and in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *496*(3), 834–839. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.143

Zhang, Y., & Stefanovic, B. (2016). Akt mediated phosphorylation of LARP6; critical step in biosynthesis of type I collagen. *Scientific Reports*, *6*, 22597. https://doi.org/10.1038/srep22597

Zhao, Y., Lin, Y., Zhang, H., Mañas, A., Tang, W., Zhang, Y., Wu, D., Lin, A., & Xiang, J. (2015). Ubl4A is required for insulin-induced Akt plasma membrane translocation through promotion of Arp2/3-dependent actin branching. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(31), 9644–9649. https://doi.org/10.1073/pnas.1508647112

Zhou, Y., Huang, X., Hecker, L., Kurundkar, D., Kurundkar, A., Liu, H., Jin, T.-H., Desai, L., Bernard, K., & Thannickal, V. J. (2013). Inhibition of mechanosensitive signaling in myofibroblasts ameliorates experimental pulmonary fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, *123*(3), 1096–1108. https://doi.org/10.1172/JCI66700

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

How to cite this article: Mergault, C., Lisée, F., Tiroille, V., Magnien, M., Parent, C., Lenga Mabonda, W., Sizaret, D., Jaillet, M., Crestani, B., Marchand-Adam, S., & Plantier, L. (2021). Inhibition of the Arp2/3 complex represses human lung myofibroblast differentiation and attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *British Journal of Pharmacology*, 1–16. https://doi.org/10.1111/bph.15675

SUPPORTING INFORMATION

SUPPLEMENTARY FILES

Supplementary Table 1. Antibodies used in the study.

Protein	**Manufacturer**	**ID**	**Dilution for Western Blotting**	**Dilution for cell-based ELISA**
Phospho-SMAD2	Cell signaling	3108	1/1000	
SMAD2	Cell signaling	5339	1/1000	
Phospho-Akt	Cell signaling	4060	1/1000	
Akt	Cell signaling	4691	1/1000	
Phospho-GSK3β	Cell signaling	D85E12	1/1000	
β-catenin	Cell signaling	D10A8	1/1000	
Phosho-ERK1/2	Cell signaling	4370	1/2000	
ERK1/2	Abcam	A42704	1/1000	
GRP78	R&D system	AF4846	1/500	
GAPDH	R&D system	AF5718	1/500	
H2B	Invitrogen	GT387	1/2500	
YAP	Cell signaling	D8H1X	1/250	
HDAC2	Cell signaling	2540	1/1000	
ACTA2	R&D system	MAB1420		1/1000
β-actin	Sigma-Aldrich	A2228	1/2000	
ARP2	Santa Cruz Biotechnology	Sc-166103	1/500	
ARP3	Santa Cruz Biotechnology	Sc-48344	1/1000	
ARPC2	Sigma-Aldrich	07-227	1/1000	

Supplementary Table 2. PCR primers.

Species	Transcript	Gene name	Forward sequence	Reverse sequence
Human	*UBC*	Ubiquitin C	CAGTTGGTCCTGCGCTTG	TTTTTTGGGAATGCAA CAACTTT

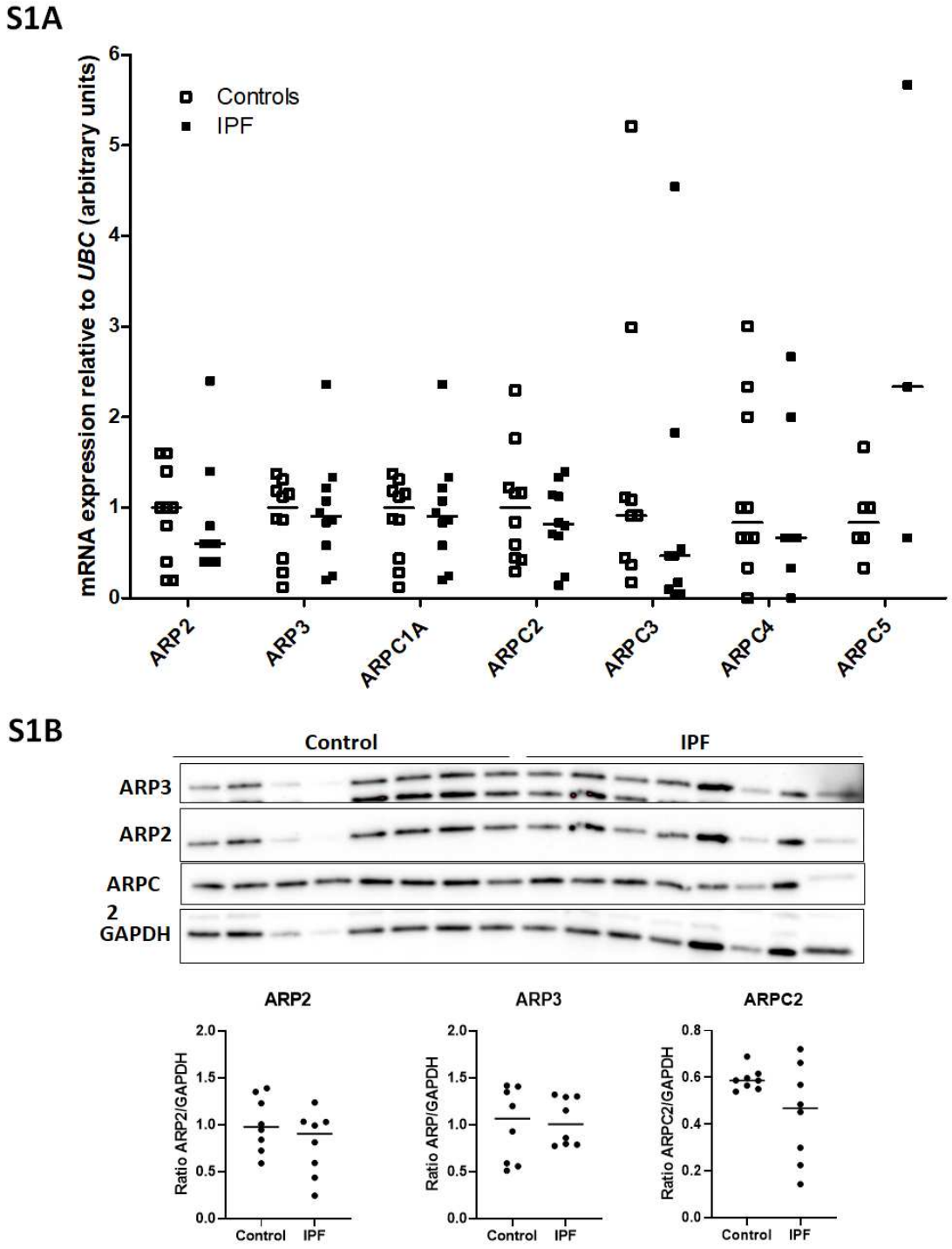
Human	*ARPC2*	Actin related protein 2/3 complex, subunit 2	TTTCATCCCGCTAATCTTGG	GGGAGAAAAGGGAAGTGAGG
Human	*ARPC1A*	Actin related protein 2/3 complex, subunit 1A	TGCCTGGAACAGGGATCGTA	CTTGCTCACCCACCAGTCAT
Human	*ARPC3*	Actin related protein 2/3 complex, subunit 3	AATTCAAAGGACCTGCCCCC	TAGGCTCTCATCACTTCATCTTCC
Human	*ARPC4*	Actin related protein 2/3 complex, subunit 4	CGGCTGTTCGGCCTCAG	TCATCAGCCTGTTTCACAGC
Human	*ARPC5*	Actin related protein 2/3 complex, subunit 5	CGGCAAGGAAACATGACAGC	GCAAGTGCCTTTTCATGCCA
Human	*ARP2*	Actin related protein 2	GTGGTGCAGTTCTAGCGGAT	CTAGCACACGGACACCCTTT
Human	*ARP3*	Actin related protein 3	CATTCCTGTGGCTGAAGGGT	AGCGCTCCTTTACTGCCTTA
Human	*ACTA2*	Actin, Alpha 2, Smooth Muscle	GAAGAGCATCCCACCCTG	ATTTTCTCCCGGTTGGCC
Human	*COL1A1*	Collagen 1 alpha 1	TTGAGACTCAGCCACCCAGAGT	CAGTTCTTGGCTGGGTGTTTT
Human	*COL1A2*	Collagen 1 alpha 2	AGCAGGTCCTTGGAAACCTT	GAAAAGGAGTTGGACTTGGC
Mouse	*Gapdh*	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogenase	TGCCCAGAACATCATCCCTG	TCAGATCCACGACGGACACA
Mouse	*Arp2*	Actin-related protein 2	CACATCTTCCCAGCTTTGGT	CAGCTCACTTGCCTCATCAC
Mouse	*Arp3*	Actin-related protein 3	CAGGCTGTTCTTGCCTTAGC	ATCCTTCAGCCACAGGAATG
Mouse	*Arpc1a*	Actin related protein 2/3 complex, subunit 1	GAGGATTAACCGTGCAGCCA	CTTGCTCACCCACCAGTCAT
Mouse	*Arpc2*	Actin related protein 2/3 complex, subunit 2	CACCGCCCTTGTTTCTCCTT	GCTTCTGGTTTGTTTCCGGC
Mouse	*Arpc3*	Actin related protein 2/3 complex, subunit 3	CCATTTATGCCAAGCCTGCG	GTCCACCACTTGCTGGGTTT

Mouse	*Arpc4*	Actin related protein 2/3 complex, subunit 4	CTCTCCGCCCCTACCTTAGT	TGCTACTCCTGACTTCGACC
Mouse	*Arpc5*	Actin related protein 2/3 complex, subunit 5	GAAGGTGGACGTGGACGAAT	GCTGTCATGTTTCCTTGCCG
Mouse	*Col1a1*	Collagen 1 alpha 1	CCAGTGGCGGTTATGACTTCA	GCTGCGGATGTTCTCAATCTG
Mouse	*Col1a2*	Collagen 1 alpha 2	CTGATGGCAGAGCTGGTGTA	ATGTTGCCAGCTTCACCTCT
Mouse	*Lox*	Lysyl oxidase	AGGGCGGATGTCAGAGACTA	AATCCCTGTGTGTGTGCAGT
Mouse	*Loxl2*	Lysyl oxidase like-2	CCTCCCTCCCGCTTTCA	CAAGTGTGCAGTCCTGGGTTT
Mouse	*Tg2*	Transglutaminase-2	GGAGGAGCGACGGGAATATG	ATTCCATCCTCGAACTGCCC

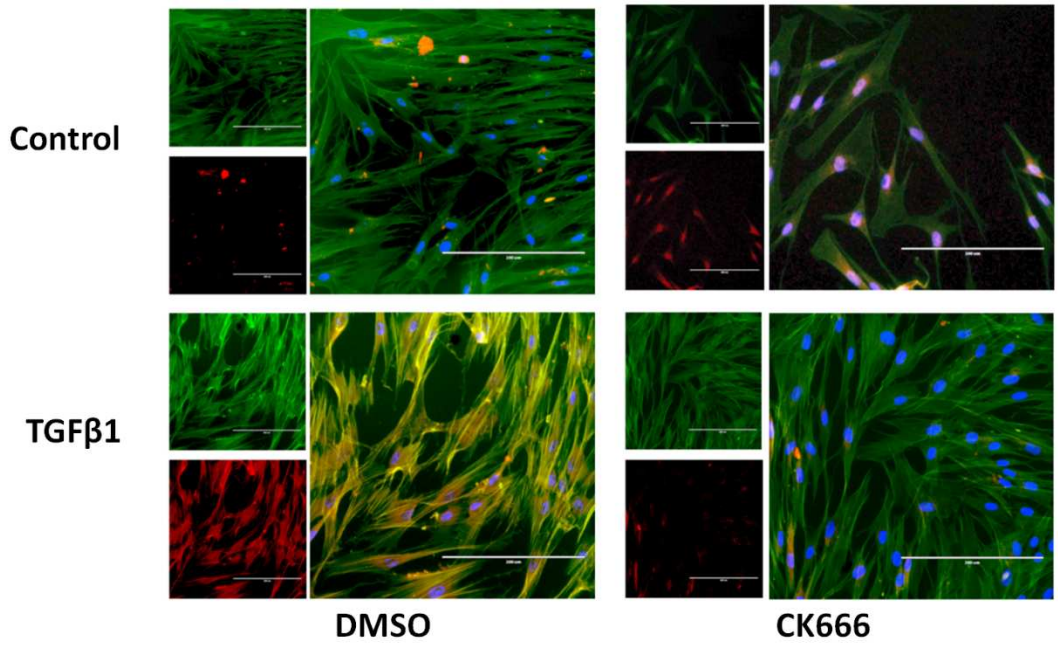
Supplementary Table 3. Expression of Arp2/3 complex subunits at the mRNA level in the lungs of bleomycin- and CK666-treated mice, reported to *Gapdh*. Bleo or saline were given intratracheally at Day 0. CK666 or the respective control were given intraperitoneally from Day 7 to Day 14. Mice were analyzed at Day 14. Arbitrary units. *: $p<0.05$ versus Saline. N=10-12 per group.

	Saline	Saline+CK666	Bleo	Bleo+CK666
Arp2	1.26+/-0.67	2.03+/-0.91*	2.15+/-0.71*	2.16+/-1.20*
Arp3	1.64+/-1.07	2.57+/-1.35	3.26+/-1.29*	3.26+/-2.06*
Arpc1a	1.30+/-0.40	1.94+/-0.61*	1.64+/-0.30*	1.72+/-0.53*
Arpc2	2.54+/-1.9	3.51+/-2.85	5.80+/-3.81*	6.14+/-5.57*
Arpc3	0.75+/-0.42	1.20+/-0.53*	1.23+/-0.47*	1.23+/-0.54*
Arpc4	1.93+/-0.90	2.71+/-1.41	3.59+/-1.45*	3.61+/-2.33*
Arpc5	1.16+/-0.62	1.69+/-1.03	1.93+/-0.73*	1.74+/-0.98

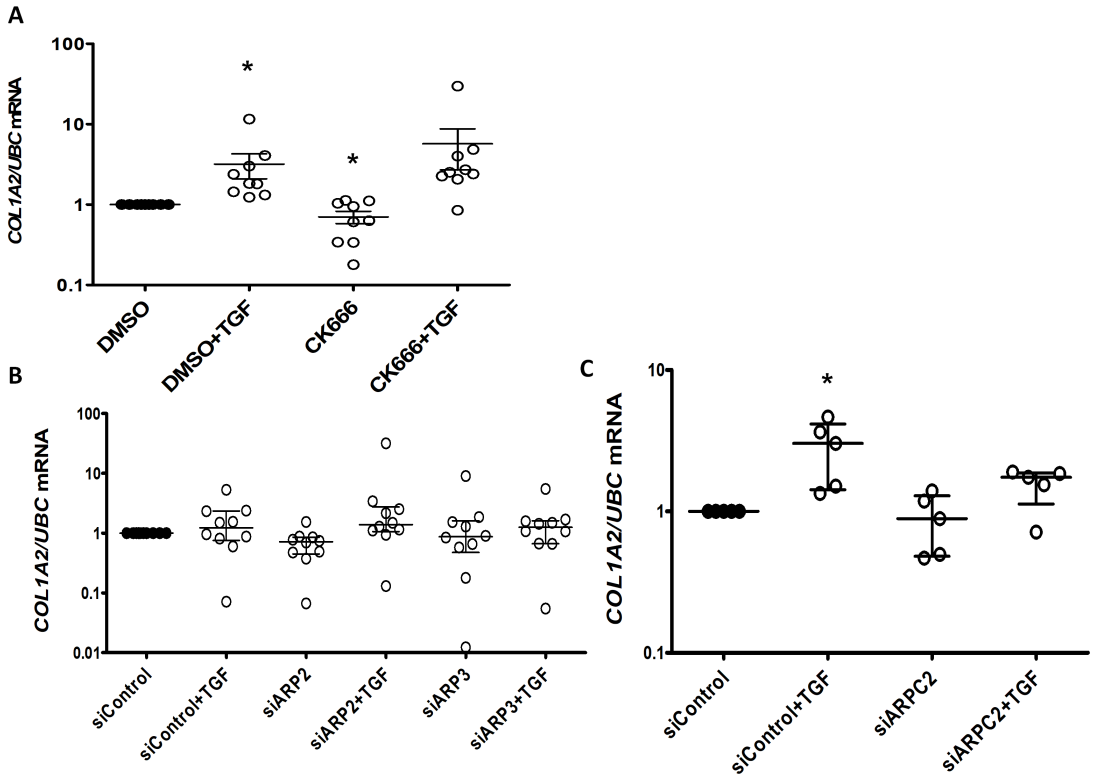
Supplementary Figure 1. Expression of Arp2/3 subunits at the mRNA and protein level in fibroblasts cultured from notrmal and IPF human lungs. S1A : RTPCR. Gene expression was reported to *UBC* mRNA and normalised to the mean of control fibroblasts. N=10 per group. S1B : Western blotting. Protein expression was reported to GAPDH. N=8 per group. Individual data and medians are shown.



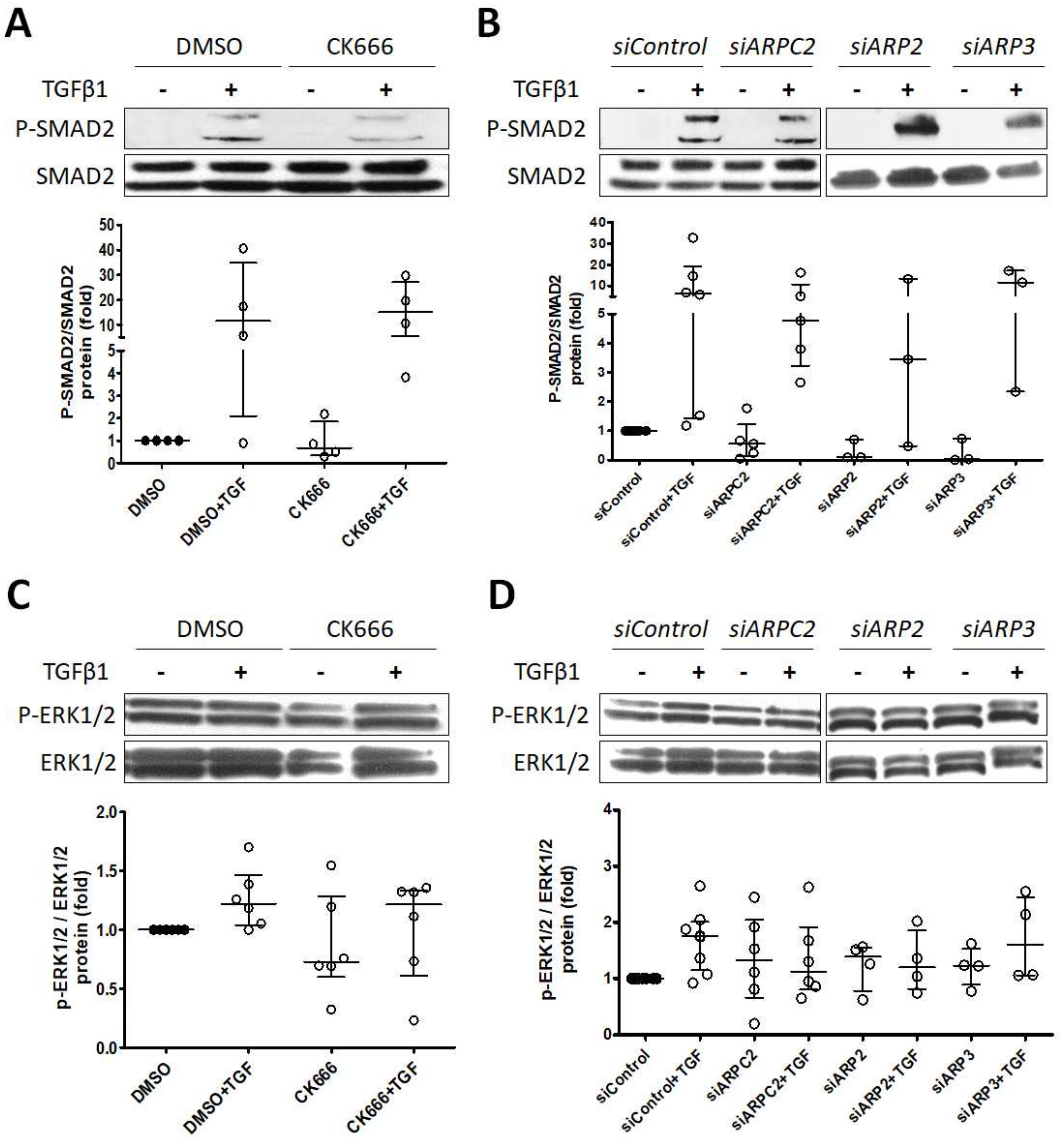
Supplementary Figure 2. Effect of CK666 on spontaneous and TGFβ1-induced stress fibers in CCD16Lu cells. ACTA2 was stained red. Slides were counterstained with phalloidin (actin cytoskeleton – green) and Hoescht 33342 (nuclei-blue). Scale bars : 100µm.



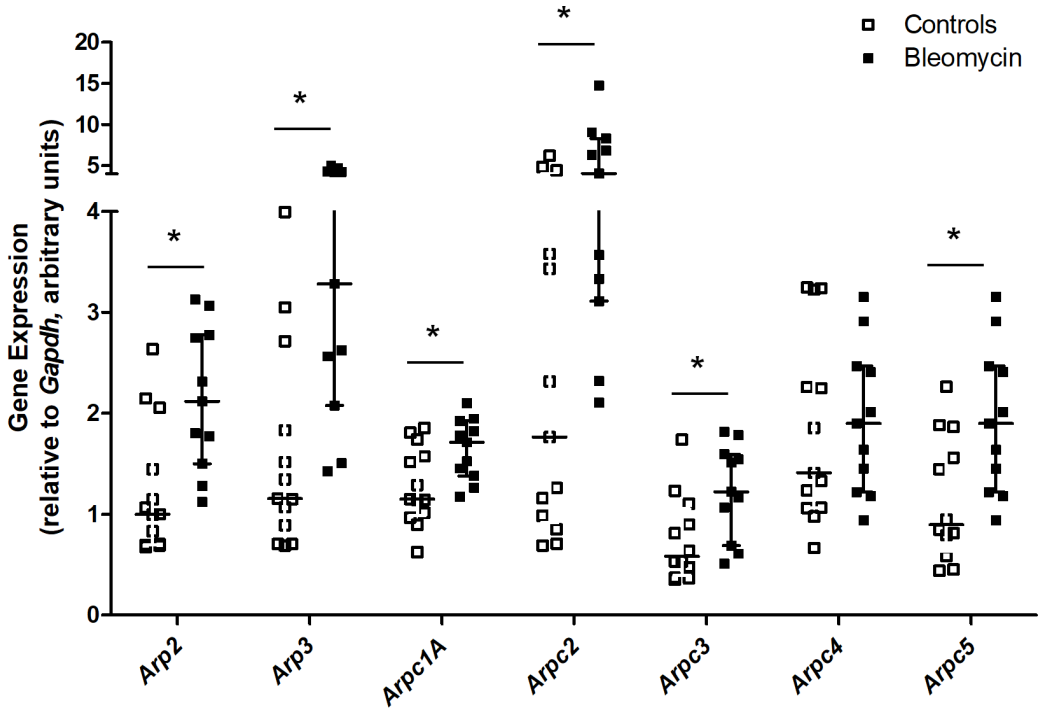
Supplementary Figure 3. Baseline and TGFβ1-stimulated expression of *COL1A2* mRNA in CCD16Lu cells treated with Arp2/3 targeting agents. A: Cells treated with either DMSO or CK666 (N=9). B: Cells treated with either inactive siRNAs (*siControl*) or siRNAs targeting *ARP2* or *ARP3* (N=10). C: Cells treated with either inactive siRNAs (*siControl*) or siRNAs targeting *ARPC2* (N=5). Individual data, medians and interquartile ranges are shown. *: p<0.05 versus DMSO or *siControl*.



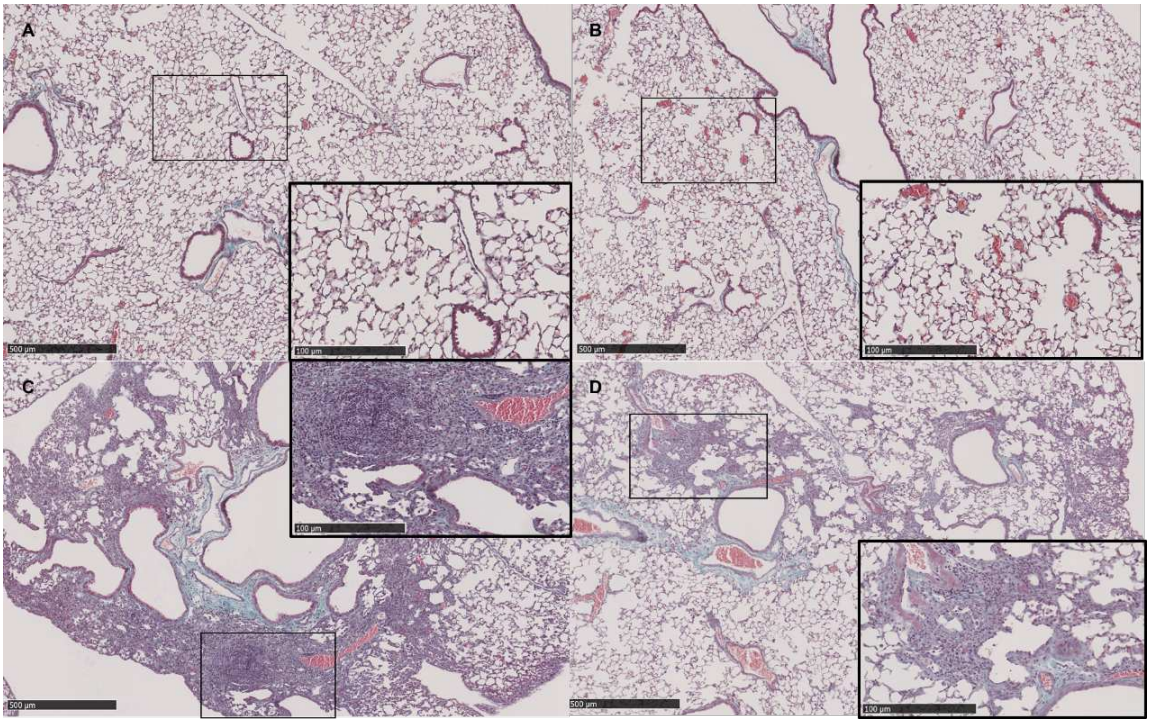
Supplementary Figure 4. Phospho-SMAD2/total SMAD2 and Phosho-ERK1/2/total ERK1/2 ratio in unstimulated and TGFβ1-stimulated CCD16Lu cells treated with Arp2/3 targeting agents. A and C : Cells were treated with either DMSO or CK666. B and D : Cells were treated with either inactive siRNAs (siControl) or siRNAs targeting *ARPC2*, *ARP2* or *ARP3*. Representative experiments and densitometric analysis. Individual data, medians and interquartile range.



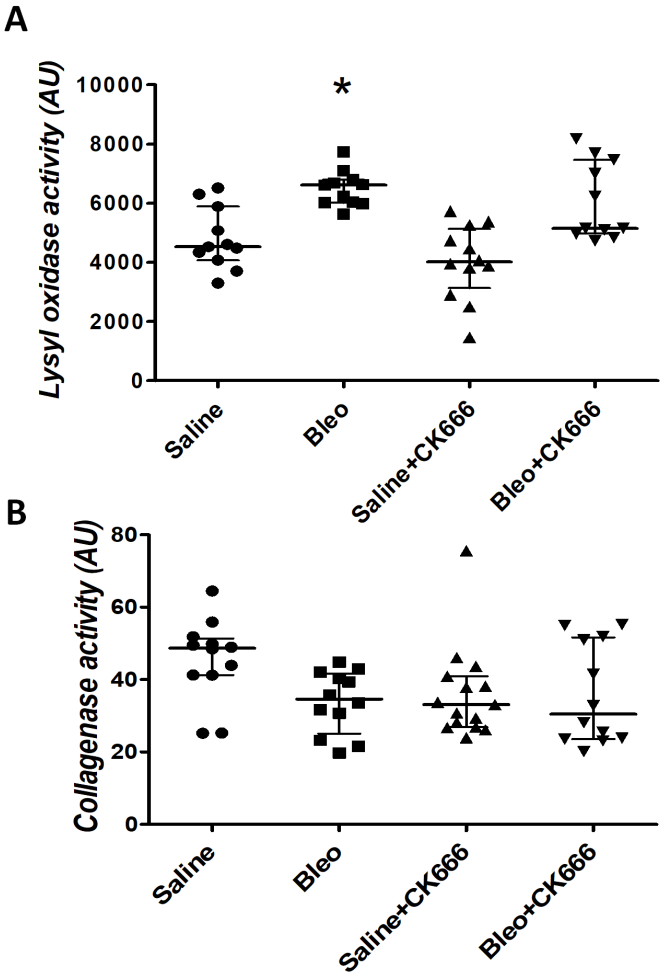
Supplementary Figure 5. Expression of Arp2/3 subunits mRNAs in the lungs of mice 14 days after instillation of bleomycin or saline. Arbitrary units. *: p<0.05 versus Control after Holm-Bonferroni correction. N=10 to 13 per group. Individual data, medians and interquartile range.



Supplementary Figure 6. Histology of mouse lungs 14 days after IT instillation of saline (A, B) or bleomycin (C, D). Mice were treated with daily IP injections of either DMSO/saline (A, C) or 5 mg/kg/day CK666 (B, D) from Day 7 to Day 14 after IT. Magnification is x50, insets are x200. Slides were stained with Masson's trichrome.



Supplementary Figure 7. CK666 did not modify lysyl oxidase and collagenase activity in lung lysates. A: Lysyl oxidase activity. B : Collagenase activity. AU: Arbitrary Units. All data are Day 14 after instillation of Bleo or Saline. *: p<0.05 versus Saline. N=10-14 per group.



III. Expériences complémentaires

En plus des travaux présentés dans l'article reproduit ci-dessus, des expériences complémentaires ont été effectuées pour 1) caractériser l'expression d'ARP2 et ARP3 dans le poumon des patients atteints de FPI, 2) déterminer si la répression simultanée d'ARP2 et ARP3 reproduisait l'effet biologique du CK666 *in vitro*, 3) déterminer si le CK666 modulait la phosphorylation de SMAD3 et 4) déterminer si l'administration d'un deuxième inhibiteur pharmacologique du complexe Arp2/3 reproduisait l'effet antifibrosant du CK666 *in vivo*.

III.1. Expression d'ARP2 et ARP3 dans les poumons humains atteints de FPI

III.1.1. Matériels et méthodes

L'expression des sous-unités ARP2 et ARP3 a été évaluée sur des coupes de poumon de 5 patients atteint de FPI (poumon explanté lors d'une transplantation pulmonaire) et de 4 patients indemne de FPI (poumon recueilli à l'occasion d'une chirurgie pour cancer, à distance de la tumeur), dans le cadre d'une collaboration avec l'unité Inserm UMR1152 (Pr Crestani, Mme Madeleine Jaillet). Les anticorps dirigés contre ARP2 (sc-166103, Santa Cruz Biotechnology, USA) et ARP3 (sc- 48344, Santa Cruz Biotechnology, USA) ont été dilué au 1/500 dans du tampon de saturation contenant 3% d'albumine de sérum bovin (BSA) et 2% de sérum de cheval.

III.1.2. Résultats

Chez le sujet sain ARP2 et ARP3 étaient détectés dans des cellules dont la localisation et la morphologie étaient celles des macrophages alvéolaires et des cellules alvéolaires de type 2 (**Figures 17A et 17C**). Dans le poumon de patient atteint de FPI, ARP2 était détectée dans des petites cellules arrondies, évoquant des lymphocytes (**Figure 17B**). ARP3 semblait également être détectée au sein des macrophages (**Figure 17D**).

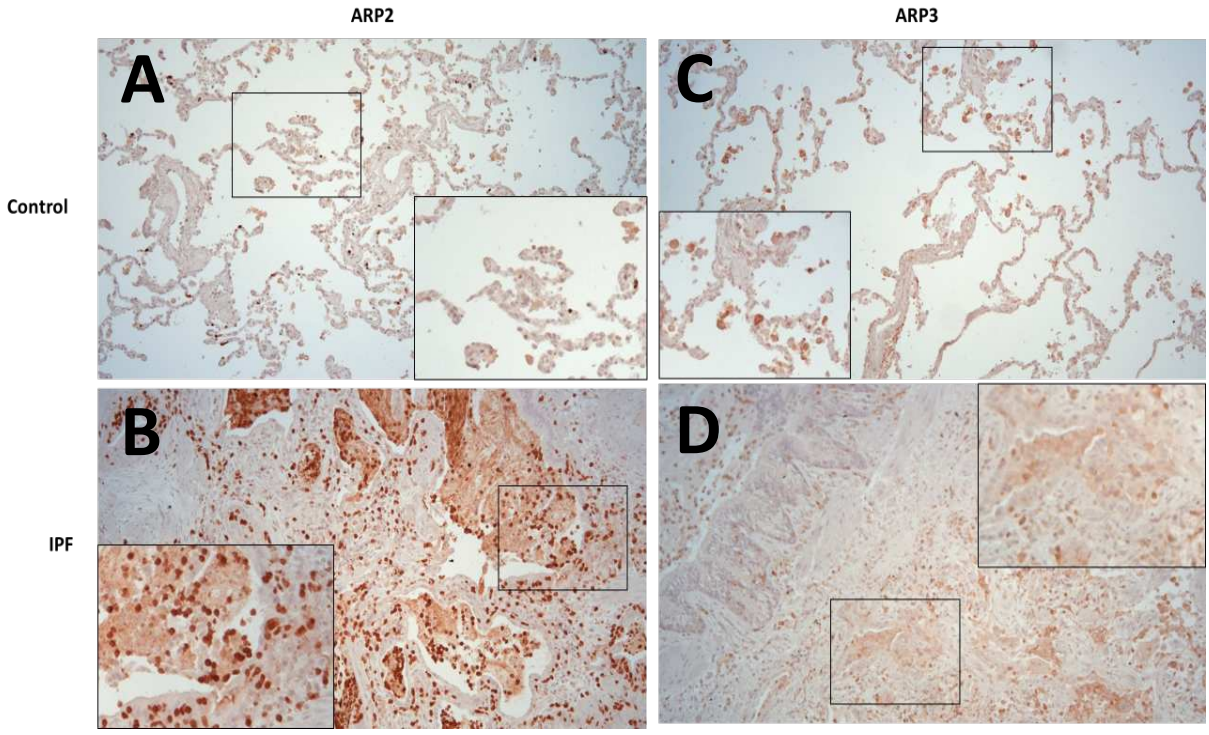


Figure 17 : Immunohistochimie pour ARP2 et ARP3 dans le poumon humain. **Marquage d'ARP2 dans les poumon d'un patient contrôle (A) ou d'un patient atteint de FPI (B). Marquage d'ARP3 dans les poumon d'un patient contrôle (C) ou d'un patient atteint de FPI (D). Le contrôle isotype n'était pas marqué (non montré).**

III.2. *In vitro* : Transfection simultanées par *siARP2* et *siARP3*

Le CK666 inhibe le complexe Arp2/3 suite à sa fixation aux sous-unités ARP2 et ARP3. Les résultats obtenus dans l'article présenté précédemment (Mergault et al. 2021) montraient que la répression isolée d'*ARP2*, *ARP3* ou *ARPC2* ne suffisait à reproduire complètement les effets du CK666.

Le CK666 et *siARPC2,* réduisaient la croissance des fibroblastes pulmonaires après 4 jours de traitement tandis que les *siARP2* et *siARP3* n'avaient aucun effet sur la croissance des fibroblastes pulmonaires. Le CK666 était capable de réduire les niveaux d'ACTA2, dans les cellules non stimulées par le TGFβ1 mais également l'expression d'ACTA2 induite par le TGFβ1, au niveau de l'ARNm et de la protéine. La répression isolée d'*ARP2* et *ARP3* n'avait aucun effet sur l'expression d'ACTA2. Le CK666 réduisait l'expression basale de COL1 au niveau ARNm et protéique.

Ces résultats ont conduit à formuler l'hypothèse que le CK666 exerce ses effets biologiques via l'inhibition conjointe de *ARP2* et *ARP3*. Pour tester cette hypothèse, une double répression d'*ARP2* et *ARP3* par des siRNAs a été effectuée.

III.2.1. Matériels et méthodes

Transfection simultanée des siRNAs ciblant ARP2 et ARP3

Les fibroblastes pulmonaires humains CCD16Lu (1 x 10^5 par puits) ont été transfectés avec 4 nM de siRNA ciblant *ARP2* et *ARP3* (*siARP2*, *siARP3*, Silencer Select, s19644 et 127242, Thermo Fisher) ou un siRNA inactif appelé ici *siControl* (Silencer Select Negative Control #1 siRNA, #4390843, Thermo Fisher) 24 h avant l'ajout du TGFβ1 ou du contrôle. Un premier mix a été réalisé avec les deux siRNAs auquel ont été ajouté 9 µl de réactif Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher) selon les instructions du fabricant. Les cellules ont été recueillies 48 h après le traitement par le témoin ou le TGFβ1 et analysées comme dans l'article reproduit plus haut.

III.2.2. Résultats

La répression simultanée d'ARP2 et ARP3 diminuait la croissance des fibroblastes.

La double répression d'*ARP2* et *ARP3* diminuait la croissance cellulaire des fibroblastes pulmonaires humains après 4 jours de traitement, de l'ordre de 45% (**Figure 18**).

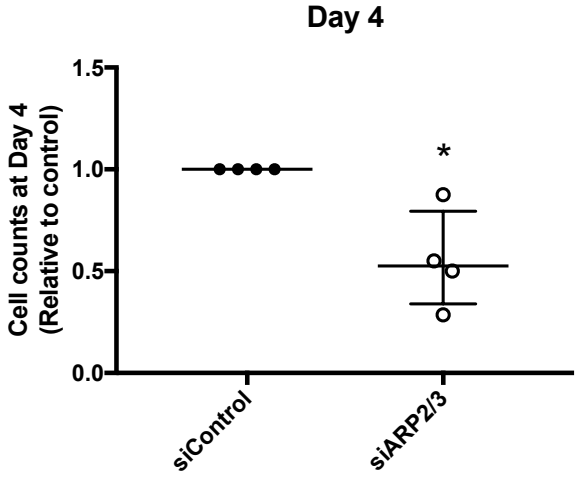


Figure 18 : Effet de la double transfection par siARP2 et siARP3 sur la croissance des fibroblastes pulmonaires humains CCD16lu (n = 4). **Les données ont été normalisés par rapport à la condition de contrôle (*siControl*). Les données individuelles, les médianes et l'écart interquartile sont indiqués. * : p<0,05 par rapport au *siControl*.**

La double répression d'ARP2 et ARP3 ne réduisait pas l'expression d'ACTA2 induite par le TGFβ1.

Le TGFβ1 induisait l'expression d'ACTA2 au niveau de l'ARNm et des protéines (**Figures 19A, 19B**). Contrairement au CK666, la double transfection par *siARP2* et *siARP3*, ne réduisait pas l'expression d'ACTA2 dans les cellules non stimulées et stimulées par le TGFβ1.

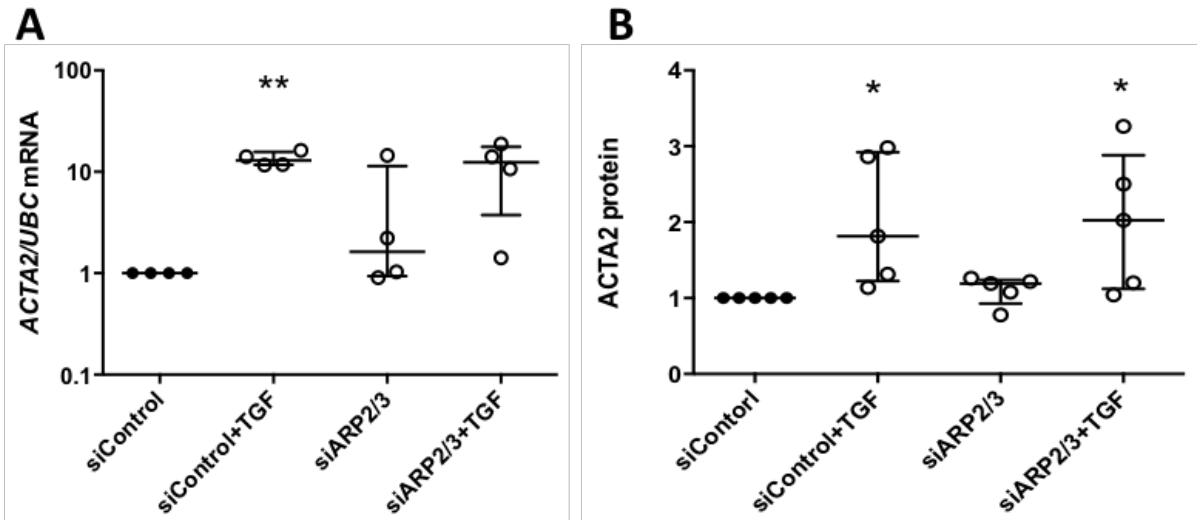


Figure 19 : Absence de régulation de l'expression d'ACTA2 par les siRNAs ciblant simultanément ARP2 et ARP3 avec ou sans stimulation par le TGFβ1 dans les cellules CCD16lu (n = 4). **A) ARNm d'*ACTA2* (RTPCR). B) Protéine ACTA2 (cell-based ELISA). Les données ont été normalisées par rapport au *siControl*. Les données individuelles, les médianes et les écarts interquartiles sont indiqués.* : p<0,05 par rapport au *siControl*.**

La double répression d'ARP2 et ARP3 réduisait l'expression de COL1 induite par le TGFβ1.

Au même titre que les siRNAs ciblant *ARP2*, *ARP3* et *ARPC2* transférés isolément, la transfection simultanée par *siARP2* et *siARP3* ne modulait pas l'expression des ARNm *COL1A1* et *COL1A2* dans les cellules stimulées ou non par le TGFβ1 (**Figures 20A, 20B**). Par contre, la double répression des sous-unités *ARP2* et *ARP3* tendait à diminuer l'expression basale de la protéine proCOL1 (p = 0,07) et diminuait de façon significative l'expression protéique de proCOL1 dans les cellules stimulées par le TGFβ1 (**Figure 20C**).

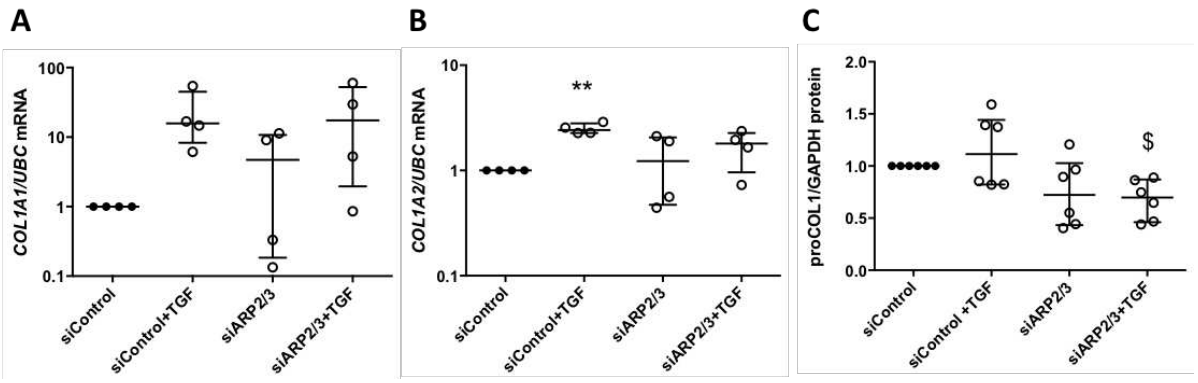


Figure 20 : Expression du collagène 1 dans les CCD16lu stimulées ou non par le TGFβ1 et traitées ou non par les siRNAs ciblant ARP2 et ARP3. **A) ARNm *COL1A1/UBC* (RTPCR, n = 4). B) ARNm *COL1A2/UBC* (RTPCR, n = 4). C) Protéine proCOL1/GAPDH (ELISA, n = 6). Les données ont été normalisées par rapport au *siControl*. Les données individuelles, les médianes et les intervalles interquartiles sont indiqués. * : p<0,05 par rapport au *siControl*. $: p<0,05 par rapport au *siControl*+TGFβ1.**

III.3. *In vitro* : Phosphorylation de SMAD3

III.3.1. Matériels et méthodes

Précédemment, nos résultats montraient que le CK666 ne modulait pas la phosphorylation de SMAD2 dans les fibroblastes pulmonaires humains stimulés par le TGFβ1. La phosphorylation de SMAD3 a été quantifiée dans ces fibroblastes, en accord avec l'expérience de western blot décrite dans l'article, en utilisant les anticorps ciblant phospho-SMAD3 (#9520, Cell Signaling Technology, USA) et SMAD3 (#9523, Cell Signaling Technology, USA) dilués au 1/1000ème dans le tampon de saturation.

III.3.2. Résultats

La **Figure 21** montre que le CK666 ne modulait pas la phosphorylation de SMAD3 induite par le TGFβ1.

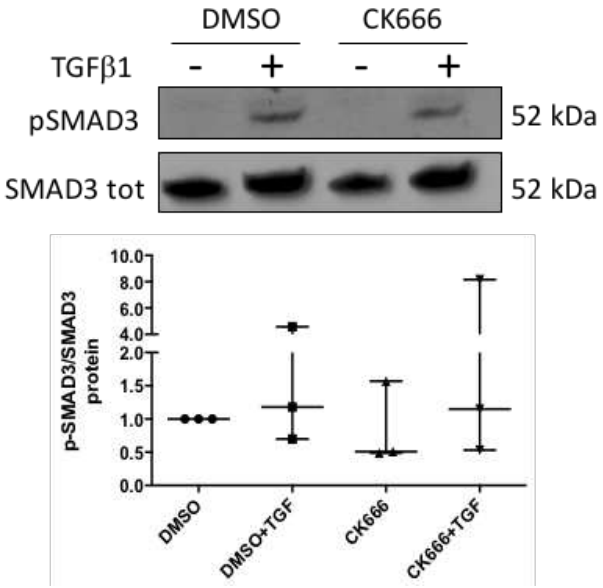


Figure 21 : Le CK666 ne modulait pas la phosphorylation de SMAD3 induite par la TGFβ1.

III.4. *In vivo* : Traitement par benpropérine des souris exposées à la bléomycine

L'utilisation de petites molécules inhibitrices pose la question de leur spécificité. Afin d'explorer l'hypothèse du bénéfice d'un traitement ciblant le complexe Arp2/3 dans la fibrose pulmonaire, nous avons testé l'effet *in vivo* d'un deuxième inhibiteur du complexe Arp2/3, la benpropérine. Tandis que le CK666 précédemment utilisé se lie aux sous-unités ARP2 et ARP3, la benpropérine se lie à la sous-unité ARPC2 du complexe Arp2/3.

III.4.1. Matériels et méthodes

Traitement des souris par la benpropérine dans le modèle de fibrose pulmonaire

La **benpropérine**, une molécule pharmacologique utilisée cliniquement comme antitussif (Yan Li et al. 2005) se lie directement à la sous-unité ARPC2 du complexe Arp2/3. Cela induit une répression de la polymérisation de l'actine, aboutissant à une perte de la capacité migratoire des cellules cancéreuses du colon (DLD-1) (Yoon et al. 2019a). La benpropérine inhibe le complexe Arp2/3 avec une IC50 de l'ordre de 10 μM dans les cellules d'adénocarcinome colorectal (DLD-1) (Yoon et al. 2019b). Les effets thérapeutiques de l'inhibition d'ARPC2 par la

benpropérine ont été validé dans des modèles murins de cancer pancréatique (Yoon et al. 2019a; H. Zhang et al. 2021). Il a été montré que l'administration de benpropérine à hauteur de 50 mg/kg, cinq fois par semaine, n'induisait pas de toxicité au niveau des poumons (H. Zhang et al. 2021), et que la benpropérine permettaient de supprimer jusqu'à 93% les métastases pulmonaires d'un cancer pancréatique chez la souris (Yoon et al. 2019a).

Des souris C57BL6-J mâles, âgées de 8 semaines (Janvier, Le Genest-St-Ile, France) ont reçu une instillation intratrachéale de 12 µg de bléomycine (Adooq, USA) ou de solution saline, sous anesthésie à l'isoflurane, avec le dispositif Microsprayer (Penn Century, Wyndmoor, USA). Les souris ont été traitées du 7^{e} au 19^{e} jour après l'instillation par des gavages quotidiens de 50 mg/kg de benpropérine (H. Zhang et al. 2021) dans 100 µL de solution saline, ou de solution saline seule. La benpropérine a été utilisé précédemment chez la souris (Yoon et al. 2019a). Les souris ont été randomisées par groupe de traitement.

Le 19^{e} jour suivant l'administration de bléomycine, les souris ont été anesthésiées avec 300 mg/kg de kétamine et 30 mg/kg de xylazine, puis euthanasiées par exsanguination. Les poumons ont ensuite été congelés dans l'azote liquide pour les études moléculaires. Le collagène insoluble total a été quantifié dans les homogénats de poumon gauche avec le test Sircol INSOLUBLE Collagen Assay (Biocolor, Carrickfergus, UK) comme décrit dans l'article.

III.4.2. Résultats

La benpropérine n'a pas réduit la perte de poids induite par la bléomycine.

Au moment de l'instillation intratrachéale de bléomycine, les souris de chacun des groupes, avaient un poids corporel similaire (**Figure 22A**). Au 7^{e} jour après l'exposition à la bléomycine, le poids des souris avait diminué de 13% chez les souris exposées à la bléomycine et de 18% chez les souris exposées à la bléomycine et traitées avec la benpropérine (**Figures 22B, 22C, 22D**), en comparaison au poids initial. La perte de poids n'était pas différente entre les souris traitées ou non avec la benpropérine après l'instillation de bléomycine. Ces résultats suggèrent que la benpropérine ne diminuait pas la perte de poids induite par la bléomycine dans le modèle murin.

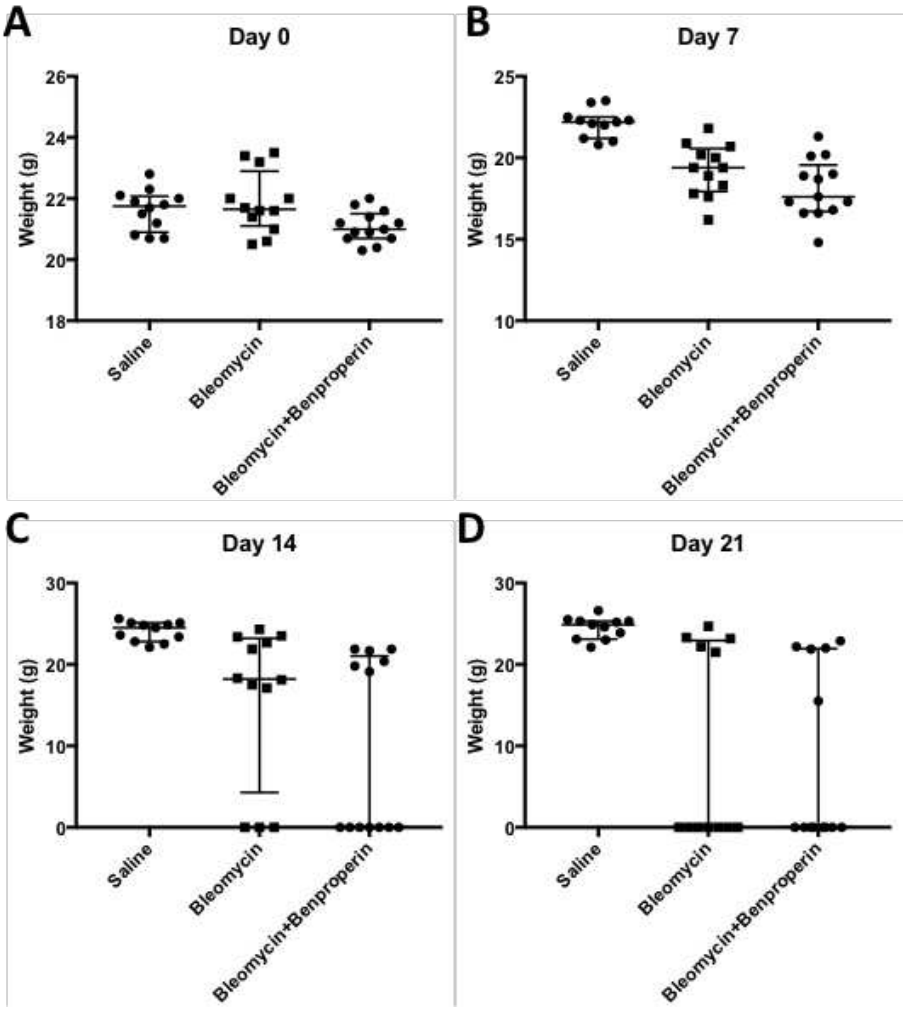


Figure 22 : Poids corporel des souris exposées ou non à la bléomycine et traitées ou non avec la benpropérine (n = 11 – 13). **(A) Poids des souris avant l'instillation de sérum physiologique ou de bléomycine pour les groupes Bléomycine et Bléomycine + Benpropérine. (B) Poids des souris 7 jours, (C) 14 jours et (D) 21 jours après l'instillation de bléomycine ou de sérum physiologique. Les données individuelles, les médianes et les intervalles interquartiles sont indiqués.**

La benpropérine n'a pas réduit la mortalité induite par la bléomycine

Aucune mortalité n'a été observée chez les souris ayant reçue une instillation de sérum physiologique. A partir du 7^{e} jour après l'instillation, des souris ayant reçu la bléomycine sont décédées. Au total, la mortalité a été de 59% dans le groupe bléomycine et de 62% dans le groupe bléomycine+benpropérine. En accord avec la diminution du poids corporel observée

chez les souris exposées à la bléomycine, la benpropérine n'a pas augmenté leur survie (**Figure 23**).

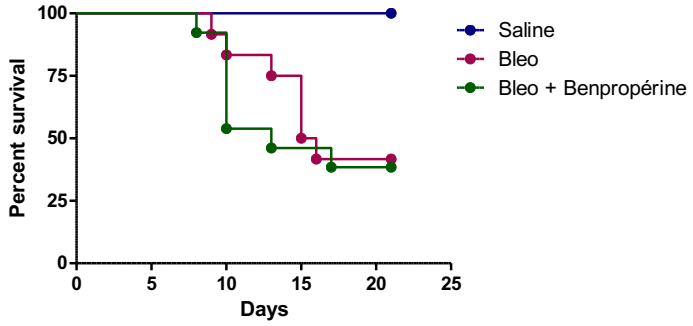


Figure 23 : Courbe de survie des souris exposées ou non à la bléomycine et traitées ou non avec la benpropérine (n = 11 – 13).

Absence d'effet de la benpropérine sur le contenu pulmonaire en collagène insoluble.

Comme le montre la **Figure 24**, la bléomycine induisait une augmentation de la quantité de collagène insoluble dans les poumons des souris (110[86-126]µg contre 70[67-84]µg, p = 0,0015). Les gavages quotidiens de benpropérine, 7 jours après l'instillation intratrachéale de bléomycine, ne réduisaient pas la quantité de collagène insoluble dans les poumons en comparaison aux souris ayant reçu la bléomycine seule (85[80-113] µg, p = 0,11).

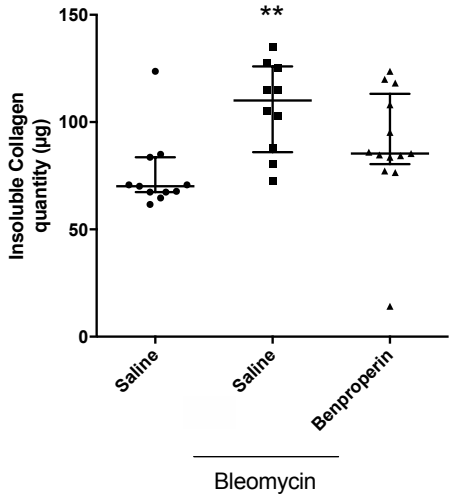


Figure 24 : Quantité de collagène insoluble dans le poumon gauche des souris exposées ou non à la bléomycine et traitées ou non avec la benpropérine (n = 11 – 13). **Les données individuelles, les médianes et les intervalles interquartiles sont indiqués. ** : P<0,01 contre le groupe Saline.**

IV. Discussion et perspectives

Le résultat principal de ces travaux est la mise en évidence de l'effet anti-fibrosant du CK666. Les mécanismes de cet effet, notamment les types cellulaires et les voies de signalisation ciblées par le CK666, peuvent être discutés.

Cibles cellulaires du CK666

Nos résultats recueillis *in vitro* suggèrent que les fibroblastes pulmonaires sont une cible cellulaire du CK666 *in vivo*. L'inhibition du complexe Arp2/3 dans d'autres types cellulaires pourrait participer aux effets antifibrosants du CK666.

L'immunohistochimie pour ARP2 et ARP3 montre un marquage prédominant des macrophages alvéolaires sur des coupes de poumon d'un patient indemne de FPI. Ce profil d'expression était similaire à celui rapporté dans l'Human Protein Atlas (https://www.proteinatlas.org/ENSG00000138071-ACTR2/tissue/lung). Un marquage majoritaire des cellules de morphologie lymphocytaire était observé sur les coupes de tissus provenant d'un patient atteint de FPI ce qui est cohérent avec le profil d'expression rapporté dans l'IPF Cell Atlas (http://ipfcellatlas.com/). Il a été rapporté, chez trois individus de deux familles distinctes, que la mutation ou la déficience de la sous-unité ARPC1B (isoforme d'ARPC1) du complexe Arp2/3, est associée à des pathologies multi-systémiques graves, associant une thrombopénie, des infections récurrentes, des modifications inflammatoires intestinales et la présence de marqueurs d'auto-immunité (anticorps cytoplasmiques anti-nucléaires et anti-neutrophiles). Ces éléments suggèrent que le complexe Arp2/3 participe à contrôler le système immunitaire (Kahr et al. 2017). Ces éléments soulèvent l'hypothèse que les cellules immunitaires soient une cible des inhibiteurs du complexe Arp2/3 *in vivo*, et que l'inhibition du complexe Arp2/3 dans ces cellules explique l'effet anti-fibrosant du CK666. A l'encontre de cette hypothèse, le CK666 ne diminuait pas le nombre des cellules inflammatoires dans le LBA des souris exposées à la bléomycine.

L'implication du complexe Arp2/3 a été montré dans des pathologies liées à l'épiderme. En effet, le KO conditionnel d'*ARPC3* chez les souris entraîne une létalité néonatale et une déficience de la barrière épidermique (K. Zhou et al. 2013). Le KO d'*ARPC4* dans l'épiderme de la souris provoque une maladie similaire au psoriasis, ce qui suggère un rôle du complexe Arp2/3 dans l'homéostasie épithéliale (van der Kammen et al. 2017). Dans les cellules endothéliales, le complexe Arp2/3 est nécessaire à la formation des jonctions d'adhérences cellulaires (Abu Taha et al. 2014; Abu Taha et Schnittler 2014; Yansong Li et al. 2004),

importantes pour l'adhérence, la migration cellulaire et l'intégrité fonctionnelle de la barrière alvéolo-capillaire (Belvitch et al. 2017). L'inhibition du complexe Arp2/3 par le CK666 induit la formation d'espaces paracellulaires entre les cellules endothéliales et diminue la perméabilité de la barrière endothéliale (Belvitch et al. 2017). Dans l'ensemble, ces données ne soutiennent pas l'hypothèse que le CK666 exerce des effets anti-fibrosants en ciblant les cellules épithéliales et endothéliales du poumon.

Voies de signalisation intracellulaires modulées par le CK666

Des expériences ont été conduites pour identifier les mécanismes par lesquels CK666 réprimait COL1 et ACTA2 *in vitro*.

La principale voie induisant l'expression de COL1 et ACTA2 est la voie SMAD2/3. Nous avons montré que le CK666 ne modulait pas la phosphorylation de SMAD2 et SMAD3. Ceci suggère que le CK666 module d'autres voies de signalisation participant à l'activité de phospho-SMAD2 et phospho-SMAD3. Il est connu que la voies ERK1/2 (Itoh et al. 2003; Funaba, Zimmerman, et Mathews 2002) participe à l'activation de la voie SMAD2/3. Dans nos expériences, le CK666 ne modulait pas la phosphorylation d'ERK1/2 induite par le TGFβ1.

Nous avons observé que le CK666 réprimait une voie de signalisation impliquant phospho-Akt, phospho-GSK3β, β-caténine et MRTF-A. Il est connu que la voie PI3K/Akt exerce des effets complexes, non univoques, sur l'activation de SMAD2/3 (Tzavlaki et Moustakas 2020).

La voie PI3K/Akt exerce un effet inhibiteur sur la voie SMAD2/3 à travers la liaison directe de phospho-Akt à SMAD3 (**Figure 25**). Quand PI3K/Akt est activée, phospho-Akt se lie à phospho-SMAD3 et la séquestre dans le cytoplasme, sans en modifier le contenu cellulaire, empêchant son activité transcriptionnelle (Conery et al. 2004). Dans nos expériences, nous avons observé une diminution de phospho-Akt associée à une diminution de l'expression de gènes cibles de phospho-SMAD3, ce qui suggère que la liaison directe de phospho-Akt à phospho-SMAD3 ne joue pas un rôle majeur dans le contrôle de l'expression de COL1 et ACTA2 dans les cellules CCD16Lu.

Notre hypothèse principale est que la répression de COL1 et ACTA2 par le CK666 soit en rapport avec la répression d'une voie impliquant phospho-Akt/phospho-GSK3β/β-caténine/MRTF-A, aboutissant à une diminution de l'activité transcriptionnelle de phospho-SMAD2/3.

La GSK3β permet la régulation des niveaux de β-caténine dans les cellules. La β-caténine est un cofacteur de SMAD2/3. Lorsque GSK3β est non phosphorylée (Akt off), la GSK3β

séquestre la β-caténine. La phosphorylation inhibitrice de GSK3β (Akt on) permet la libération de la β-caténine, qui se transloque au noyau et se lie au complexe SMAD2/3/4, entrainant l'expression de leurs gènes cibles (Guo et al. 2012) (**Figure 25**).

Notre hypothèse est que l'inhibition d'Akt par le CK666 pourrait permettre l'activation de la GSK3β, empêchant la β-caténine de se lier au complexe SMAD2/3/4 et d'activer la transcription des gènes cibles tels que ACTA2 et COL1. Cette hypothèse est suggérée par la réduction par le CK666 de phospho-Akt accompagnée de la diminution de phospho-GSK3β et des niveaux protéiques de β-caténine dans les fibroblastes pulmonaires stimulés ou non par le TGFβ1.

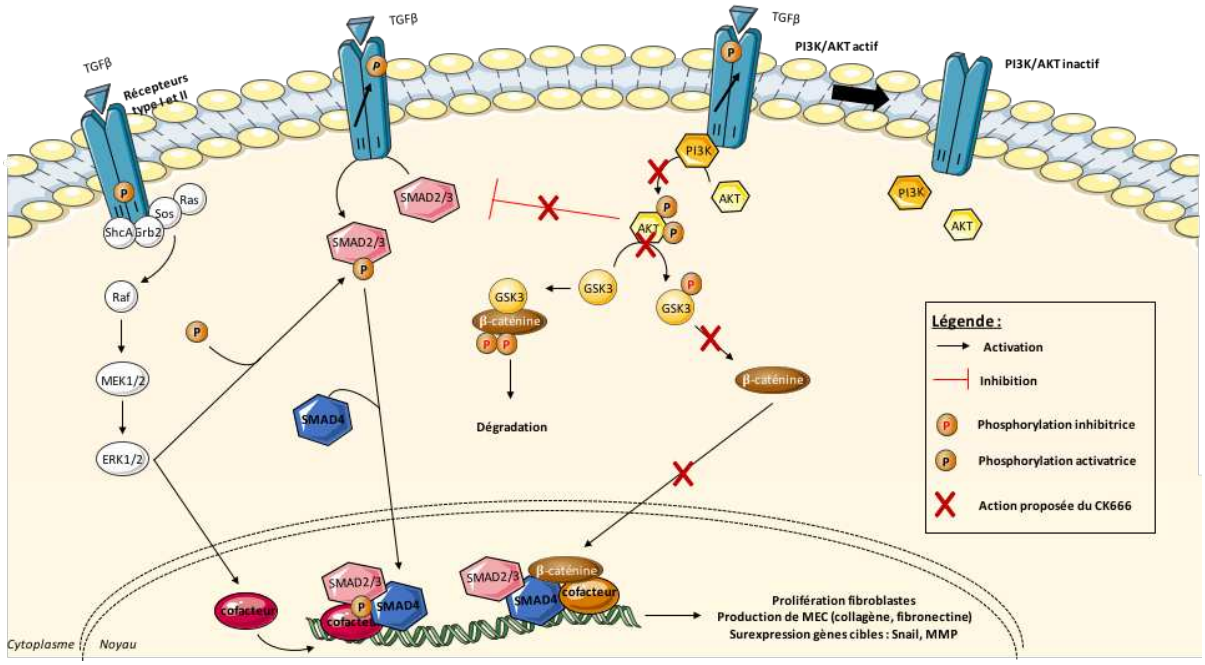


Figure 25 : Proposition d'un modèle d'interactions entre les voies de signalisation ERK1/2, SMAD et PI3K/Akt.

Une autre voie jouant un rôle majeur dans la différenciation des fibroblastes et notamment l'expression de d'ACTA2 et COL1 est celle du facteur de transcription MRTF-A.

MRTF-A est un facteur de transcription dont l'activité nécessite sa translocation au noyau. La translocation de MRTF-A au noyau est induite par l'intermédiaire du cytosquelette d'actine, via la mécanotransduction directe. Les voies de mécanotransduction directe médiées par les facteurs de transcription YAP et MRTF-A jouent un rôle majeur dans le maintien et l'amplification des réponses fibrogéniques (F. Liu et al. 2015). Nos résultats confirment que le

TGFβ1 induit la translocation nucléaire de YAP et MRTF-A dans les cellules CCD16Lu. Cependant, le CK666 ne modifiait pas la distribution nucléo-cytoplasmique de YAP et MRTF-A, ce qui suggère que le CK666 ne réprime pas de façon globale la mécanotransduction directe.

En revanche, le CK666 diminuait de 50% les niveaux protéiques de MRTF-A dans le lysat des fibroblastes stimulés ou non par le TGFβ1. Il est possible que la diminution des niveaux protéiques de MRTF-A par le CK666 ait participé à l'effet biologique de celui-ci. Les mécanismes par lesquels le CK666 réduisait les niveaux cellulaires de MRTF-A restent à identifier.

Une hypothèse pour expliquer la diminution des niveaux de MRTF-A dans les fibroblastes traités par le CK666 est que le CK666 favorise la dégradation de MRTF-A en diminuant la phosphorylation inhibitrice de GSK3β. En effet, GSK3β (non phosphorylée) se lie à MRTF-A et induit sa dégradation par ubiquitination (**Figure 26**). De plus, la dégradation de MRTF-A par la GSK3β est inhibée par la β-caténine (Charbonney et al. 2011), dont le niveau cellulaire était diminué par le CK666.

Le mécanisme de la diminution du contenu cellulaire en β-caténine par le CK666 restent à identifier.

La β-caténine est classiquement régulée par la voie Wnt (**Figure 26**), impliquée dans le développement et la croissance cellulaire (Taciak et al. 2018; Nusse et Clevers 2017). Le peu de données disponibles suggère que les voies induisant la polymérisation de l'actine en amont du complexe Arp2/3 répriment la voie Wnt (Cohen et al. 2019), ce qui n'est pas cohérent avec nos observations.

Il est notable que GSK3β contrôle pour partie le contenu cellulaire en β-caténine. En présence d'une activation de PI3K/Akt, GSK3β subit une phosphorylation inactivatrice et libère la β-caténine dans le cytoplasme (Ge et al. 2018; Hao et al. 2020). En l'absence d'activation de PI3K/Akt, GSK3β se complexe à la β-caténine et la phosphoryle, ce qui induit sa dégradation (**Figure 26**).

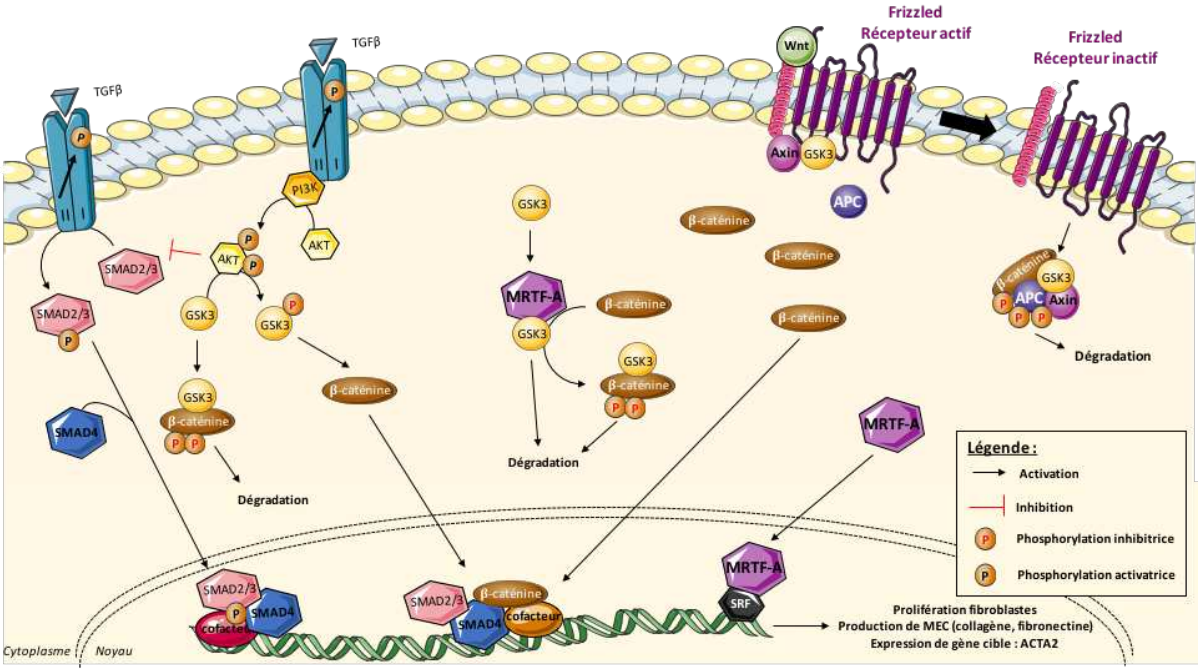


Figure 26 : Proposition d'un modèle d'interaction entre les voies de signalisation GSK3β/β-caténine et MRTF-A.

Il reste à déterminer si le CK666 régulait l'activité **d'autres voies de signalisation** liées au complexe Arp2/3. Notamment, le complexe Arp2/3 régule la motilité et la migration des cellules de gliome à travers le transport vésiculaire de la protéine Delta-like 1 (DLL1). DLL1 est impliquée dans l'invasion tumorale par activation de la voie Notch1. La déplétion du complexe Arp2/3 dans les cellules de gliomes augmente la localisation cytoplasmique de DLL1 diminuant l'activation de la voie Notch1 et le phénotype des cellules souches initiatrices de gliome (C. Zhang et al. 2017).

Les interactions présentées ci-dessus confortent notre hypothèse selon laquelle la répression de la voie phospho-Akt/phospho-GSK3β/β-caténine/MRTF-A ait médié l'inhibition de la différenciation profibrotique par les antagonistes du complexe Arp2/3. Dans le modèle murin de fibrose pulmonaire, nous avons précédemment montré que le CK666 réduit la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine. Il serait intéressant d'évaluer les niveaux protéiques de β-caténine et MRTF-A chez ces souris exposées à la bléomycine et traitées avec le CK666. Cela permettrait d'avoir une corrélation supplémentaire entre les données obtenues *in vitro* et *in vivo*.

Sélectivité du CK666 pour le complexe Arp2/3

Nos résultats complémentaires montrent que l'inhibition simultanée d'*ARP2* et *ARP3* mime l'effet du CK666 sur la croissance cellulaire et l'expression protéique de COL1 induite par le TGFβ1 mais ne reproduit pas l'effet du CK666 sur la réduction de l'expression d'ACTA2. Ces résultats soutiennent l'hypothèse que le CK666 exerce ses effets en partie via les sous-unités ARP2 et ARP3. En accord avec cette hypothèse, il a été montré qu'un autre inhibiteur du complexe Arp2/3, Arpin, réprimait également la phosphorylation d'Akt (Yi Li et al. 2017). Il n'est cependant pas exclu que le CK666 exerce des effets par des mécanismes indépendants du complexe Arp2/3.

Un autre inhibiteur du complexe Arp2/3, la benpropérine, a été utilisé chez la souris afin d'évaluer un potentiel bénéfice de traitement ciblant le complexe Arp2/3 dans le processus de fibrogénèse. Les résultats que nous avons obtenus ne permettent pas de conclure sur l'effet de la benpropérine sur la fibrogenèse pulmonaire. Ce résultat négatif peut être interprété de plusieurs façons. La benpropérine se liant à ARPC2, ce résultat pourrait être en faveur d'un rôle critique d'ARP2 et ARP3 dans la participation du complexe Arp2/3 à la fibrogénèse. D'autre part, l'absence d'effet anti-fibrosant de la benpropérine pourrait être liée au protocole expérimental. Une seule dose quotidienne de benpropérine à hauteur de 50 mg/kg a été testée. La cinétique de la benpropérine chez la souris naïve et dans le modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, n'a pas été étudiée, ce qui est une limite à l'interprétation de nos résultats.

V. Conclusion

Le complexe Arp2/3 est surexprimé dans les fibroblastes pulmonaires humains stimulés par la cytokine profibrosante, TGFβ1. Les expériences menées *in vitro* ont montré que l'inhibition du complexe Arp2/3 par le CK666 ou des siRNA ciblant *ARPC2* et/ou *ARP3* et *ARP3* était capable de réprimer la croissance cellulaire et l'expression de COL1 et d'ACTA2 dans les fibroblastes pulmonaires. Ces observations sont cohérentes avec un rôle du complexe Arp2/3 dans la fibrogenèse pulmonaire. Le mécanisme d'action du CK666 semble faire intervenir une voie de signalisation AKT/phospho-GSK3β/β-caténine/MRTF-A.

Les expériences *in vivo* utilisant le CK666 ont suggéré que le complexe Arp2/3 est nécessaire à la fibrogenèse dans le poumon après exposition des souris à la bléomycine. Ces données soutiennent la poursuite des recherches sur l'utilisation des inhibiteurs du complexe Arp2/3 pour le traitement de la fibrose pulmonaire.

Partie III : Rôle de LIMCH1 *in vitro*

I. Introduction

LIMCH1 est un composant des fibres de stress du cytosquelette d'actine (Y.-H. Lin et al. 2017). La régulation de son expression et ses fonctions biologiques sont mal connues.

LIM and calponin homology domain 1 (LIMCH1) est une protéine de 130 kDa. LIMCH1 est un composant des fibres de stress, associé aux filaments d'actine et de myosine-II **(Figure 27A)** (Y.-H. Lin et al. 2017). LIMCH1 est composée d'un domaine d'homologie à la calponine (CH) à son extrémité N-terminale, lui permettant de se lier aux filaments d'actine (Gimona et Mital 1998). LIMCH1 est également constituée de deux domaines en spirales, permettant la liaison directe avec le myosine non musculaire IIA, ainsi qu'un domaine LIM à l'extrémité C-terminale (**Figure 27B**), nécessaire à l'interaction d'autres protéines contenant un domaine LIM telles que la zyxine et la paxilline, présentes au niveau des adhérences focales (Yuan Wang et Gilmore 2003; Legerstee et al. 2019; Dawid, Breen, et Toyama 1998).

Dans les cellules Hela, LIMCH1 se lie à l'actine en association avec la myosine non musculaire IIA. La perte de l'expression de LIMCH1 réduit la phosphorylation et l'assemblage de la chaîne légère régulatrice de la myosine. Lors de l'étalement cellulaire, LIMCH1 favorise l'assemblage de l'actine et de la myosine en fibres de stress contractiles, dans les cellules HeLa qui ne sont pas en division (Y.-H. Lin et al. 2017). Par ailleurs, LIMCH1 joue le rôle d'un suppresseur de tumeur (encadré).

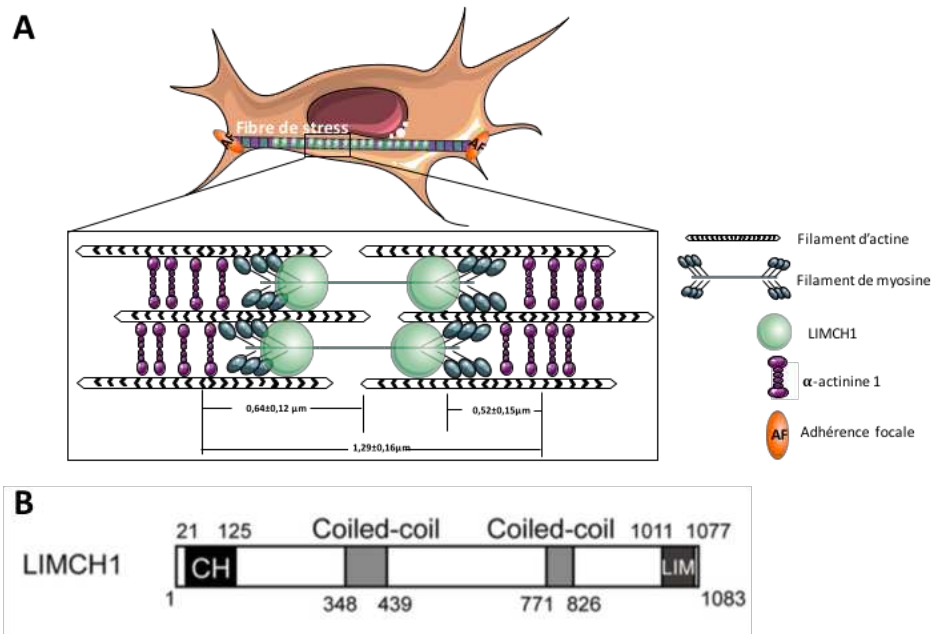


Figure 27 : Localisation de LIMCH1 au sein du cytosquelette d'actine (A) et composition de LIMCH1 (B) (D'après (Y.-H. Lin et al. 2017)).

Expression et fonctions de LIMCH1 dans le contexte du cancer.

Les données disponibles concernant les fonctions biologiques de LIMCH1 ont été recueillies dans le cadre du cancer, et suggèrent un rôle de suppresseur de tumeur. Chez les patientes atteintes d'un cancer du sein triple-négatif de stade tardif, la faible expression de LIMCH1 est corrélée à la forte expression de la nucléosporine 93 (Nup93), une protéine nucléaire impliquée dans le transport de molécules entre le noyau et le cytoplasme. Dans les cellules MDA-MB-231, l'expression de LIMCH1 est réprimée par Nup93 et la répression de LIMCH1 par un siRNA augmente l'invasivité des cellules (Bersini et al. 2020). Chez les patients atteints de cancer pulmonaire, LIMCH1 est faiblement exprimée dans le tissu tumoral. Dans les cellules cancéreuses pulmonaires A549, la répression de LIMCH1 par des siRNA et shRNA réduit le contenu cellulaire de la protéine p53 en augmentant l'ubiquitination, et augmente la prolifération cellulaire (Y. Zhang, Zhang, et Xu 2019). Dans le tissu tumoral de patients atteints d'adénocarcinome pulmonaire, la faible expression de LIMCH1 est associée à une invasion pleurale, une tumorigenèse agressive et à un stade tumoral plus avancé, prédisant une durée de survie globale plus courte (Cao et al. 2021). LIMCH1 est surexprimée dans certaines lignées cellulaires cancéreuses comme Mahlavu, J7 et les cellules Hela (Y.-H. Lin et al. 2017).

Nos données préliminaires ont montré 1) que la protéine LIMCH1 était surexprimée dans la fraction cytosolique des fibroblastes pulmonaires de patients FPI et 2) que des esiRNA ciblant LIMCH1 entrainaient une diminution de l'expression d'ACTA2 et COL1 dans les fibroblastes pulmonaires humains (CCD16Lu) stimulés par le TGFβ1. Les travaux présentés ici ont été consacrés à identifier l'intérêt éventuel de la répression de LIMCH1 pour le traitement de la fibrose pulmonaire.

Les hypothèses de ce travail étaient 1) que l'expression de LIMCH1 par les fibroblastes *in vitro* est induite dans un environnement profibrosant, 2) que la répression de LIMCH1 réduit la différenciation profibrosante des fibroblastes humains *in vitro*.

Les objectifs de ce travail étaient 1) de quantifier l'expression de LIMCH1 dans les fibroblastes pulmonaires de patients atteints de FPI et dans les fibroblastes de lignées CCD16Lu traités par des agents profibrosants, 2) de déterminer l'effet de la répression pérenne (shRNA) ou transitoire (ASO) de *LIMCH1* sur l'expression d'ACTA2 et COL1 dans les fibroblastes CCD16Lu stimulés ou non par une cytokine profibrosante, le TGFβ1.

II. Matériels et méthodes

II.1. Expériences sur cellules humaines

II.1.1. Expression de LIMCH1 dans les fibroblastes pulmonaires

II.1.1.1. Fibroblastes de patients atteints de FPI

L'expression de LIMCH1 a été quantifiée dans les fibroblastes pulmonaires de patients atteints de FPI (collaboration U1152, Pr Crestani, Mme Jaillet) comme décrit dans la partie II (Partie II. II. Article). Il s'agit d'échantillons provenant des mêmes patients.

II.1.1.2. Fibroblastes CCD16Lu exposés à des agents profibrosants

Les fibroblastes pulmonaires primaires CCD-16Lu ont été cultivés comme rapporté dans la partie II. Les CCD16Lu ont été traités pendant 48 heures avec 5 ng/mL de TGFβ1 (R&D Systems, Lille, France), 10 µg/mL de CTGF (R&D Systems, Lille, France), 10 ng/mL de PDGF-BB (R&D Systems, Lille, France), 10 ng/mL de WISP1 (R&D Systems, Lille, France) et 500 nM de PGE2 (Cayman Chemical, USA) ou avec du milieu de culture seul.

II.2. Effet de la répression de LIMCH1 sur le phénotype cellulaire *in vitro*

II.2.1. Répression stable par transduction de particules lentivirales

Les short hairpin RNA (shRNA) sont des ARN interférents placés dans un vecteur tel que des particules lentivirales. Les shRNA matures hybridés à l'ARN cible sont pris en charge par la protéine Argonaute et le complexe RISC permettant le clivage et la dégradation de l'ARNm cible (Rao et al. 2009).

Les fibroblastes ont été transduits de façon pérenne par 3 lots de particules lentivirales différentes ciblant *LIMCH1* (Sh1, Sh2, Sh3) et un lot de particules contrôles (shNeg). Les particules Sh1, 2 et 3 portaient des short hairpin RNA (shRNAs) ciblant chacun une séquence différente appartenant à l'ARNm *LIMCH1* (**Tableau 4**), ainsi que le gène rapporteur TurboGFP et une cassette de résistance à la puromycine (GIPZ, Horizon Discovery, Cambridge, UK). Les fibroblastes ont reçu 4 particules lentivirales pour une cellule dans 5mL de milieu de culture dépourvu de SVF et contenant 8 µg/mL de polybrène (sc-134220, Santa Cruz Biotechnology). Après 5 heures d'incubation, 5mL de milieu de culture contenant 10% de SVF ont été ajoutés. Une sélection des cellules transduites a été réalisée par l'ajout de 2 µg/mL de puromycine (sc-108071, Santa Cruz Biotechnology). Les cellules étaient observées par microscopie de

fluorescence puis récupérées dans 500 µL de PBS contenant 2% de SVF. Après centrifugation et reprise du culot cellulaire dans 200 µL de PBS contenant 2% de SVF, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux (MACSQuant Analyzer, Miltenyi Biotec).

Tableau 4 : shRNA utilisés pour l'étude.

Nom	ID	Séquence cible	Gène
shNeg – RHS4348	Non-silencing GIPZ lentiviral shRNA negative control (viral particles)	non fournie par le fabricant	non applicable
Sh1 – V2LHS_223366	GIPZ LIMCH1 shRNA Viral particle	CCATTCAACAGAGCCAAAT	LIMCH1
Sh2 – V3LHS_346266	GIPZ LIMCH1 shRNA Viral particle	CCGAATAGTCAAGAGGACA	LIMCH1
Sh3 – V3LHS_346267	GIPZ LIMCH1 shRNA Viral particle	ACTGTCAAGATGAAAAACA	LIMCH1

II.2.2. Répression transitoire par transfection d'oligonucléotides antisens

Les oligonucléotides antisens de 3ème génération sont des oligonucléotides modifiés contenant un segment central d'ADN appelé Locked nucleic acid (LNA) gapmer, permettent une hybridation avec l'ARN complémentaire ciblé. Les ASOs entrent dans la cellule via le processus d'endocytose. Une fois dans la cellule, les séquences LNA (ADN) forment des complexes ARN-ADN suite à l'hybridation sur la séquence cible. Ces complexes activent la RNAse H qui induit le clivage des complexes ARN-ADN, résultant en la dégradation de l'ARN cible (Kurreck et al. 2002). Les ASO permettent la dégradation efficace de l'ARN messager et des ARN long non codants ciblés (Hagedorn et al. 2018) (**Figure 28**. Secarna).

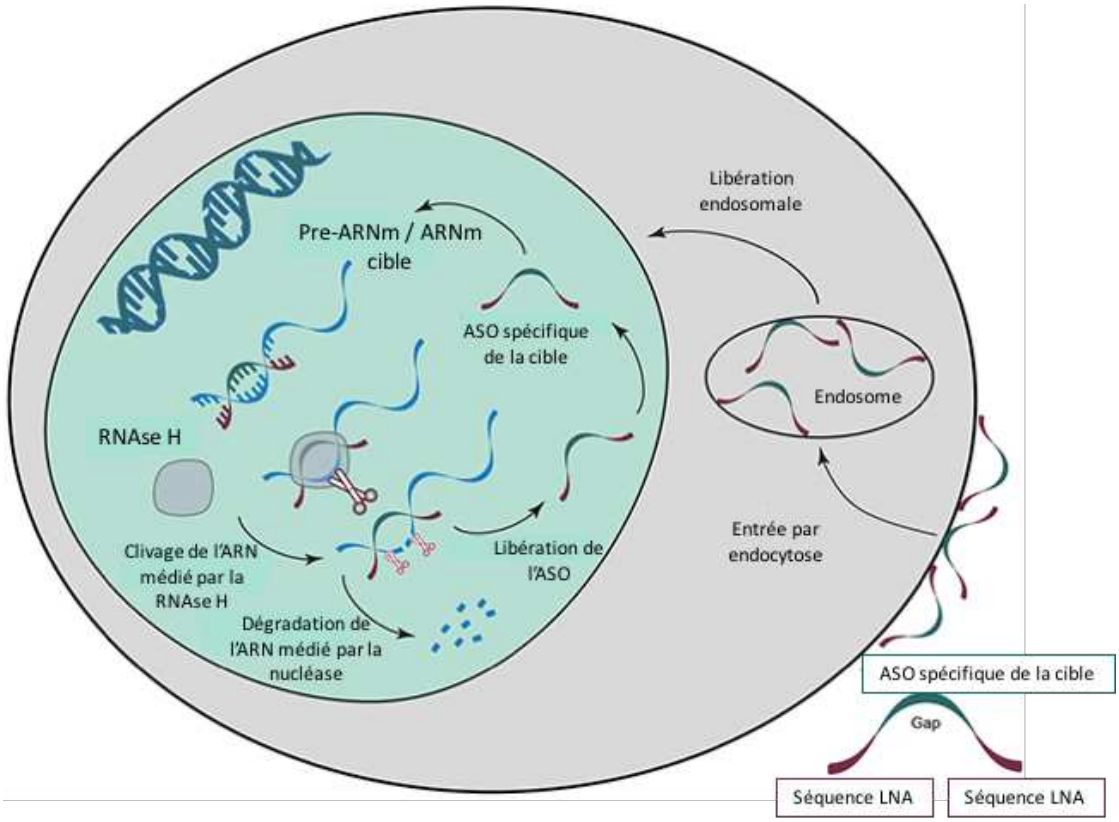


Figure 28 : Mécanisme d'action des oligonucléotides antisens (D'après Secarna, Allemagne).

Les ASOs ont été sélectionnés dans le cadre d'une collaboration avec la société Secarna (Munich, Allemagne) d'abord *in silico* puis par des étapes de sélection *in vitro* dans les lignées cellulaires A549 et EFO-21. L'ASO sélectionné montre une concentration inhibitrice médiane (IC50) inférieure à 1µM et l'absence de toxicité *in vitro*.

Les CCD16lu ont été traitées par l'ASO ciblant *LIMCH1* (LIMCH1-ASO), avec une gamme de concentrations entre 0,01 µM et 10 µM d'ASO (Secarna, Allemagne) diluées dans de l'eau stérile, ou avec un ASO inactif (Control-ASO, 10 µM). Les cellules ont été incubées pendant 72 heures avec les ASOs, en l'absence de tout réactif de transfection.

II.3. Critères de jugement

II.3.1. Expression de LIMCH1

LIMCH1 a été quantifié par RT-PCR et western blot comme décrit dans la partie II. Les amorces utilisées pour la PCR étaient GGTCAGTCACCAAACAGGTCT et GTCCCACTCACTGCATCTCC. L'anticorps LIMCH1 (NBP2-39006, Novus Biologicals, UK) a été dilué au 1/1000.

II.3.2. Croissance cellulaire et expressions d'ACTA2 et COL1

Les CCD16Lu ont été ensemencées, cultivées, récupérées et comptées comme décrit dans la partie II. L'expression d'ACTA2 et COL1 a été quantifiée comme décrit dans la partie II.

III. Résultats

III.1. LIMCH1 était exprimée dans les fibroblastes pulmonaires

L'ARNm *LIMCH1* était détecté dans les lysats cellulaires de tous les échantillons. L'expression de l'ARNm *LIMCH1* était similaire dans les fibroblastes de FPI par rapport au groupe contrôle (**Figure 29A**). De même, la protéine LIMCH1 était détectable dans toutes les cultures de fibroblastes. Les niveaux de LIMCH1 n'étaient pas augmentés dans les fibroblastes de FPI par rapport au groupe contrôle (**Figure 29B**).

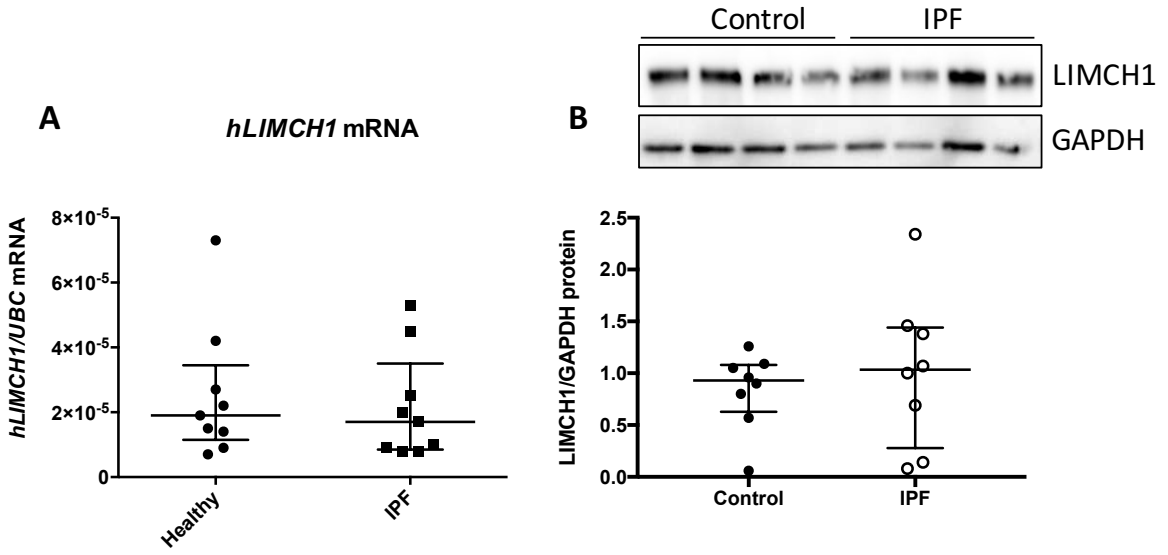


Figure 29 : Expression de LIMCH1 dans les fibroblastes pulmonaires humains de patients atteints de FPI ou patients indemnes de FPI (n = 8). **A) ARNm *LIMCH1/UBC* (RT-PCR, n=9). B) Protéine LIMCH1 et GAPDH (Western Blot, n = 8). Les données individuelles, les médianes et les écarts interquartiles sont indiqués.**

III.2. L'expression de LIMCH1 dans les fibroblastes CCD16Lu n'était pas induite par des agents profibrosants

Afin d'évaluer l'expression de LIMCH1 dans un contexte profibrosant, les CCD16Lu ont été stimulées avec différents agents pro et anti-fibrosants.

L'expression de *LIMCH1* au niveau de l'ARNm et de la protéine n'était pas modulée par les différents agents profibrosants (TGFβ1, PDGF, CTGF, WISP1) et anti-fibrosant (PGE2) (**Figures 30A et 30B**).

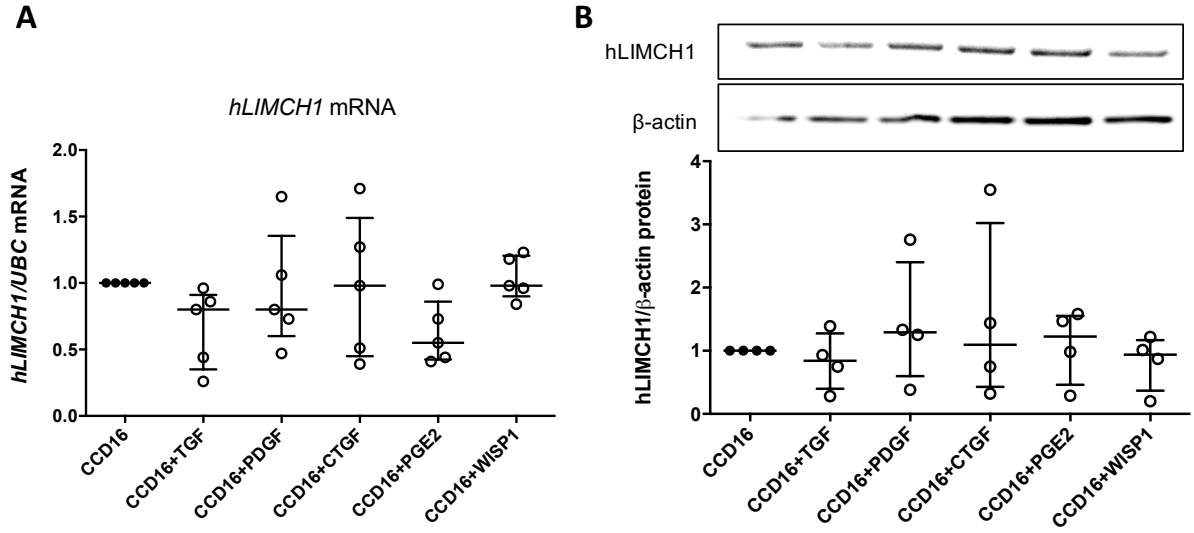


***Figure 30 : Expression de LIMCH1 dans les fibroblastes pulmonaires humains CCD16lu traités ou non par des agents profibrosants, TGFβ1, PDGF, CTGF, WISP1 ou antifibrosant, PGE2*. A) ARNm *LIMCH1/UBC* (RTPCR, n = 5). B) Protéine LIMCH1/β-actine (Western Blot, n = 4). Les données ont été normalisées par rapport au CCD16Lu. Les données individuelles, les médianes et les écarts interquartiles sont indiqués.**

III.3. Répression de LIMCH1 par shRNA et ASO

Trois jours après l'exposition à la puromycine des populations cellulaires transduites par les shRNA, les fibroblastes ont été analysés en cytométrie en flux et par microscopie à fluorescence. L'analyse des populations de fibroblastes montrait une transduction de l'ordre de 99% (**Figure 31A**) visible par l'expression de la GFP marquée en vert (**Figure 31B**).

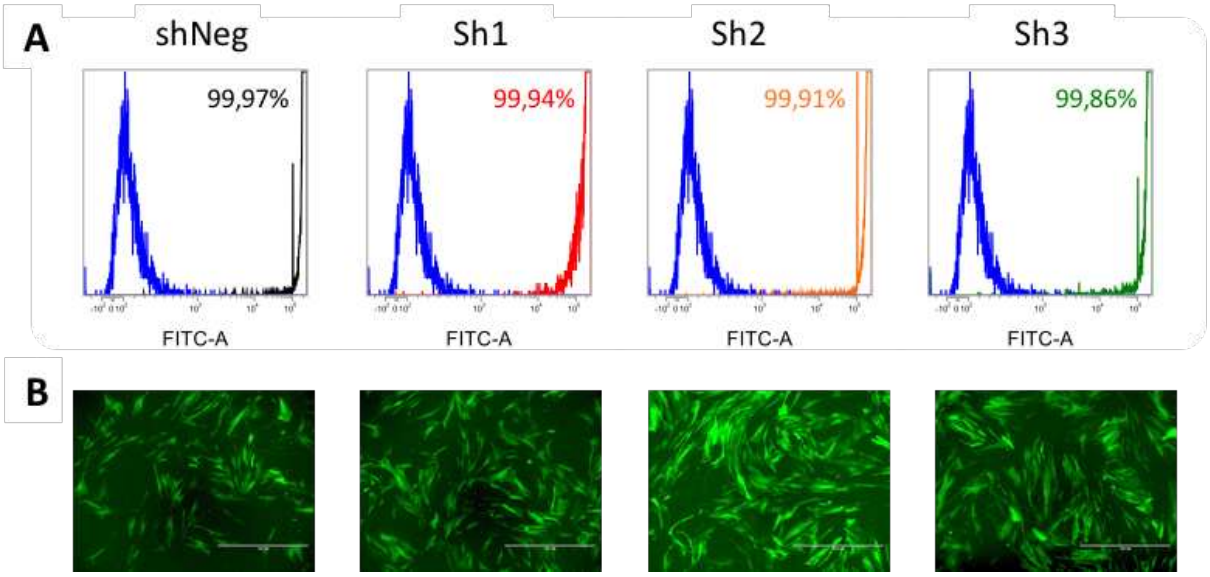


Figure 31 : Mise au point de la transduction des shRNAs. **A) Cytométrie en flux des populations de fibroblastes pulmonaires humains transduits par des shRNAs (marquage FITC) 3 jours après la sélection à la puromycine. B) Observation au microscope à fluorescence des fibroblastes CCD16Lu transduits 3 jours après la sélection à la puromycine (objectif x40).**

Dans les CCD16Lu, les shRNA sh1, sh2 et sh3 diminuaient respectivement de 70, 90 et 84% l'ARNm *LIMCH1* (**Figure 32A**) comparativement à ShNeg. Une répression similaire au niveau protéique était observée avec Sh2 tandis que LIMCH1 était diminuée à hauteur de 58% et 64% par Sh1 et Sh3 (**Figure 32B**).

L'utilisation d'une concentration de 10 µM de LIMCH1-ASO sur ces mêmes cellules, permettait une répression de 90% de l'expression de LIMCH1 au niveau ARNm et protéique, comparativement au control-ASO (**Figures 32C, 32D**).

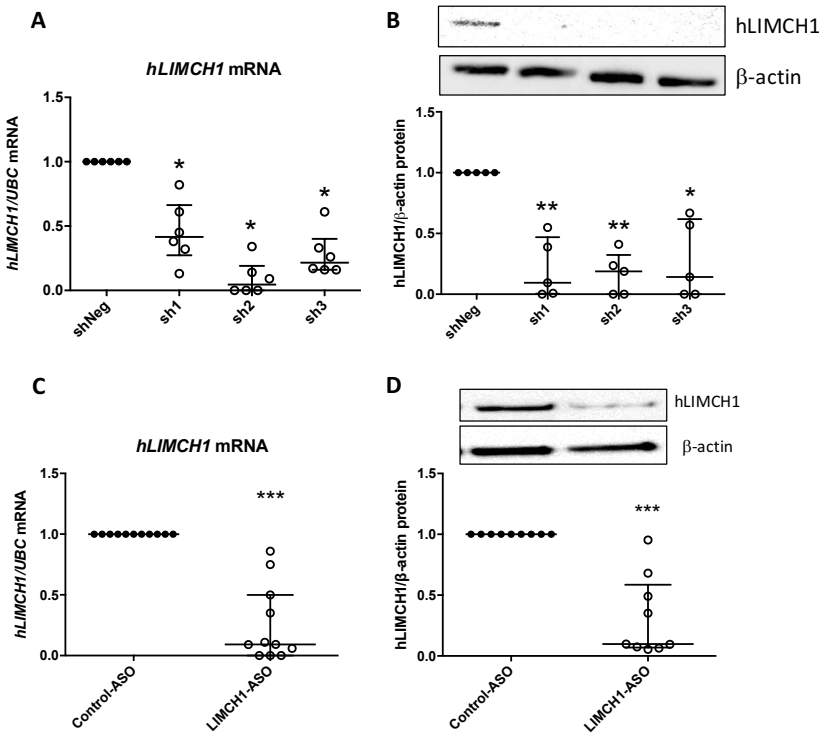


Figure 32 : Inhibition de LIMCH1 par les shRNAs ou les ASOs dans les fibroblastes pulmonaires humains CCD16lu. **A, C) ARNm *LIMCH1/UBC* (RTPCR, n = 6-11). B, D) Protéine LIMCH1/β-actine (Western Blot, n = 5-9). Les données ont été normalisées par rapport au shNeg. Les données individuelles, les médianes et les écarts interquartiles sont indiqués. * : p<0,05 par rapport au shNeg ou au Control-ASO.**

III.3.1. La répression de LIMCH1 ne modifiait pas la croissance cellulaire

La croissance des cellules transduites par les shRNA (**Figure 33A**) ou transfectées avec LIMCH1-ASO, a été évaluée sur une période de 4 jours (**Figure 33B**). Aucune modification de la croissance cellulaire n'a été observée par rapport à la condition contrôle.

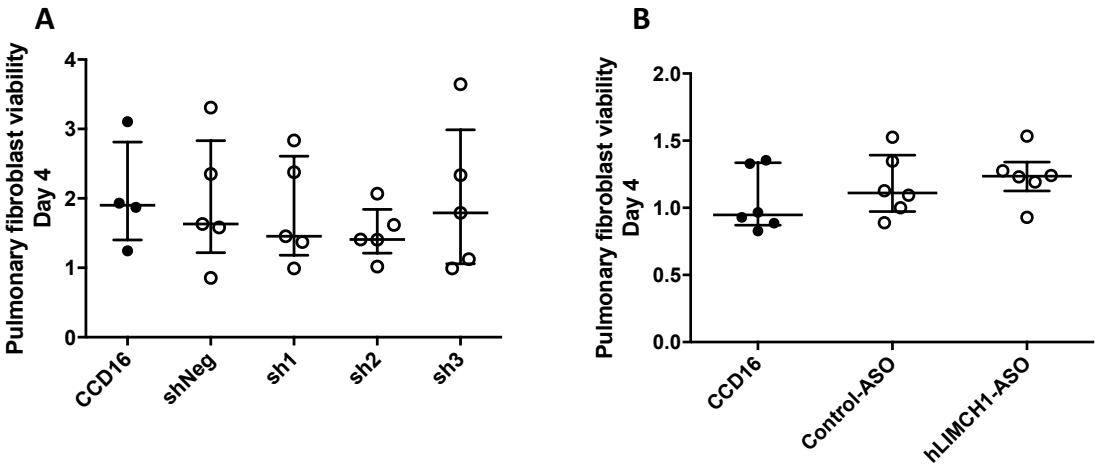


Figure 33 : Absence d'effet de l'inhibition de LIMCH1 par (A) les shRNA ou (B) l'oligonucléotide antisens ciblant LIMCH1 (LIMCH1-ASO) sur la viabilité cellulaire des fibroblastes pulmonaires humains CCD16lu (n = 4 – 6). **Les données individuelles, les médianes et les écarts interquartiles sont indiqués.**

III.3.2. La répression de LIMCH1 diminuait l'expression basale d'ACTA2 et COL1

L'expression d'ACTA2 et COL1 par les cellules CCD16Lu a été évaluée avec et sans stimulation par le TGFβ1.

En l'absence de stimulation par le TGFβ1, les shRNA sh1 et sh2 ciblant *LIMCH1* diminuaient l'expression basale de l'ARNm *ACTA2* (**Figure 34A**). Une tendance similaire était observée pour sh3 (p = 0.15). Sh1 et sh2 semblaient diminuer l'expression d'*ACTA2* (**Figure 34B**).
LIMCH1-ASO tendait à diminuer l'expression basale d'*ACTA2* au niveau de l'ARNm (p = 0,064), sans effet sur la protéine ACTA2 (**Figures 34C, 34D)**.
L'inhibition de *LIMCH1* par sh1 diminuait l'expression basale de l'ARNm *COL1A2* (p = 0,037) (**Figure 35B**). LIMCH1-ASO tendait à diminuer celle de *COL1A1* (p = 0,078) (**Figure 35D**). Ni les shRNA ni LIMCH1-ASO ne modifiaient l'expression de la protéine proCOL1.

Le TGFβ1 induisait l'expression d'ACTA2 dans les CCD16lu traitées ou non par les shRNA (**Figures 34A, 34B**) ou les ASOs (**Figures 34C, 34D**). La répression de *LIMCH1* ne modulait pas le niveau d'expression d'ACTA2 induit par le TGFβ1, que ce soit au niveau de l'ARNm ou protéique. Le TGFβ1 induisait l'expression de COL1 dans les CCD16lu traitées ou non par les shRNAs (**Figures 35A, 35B, 35C**) ou LIMCH1-ASO (**Figures 35D, 35E, 35F**). Les

shRNAs et LIMCH1-ASO ne réduisaient pas l'expression de proCOL1 induite par le TGFβ1 (**Figures 35A, 35B**).

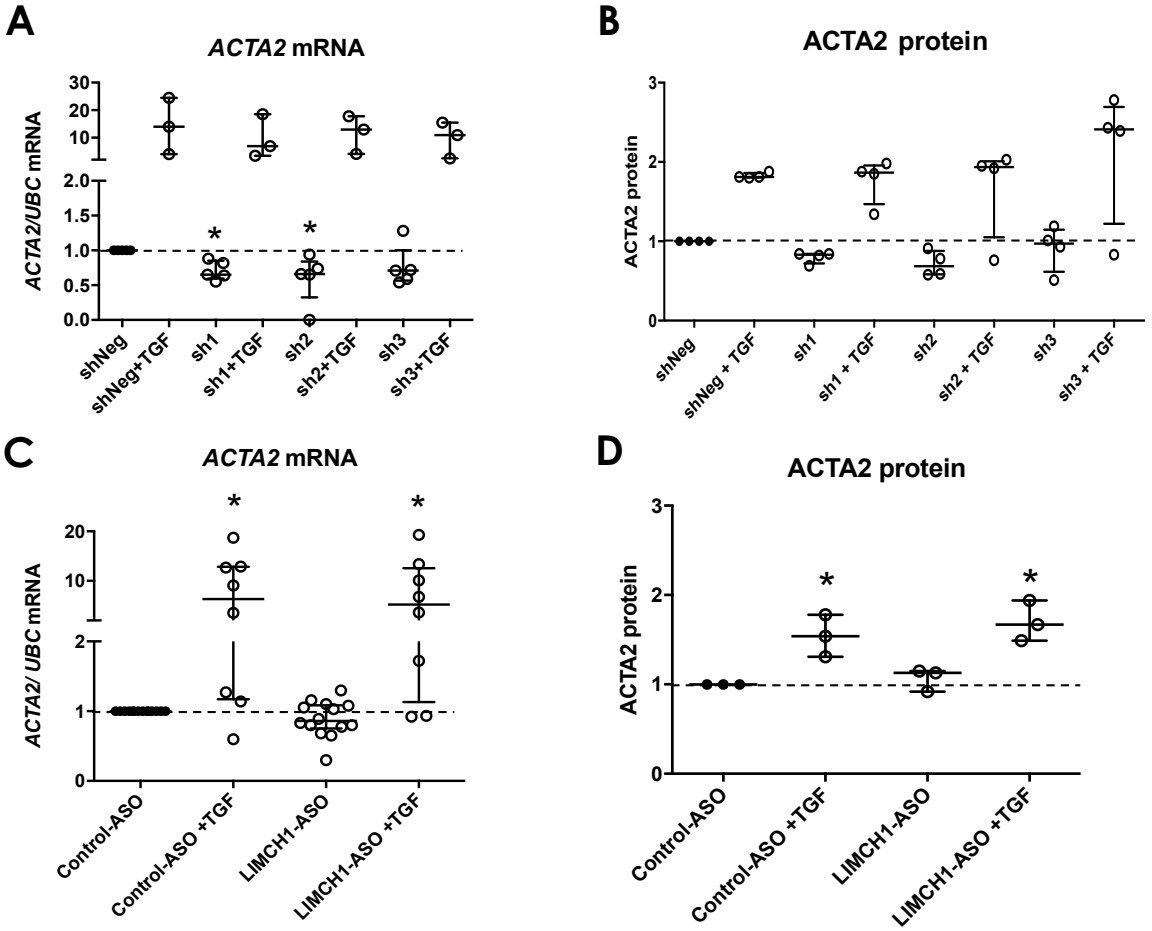


Figure 34 : Régulation de l'expression d'ACTA2 par les shRNA (A, B) ou l'oligonucléotide antisens ciblant LIMCH1 (C, D) dans les cellules CCD16lu stimulées ou non par le TGFβ1 (n = 3 – 14). **A, C) ARNm *d'ACTA2/UBC* (RTPCR). B, D) Protéine ACTA2 (cell-based ELISA). Les données ont été normalisées par rapport au shNeg ou au Control-ASO. Les données individuelles, les médianes et les écarts interquartiles sont indiqués. * : p < 0,05 par rapport au shNeg ou Control-ASO.**

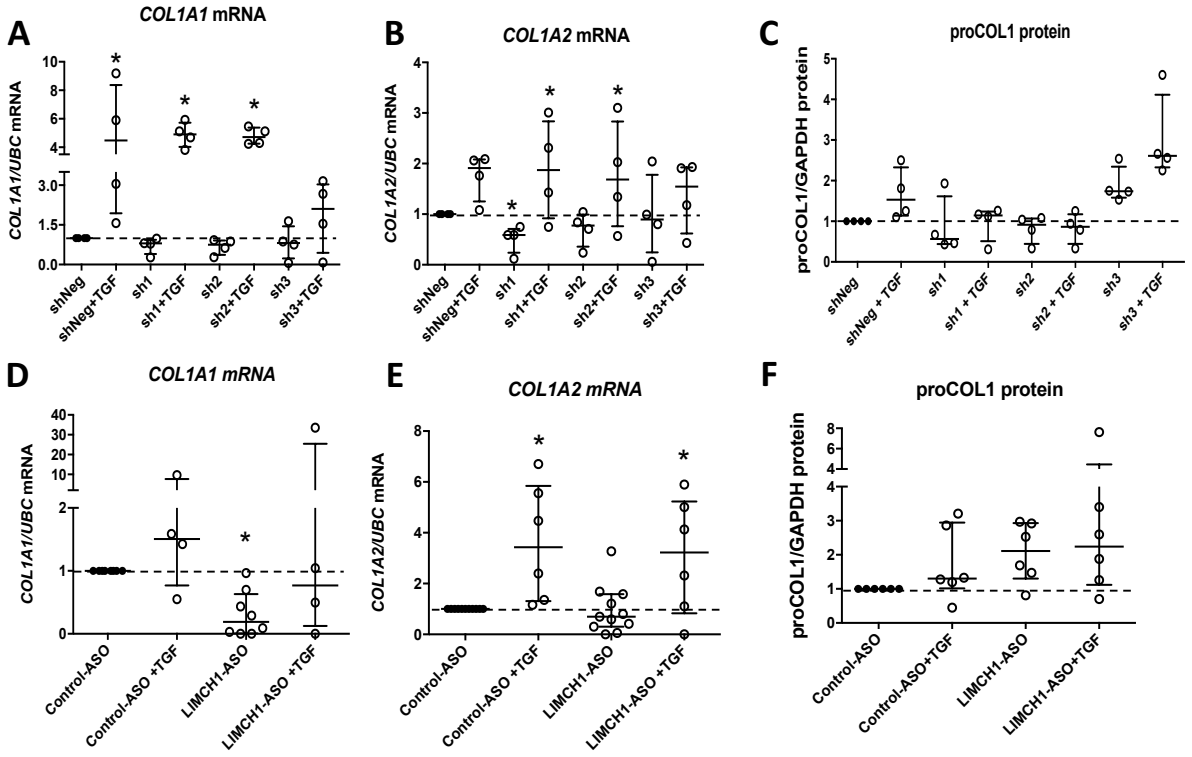


Figure 35 : Expression de COL1 dans les CCD16lu stimulées ou non par le TGFβ1 et traitées ou non par les shRNA (A, B, C) ou l'oligonucléotide antisens ciblant LIMCH1 (D, E, F). **A, D) ARNm de *COL1A1/UBC* (RTPCR, n = 4 – 8). B, E) ARNm de *COL1A2/UBC* (RTPCR, n = 4 – 11). C, F) Ratio protéique de proCOL1/GAPDH (ELISA, n = 6). Les données ont été normalisées par rapport au shNeg ou au Control-ASO. Les données individuelles, les médianes et les écarts interquartiles sont indiqués. * : p < 0,05 par rapport au shNeg ou Control-ASO.**

IV. Discussion

Nous avons observé que LIMCH1 était exprimée à des niveaux similaires dans les fibroblastes pulmonaires de patients atteints de FPI en comparaison aux fibroblastes de patients indemnes de FPI, ce qui est cohérent avec les données de l'IPF cell atlas montrant une expression similaire de LIMCH1 dans les fibroblastes de patients FPI versus patients contrôles (http://ipfcellatlas.com/). Ce résultat va à l'encontre des résultats préliminaires obtenus dans les fibroblastes de patients FPI, qui montraient une surexpression de LIMCH1 dans le cytosol de ces cellules. Cette discordance pourrait s'expliquer par une distribution essentiellement non cytosolique de LIMCH1, en accord avec la notion que LIMCH1 est majoritairement un composant des fibres de stress. La détection de LIMCH1 dans le cytosol par l'analyse protéomique soulève l'hypothèse que LIMCH1 exerce des fonctions indépendantes des fibres de stress ou du cytosquelette d'actine. En accord avec cette hypothèse, LIMCH1 interagit avec la ligase HUWE1 (Y. Zhang, Zhang, et Xu 2019), dont la localisation est majoritairement cytoplasmique, dans les cellules A549.

La répression de *LIMCH1* par des siRNA induit une augmentation de la croissance cellulaire des cellules A549 (Y. Zhang, Zhang, et Xu 2019) et une augmentation de la prolifération des cellules MDA-MB-231 (Bersini et al. 2020), induites par 10% de SVF. Nos résultats montrent que la répression de LIMCH1 par des shRNA ou LIMCH1-ASO n'avait pas d'impact sur la croissance des fibroblastes pulmonaires humains. Une hypothèse pouvant expliquer cette divergence de résultats est que les cellules CCD16Lu expriment faiblement HUWE1 et/ou Nup93, qui sont les partenaires moléculaires responsables de son effet sur la prolifération cellulaire dans les cellules A549 et MDA-MB-231. Cette hypothèse est peu probable compte-tenu la conservation de l'expression de ces gènes entre les différents types cellulaires du poumon (données de l'IPF cell atlas - http://ipfcellatlas.com/). Une deuxième hypothèse est que le rôle de suppresseur de tumeur de LIMCH1 soit spécifique des cellules tumorales. Les cellules A549 et MDA-MB-231 sont des cellules épithéliales cancéreuses tandis que les cellules CCD16Lu sont des cellules mésenchymateuses pulmonaires obtenues par culture primaire de poumon sain.

LIMCH1 est un composant des fibres de stress dans les cellules Hela, une lignée cancéreuse utérine (Y.-H. Lin et al. 2017). La formation de fibres de stress est un aspect majeur du phénotype profibrosant des cellules mésenchymateuses. Nous avons formulé l'hypothèse que l'expression de LIMCH1 serait induite par des agents profibrosants dans les cellules CCD16Lu. Or, nos résultats n'ont montré aucune modulation de l'expression de LIMCH1 suite à la stimulation des fibroblastes pulmonaires par le TGFβ1, le CTGF, le PDGF et WISP1. Ce résultat suggère que l'intégration de LIMCH1 dans les fibres de stress puisse être un phénomène spécifique des cellules tumorales et/ou des cellules d'origine utérine, plutôt qu'un phénomène généralement associé à la formation de fibres de stress.

La répression de *LIMCH1* par les shRNA diminuait l'expression basale des ARNm *ACTA2* et *COL1* mais pas des protéines correspondantes. LIMCH1-ASO diminuait l'ARNm *COL1A1* en condition basale mais pas *d'ACTA2*. Les effets des shRNA et de LIMCH1-ASO sur l'expression d'*ACTA2* et *COL1* n'étant pas similaires, il est possible que ces effets soient dépendants de la méthode de répression de LIMCH1. La transduction de shRNA par infection avec des vecteurs viraux, permet une répression à long terme du gène ciblé. Cette technologie permet de limiter les effets hors cible par l'utilisation d'un faible nombre de copies, tout en obtenant une efficacité de répression élevée (Rao et al. 2009; Moore et al. 2010). Contrairement aux shRNA, la transfection d'ASO ne nécessite pas de réactif de transfection, ni d'infection virale, ni d'intégration de gêne rapporteur ou de cassette de sélection à un antibiotique, ayant chacun leur effet propre sur les cellules transfectées. Les shRNA permettent une répression à long terme, alors que les ASOs entraînent une répression à court terme. Si on peut émettre l'hypothèse que l'expression basale de l'ARNm *COL1* soit régulée à court terme par LIMCH1, peut-être par des mécanismes directs, les mécanismes de la régulation de l'expression d'ACTA2 sont probablement complexes.

Les voies de signalisation régulant l'expression de COL1 et ACTA2, potentiellement modulées par LIMCH1, sont nombreuses et incluent les voies du TGFβ1, Interleukine-6 (IL-6) /JAK/STAT, PI3K/Akt, MAPK, WNT/β-caténine et MRTF/SRF. L'IL-6, une cytokine pro-inflammatoire, induit la différenciation myofibroblastique des fibroblastes murins NIH3T3, associée à la surexpression d'ACTA2 et de COL1 à travers l'activation des voies JAK/STAT, MAPK et PI3K (Lu et al. 2021; C. Meng et al. 2018). La surexpression de l'IL-6 dans les fibroblastes associés au cancer (CAF), est corrélée à la surexpression d'ACTA2 dans ces

cellules (Goulet et al. 2019). L'activation de la voie WNT/β-caténine, indépendamment du TGFβ1, induit l'expression de COL1 et ACTA2 à travers l'interaction de la β-caténine aux facteurs de transcription TCF/LEF (Verjee et al. 2013). La répression de LIMCH1 ne modifiait pas l'expression de *COL1* et *ACTA2* induite par le TGFβ1, ce qui suggère que la répression de LIMCH1 module des voies indépendantes des voies activées par le TGFβ1.

V. Conclusion

LIMCH1 était exprimée dans les fibroblastes pulmonaires de patients atteints de FPI à des niveaux similaires à ceux des témoins et son expression n'était pas induite par des agents profibrosants *in vitro*. La répression de LIMCH1 n'avait pas d'impact sur la croissance cellulaire des CCD16Lu ni sur l'expression d'ACTA2 et COL1 en présence de TGFβ1. Ces éléments suggèrent que LIMCH1 ne soit pas une cible prioritaire pour le traitement des pneumopathies interstitielles fibrosantes.

Partie IV : Faisabilité de l'administration répétée d'oligonucléotides antisens par voie aérienne pour le traitement de la fibrose pulmonaire.

I. Introduction

Au-delà des traitements, il est important que la molécule médicamenteuse parvienne jusqu'au poumon afin d'agir sur sa cible thérapeutique. Deux voies d'administration sont envisagées : la voie systémique (orale ou parentérale) et la voie inhalée. Chez les patients atteints de FPI, la voie systémique permet d'atteindre le parenchyme pulmonaire. L'inconvénient de cette voie d'administration est que son index thérapeutique est étroit pour les molécules actuellement disponibles. L'administration de médicaments par voie inhalée comporte des avantages majeurs pour le traitement des maladies pulmonaires, en particulier une concentration locale élevée, puisque le médicament atteint spécifiquement les voies respiratoires sous forme d'un aérosol, distribué directement dans le tractus respiratoire, réduisant les effets indésirables systémiques. Ces arguments font de cette voie d'administration, une voie spécifique et locale pour le traitement de maladies pulmonaires. L'administration inhalée est une pratique courante en médecine respiratoire (Ari 2015), représentant une perspective intéressante pour l'administration de médicaments innovants.

L'instillation d'ASO chez la souris est faisable et permet une répression de l'expression du gène cible dépendant de la dose administrée (Uemura, Hagiwara, et Kobayashi 2017). L'administration intratrachéale d'ASO a montré son intérêt par rapport à l'administration systémique. L'administration intratrachéale d'ASO encapsulé dans des liposomes, augmente leur concentration dans le tissu pulmonaire et réduit leur concentration dans les autres organes comme le cœur, le foie, les reins et la rate, en comparaison à la voie intraveineuse (Garbuzenko et al. 2009).

La possibilité de réprimer des gènes cibles par des ASOs administrés par voie aérienne dans le poumon fibrosé est mal connue. En particulier, l'administration dans le modèle de fibrose induite par la bléomycine d'ASO de 3^{e} génération, porteur de séquences d'acides nucléiques bloquées (LNA), n'a pas été rapportée à ce jour. Notre hypothèse était que l'administration intratrachéale d'ASO ciblant *Limch1* (mLimch1-ASO) permettait la répression de LIMCH1 dans le poumon de souris saine et dans le modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine.

Les objectifs étaient 1) de définir la dose et la cinétique appropriées pour l'administration intratrachéale de mLimch1-ASO dans le but de réduire l'expression de *Limch1* chez la souris

saine et 2) de quantifier l'effet de mLimch1-ASO sur l'expression de *Limch1* chez les souris exposées à la bléomycine.

II. Matériels et méthodes

II.1. Répression de LIMCH1 chez la souris

II.1.1. Répression de LIMCH1 dans les cellules murines LL/2 par l'ASO

Un ASO ciblant *Limch1* murin (mLimch1-ASO) a été sélectionné dans le cadre d'une collaboration avec la société Secarna (Munich, Allemagne) comme décrit dans la partie III, d'abord *in silico* puis par des étapes de sélection *in vitro* dans les lignées cellulaires murines 3T3 et 4T1. L'ASO sélectionné montre une concentration inhibitrice médiane (IC50) inférieure à 1µM et l'absence de toxicité *in vitro*. Un ASO inactif (control-ASO) a été fourni par Secarna pour servir de témoin.

Pour vérifier l'effet de mLimch1-ASO, les cellules épithéliales cancéreuses murines LL/2 (Lewis Lung carcinoma, ATCC®CRL-1642^{TM}) ont été utilisées. Les cellules LL/2 étaient cultivées dans un milieu de culture DMEM-Glutamax complété par 10% de SVF et 1% de P/S à 37° C avec 5% de CO_2. Les expériences ont été réalisées entre les passages 6 et 10, lorsque les cellules avaient atteint 70 % de confluence.

Les LL/2 ont été traités avec une gamme de concentration entre 0,01 µM et 10 µM de mLimch1-ASO (Secarna, Allemagne) ou avec le control-ASO (10µM), dilués dans de l'eau pure stérile et incubées pendant 72 heures. L'expression de LIMCH1 a été quantifiée comme décrit plus haut avec l'anticorps LIMCH1 (NBP2-39006, Novus Biologicals, UK).

II.1.2. Instillation d'ASO chez la souris naïve

L'ensemble des expériences a été réalisé avec des souris mâles âgés de 8 semaines et de souche C57Bl6 (Janvier, France). Les animaux avaient une période d'acclimatation de 7 jours à compter de la date d'arrivée dans les locaux animaliers. Ils étaient ensuite répartis par cage de 5 animaux.

Les instillations intratrachéales d'ASO ont été effectuées à l'aide d'un microsprayer (BJ-PW-M, BioJane, Chine). Les souris étaient anesthésiées durant la procédure avec 3,5% d'isoflurane (ISOVET 100%, COVETO) et un débit d'oxygène constant de 1 L/min. Les solutions d'ASO

ont été instillées à hauteur de 50 µL par souris. *In vivo*, les ASOs ont été dilués dans 50 µL de PBS contenant 5% de sucrose. Le choix du sucrose 5% est justifié dans la section IV.1.1.

II.1.2.1. Expérience de dose réponse chez la souris saine

Des souris naïves ont reçu une instillation unique de mLimch1-ASO (2, 10, 50 et 100 µg) ou de control-ASO (2, 10, 50 et 100 µg). Les souris témoins recevaient le sucrose seul. Trois jours après l'instillation, les souris ont été sacrifiées par exsanguination (**Figure 36**). L'ARNm et la protéine LIMCH1 ont été quantifiés comme décrit dans la partie III.

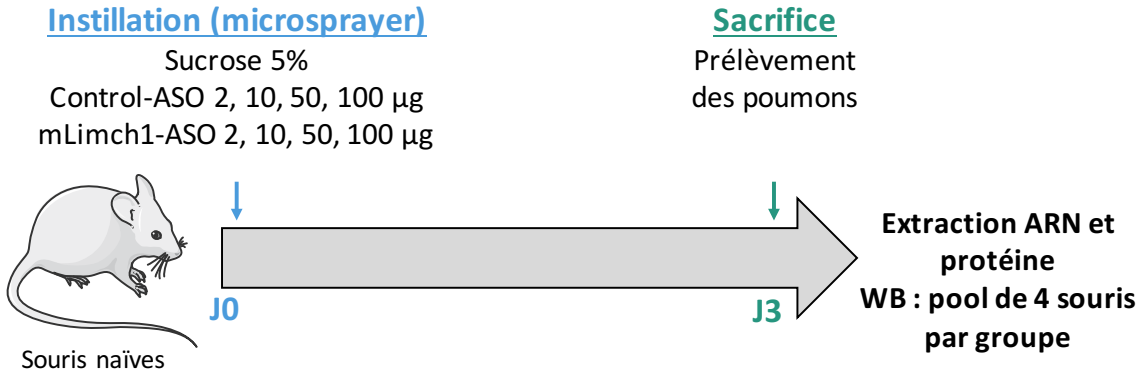


Figure 36 : Schéma d'administration de l'ASO - Expérience dose réponse.

II.1.2.2. Cinétique de répression de LIMCH1 chez la souris saine

Des souris naïves ont reçu une instillation unique d'ASO à la dose de 50 µg. Les souris ont été sacrifiées à J3, J7, J12 après l'instillation (**Figure 37**).

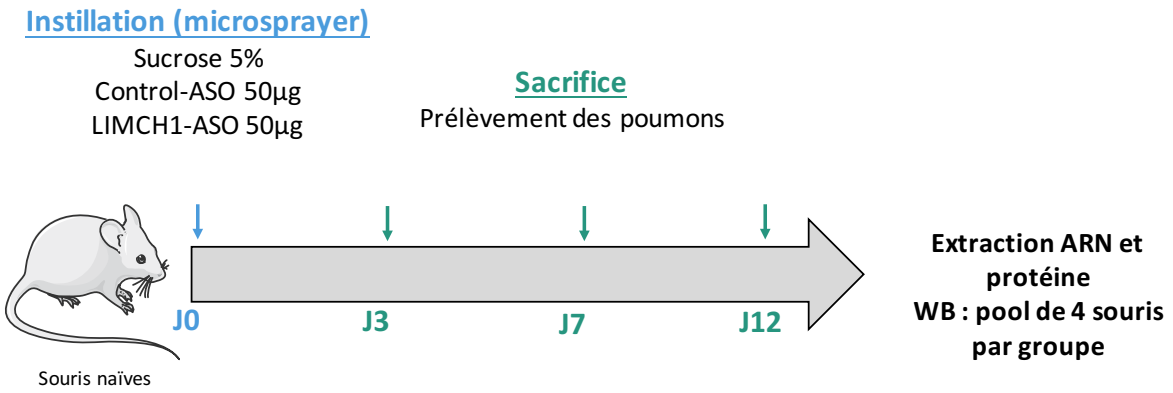


Figure 37 : Schéma d'administration de l'ASO - Expérience cinétique.

II.2.Cinétique de répression de LIMCH1 chez la souris exposée à la bléomycine

La bléomycine (Adooq Chemicals) a été administrée dans les poumons par voie intratrachéale comme décrit plus haut, à une dose de 12 µg par animal. Les souris ont été pesées tous les deux jours et euthanasiées si elles dépassaient le point limite (perte de poids de plus de 25%).
Trois jours après l'administration de bléomycine, une première instillation d'ASO à 50 µg était réalisée puis une seconde 7 jours après la première administration d'ASO, soit 10 jours après l'instillation de bléomycine (**Figure 38**).
Les souris ont été sacrifiées 14 jours et 21 jours après l'instillation de bléomycine. Le poumon droit entier a été prélevé afin d'en extraire les ARNs.

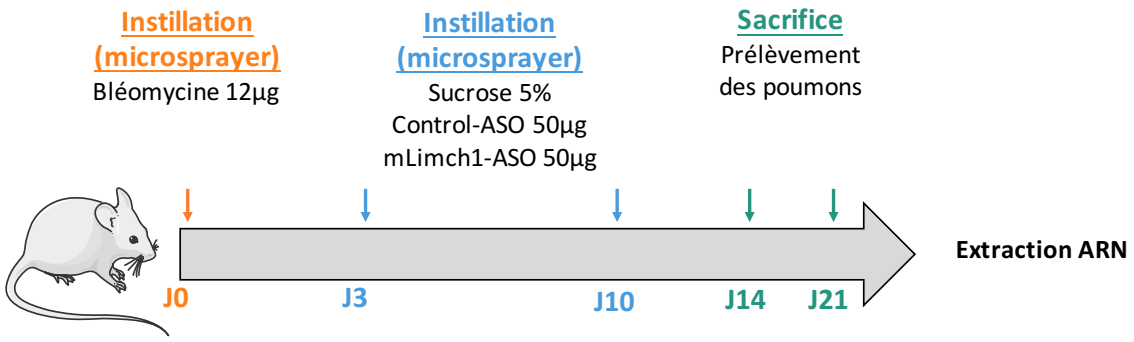


Figure 38 : Schéma d'administration de l'ASO - Modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine.

II.3.Critères de jugement

L'expression de LIMCH1 a été quantifiée par RT-PCR et western blot à partir de poumons de souris broyés comme décrit dans la partie II. Les ARN ont été extraits avec le kit de purification Nucleospin RNA/protein (#740933, Macherey-Nagel). Les amorces utilisées sont listées dans le **Tableau 5**. L'expression de la protéine LIMCH1 a été quantifiée dans les broyats pulmonaires poolés de 4 animaux (1 échantillon pour chaque condition). Le collagène insoluble total et ProCOL1 ont été quantifiés comme décrit dans la partie II.

Tableau 5 : Amorces utilisés

Espèce	Transcrit	Nom du gène	Forward sequence	Reverse sequence
Murin	*Hprt1*	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	TCCCAGCGTCG TGATTAGC	TGATGGCCTCC CATCTCCTT
Murin	*Limch1*	Lim Calponin homology domain 1	ATGACGCAGAG AGCACGAGT	GCTTTTCCTCCG CTCACTTG

II.4. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées comme décrit dans l'article (Mergault et al. 2021).

III. Résultats

III.1. Effet de mLimch1-ASO *in vitro*

L'efficacité de mLimch1-ASO a été vérifiée dans des cellules *in vitro*. Pour cela, les cellules LL/2 ont été transfectées avec 10 µM de mLimch1-ASO. mLimch1-ASO réprimait à plus de 90% l'expression de LIMCH1 au niveau ARNm (**Figure 39A**) et protéique (**Figure 39B**).

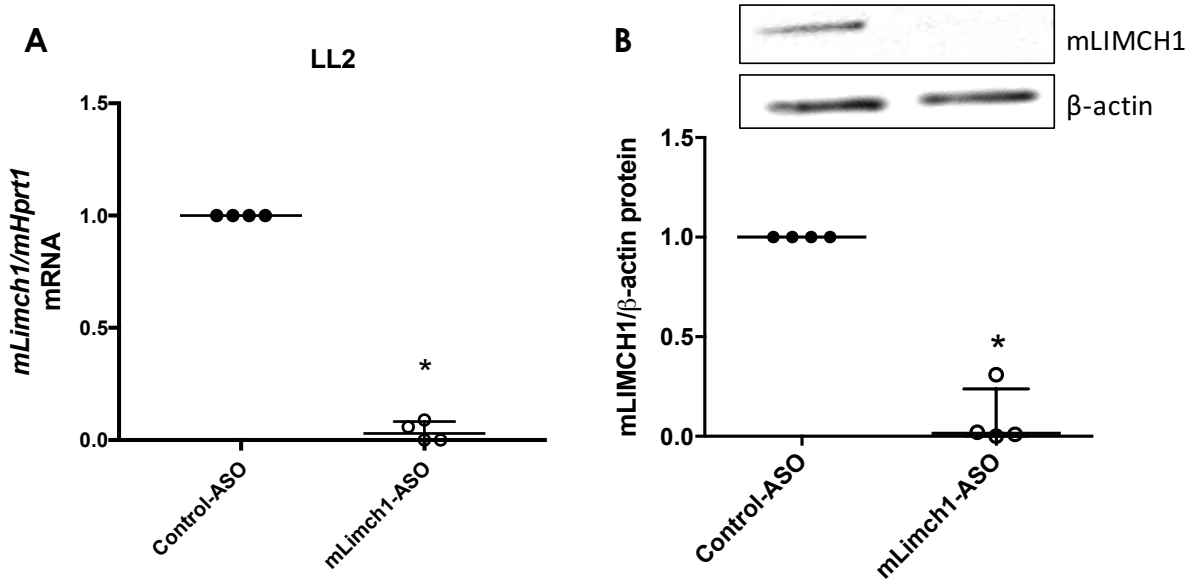


Figure 39 : Expression de LIMCH1 dans les cellules épithéliales murines LL/2. **A) ARNm de *Limch1* (RTPCR, n = 4). B) Protéine LIMCH1/β-actine (Western Blot, n = 4). Les données ont été normalisées par rapport au Control-ASO. Les données individuelles, les médianes et les intervalles interquartiles sont indiqués. * : p<0,0005 par rapport au Control-ASO.**

III.2. Expérience de dose réponse chez la souris naïve

Le control-ASO à 50 µg diminuait de 70% l'expression pulmonaire de l'ARNm *Limch1* en comparaison au sucrose 5%. L'expression de l'ARNm de *Limch1* était diminuée de 80% à partir de 50 µg de mLimch1-ASO en comparaison avec le groupe sucrose 5%. Une dose de 100 µg de mLimch1-ASO induisait aussi la répression de *Limch1* par rapport au control-ASO 100 µg (50% de répression) (**Figure 40A**). Les mêmes résultats étaient observés au niveau de la protéine (**Figure 40B**).

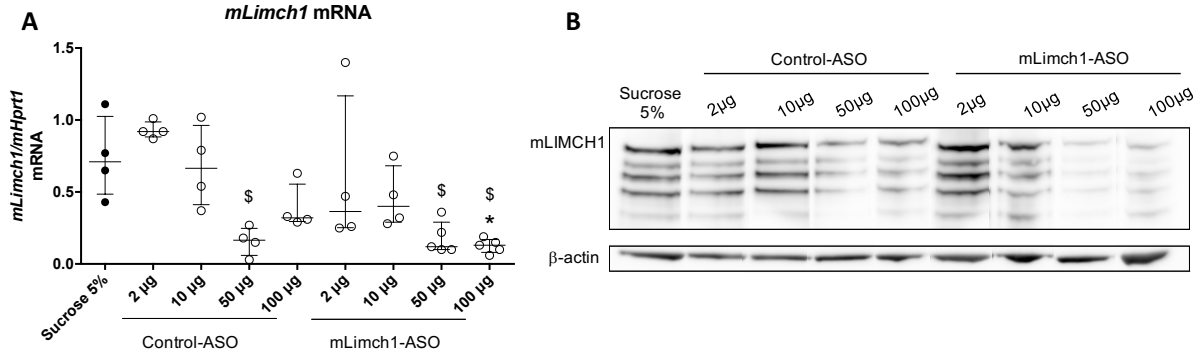


***Figure 40 : Expression de LIMCH1 dans les poumons de souris saines C57Bl6, 3 jours après l'instillation trachéale de 5% sucrose et/ou une dose de 2, 10, 50 ou 100 µg d'ASO*. A) ARNm de m*Limch1/Hprt1* (RTPCR, n = 4 – 5). B) Protéine LIMCH1 et β-actine (Western Blot, pool de n = 4). Les données individuelles, les médianes et les intervalles interquartiles sont indiqués. $: p<0,05 par rapport au Sucrose 5% ; * : p <0,05 par rapport au Control-ASO 100 µg.**

III.3. Etude cinétique chez la souris naïve

Les données de toxicité obtenues dans le cadre d'une collaboration (Pr Rita Vanbever, Eleonor Hardy, Université Catholique de Louvain, Belgique) montraient une toxicité pulmonaire aiguë induite par une dose d'ASO supérieure à 50 µg. Les expériences de cinétique chez la souris saine ont été effectuées à une dose de 50 µg d'ASO.

Trois jours après l'instillation, le control-ASO tendait à réprimer l'expression de l'ARNm *Limch1* en comparaison au groupe sucrose. Le retour à l'état basal de l'expression de *Limch1* était observé à partir du 7ème jour après l'instillation du control-ASO. mLimch1-ASO réprimait l'expression de *Limch1* à partir du 7ème jour en comparaison au control-ASO (p = 0,036) (**Figure 41A**). L'expression de *Limch1* était réprimée jusqu'à 12 jours après l'instillation

unique de mLimch1-ASO. Un profil de répression similaire est retrouvé au niveau de la protéine LIMCH1 (**Figure 41B**).

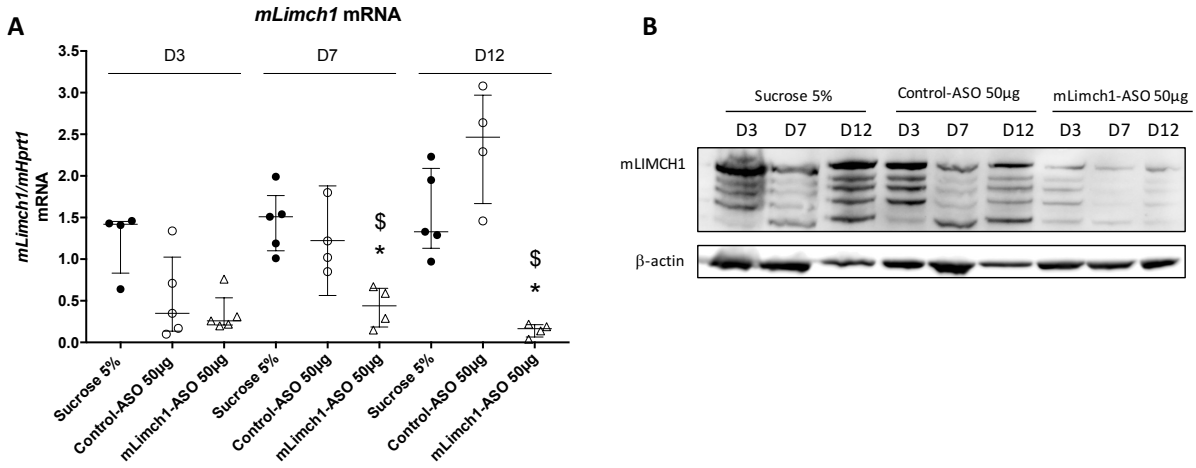


Figure 41 : Cinétique de mLimch1-ASO dans les poumons de souris saines C57Bl6 à partir de 3 jours après l'instillation jusqu'au 12ème jour. **A) ARNm *mLimch1/mHprt1* (RT-PCR, n = 4-5). B) Protéine LIMCH1 et β-actine (Western Blot, pool de n = 4). Les ASO ont été instillé à une dose de 50 µg / 50 µL à l'aide d'un microsprayer. Les données individuelles, les médianes et les intervalles interquartiles sont indiqués. * : p<0,05 par rapport au Control-ASO et $: p<0,05 par rapport au sucrose 5%.**

III.4. Efficacité de l'ASO dans un modèle murin de fibrose pulmonaire

Les études de cinétique chez la souris saine, montraient une répression de LIMCH1 satisfaisante avec 50 µg d'ASO, au niveau de l'ARNm et de la protéine. Nous avons poursuivi l'étude de l'ASO dans le modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine. Le dosage du collagène insoluble (**Figure 42**) montre que la bléomycine induisait une augmentation significative du contenu pulmonaire des souris en collagène insoluble ($p < 0,0001$).

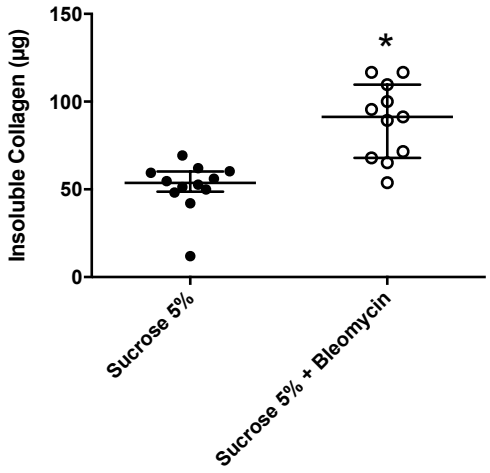


Figure 42 : Dosage du contenu pulmonaire des souris exposées à la bléomycine, en collagène insoluble. Sircol Assay (n = 11 – 13). **Les données individuelles, les médianes et les intervalles interquartiles sont indiqués. * : p<0,0001 par rapport au Sucrose 5%.**

Chez les souris sacrifiées 4 jours après la dernière instillation d'ASO, l'expression de *Limch1* était réprimée par 50 µg de mLimch1-ASO en comparaison au control-ASO (p = 0,017) et au groupe sucrose 5% (p = 0,033) (**Figure 43A**). Lorsque les souris étaient sacrifiées 11 jours après la deuxième instillation d'ASO, l'expression de *Limch1* était diminuée chez toutes les souris ayant reçues un ASO (Control-ASO ou mLimch1-ASO) en comparaison aux souris ayant reçues une instillation de sucrose (p = 0,057). Il n'y avait alors pas de différence entre le groupe control-ASO et le groupe mLimch1-ASO (**Figure 43B**).

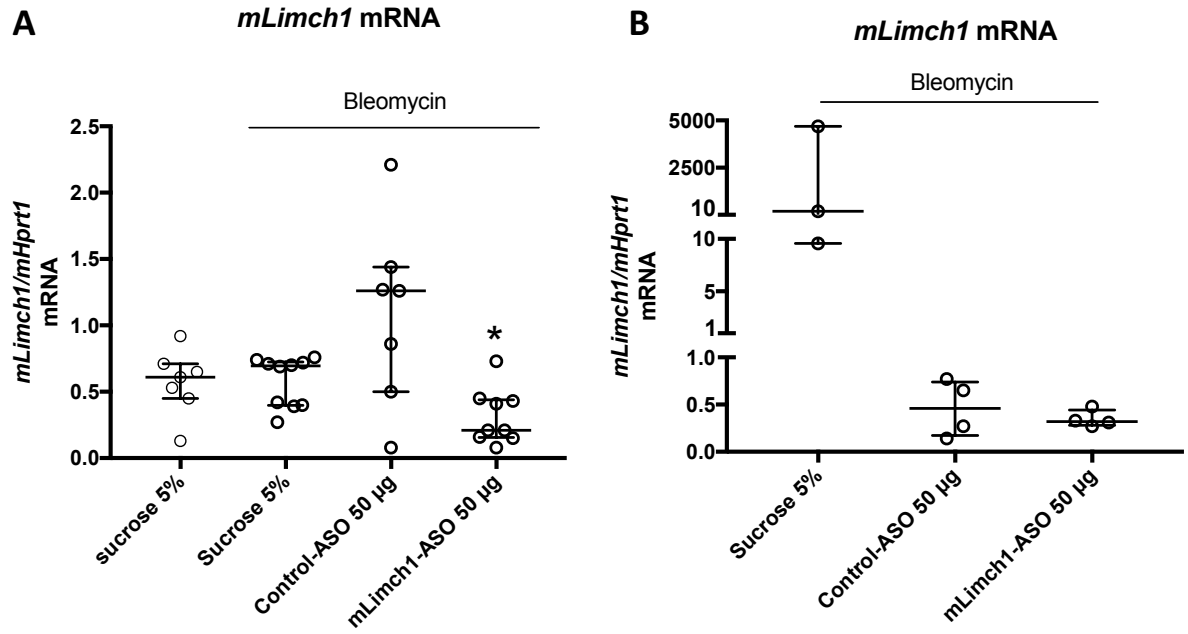


Figure 43 : Effet de mLimch1-ASO dans le modèle murin de fibrose pulmonaire. **A) Prélèvement pulmonaire 14 jours après l'exposition à la bléomycine, ARNm *Limch1* (RT-PCR, n = 7 – 10). B) Prélèvement pulmonaire 21 jours après l'exposition à la bléomycine, ARNm *Limch1* (RT-PCR, n = 7 – 10). Les données individuelles, les médianes et les intervalles interquartiles sont indiqués. * : p<0,05 par rapport au Sucrose 5% et au Control-ASO.**

IV. Expériences complémentaires : Utilisation de nanovecteurs peptidiques pour l'administration d'ASO

Outre l'utilisation d'ASO, nous avons cherché à déterminer si la transfection de nanoparticules, composées des ASOs utilisés précédemment (nanoASO) et de vecteurs peptidiques obtenus auprès de la société Div'incell (Nîmes), était supérieure à l'administration d'ASO seul. Les nanoparticules ont été obtenues dans le cadre du projet INAT (appel d'offres Euronanomed III).

IV.1. Répression de LIMCH1 par des nanoASO *in vitro*

IV.1.1. Matériels et méthodes

Formulation des nanoASOs

Les nanoASOs contrôle (control-nanoASO) et ciblant LIMCH1 (LIMCH1-nanoASO) ont été formulées par Divincell. Les formulations de nanoASO étaient stockées jusqu'à un mois à 4°C. Les nanoparticules étaient formulées dans une solution de sucrose 5%. Le sucrose 5% permettait d'augmenter la stabilité des nanoparticules dans le temps.

Transfection des nanoASOs

Les CCD16lu et les LL/2 ont été traitées avec une gamme de LIMCH1-nanoASOs (Dinvincell, Nîmes) à une concentration d'ASO entre 0,01 µM et 10 µM ou avec 10 µM pour le control-nanoASO. Les cellules sont incubées pendant 72 heures avec les nanoASOs puis collectées. La RT-PCR a été réalisée en suivant le protocole décrit plus haut.

IV.1.2. Résultats

L'expression de l'ARNm *Limch1* a été réduite par une concentration de 10 µM de LIMCH1-nanoASO dans les cellules CCD16Lu (**Figure 44A**), mais pas à des concentrations inférieures. Dans les cellules épithéliales murines LL/2, le LIMCH1-nanoASO avait le même profil de répression que les ASO seuls au niveau de l'ARN (**Figure 44B).**

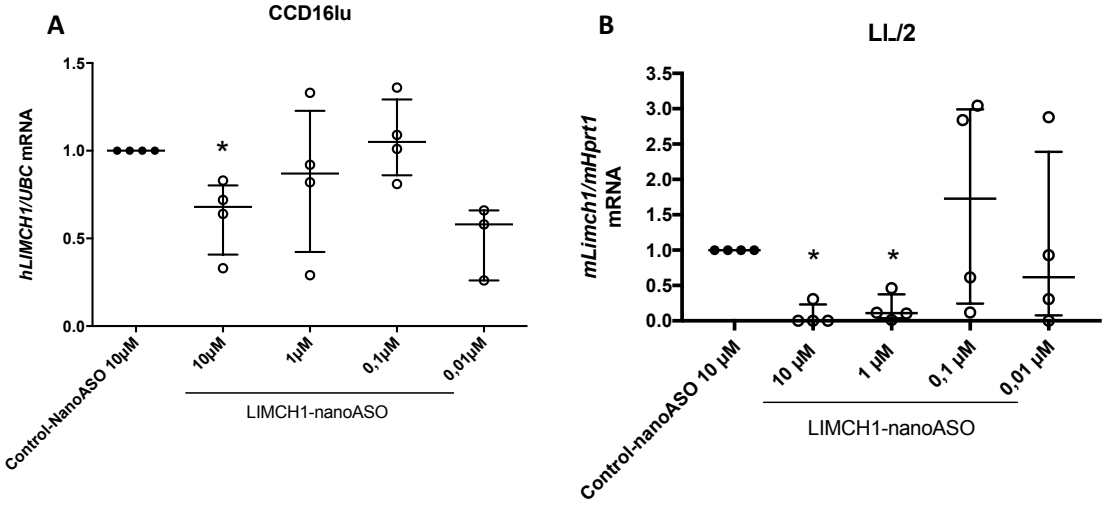


Figure 44 : Répression de LIMCH1 par les nanoASOs in vitro. **A) Répression de l'expression de *Limch1* par les nanoASOs humaines dans les fibroblates pulmonaires humains CCD16Lu (RT-PCR, n=3-4). B) Diminution de l'expression de *Limch1* par les nanoASOs murines dans les cellules épithéliales cancéreuses murines LL2 (RT-PCR,**

n=4). Les données individuelles, les médianes et les intervalles interquartiles sont indiqués. * : p<0,05 par rapport au Control-nanoASO.

IV.2. Absence de répression de *Limch1* par des nanoASO *in vivo*

IV.2.1. Matériels et méthodes

Instillation des nanoASOs

Les nanoASOs ont été instillées à hauteur de 50 µL par souris, à l'aide d'une seringue Hamilton (Microliter™ #710). Suite aux résultats de toxicité montrant une toxicité à partir de 20 µg de nanoASO (Pr Rita Vanbever, Université Catholique de Louvain), des souris saines ont reçu une instillation de 20 µg de control-ASO sous forme de control-nanoASO et 2, 5 et 20 µg de mLimch1-ASO sous forme de mLimch1-nanoASOs. Trois jours après l'instillation de nanoASO, les souris ont été sacrifiées par exsanguination. Les mêmes critères de jugement ont été utilisés pour les ASOs et nanoASOs. Dans une deuxième série d'expérience, une dose unique de 20 µg de nanoASO a été instillée chez les souris naïves. Les souris ont été sacrifiées à J3, J7, J10, J14 et J21 après l'instillation des nanoASOs.

IV.2.2. Résultats

L'expression de l'ARNm *Limch1* dans le poumon des souris ayant reçue une instillation du control-nanoASO tendait à être inférieure à celle observée dans le poumon des souris témoins ($p = 0,095$). L'expression de l'ARNm *Limch1* n'était pas diminuée trois jours après l'instillation intratrachéale de mLimch1-nanoASO, quelle que soit la dose instillée, en comparaison au control- nanoASO (**Figure 45**).

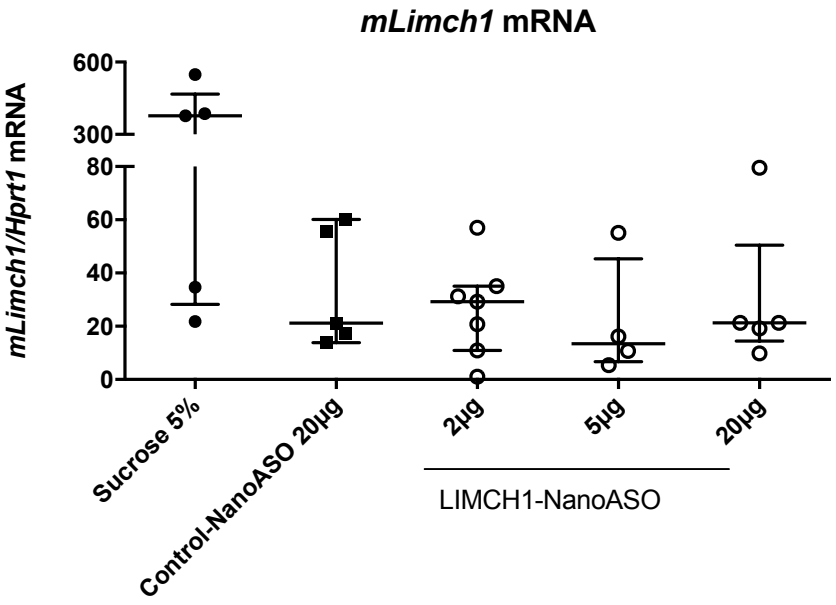


Figure 45 : Dose réponse des nanoASO chez la souris naïve. Les souris ont été sacrifiées trois jours après l'instillation intratrachéale de nanoASOs.

Suite à l'instillation de plusieurs doses de nanoASOs, nous avons décidé de réaliser une expérience cinétique des nanoASOs en instillant aux souris naïves la dose la plus forte de nanoASOs. Les résultats montrent que LIMCH1-nanoASO ne diminuait pas l'expression de LIMCH1 de J3 à J21 après l'instillation de 20 µg de LIMCH1-ASO sous forme de LIMCH1-nanoASO, ni en comparaison au sucrose ni en comparaison au control-nanoASO (**Figure 46**).

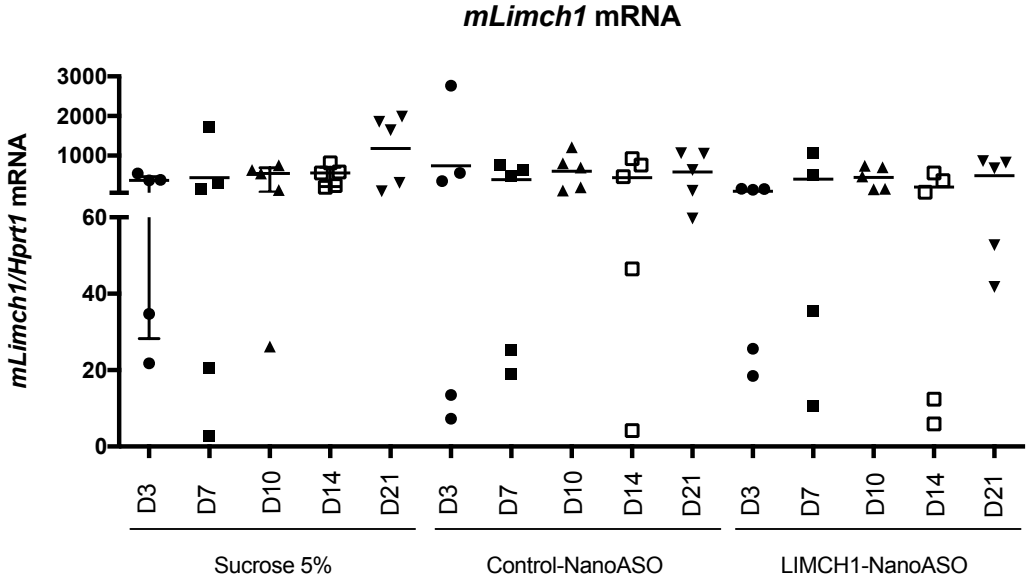


Figure 46 : Les nanoASO ciblant LIMCH1 ne répriment pas l'expression de LIMCH1 après 3, 7, 10, 14 et 21 jours.

V. Discussion

Chez l'animal, nous avons montré que l'instillation intratrachéale d'ASO de 3ème génération permettait la répression de LIMCH1 chez les souris naïves pour une dose supérieure ou égale à 50 µg de mLimch1-ASO.

Chez la souris naïve, nous avons observé que l'administration de 50 µg de mLimch1-ASO permettait une répression de 80% de l'ARNm de *Limch1* en comparaison au sucrose 5%, trois jours après l'instillation. L'administration d'une dose de 100 µg réduisait l'expression de *Limch1* significativement par rapport au control-ASO. Ces doses sont de l'ordre de grandeur de celles précédemment utilisées (40 µg et 100 µg d'ASO) pour réprimer *Hprt1* et *Scarb1* chez les souris C57BL/6 (Uemura, Hagiwara, et Kobayashi 2017).

Même si la dose de 50 µg montrait une efficacité de répression plus faible que 100 µg de mLimch1-ASO, nous avons sélectionné la dose de 50 µg de mLimch1-ASO pour l'étude cinétique en raison d'une toxicité apparue à 100 µg d'ASO (Pr Rita Vanbever et Mme Eleonor Hardy, Université Catholique de Louvain).

L'étude de cinétique a révélé que l'instillation unique de 50 µg de mLimch1-ASO réprimait l'expression de l'ARNm *Limch1*, 7 et 12 jours après l'instillation de mLimch1-ASO, en comparaison au control-ASO. Ce résultat suggère que l'administration unique d'ASO par voie aérienne possède un effet rémanent. La demi-vie de l'ASO dans le poumon n'est pas connue mais les ASOs de 3ème génération sont détectables jusqu'à 4 jours après leur instillation dans les poumons de souris saines (Pr Rita Vanbever et Mme Eleonor Hardy, Université Catholique de Louvain).

Dans le modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, l'instillation de 50 µg d'ASO permettait la répression de LIMCH1 jusqu'à 4 jours après la dernière instillation d'ASO. La répression de LIMCH1 n'était plus détectable 11 jours après la dernière instillation d'ASO. En comparaison avec les résultats de l'étude cinétique de mLimch1-ASO chez les souris naïves, ces résultats indiquent que l'effet de mLimch1-ASO est moins durable chez les souris exposées à la bléomycine.

Une première hypothèse pour expliquer la moindre durée d'action des ASOs chez les souris exposées à la bléomycine est une ½ vie plus courte de l'ASO dans le poumon, en rapport avec une augmentation de leur dégradation et/ou de leur clairance. Au sein du poumon, les oligonucléotides peuvent être la cible de nucléases dégradant le médicament (He et al. 2017; Feldmann et al. 2020). Une autre hypothèse est que la clairance pulmonaire de mLimch1-ASO

est plus rapide chez les souris exposées à la bléomycine. Cette hypothèse est appuyée par la biodistribution de mLimch1-ASO chez les souris naïves versus exposées à la bléomycine, montrant une clairance pulmonaire de 24 heures chez les souris exposées à la bléomycine et de 4 jours chez les souris naïves (Pr Rita Venbever et Mme Eleonor Hardy, Université Catholique de Louvain).

Une deuxième hypothèse pour expliquer la moindre action des ASOs chez les souris exposées à la bléomycine est une réduction de l'expression de la machinerie liée à la RNAse H. D'après les résultats d'analyse de microarrays GDS1492 (Haston et al. 2005) et GDS5078 (Rajasekaran et al. 2013), l'expression du gène RNASEH1 codant la RNase H, n'est pas augmentée ni diminuée dans les poumons des souris exposées à la bléomycine, ce qui ne corrobore pas cette hypothèse.

Les types cellulaires dans lesquels l'ASO réprimait *Limch1* n'ont pas été décrits dans ce travail, l'anticorps ciblant LIMCH1 dont nous disposions, ne donnant pas un signal interprétable en immunohistochimie. Les données de single-cell RNAseq (www.ipfcellatlas.com) indiquent que LIMCH1 est exprimée majoritairement dans les cellules épithéliales, et n'est pas exprimée par les macrophages.

Il a été montré que l'instillation d'une dose inférieure à 20 µg d'ASO permet de réprimer l'ARNm ciblé dans les macrophages alvéolaires mais pas dans le lysat pulmonaire (Uemura et Kobayashi 2019). Dans nos expériences, l'administration d'une dose supérieure ou égale à 50 µg était nécessaire pour réduire *Limch1* dans le poumon. Cette dose était très proche de la dose toxique identifiée par nos collaborateurs (Pr Rita Venbever et Mme Eleonor Hardy, Université Catholique de Louvain). Ceci suggère que l'index thérapeutique des ASOs inhalés soit en fait très étroit.

Une piste de recherche pour améliorer la ½ vie et/ou l'action et/ou la toxicité des ASOs et d'autres oligonucléotides dans le poumon, est l'utilisation de vecteurs. Nos premiers résultats montrent que LIMCH1-nanoASO n'augmentait pas l'effet de LIMCH1-ASO *in vitro* et n'avait pas d'effet *in vivo* aux doses testées. La chimie et la formulation des nanoASOs restent à optimiser.

VI. Conclusion

L'administration intratrachéale de mLimch1-ASO diminuait l'expression de LIMCH1 dans le poumon des souris saines, jusqu'à 12 jours après une instillation unique de 50 μg de mLimch1-ASO. Chez les souris exposées à la bléomycine, l'effet de mLimch1-ASO sur l'expression de *Limch1* n'était observé que 4 jours après la dernière instillation d'ASO.

Ces résultats suggèrent que l'administration intratrachéale d'ASO de 3ème génération pour la répression d'un gène cible est faisable dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, sous réserve d'une durée d'action plus courte que chez la souris saine, et d'un index thérapeutique étroit.

Partie V : Discussion, perspectives et conclusion générales

I. Discussion générale

Dans un premier temps, ce travail a permis de mettre en avant un régulateur du cytosquelette d'actine, comme nouvelle cible thérapeutique pour le traitement de la fibrose pulmonaire, le complexe Arp2/3.
Dans un deuxième temps, nous avons montré que LIMCH1, un composant des fibres de stress, n'était pas une cible prioritaire pour le traitement de la fibrose pulmonaire.
Dans un troisième temps, ce travail a permis de montrer la faisabilité de l'administration intratrachéale répétée d'ASO de 3ème génération dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine.

Les expériences menées *in vitro*, ont impliqué l'utilisation d'un large panel d'outils de répression avec des siRNA, shRNA, ASO et petite molécule pharmacologique. Chacun de ces outils a montré son efficacité d'inhibition de la cible. Cependant, l'inhibition d'une même cible par des agents différents n'obtenait pas des effets strictement identiques. La transfection de siRNA et d'ASO induit une répression transitoire de la cible mais utilise un mécanisme différent. Les siRNA sont des ARN double brins pris en charge par le complexe RISC, qui induit la perte du brin passager, pour que le brin complémentaire puisse s'hybrider à la séquence d'ARNm cible et la cliver. L'ASO, lui, est un simple brin d'ARN complémentaire composé de petite séquence ADN à ses extrémités, et n'a pas besoin du complexe RISC pour s'hybrider à la séquence d'ARNm cible. Lorsque l'ASO est hybridée à l'ARNm cible, la RNase H est recrutée au niveau des liaisons ADN-ARN induisant le clivage de l'ARNm cible (Watts et Corey 2012). Un avantage de l'utilisation d'ASO par rapport aux siRNA est que l'ASO ne nécessite pas de réactif de transfection, limitant un effet propre du réactif sur les cellules.

Les expériences *in vivo* dans un modèle murin de fibrose pulmonaire, ont montré que l'inhibition du complexe Arp2/3 par le CK666 réduisait le contenu pulmonaire en collagène insoluble et la fibrogenèse dans les poumons des souris exposées à la bléomycine. Ces résultats suggèrent un rôle important du complexe Arp2/3 dans la fibrogénèse, et soutiennent l'hypothèse d'un rôle important du cytosquelette d'actine dans la différenciation des cellules mésenchymateuses pulmonaires et du processus induisant la fibrose. L'inhibition du complexe Arp2/3 pourrait être utile pour le traitement de la fibrose pulmonaire.
Notre hypothèse est que l'effet anti-fibrosant de l'inhibition du complexe Arp2/3 soit liée à la répression de l'expression de MRTF-A. En effet, le CK666 réduisait l'expression protéique de

MRTF-A dans les fibroblastes pulmonaires humains stimulés ou non par le TGFβ1. L'inhibition de MRTF-A a été montrée comme protégeant le poumon, le cœur et les reins, de la fibrose (Y. Zhou et al. 2013a; Small et al. 2010; Xu et al. 2015). L'hypothèse que l'inhibition du complexe Arp2/3 pourrait être une possibilité pour le traitement de la fibrose d'organes autres que le poumon reste à explorer.

Dans ces expériences *in vivo*, le CK666 a été administré par voie systémique à travers une injection péritonéale quotidienne. Aucune donnée n'a été rapportée sur l'administration du CK666 par voie aérienne. L'instillation intratrachéale du CK666 pourrait permettre d'augmenter son exposition locale au niveau pulmonaire puisque l'administration intratrachéale permet d'augmenter la concentration de l'agent thérapeutique dans le tissu pulmonaire (Garbuzenko et al. 2009). L'administration intratrachéale du CK666 pourrait permettre de réduire la dose instillée, ainsi que de réduire le volume de solvant co-administré, tout en gardant le même effet que son administration systémique.

Lors de l'administration intratrachéale d'ASO, les premières cellules en contact avec l'ASO sont les cellules épithéliales qui tapissent la paroi pulmonaire et les macrophages présents dans les alvéoles pulmonaires. La répression d'un gêne cible au niveau d'autres populations cellulaires du poumon n'a pas été rapportée spécifiquement. Nos données ne permettent pas de répondre à cette question.

L'administration d'agents thérapeutiques par voie aérienne, peut représenter un progrès majeur pour le traitement des maladies pulmonaires, afin d'augmenter l'index thérapeutique et diminuer les effets indésirables. Nos résultats indiquent que l'administration d'ASO seul par voie aérienne possède en réalité un index thérapeutique étroit.

II. Conclusion et perspectives

Les traitements administrés aux patients atteints de PID, ne parviennent pas à stopper la progression de la fibrose mais seulement à la ralentir. Dans ce contexte, il existe un besoin de nouveaux traitements pour les maladies pulmonaires fibrosantes. Nos résultats montrent le rôle du complexe Arp2/3 dans l'expression d'ACTA2 et COL1 induite par le TGFβ1 *in vitro* et dans le processus de fibrogénèse *in vivo*. L'inhibition du complexe Arp2/3 par le CK666 réprimait la voie de signalisation pAkt/pGSK3β/β-caténine/MRTF-A dans les fibroblastes pulmonaires humains. Il serait intéressant d'étudier l'expression des facteurs impliqués dans cette voie de signalisation chez la souris exposée à la bléomycine. Cette étude permettrait de mieux comprendre le rôle du complexe Arp2/3 dans la fibrogenèse pulmonaire. En plus de l'étude des mécanismes d'action du complexe Arp2/3 dans la fibrogenèse, l'administration intratrachéale de CK666 ou d'oligonucléotides ciblant *ARP2* et *ARP3* serait une perspective thérapeutique intéressante. Le cytosquelette d'actine est connu pour son implication dans le processus de fibrogenèse à travers la polymérisation linéaire et maintenant, la polymérisation branchée de l'actine.

La formation de structures comme les fibres de stress pourrait également jouer un rôle important dans la fibrogenèse pulmonaire. Pour explorer cette piste, nous avons étudié le rôle de LIMCH1, un composant des fibres de stress, dans les fibroblastes pulmonaires humains. L'ensemble de ces résultats suggèrent que LIMCH1 n'est pas une cible prioritaire pour le traitement de la fibrose pulmonaire.

Le traitement des PID nécessite le choix d'une cible moléculaire pertinente mais également d'une voie d'administration efficace. Nos résultats montrent la faisabilité de l'administration intratrachéale d'ASO de 3ème génération dans le modèle murin de fibrose pulmonaire. Le développement de nouveaux vecteurs pourrait permettre d'améliorer l'index thérapeutique étroit des ASOs seuls.

Références bibliographiques

Abdollahi, Amir, Minglun Li, Gong Ping, Christian Plathow, Sophie Domhan, Fabian Kiessling, Leslie B. Lee, et al. 2005. « Inhibition of Platelet-Derived Growth Factor Signaling Attenuates Pulmonary Fibrosis ». *The Journal of Experimental Medicine* 201 (6): 925-35. https://doi.org/10.1084/jem.20041393.

Abu Taha, Abdallah, et Hans-J. Schnittler. 2014. « Dynamics between Actin and the VE-Cadherin/Catenin Complex: Novel Aspects of the ARP2/3 Complex in Regulation of Endothelial Junctions ». *Cell Adhesion & Migration* 8 (2): 125-35. https://doi.org/10.4161/cam.28243.

Abu Taha, Abdallah, Muna Taha, Jochen Seebach, et Hans-J. Schnittler. 2014. « ARP2/3-Mediated Junction-Associated Lamellipodia Control VE-Cadherin-Based Cell Junction Dynamics and Maintain Monolayer Integrity ». *Molecular Biology of the Cell* 25 (2): 245-56. https://doi.org/10.1091/mbc.E13-07-0404.

Addi, Cyril, Jian Bai, et Arnaud Echard. 2018. « Actin, Microtubule, Septin and ESCRT Filament Remodeling during Late Steps of Cytokinesis ». *Current Opinion in Cell Biology* 50: 27-34. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.01.007.

Akhmetshina, Alfiya, Clara Dees, Margarita Pileckyte, Gabriella Szucs, Bernd M. Spriewald, Jochen Zwerina, Oliver Distler, Georg Schett, et Jörg H. W. Distler. 2008. « Rho-Associated Kinases Are Crucial for Myofibroblast Differentiation and Production of Extracellular Matrix in Scleroderma Fibroblasts ». *Arthritis and Rheumatism* 58 (8): 2553-64. https://doi.org/10.1002/art.23677.

Almaaitah, Saja, Kristin B. Highland, et Adriano R. Tonelli. 2020. « Management of Pulmonary Arterial Hypertension in Patients with Systemic Sclerosis ». *Integrated Blood Pressure Control* 13: 15-29. https://doi.org/10.2147/IBPC.S232038.

Altamirano-Barrera, Alejandra, Beatriz Barranco-Fragoso, et Nahum Méndez-Sánchez. 2017. « Management Strategies for Liver Fibrosis ». *Annals of Hepatology* 16 (1): 48-56. https://doi.org/10.5604/16652681.1226814.

Amano, Hideki, Yoshio Mastui, Yoshiya Ito, Yusaku Shibata, Tomohiro Betto, Koji Eshima, Fumihiro Ogawa, Yukitoshi Satoh, Masabumi Shibuya, et Masataka Majima. 2019. « The Role of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 Tyrosine Kinase Signaling in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis ». *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 117 (septembre): 109067. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109067.

Anderson, Tom W., Andrew N. Vaughan, et Louise P. Cramer. 2008. « Retrograde Flow and Myosin II Activity within the Leading Cell Edge Deliver F-Actin to the Lamella to Seed the Formation of Graded Polarity Actomyosin II Filament Bundles in Migrating Fibroblasts ». *Molecular Biology of the Cell* 19 (11): 5006-18. https://doi.org/10.1091/mbc.e08-01-0034.

Annes, Justin P., Daniel B. Rifkin, et John S. Munger. 2002. « The Integrin AlphaVbeta6 Binds and Activates Latent TGFbeta3 ». *FEBS Letters* 511 (1-3): 65-68. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)03280-x.

Antoniades, H. N., M. A. Bravo, R. E. Avila, T. Galanopoulos, J. Neville-Golden, M. Maxwell, et M. Selman. 1990. « Platelet-Derived Growth Factor in Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *The Journal of Clinical Investigation* 86 (4): 1055-64. https://doi.org/10.1172/JCI114808.

Ari, Arzu. 2015. « Aerosol Therapy in Pulmonary Critical Care ». *Respiratory Care* 60 (6): 858-79. https://doi.org/10.4187/respcare.03790.

Baarlink, Christian, Matthias Plessner, Alice Sherrard, Kohtaro Morita, Shinji Misu, David Virant, Eva-Maria Kleinschnitz, et al. 2017. « A Transient Pool of Nuclear F-Actin at Mitotic Exit Controls Chromatin Organization ». *Nature Cell Biology* 19 (12): 1389-99. https://doi.org/10.1038/ncb3641.

Ballester, Beatriz, Javier Milara, et Julio Cortijo. 2019. « Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Lung Cancer: Mechanisms and Molecular Targets ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (3). https://doi.org/10.3390/ijms20030593.

Barczyk, Malgorzata, Sergio Carracedo, et Donald Gullberg. 2010. « Integrins ». *Cell and Tissue Research* 339 (1): 269-80. https://doi.org/10.1007/s00441-009-0834-6.

Barratt, Shaney L., Sarah Mulholland, Khaled Al Jbour, Henry Steer, Markus Gutsche, Noeleen Foley, Rajiv Srivastava, Charles Sharp, et Huzaifa I. Adamali. 2018. « South-West of England's Experience of the Safety and Tolerability Pirfenidone and Nintedanib for the Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) ». *Frontiers in Pharmacology* 9: 1480. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01480.

Bartolák-Suki, Erzsébet, Jasmin Imsirovic, Yuichiro Nishibori, Ramaswamy Krishnan, et Béla Suki. 2017. « Regulation of Mitochondrial Structure and Dynamics by the Cytoskeleton and Mechanical Factors ». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (8): E1812. https://doi.org/10.3390/ijms18081812.

Bear, James E., et Frank B. Gertler. 2009. « Ena/VASP: Towards Resolving a Pointed Controversy at the Barbed End ». *Journal of Cell Science* 122 (Pt 12): 1947-53. https://doi.org/10.1242/jcs.038125.

Bedossa, Pierre, Sophie Ferlicot, Valérie Paradis, Delphine Dargère, Frank Bonvoust, et Michel Vidaud. 2002. « Dystroglycan Expression in Hepatic Stellate Cells: Role in Liver Fibrosis ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 82 (8): 1053-61.

Belvitch, Patrick, Mary E. Brown, Brittany N. Brinley, Eleftheria Letsiou, Alicia N. Rizzo, Joe G. N. Garcia, et Steven M. Dudek. 2017. « The ARP 2/3 Complex Mediates Endothelial Barrier Function and Recovery ». *Pulmonary Circulation* 7 (1): 200-210. https://doi.org/10.1086/690307.

Benarroch, Eduardo E. 2007. « Rho GTPases: Role in Dendrite and Axonal Growth, Mental Retardation, and Axonal Regeneration ». *Neurology* 68 (16): 1315-18. https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000259588.97409.8f.

Bergsten, E., M. Uutela, X. Li, K. Pietras, A. Ostman, C. H. Heldin, K. Alitalo, et U. Eriksson. 2001. « PDGF-D Is a Specific, Protease-Activated Ligand for the PDGF Beta-Receptor ». *Nature Cell Biology* 3 (5): 512-16. https://doi.org/10.1038/35074588.

Bersini, Simone, Nikki K. Lytle, Roberta Schulte, Ling Huang, Geoffrey M. Wahl, et Martin W. Hetzer. 2020. « Nup93 Regulates Breast Tumor Growth by Modulating Cell Proliferation and Actin Cytoskeleton Remodeling ». *Life Science Alliance* 3 (1). https://doi.org/10.26508/lsa.201900623.

Bettenworth, Dominik, et Florian Rieder. 2017. « Pathogenesis of Intestinal Fibrosis in Inflammatory Bowel Disease and Perspectives for Therapeutic Implication ». *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)* 35 (1-2): 25-31. https://doi.org/10.1159/000449079.

Bishop, A L, et A Hall. 2000. « Rho GTPases and their effector proteins. » *Biochemical Journal* 348 (Pt 2): 241-55.

Blattner, Simone Monika, et Matthias Kretzler. 2005. « Integrin-Linked Kinase in Renal Disease: Connecting Cell-Matrix Interaction to the Cytoskeleton ». *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 14 (4): 404-10. https://doi.org/10.1097/01.mnh.0000172730.67746.5b.

Boer, Rudolf A. de, Gilles De Keulenaer, Johann Bauersachs, Dirk Brutsaert, John G. Cleland, Javier Diez, Xiao-Jun Du, et al. 2019. « Towards Better Definition, Quantification and Treatment of Fibrosis in Heart Failure. A Scientific Roadmap by the Committee of Translational Research of the Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology ». *European Journal of Heart Failure* 21 (3): 272-85. https://doi.org/10.1002/ejhf.1406.

Boiero Sanders, Micaela, Adrien Antkowiak, et Alphée Michelot. 2020. « Diversity from similarity: cellular strategies for assigning particular identities to actin filaments and networks ». *Open Biology* 10 (9): 200157. https://doi.org/10.1098/rsob.200157.

Boilly, B., A. S. Vercoutter-Edouart, H. Hondermarck, V. Nurcombe, et X. Le Bourhis. 2000. « FGF Signals for Cell Proliferation and Migration through Different Pathways ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 11 (4): 295-302. https://doi.org/10.1016/S1359-6101(00)00014-9.

Bolaños, Alfredo Lozano, Criselda Mendoza Milla, José Cisneros Lira, Remedios Ramírez, Marco Checa, Lourdes Barrera, Jorge García-Alvarez, et al. 2012. « Role of Sonic Hedgehog in idiopathic pulmonary fibrosis ». *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 303 (11): L978-90. https://doi.org/10.1152/ajplung.00184.2012.

Bonniaud, Philippe, Peter J. Margetts, Martin Kolb, Thomas Haberberger, Margaret Kelly, Jennifer Robertson, et Jack Gauldie. 2003. « Adenoviral Gene Transfer of Connective Tissue Growth Factor in the Lung Induces Transient Fibrosis ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 168 (7): 770-78. https://doi.org/10.1164/rccm.200210-1254OC.

Bos, Simon, et Debby Laukens. 2020. « Metabolic Modulation during Intestinal Fibrosis ». *Journal of Digestive Diseases* 21 (6): 319-25. https://doi.org/10.1111/1751-2980.12882.

Brenner, Sibylle, Florian Berger, Lu Rao, Matthew P. Nicholas, et Arne Gennerich. 2020. « Force Production of Human Cytoplasmic Dynein Is Limited by Its Processivity ». *Science Advances* 6 (15): eaaz4295. https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz4295.

Breuss, J. M., N. Gillett, L. Lu, D. Sheppard, et R. Pytela. 1993. « Restricted Distribution of Integrin Beta 6 MRNA in Primate Epithelial Tissues ». *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 41 (10): 1521-27. https://doi.org/10.1177/41.10.8245410.

Caam, A. van, J. Aarts, T. van Ee, E. Vitters, M. Koenders, F. van de Loo, P. van Lent, et al. 2020. « TGFβ-mediated expression of TGFβ-activating integrins in SSc monocytes: disturbed activation of latent TGFβ? » *Arthritis Research & Therapy* 22. https://doi.org/10.1186/s13075-020-2130-5.

Cai, Guo-Qiang, Chu-Fang Chou, Meng Hu, Anni Zheng, Louis F. Reichardt, Jun-Lin Guan, Haotian Fang, et al. 2012. « Neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (N-WASP) Is Critical for Formation of α-Smooth Muscle Actin Filaments during Myofibroblast Differentiation ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 303 (8): L692-702. https://doi.org/10.1152/ajplung.00390.2011.

Calderwood, D. A., R. Zent, R. Grant, D. J. Rees, R. O. Hynes, et M. H. Ginsberg. 1999. « The Talin Head Domain Binds to Integrin Beta Subunit Cytoplasmic Tails and Regulates Integrin Activation ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (40): 28071-74. https://doi.org/10.1074/jbc.274.40.28071.

Cao, He, Jing Zhao, Zhen Chen, Wenjia Sun, Kexin Ruan, Jianya Zhou, et Jianying Zhou. 2021. « Loss of LIMCH1 predicts poor prognosis in patients with surgically resected Lung Adenocarcinoma: A study based on Immunohistochemical Analysis and Bioinformatics ». *Journal of Cancer* 12 (1): 181-89. https://doi.org/10.7150/jca.47883.

Case, Lindsay B., et Clare M. Waterman. 2015. « Integration of Actin Dynamics and Cell Adhesion by a Three-Dimensional, Mechanosensitive Molecular Clutch ». *Nature Cell Biology* 17 (8): 955-63. https://doi.org/10.1038/ncb3191.

Cerutti, Camilla, et Anne J. Ridley. 2017. « Endothelial cell-cell adhesion and signaling ». *Experimental Cell Research* 358 (1): 31-38. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.06.003.

Charbonney, Emmanuel, Pam Speight, András Masszi, Hiroyasu Nakano, et András Kapus. 2011. « β-Catenin and Smad3 Regulate the Activity and Stability of Myocardin-Related Transcription Factor during Epithelial-Myofibroblast Transition ». *Molecular Biology of the Cell* 22 (23): 4472-85. https://doi.org/10.1091/mbc.E11-04-0335.

Chen, Hui, Dilshad M. Choudhury, et Susan W. Craig. 2006. « Coincidence of Actin Filaments and Talin Is Required to Activate Vinculin ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (52): 40389-98. https://doi.org/10.1074/jbc.M607324200.

Chen, Yahong, Mingwu Zhao, Mingui Fu, Wanzhen Yao, et Chaoshu Tang. 2003. « The Role of Calcineurin in the Lung Fibroblasts Proliferation and Collagen Synthesis Induced by Basic Fibroblast Growth Factor ». *Chinese Medical Journal* 116 (6): 857-62.

Choi, Hee-Jung, Andrew H. Huber, et William I. Weis. 2006. « Thermodynamics of Beta-Catenin-Ligand Interactions: The Roles of the N- and C-Terminal Tails in Modulating Binding Affinity ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (2): 1027-38. https://doi.org/10.1074/jbc.M511338200.

Christensen, Jenna R., Glen M. Hocky, Kaitlin E. Homa, Alisha N. Morganthaler, Sarah E. Hitchcock-DeGregori, Gregory A. Voth, et David R. Kovar. 2017. « Competition between Tropomyosin, Fimbrin, and ADF/Cofilin Drives Their Sorting to Distinct Actin Filament Networks ». *ELife* 6 (mars): e23152. https://doi.org/10.7554/eLife.23152.

Chunguo, Jiang, Huang Hui, Liu Jia, Wang Yanxun, Zhao Yuyue, et Xu Zuojun. 2014. « Effects of fasudil on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice and on the biological behaviors in NIH3T3 mouse fibroblast cell line ». *Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases* 37 (9): 671-76. https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2014.09.010.

Churg, Andrew, AnaMaria Bilawich, et Joanne L. Wright. 2018. « Pathology of Chronic Hypersensitivity Pneumonitis What Is It? What Are the Diagnostic Criteria? Why Do We Care? » *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 142 (1): 109-19. https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0173-RA.

Cigna, Natacha, Elika Farrokhi Moshai, Stéphanie Brayer, Joëlle Marchal-Somme, Lidwine Wémeau-Stervinou, Aurélie Fabre, Hervé Mal, et al. 2012. « The Hedgehog System Machinery Controls Transforming Growth Factor-β–Dependent Myofibroblastic Differentiation in Humans: Involvement in Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *The American Journal of Pathology* 181 (6): 2126-37. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.08.019.

Cohen, Jonathan, Shaul Raviv, Orit Adir, Krishnanand Padmanabhan, Arad Soffer, et Chen Luxenburg. 2019. « The Wave Complex Controls Epidermal Morphogenesis and Proliferation by Suppressing Wnt-Sox9 Signaling ». *The Journal of Cell Biology* 218 (4): 1390-1406. https://doi.org/10.1083/jcb.201807216.

Colin-York, Huw, Dong Li, Kseniya Korobchevskaya, Veronica T. Chang, Eric Betzig, Christian Eggeling, et Marco Fritzsche. 2019. « Cytoskeletal Actin Patterns Shape Mast Cell Activation ». *Communications Biology* 2: 93. https://doi.org/10.1038/s42003-019-0322-9.

Conery, Andrew R., Yanna Cao, E. Aubrey Thompson, Courtney M. Townsend, Tien C. Ko, et Kunxin Luo. 2004. « Akt Interacts Directly with Smad3 to Regulate the Sensitivity to TGF-Beta Induced Apoptosis ». *Nature Cell Biology* 6 (4): 366-72. https://doi.org/10.1038/ncb1117.
Cooper, Lee Ann, Tang-Long Shen, et Jun-Lin Guan. 2003. « Regulation of Focal Adhesion Kinase by Its Amino-Terminal Domain through an Autoinhibitory Interaction ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (22): 8030-41. https://doi.org/10.1128/MCB.23.22.8030-8041.2003.

Dang, Irene, Roman Gorelik, Carla Sousa-Blin, Emmanuel Derivery, Christophe Guérin, Joern Linkner, Maria Nemethova, et al. 2013. « Inhibitory Signalling to the Arp2/3 Complex Steers Cell Migration ». *Nature* 503 (7475): 281-84. https://doi.org/10.1038/nature12611.

Dawid, I. B., J. J. Breen, et R. Toyama. 1998. « LIM Domains: Multiple Roles as Adapters and Functional Modifiers in Protein Interactions ». *Trends in Genetics: TIG* 14 (4): 156-62. https://doi.org/10.1016/s0168-9525(98)01424-3.

Deng, Su, Ingo Bothe, et Mary K. Baylies. 2015. « The Formin Diaphanous Regulates Myoblast Fusion through Actin Polymerization and Arp2/3 Regulation ». *PLoS Genetics* 11 (8): e1005381. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005381.

Dominguez, Roberto, et Kenneth C. Holmes. 2011. « Actin Structure and Function ». *Annual Review of Biophysics* 40: 169-86. https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-042910-155359.

Dopie, Joseph, Kari-Pekka Skarp, Eeva Kaisa Rajakylä, Kimmo Tanhuanpää, et Maria K. Vartiainen. 2012. « Active Maintenance of Nuclear Actin by Importin 9 Supports Transcription ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (9): E544-552. https://doi.org/10.1073/pnas.1118880109.

Drees, Frauke, Sabine Pokutta, Soichiro Yamada, W. James Nelson, et William I. Weis. 2005. « Alpha-Catenin Is a Molecular Switch That Binds E-Cadherin-Beta-Catenin and Regulates Actin-Filament Assembly ». *Cell* 123 (5): 903-15. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.021.

Dugina, Vera, Galina Shagieva, Natalya Khromova, et Pavel Kopnin. 2018. « Divergent Impact of Actin Isoforms on Cell Cycle Regulation ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 17 (23): 2610-21. https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1553337.

Dupont, Sirio. 2016. « Role of YAP/TAZ in Cell-Matrix Adhesion-Mediated Signalling and Mechanotransduction ». *Experimental Cell Research* 343 (1): 42-53. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.10.034.

Dupont, Sirio, Leonardo Morsut, Mariaceleste Aragona, Elena Enzo, Stefano Giulitti, Michelangelo Cordenonsi, Francesca Zanconato, et al. 2011. « Role of YAP/TAZ in Mechanotransduction ». *Nature* 474 (7350): 179-83. https://doi.org/10.1038/nature10137.

Eden, Sharon, Rajat Rohatgi, Alexandre V. Podtelejnikov, Matthias Mann, et Marc W. Kirschner. 2002. « Mechanism of Regulation of WAVE1-Induced Actin Nucleation by Rac1 and Nck ». *Nature* 418 (6899): 790-93. https://doi.org/10.1038/nature00859.

Efimova, Nadia, et Tatyana M. Svitkina. 2018. « Branched actin networks push against each other at adherens junctions to maintain cell–cell adhesion ». *The Journal of Cell Biology* 217 (5): 1827-45. https://doi.org/10.1083/jcb.201708103.

Elosegui-Artola, Alberto, Ion Andreu, Amy E. M. Beedle, Ainhoa Lezamiz, Marina Uroz, Anita J. Kosmalska, Roger Oria, et al. 2017. « Force Triggers YAP Nuclear Entry by Regulating Transport across Nuclear Pores ». *Cell* 171 (6): 1397-1410.e14. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.008.

Fanning, A. S., B. J. Jameson, L. A. Jesaitis, et J. M. Anderson. 1998. « The Tight Junction Protein ZO-1 Establishes a Link between the Transmembrane Protein Occludin and the Actin Cytoskeleton ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (45): 29745-53. https://doi.org/10.1074/jbc.273.45.29745.

Farhadi, Leila, Shea N. Ricketts, Michael J. Rust, Moumita Das, Rae M. Robertson-Anderson, et Jennifer L. Ross. 2020. « Actin and Microtubule Crosslinkers Tune Mobility and Control Co-Localization in a Composite Cytoskeletal Network ». *Soft Matter*, mars. https://doi.org/10.1039/c9sm02400j.

Feldmann, Daniel P., Joshua Heyza, Christoph M. Zimmermann, Steve M. Patrick, et Olivia M. Merkel. 2020. « Nanoparticle-Mediated Gene Silencing for Sensitization of Lung Cancer to Cisplatin Therapy ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 25 (8): E1994. https://doi.org/10.3390/molecules25081994.

Fernández-Barrera, Jaime, et Miguel A. Alonso. 2018. « Coordination of Microtubule Acetylation and the Actin Cytoskeleton by Formins ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 75 (17): 3181-91. https://doi.org/10.1007/s00018-018-2855-3.

Fernández-Barrera, Jaime, Miguel Bernabé-Rubio, Javier Casares-Arias, Laura Rangel, Laura Fernández-Martín, Isabel Correas, et Miguel A. Alonso. 2018. « The actin-MRTF-SRF transcriptional circuit controls tubulin acetylation via α-TAT1 gene expression ». *The Journal of Cell Biology* 217 (3): 929-44. https://doi.org/10.1083/jcb.201702157.

Freeman, Spencer A., et Sergio Grinstein. 2014. « Phagocytosis: Receptors, Signal Integration, and the Cytoskeleton ». *Immunological Reviews* 262 (1): 193-215. https://doi.org/10.1111/imr.12212.

Friedberg, Felix, et Francisco Rivero. 2010. « Single and Multiple CH (Calponin Homology) Domain Containing Multidomain Proteins in Dictyostelium Discoideum: An Inventory ». *Molecular Biology Reports* 37 (6): 2853-62. https://doi.org/10.1007/s11033-009-9839-1.

Froese, Aaron R., Chiko Shimbori, Pierre-Simon Bellaye, Mark Inman, Steffen Obex, Safoora Fatima, Gisli Jenkins, Jack Gauldie, Kjetil Ask, et Martin Kolb. 2016. « Stretch-Induced Activation of Transforming Growth Factor-B1 in Pulmonary Fibrosis ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 194 (1): 84-96. https://doi.org/10.1164/rccm.201508-1638OC.

Funaba, Masayuki, Cole M. Zimmerman, et Lawrence S. Mathews. 2002. « Modulation of Smad2-Mediated Signaling by Extracellular Signal-Regulated Kinase ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (44): 41361-68. https://doi.org/10.1074/jbc.M204597200.

Galbraith, Catherine G., Kenneth M. Yamada, et Michael P. Sheetz. 2002. « The Relationship between Force and Focal Complex Development ». *The Journal of Cell Biology* 159 (4): 695-705. https://doi.org/10.1083/jcb.200204153.

Galie, Peter A., Margaret V. Westfall, et Jan P. Stegemann. 2011. « Reduced serum content and increased matrix stiffness promote the cardiac myofibroblast transition in 3D collagen matrices. » *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 20 (6): 325-33. https://doi.org/10.1016/j.carpath.2010.10.001.

Gandhi, Meghal, Mohini Jangi, et Bruce L. Goode. 2010. « Functional Surfaces on the Actin-binding Protein Coronin Revealed by Systematic Mutagenesis ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (45): 34899-908. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.171496.

Garbuzenko, Olga B., Maha Saad, Seema Betigeri, Min Zhang, Alexandre A. Vetcher, Viatcheslav A. Soldatenkov, David C. Reimer, Vitaly P. Pozharov, et Tamara Minko. 2009. « Intratracheal versus Intravenous Liposomal Delivery of SiRNA, Antisense Oligonucleotides and Anticancer Drug ». *Pharmaceutical Research* 26 (2): 382-94. https://doi.org/10.1007/s11095-008-9755-4.

Garcia, Miguel A., W. James Nelson, et Natalie Chavez. 2018. « Cell-Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10 (4). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029181.

Gau, David, et Partha Roy. 2018. « SRF'ing and SAP'ing – the Role of MRTF Proteins in Cell Migration ». *Journal of Cell Science* 131 (19). https://doi.org/10.1242/jcs.218222.

Ge, Hua, Chaojie Liang, Zhixia Li, Dali An, Shulin Ren, Chaosen Yue, et Jixiang Wu. 2018. « DcR3 induces proliferation, migration, invasion, and EMT in gastric cancer cells via the PI3K/AKT/GSK-3β/β-catenin signaling pathway ». *OncoTargets and therapy* 11 (juillet): 4177-87. https://doi.org/10.2147/OTT.S172713.

Gelse, K., E. Pöschl, et T. Aigner. 2003. « Collagens--Structure, Function, and Biosynthesis ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 55 (12): 1531-46. https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.002.

Gimona, M., et R. Mital. 1998. « The Single CH Domain of Calponin Is Neither Sufficient nor Necessary for F-Actin Binding ». *Journal of Cell Science* 111 (Pt 13) (juillet): 1813-21.

Goffin, Jérôme M., Philippe Pittet, Gabor Csucs, Jost W. Lussi, Jean-Jacques Meister, et Boris Hinz. 2006. « Focal Adhesion Size Controls Tension-Dependent Recruitment of Alpha-Smooth Muscle Actin to Stress Fibers ». *The Journal of Cell Biology* 172 (2): 259-68. https://doi.org/10.1083/jcb.200506179.

Gohla, Antje, Jörg Birkenfeld, et Gary M. Bokoch. 2005. « Chronophin, a Novel HAD-Type Serine Protein Phosphatase, Regulates Cofilin-Dependent Actin Dynamics ». *Nature Cell Biology* 7 (1): 21-29. https://doi.org/10.1038/ncb1201.

Goldmann, Wolfgang H. 2018. « Intermediate Filaments and Cellular Mechanics ». *Cell Biology International* 42 (2): 132-38. https://doi.org/10.1002/cbin.10879.

Goulet, Cassandra Ringuette, Audrey Champagne, Geneviève Bernard, Dominique Vandal, Stéphane Chabaud, Frédéric Pouliot, et Stéphane Bolduc. 2019. « Cancer-Associated Fibroblasts Induce Epithelial-Mesenchymal Transition of Bladder Cancer Cells through Paracrine IL-6 Signalling ». *BMC Cancer* 19 (1): 137. https://doi.org/10.1186/s12885-019-5353-6.

Gourlay, Campbell W., Lindsay N. Carpp, Paul Timpson, Steven J. Winder, et Kathryn R. Ayscough. 2004. « A Role for the Actin Cytoskeleton in Cell Death and Aging in Yeast ». *The Journal of Cell Biology* 164 (6): 803-9. https://doi.org/10.1083/jcb.200310148.

Green, Hannah L. H., Malou Zuidscherwoude, Fawaz Alenazy, Christopher W. Smith, Markus Bender, et Steven G. Thomas. 2020. « SMIFH2 Inhibition of Platelets Demonstrates a Critical Role for Formin Proteins in Platelet Cytoskeletal Dynamics ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 18 (4): 955-67. https://doi.org/10.1111/jth.14735.

Greenberg, Roseanne S., Audrey M. Bernstein, Miriam Benezra, Irwin H. Gelman, Lavinia Taliana, et Sandra K. Masur. 2006. « FAK-Dependent Regulation of Myofibroblast Differentiation ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20 (7): 1006-8. https://doi.org/10.1096/fj.05-4838fje.

Guo, Y., L. Xiao, L. Sun, et F. Liu. 2012. « Wnt/Beta-Catenin Signaling: A Promising New Target for Fibrosis Diseases ». *Physiological Research* 61 (4): 337-46. https://doi.org/10.33549/physiolres.932289.

Gupton, Stephanie L., et Clare M. Waterman-Storer. 2006. « Spatiotemporal Feedback between Actomyosin and Focal-Adhesion Systems Optimizes Rapid Cell Migration ». *Cell* 125 (7): 1361-74. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.029.

Habiel, David M., et Cory M. Hogaboam. 2017. « Heterogeneity of Fibroblasts and Myofibroblasts in Pulmonary Fibrosis ». *Current Pathobiology Reports* 5 (2): 101-10. https://doi.org/10.1007/s40139-017-0134-x.

Hagedorn, Peter H., Robert Persson, Erik D. Funder, Nanna Albæk, Sanna L. Diemer, Dennis J. Hansen, Marianne R. Møller, et al. 2018. « Locked Nucleic Acid: Modality, Diversity, and Drug Discovery ». *Drug Discovery Today* 23 (1): 101-14. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.09.018.

Hanmandlu, Ankit, Lisha Zhu, Tinne Cj Mertens, Scott Collum, Weizhen Bi, Feng Xiong, Ruoyu Wang, et al. 2021. « Transcriptomic and Epigenetic Profiling of Fibroblasts in Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, août. https://doi.org/10.1165/rcmb.2020-0437OC.

Hao, Qingya, Lihua Gao, Wenyang Niu, Liang Chen, Peng Zhang, et Zhong Chen. 2020. « POTEE Stimulates the Proliferation of Pancreatic Cancer by Activating the PI3K/Akt/GSK-3β/β-Catenin Signaling ». *BioFactors (Oxford, England)* 46 (4): 685-92. https://doi.org/10.1002/biof.1640.

Haston, C. K., T. G. Tomko, N. Godin, L. Kerckhoff, et M. T. Hallett. 2005. « Murine Candidate Bleomycin Induced Pulmonary Fibrosis Susceptibility Genes Identified by Gene Expression and Sequence Analysis of Linkage Regions ». *Journal of Medical Genetics* 42 (6): 464-73. https://doi.org/10.1136/jmg.2004.027938.

He, Lingfeng, Libo Luo, Hong Zhu, Huan Yang, Yilan Zhang, Huan Wu, Hongfang Sun, et al. 2017. « FEN1 Promotes Tumor Progression and Confers Cisplatin Resistance in Non-Small-Cell Lung Cancer ». *Molecular Oncology* 11 (6): 640-54. https://doi.org/10.1002/1878-0261.12058.

Heissler, Sarah M., et James R. Sellers. 2016. « Various Themes of Myosin Regulation ». *Journal of Molecular Biology* 428 (9 Pt B): 1927-46. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.01.022.

Helgeson, Luke A, et Brad J Nolen. 2013. « Mechanism of synergistic activation of Arp2/3 complex by cortactin and N-WASP ». Édité par Wesley Sundquist. *eLife* 2 (septembre): e00884. https://doi.org/10.7554/eLife.00884.

Henderson, Neil C., et Dean Sheppard. 2013. « Integrin-Mediated Regulation of TGFβ in Fibrosis ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1832 (7): 891-96. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.10.005.

Henderson, William R., Emil Y. Chi, Xin Ye, Cu Nguyen, Ying-tzang Tien, Beiyun Zhou, Zea Borok, Darryl A. Knight, et Michael Kahn. 2010. « Inhibition of Wnt/Beta-Catenin/CREB Binding Protein (CBP) Signaling Reverses Pulmonary Fibrosis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (32): 14309-14. https://doi.org/10.1073/pnas.1001520107.

Heng, Yi-Wen, et Cheng-Gee Koh. 2010. « Actin Cytoskeleton Dynamics and the Cell Division Cycle ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42 (10): 1622-33. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.04.007.

Herrmann, Harald, et Ueli Aebi. 2016. « Intermediate Filaments: Structure and Assembly ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8 (11). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018242.

Hinz, Boris, Sem H. Phan, Victor J. Thannickal, Andrea Galli, Marie-Luce Bochaton-Piallat, et Giulio Gabbiani. 2007. « The Myofibroblast: One Function, Multiple Origins ». *The American Journal of Pathology* 170 (6): 1807-16. https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070112.

Hinz, Boris, Sem H. Phan, Victor J. Thannickal, Marco Prunotto, Alexis Desmoulière, John Varga, Olivier De Wever, Marc Mareel, et Giulio Gabbiani. 2012. « Recent Developments in Myofibroblast Biology: Paradigms for Connective Tissue Remodeling ». *The American Journal of Pathology* 180 (4): 1340-55. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.02.004.

Horwitz, A., K. Duggan, C. Buck, M. C. Beckerle, et K. Burridge. 1986. « Interaction of Plasma Membrane Fibronectin Receptor with Talin--a Transmembrane Linkage ». *Nature* 320 (6062): 531-33. https://doi.org/10.1038/320531a0.

Hostettler, Katrin E., Jun Zhong, Eleni Papakonstantinou, George Karakiulakis, Michael Tamm, Petra Seidel, Qingzhu Sun, et al. 2014. « Anti-Fibrotic Effects of Nintedanib in Lung Fibroblasts Derived from Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *Respiratory Research* 15 (décembre): 157. https://doi.org/10.1186/s12931-014-0157-3.

Hou, Wei, et Wing-Kin Syn. 2018. « Role of Metabolism in Hepatic Stellate Cell Activation and Fibrogenesis ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6 (novembre). https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00150.

Houy, Sébastien, Gaël Nicolas, Fanny Momboisse, Magali Malacombe, Marie-France Bader, Nicolas Vitale, Marie-Christine Lecomte, Stéphane Ory, et Stéphane Gasman. 2020. « AII-Spectrin Controls Calcium-Regulated Exocytosis in Neuroendocrine Chromaffin Cells through Neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Interaction ». *IUBMB Life* 72 (4): 544-52. https://doi.org/10.1002/iub.2217.

Huang, H., Y. X. Sun, S. Li, C. Shao, K. Xu, et Z. J. Xu. 2019. « [The clinical experience of pirfenidone based on corticosteroids and immunosuppressant treatment for interstitial pneumonia with autoimmune features] ». *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi = Zhonghua Jiehe He Huxi Zazhi = Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases* 42 (9): 700-704. https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2019.09.009.

Huang, X. Z., J. F. Wu, D. Cass, D. J. Erle, D. Corry, S. G. Young, R. V. Farese, et D. Sheppard. 1996. « Inactivation of the Integrin Beta 6 Subunit Gene Reveals a Role of Epithelial Integrins in Regulating Inflammation in the Lung and Skin ». *The Journal of Cell Biology* 133 (4): 921-28. https://doi.org/10.1083/jcb.133.4.921.

Huang, Xiangwei, Naiheng Yang, Vincent F. Fiore, Thomas H. Barker, Yi Sun, Stephan W. Morris, Qiang Ding, Victor J. Thannickal, et Yong Zhou. 2012. « Matrix Stiffness-Induced Myofibroblast Differentiation Is Mediated by Intrinsic Mechanotransduction ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 47 (3): 340-48. https://doi.org/10.1165/rcmb.2012-0050OC.

Huang, Yu, Xin Deng, et Jian Liang. 2017. « Modulation of Hepatic Stellate Cells and Reversibility of Hepatic Fibrosis ». *Experimental Cell Research* 352 (2): 420-26. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.02.038.

Hünerwadel, A., S. Fagagnini, G. Rogler, C. Lutz, S. U. Jaeger, C. Mamie, B. Weder, P. A. Ruiz, et M. Hausmann. 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, Ruei-Jiun, et Jonathan R. Terman. 2011. « Extracellular Inhibitors, Repellents, and Semaphorin/Plexin/MICAL-Mediated Actin Filament Disassembly ». *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 68 (8): 415-33. https://doi.org/10.1002/cm.20527.

Hynes, Richard O. 2002. « Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines ». *Cell* 110 (6): 673-87. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00971-6.

Innocenti, Metello, Adriana Zucconi, Andrea Disanza, Emanuela Frittoli, Liliana B. Areces, Anika Steffen, Theresia E. B. Stradal, Pier Paolo Di Fiore, Marie-France Carlier, et Giorgio Scita. 2004. « Abi1 Is Essential for the Formation and Activation of a WAVE2 Signalling Complex ». *Nature Cell Biology* 6 (4): 319-27. https://doi.org/10.1038/ncb1105.

Itoh, Susumu, Midory Thorikay, Marcin Kowanetz, Aristidis Moustakas, Fumiko Itoh, Carl-Henrik Heldin, et Peter ten Dijke. 2003. « Elucidation of Smad Requirement in Transforming Growth Factor-β Type I Receptor-Induced Responses ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (6): 3751-61. https://doi.org/10.1074/jbc.M208258200.

Iyer, Anand Krishnan V., Vani Ramesh, Carlos A. Castro, Vivek Kaushik, Yogesh M. Kulkarni, Clayton A. Wright, Rajkumar Venkatadri, Yon Rojanasakul, et Neelam Azad. 2015. « Nitric Oxide Mediates Bleomycin-Induced Angiogenesis and Pulmonary Fibrosis via Regulation of VEGF ». *Journal of Cellular Biochemistry* 116 (11): 2484-93. https://doi.org/10.1002/jcb.25192.

Iyer, S. N., G. Gurujeyalakshmi, et S. N. Giri. 1999. « Effects of Pirfenidone on Transforming Growth Factor-Beta Gene Expression at the Transcriptional Level in Bleomycin Hamster Model of Lung Fibrosis ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 291 (1): 367-73.

Jiang, Chunguo, Hui Huang, Jia Liu, Yanxun Wang, Zhiwei Lu, et Zuojun Xu. 2012. « Fasudil, a Rho-Kinase Inhibitor, Attenuates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice ». *International Journal of Molecular Sciences* 13 (7): 8293-8307. https://doi.org/10.3390/ijms13078293.

Jing, Huan, Simin Tang, Sen Lin, Meijuan Liao, Hongtao Chen, Youling Fan, et Jun Zhou. 2020. « Adiponectin in Renal Fibrosis ». *Aging* 12 (5): 4660-72. https://doi.org/10.18632/aging.102811.

Jiu, Yaming, Johan Peränen, Niccole Schaible, Fang Cheng, John E. Eriksson, Ramaswamy Krishnan, et Pekka Lappalainen. 2017. « Vimentin intermediate filaments control actin stress fiber assembly through GEF-H1 and RhoA ». *Journal of Cell Science* 130 (5): 892-902. https://doi.org/10.1242/jcs.196881.

Jones, Matthew C., Junzhe Zha, et Martin J. Humphries. 2019. « Connections between the cell cycle, cell adhesion and the cytoskeleton ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 374 (1779). https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0227.

Kagan, Herbert M., et Wande Li. 2003. « Lysyl Oxidase: Properties, Specificity, and Biological Roles inside and Outside of the Cell ». *Journal of Cellular Biochemistry* 88 (4): 660-72. https://doi.org/10.1002/jcb.10413.

Kage, Frieda, Anika Steffen, Adolf Ellinger, Carmen Ranftler, Christian Gehre, Cord Brakebusch, Margit Pavelka, Theresia Stradal, et Klemens Rottner. 2017. « FMNL2 and -3 Regulate Golgi Architecture and Anterograde Transport Downstream of Cdc42 ». *Scientific Reports* 7 (1): 9791. https://doi.org/10.1038/s41598-017-09952-1.

Kahr, Walter H. A., Fred G. Pluthero, Abdul Elkadri, Neil Warner, Marko Drobac, Chang Hua Chen, Richard W. Lo, et al. 2017. « Loss of the Arp2/3 complex component ARPC1B causes platelet abnormalities and predisposes to inflammatory disease ». *Nature Communications* 8 (avril). https://doi.org/10.1038/ncomms14816.

Kaminski, N., J. D. Allard, J. F. Pittet, F. Zuo, M. J. Griffiths, D. Morris, X. Huang, D. Sheppard, et R. A. Heller. 2000. « Global Analysis of Gene Expression in Pulmonary Fibrosis Reveals Distinct Programs Regulating Lung Inflammation and Fibrosis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (4): 1778-83. https://doi.org/10.1073/pnas.97.4.1778.

Kammen, Rob van der, Ji-Ying Song, Iris de Rink, Hans Janssen, Stefania Madonna, Claudia Scarponi, Cristina Albanesi, Wim Brugman, et Metello Innocenti. 2017. « Knockout of the Arp2/3 complex in epidermis causes a psoriasis-like disease hallmarked by hyperactivation of transcription factor Nrf2 ». *Development* 144 (24): 4588-4603. https://doi.org/10.1242/dev.156323.

Kanchanawong, Pakorn, Gleb Shtengel, Ana M. Pasapera, Ericka B. Ramko, Michael W. Davidson, Harald F. Hess, et Clare M. Waterman. 2010. « Nanoscale Architecture of Integrin-Based Cell Adhesions ». *Nature* 468 (7323): 580-84. https://doi.org/10.1038/nature09621.

Kanellos, Georgios, et Margaret C. Frame. 2016. « Cellular Functions of the ADF/Cofilin Family at a Glance ». *Journal of Cell Science* 129 (17): 3211-18. https://doi.org/10.1242/jcs.187849.

Kang, Seounghun, Jun Kim, Minchul Ahn, Jungho Kim, Myeong-Gang Heo, Dal-Hee Min, et Cheolhee Won. 2020. « RNAi Nanotherapy for Fibrosis: Highly Durable Knockdown of CTGF/CCN-2 Using SiRNA-DegradaBALL (LEM-S401) to Treat Skin Fibrotic Diseases ». *Nanoscale* 12 (11): 6385-93. https://doi.org/10.1039/c9nr10305h.

Karvar, Serhan, Ephraim A. Ansa-Addo, Jo Suda, Shweta Singh, Lixin Zhu, Zihai Li, et Don C. Rockey. 2019. « Moesin, an ERM Family Member, Regulates Hepatic Fibrosis ». *Hepatology (Baltimore, Md.)*, décembre. https://doi.org/10.1002/hep.31078.

Karvonen, Henna M., Siri T. Lehtonen, Raija T. Sormunen, Terttu H. Harju, Elisa Lappi-Blanco, Risto S. Bloigu, et Riitta L. Kaarteenaho. 2012. « Myofibroblasts in Interstitial Lung Diseases Show Diverse Electron Microscopic and Invasive Features ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 92 (9): 1270-84. https://doi.org/10.1038/labinvest.2012.95.

Kim, Do Kyeong, Eun Kyoung Kim, Da-Woon Jung, et Jin Kim. 2019. « Cytoskeletal Alteration Modulates Cancer Cell Invasion through RhoA-YAP Signaling in Stromal Fibroblasts ». *PloS One* 14 (3): e0214553. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214553.

Kim, Sun Woong, Hye-In Kim, Bikash Thapa, Selikem Nuwromegbe, et Keunwook Lee. 2019. « Critical Role of MTORC2-Akt Signaling in TGF-B1-Induced Myofibroblast Differentiation of Human Pterygium Fibroblasts ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 60 (1): 82-92. https://doi.org/10.1167/iovs.18-25376.

Kim, Wha Young, Wen Ting Cai, Ju Kyong Jang, et Jeong-Hoon Kim. 2020. « Ezrin-Radixin-Moesin Proteins Are Regulated by Akt-GSK3β Signaling in the Rat Nucleus Accumbens Core ». *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology: Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 24 (1): 121-26. https://doi.org/10.4196/kjpp.2020.24.1.121.

Kim, Woosook, David A. Barron, Rebeca San Martin, Keith S. Chan, Linda L. Tran, Feng Yang, Steven J. Ressler, et David R. Rowley. 2014. « RUNX1 Is Essential for Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Myofibroblast Differentiation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (46): 16389-94. https://doi.org/10.1073/pnas.1407097111.

Kimura, K., M. Ito, M. Amano, K. Chihara, Y. Fukata, M. Nakafuku, B. Yamamori, et al. 1996. « Regulation of Myosin Phosphatase by Rho and Rho-Associated Kinase (Rho-Kinase) ». *Science (New York, N.Y.)* 273 (5272): 245-48. https://doi.org/10.1126/science.273.5272.245.

Kinley, Andrew W., Scott A. Weed, Alissa M. Weaver, Andrei V. Karginov, Eric Bissonette, John A. Cooper, et J. Thomas Parsons. 2003. « Cortactin Interacts with WIP in Regulating Arp2/3 Activation and Membrane Protrusion ». *Current Biology* 13 (5): 384-93. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00107-6.

Kinoshita, Katsuhiro, Yoshinori Aono, Momoyo Azuma, Jun Kishi, Akio Takezaki, Masami Kishi, Hideki Makino, et al. 2013. « Antifibrotic Effects of Focal Adhesion Kinase Inhibitor in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 49 (4): 536-43. https://doi.org/10.1165/rcmb.2012-0277OC.

Knight, C. G., L. F. Morton, A. R. Peachey, D. S. Tuckwell, R. W. Farndale, et M. J. Barnes. 2000. « The Collagen-Binding A-Domains of Integrins Alpha(1)Beta(1) and Alpha(2)Beta(1) Recognize the Same Specific Amino Acid Sequence, GFOGER, in Native (Triple-Helical) Collagens ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (1): 35-40. https://doi.org/10.1074/jbc.275.1.35.

Knipe, Rachel S., Andrew M. Tager, et James K. Liao. 2015. « The Rho Kinases: Critical Mediators of Multiple Profibrotic Processes and Rational Targets for New Therapies for Pulmonary Fibrosis ». *Pharmacological Reviews* 67 (1): 103-17. https://doi.org/10.1124/pr.114.009381.

Koch, Sina, et Lena Claesson-Welsh. 2012. « Signal Transduction by Vascular Endothelial Growth Factor Receptors ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (7): a006502. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006502.

Koch, Sina, Sònia Tugues, Xiujuan Li, Laura Gualandi, et Lena Claesson-Welsh. 2011. « Signal Transduction by Vascular Endothelial Growth Factor Receptors ». *The Biochemical Journal* 437 (2): 169-83. https://doi.org/10.1042/BJ20110301.

Kotila, Tommi, Konstantin Kogan, Giray Enkavi, Siyang Guo, Ilpo Vattulainen, Bruce L. Goode, et Pekka Lappalainen. 2018. « Structural Basis of Actin Monomer Re-Charging by Cyclase-Associated Protein ». *Nature Communications* 9 (1): 1892. https://doi.org/10.1038/s41467-018-04231-7.

Kumar, Narendra, Peilin Zhao, Alok Tomar, Charles A. Galea, et Seema Khurana. 2004. « Association of Villin with Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Regulates the Actin Cytoskeleton ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (4): 3096-3110. https://doi.org/10.1074/jbc.M308878200.

Kumar, Saroj, et Alf Mansson. 2017. « Covalent and Non-Covalent Chemical Engineering of Actin for Biotechnological Applications ». *Biotechnology Advances* 35 (7): 867-88. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.08.002.

Kunda, Patricia, Gavin Craig, Veronica Dominguez, et Buzz Baum. 2003. « Abi, Sra1, and Kette Control the Stability and Localization of SCAR/WAVE to Regulate the Formation of Actin-Based Protrusions ». *Current Biology: CB* 13 (21): 1867-75. https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.10.005.

Kunitomi, Haruko, Yoshinao Oki, Nobuyuki Onishi, Koichiro Kano, Kouji Banno, Daisuke Aoki, Hideyuki Saya, et Hiroyuki Nobusue. 2020. « The Insulin-PI3K-Rac1 Axis Contributes to Terminal Adipocyte Differentiation through Regulation of Actin Cytoskeleton Dynamics ». *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 25 (3): 165-74. https://doi.org/10.1111/gtc.12747.

Kurisu, Shusaku, et Tadaomi Takenawa. 2009. « The WASP and WAVE family proteins ». *Genome Biology* 10 (6): 226. https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-6-226.

Kurreck, Jens, Eliza Wyszko, Clemens Gillen, et Volker A. Erdmann. 2002. « Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids ». *Nucleic Acids Research* 30 (9): 1911-18.

Kyselovič, Jan, et John J. Leddy. 2017. « Cardiac Fibrosis: The Beneficial Effects of Exercise in Cardiac Fibrosis ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 999: 257-68. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4307-9_14.

Lagares, David, et Mohit Kapoor. 2013. « Targeting Focal Adhesion Kinase in Fibrotic Diseases ». *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy* 27 (1): 15-23. https://doi.org/10.1007/s40259-012-0003-4.

Lako, M., T. Strachan, P. Bullen, D. I. Wilson, S. C. Robson, et S. Lindsay. 1998. « Isolation, Characterisation and Embryonic Expression of WNT11, a Gene Which Maps to 11q13.5 and Has Possible Roles in the Development of Skeleton, Kidney and Lung ». *Gene* 219 (1-2): 101-10. https://doi.org/10.1016/s0378-1119(98)00393-x.

Lampugnani, M. G., M. Corada, L. Caveda, F. Breviario, O. Ayalon, B. Geiger, et E. Dejana. 1995. « The Molecular Organization of Endothelial Cell to Cell Junctions: Differential Association of Plakoglobin, Beta-Catenin, and Alpha-Catenin with Vascular Endothelial Cadherin (VE-Cadherin) ». *The Journal of Cell Biology* 129 (1): 203-17. https://doi.org/10.1083/jcb.129.1.203.

Lauffenburger, D. A., et A. F. Horwitz. 1996. « Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process ». *Cell* 84 (3): 359-69. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81280-5.

Leaf, Irina A., et Jeremy S. Duffield. 2017. « What Can Target Kidney Fibrosis? » *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 32 (suppl_1): i89-97. https://doi.org/10.1093/ndt/gfw388.

Leask, Andrew, et David J. Abraham. 2004. « TGF-Beta Signaling and the Fibrotic Response ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18 (7): 816-27. https://doi.org/10.1096/fj.03-1273rev.

Lee, Chang-Hun, Min-Sung Kim, Shuang Li, Daniel J. Leahy, et Pierre A. Coulombe. 2020. « Structure-Function Analyses of a Keratin Heterotypic Complex Identify Specific Keratin Regions Involved in Intermediate Filament Assembly ». *Structure* 28 (3): 355-362.e4. https://doi.org/10.1016/j.str.2020.01.002.

Legerstee, Karin, Bart Geverts, Johan A. Slotman, et Adriaan B. Houtsmuller. 2019. « Dynamics and Distribution of Paxillin, Vinculin, Zyxin and VASP Depend on Focal Adhesion Location and Orientation ». *Scientific Reports* 9 (1): 10460. https://doi.org/10.1038/s41598-019-46905-2.

Lessey, Elizabeth C., Christophe Guilluy, et Keith Burridge. 2012. « From Mechanical Force to RhoA Activation ». *Biochemistry* 51 (38): 7420-32. https://doi.org/10.1021/bi300758e.

Li, Dong, Su Ni, Kai-Song Miao, et Chao Zhuang. 2019. « PI3K/Akt and Caspase Pathways Mediate Oxidative Stress-Induced Chondrocyte Apoptosis ». *Cell Stress & Chaperones* 24 (1): 195-202. https://doi.org/10.1007/s12192-018-0956-4.

Li, Qianzhi, Mark R. Nance, Rima Kulikauskas, Kevin Nyberg, Richard Fehon, P. Andrew Karplus, Anthony Bretscher, et John J. G. Tesmer. 2007. « Self-Masking in an Intact ERM-Merlin Protein: An Active Role for the Central α-Helical Domain ». *Journal of Molecular Biology* 365 (5): 1446-59. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.10.075.

Li, X., A. Pontén, K. Aase, L. Karlsson, A. Abramsson, M. Uutela, G. Bäckström, et al. 2000. « PDGF-C Is a New Protease-Activated Ligand for the PDGF Alpha-Receptor ». *Nature Cell Biology* 2 (5): 302-9. https://doi.org/10.1038/35010579.

Li, Yan, Da-Fang Zhong, Si-Wei Chen, et Isamu Maeba. 2005. « Identification of Some Benproperine Metabolites in Humans and Investigation of Their Antitussive Effect ». *Acta Pharmacologica Sinica* 26 (12): 1519-26. https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2005.00212.x.

Li, Yansong, Takehito Uruno, Christian Haudenschild, Steven M. Dudek, Joe G. N. Garcia, et Xi Zhan. 2004. « Interaction of Cortactin and Arp2/3 Complex Is Required for Sphingosine-1-Phosphate-Induced Endothelial Cell Remodeling ». *Experimental Cell Research* 298 (1): 107-21. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.03.023.

Li, Yi, Jiliang Qiu, Ting Pang, Zhixing Guo, Yonghui Su, Qingan Zeng, et Xuexia Zhang. 2017. « Restoration of Arpin Suppresses Aggressive Phenotype of Breast Cancer Cells ». *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 92 (août): 116-21. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.053.

Li, Zhaodong, Jonathan A. Dranoff, Erick P. Chan, Masayuki Uemura, Jean Sévigny, et Rebecca G. Wells. 2007. « Transforming Growth Factor-Beta and Substrate Stiffness Regulate Portal Fibroblast Activation in Culture ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 46 (4): 1246-56. https://doi.org/10.1002/hep.21792.

Liang, Ying-Chun, Xiao-Dong Li, Yu-Peng Wu, Zhi-Bin Ke, Zhang-Qi Liu, Shao-Hao Chen, Yong Wei, Qing-Shui Zheng, Xue-Yi Xue, et Ning Xu. 2019. « LIMK1 Depletion Enhances Fasudil-Dependent Inhibition of Urethral Fibroblast Proliferation and Migration ». *Journal of Cellular Biochemistry*, mars. https://doi.org/10.1002/jcb.28569.

Lieleg, Oliver, Kurt M. Schmoller, Kirstin R. Purdy Drew, Mireille M. A. E. Claessens, Christine Semmrich, Lili Zheng, James R. Bartles, et Andreas R. Bausch. 2009. « Structural and Viscoelastic Properties of Actin Networks Formed by Espin or Pathologically Relevant Espin Mutants ». *Chemphyschem: A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry* 10 (16): 2813-17. https://doi.org/10.1002/cphc.200900604.

Lin, Shengchen, Chongbiao Huang, Venugopal Gunda, Jianwei Sun, Srikumar P. Chellappan, Zengxun Li, Victoria Izumi, et al. 2019. « Fascin Controls Metastatic Colonization and Mitochondrial Oxidative Phosphorylation by Remodeling Mitochondrial Actin Filaments ». *Cell reports* 28 (11): 2824-2836.e8. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.011.

Lin, Xianchai, Jiamin Wen, Rongjiao Liu, Wuyou Gao, Bo Qu, et Minbin Yu. 2018. « Nintedanib Inhibits TGF-β-Induced Myofibroblast Transdifferentiation in Human Tenon's Fibroblasts ». *Molecular Vision*, 12. https://doi.org/PMID : 30636861.

Lin, Yu-Hung, Yen-Yi Zhen, Kun-Yi Chien, I-Ching Lee, Wei-Chi Lin, Mei-Yu Chen, et Li-Mei Pai. 2017. « LIMCH1 regulates nonmuscle myosin-II activity and suppresses cell migration ». *Molecular Biology of the Cell* 28 (8): 1054-65. https://doi.org/10.1091/mbc.E15-04-0218.

Lindblom, Per, Holger Gerhardt, Stefan Liebner, Alexandra Abramsson, Maria Enge, Mats Hellstrom, Gudrun Backstrom, et al. 2003. « Endothelial PDGF-B Retention Is Required for Proper Investment of Pericytes in the Microvessel Wall ». *Genes & Development* 17 (15): 1835-40. https://doi.org/10.1101/gad.266803.

Liu, Chenshu, Ruijun Zhu, et Yinghui Mao. 2018. « Nuclear Actin Polymerized by mDia2 Confines Centromere Movement during CENP-A Loading ». *iScience* 9 (novembre): 314-27. https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.10.031.

Liu, Fei, David Lagares, Kyoung Moo Choi, Lauren Stopfer, Aleksandar Marinković, Vladimir Vrbanac, Clemens K. Probst, et al. 2015. « Mechanosignaling through YAP and TAZ Drives Fibroblast Activation and Fibrosis ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 308 (4): L344-357. https://doi.org/10.1152/ajplung.00300.2014.

Liu, Fei, Justin D. Mih, Barry S. Shea, Alvin T. Kho, Asma S. Sharif, Andrew M. Tager, et Daniel J. Tschumperlin. 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, Su-Ling, Karen M. Needham, Jordan R. May, et Brad J. Nolen. 2011. « Mechanism of a Concentration-dependent Switch between Activation and Inhibition of Arp2/3 Complex by Coronin ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (19): 17039-46. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.219964.

Liu, Tianju, Hyun Ah Baek, Hongfeng Yu, Ho Jin Lee, Byung-Hyun Park, Matthew Ullenbruch, Jianhua Liu, et al. 2011. « FIZZ2/RELM-β Induction and Role in Pulmonary Fibrosis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 187 (1): 450-61. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000964.

Liu, Xiaoling, Xinyu Long, Weiwei Liu, Yeli Zhao, Toshihiko Hayashi, Masayuki Yamato, Kazunori Mizuno, et al. 2018. « Type I Collagen Induces Mesenchymal Cell Differentiation into Myofibroblasts through YAP-Induced TGF-B1 Activation ». *Biochimie* 150 (juillet): 110-30. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.05.005.

Liu, Yuan, Fuai Lu, Lirong Kang, Zhihua Wang, et Yongfu Wang. 2017. « Pirfenidone Attenuates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice by Regulating Nrf2/Bach1 Equilibrium ». *BMC Pulmonary Medicine* 17 (1): 63. https://doi.org/10.1186/s12890-017-0405-7.

Lombardi, Maria L., Diana E. Jaalouk, Catherine M. Shanahan, Brian Burke, Kyle J. Roux, et Jan Lammerding. 2011. « The Interaction between Nesprins and Sun Proteins at the Nuclear Envelope Is Critical for Force Transmission between the Nucleus and Cytoskeleton ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (30): 26743-53. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.233700.

Lu, Liqin, Lili Zhuang, Ximei Shen, et Liyong Yang. 2021. « Glucotoxicity Activation of IL6 and IL11 and Subsequent Induction of Fibrosis May Be Involved in the Pathogenesis of Islet Dysfunction ». *Frontiers in Molecular Biosciences* 8 (août): 708127. https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.708127.

Luan, Qing, et Brad J. Nolen. 2013. « Structural Basis for Regulation of Arp2/3 Complex by GMF ». *Nature Structural & Molecular Biology* 20 (9): 1062-68. https://doi.org/10.1038/nsmb.2628.

Luchsinger, Larry L., Cassandra A. Patenaude, Barbara D. Smith, et Matthew D. Layne. 2011. « Myocardin-Related Transcription Factor-A Complexes Activate Type I Collagen Expression in Lung Fibroblasts ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (51): 44116-25. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.276931.

Lundquist, Mark R., Andrew J. Storaska, Ting-Chun Liu, Scott D. Larsen, Todd Evans, Richard R. Neubig, et Samie R. Jaffrey. 2014. « Redox modification of nuclear actin by MICAL-2 regulates SRF signaling ». *Cell* 156 (3): 563-76. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.035.

Lv, Qun, Jianjun Wang, Changqing Xu, Xuqing Huang, Zhaoyang Ruan, et Yifan Dai. 2020. « Pirfenidone alleviates pulmonary fibrosis in vitro and in vivo through regulating Wnt/GSK-3β/β-catenin and TGF-β1/Smad2/3 signaling pathways ». *Molecular Medicine* 26 (mai). https://doi.org/10.1186/s10020-020-00173-3.

Macconi, Daniela, Susanna Tomasoni, Paola Romagnani, Piera Trionfini, Fabio Sangalli, Benedetta Mazzinghi, Paola Rizzo, et al. 2012. « MicroRNA-324-3p Promotes Renal Fibrosis and Is a Target of ACE Inhibition ». *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 23 (9): 1496-1505. https://doi.org/10.1681/ASN.2011121144.

Maher, T. M. 2010. « Pirfenidone in Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *Drugs of Today (Barcelona, Spain: 1998)* 46 (7): 473-82. https://doi.org/10.1358/dot.2010.46.7.1488336.

Mana-Capelli, Sebastian, Murugan Paramasivam, Shubham Dutta, et Dannel McCollum. 2014. « Angiomotins Link F-Actin Architecture to Hippo Pathway Signaling ». *Molecular Biology of the Cell* 25 (10): 1676-85. https://doi.org/10.1091/mbc.E13-11-0701.

Manso, Ana Maria, Ruixia Li, Susan J. Monkley, Nathalia M. Cruz, Shannon Ong, Dieu H. Lao, Yevgeniya E. Koshman, et al. 2013. « Talin1 Has Unique Expression versus Talin 2 in the Heart and Modifies the Hypertrophic Response to Pressure Overload ». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (6): 4252-64. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.427484.

Maria, A. T. J., C. Bourgier, C. Martinaud, R. Borie, P. Rozier, S. Rivière, B. Crestani, et P. Guilpain. 2020. « [From fibrogenesis towards fibrosis: Pathophysiological mechanisms and clinical presentations] ». *La Revue De Medecine Interne*, février. https://doi.org/10.1016/j.revmed.2020.01.002.

Mattyasovszky, Stefan G., Alexander Hofmann, Christoph Brochhausen, Ulrike Ritz, Sebastian Kuhn, Jochen Wollstädter, Hendrik Schulze-Koops, Lars P. Müller, Bernhard Watzer, et Pol M. Rommens. 2010. « The effect of the pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha on human joint capsule myofibroblasts ». *Arthritis Research & Therapy* 12 (1): R4. https://doi.org/10.1186/ar2902.

Melboucy-Belkhir, Sara, Pauline Pradère, Sara Tadbiri, Stéfanie Habib, Antoine Bacrot, Stéphanie Brayer, Bernard Mari, et al. 2014. « Forkhead Box F1 Represses Cell Growth and Inhibits COL1 and ARPC2 Expression in Lung Fibroblasts in Vitro ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 307 (11): L838-847. https://doi.org/10.1152/ajplung.00012.2014.

Melincovici, Carmen Stanca, Adina Bianca Boşca, Sergiu Şuşman, Mariana Mărginean, Carina Mihu, Mihnea Istrate, Ioana Maria Moldovan, Alexandra Livia Roman, et Carmen Mihaela Mihu. 2018. « Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) - Key Factor in Normal and Pathological Angiogenesis ». *Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine De Morphologie Et Embryologie* 59 (2): 455-67.

Meltzer, Eric B., William T. Barry, Thomas A. D'Amico, Robert D. Davis, Shu S. Lin, Mark W. Onaitis, Lake D. Morrison, Thomas A. Sporn, Mark P. Steele, et Paul W. Noble. 2011. « Bayesian Probit Regression Model for the Diagnosis of Pulmonary Fibrosis: Proof-of-Principle ». *BMC Medical Genomics* 4 (octobre): 70. https://doi.org/10.1186/1755-8794-4-70.

Mendivil-Perez, Miguel, Carlos Velez-Pardo, et Marlene Jimenez-Del-Rio. 2012. « TPEN Induces Apoptosis Independently of Zinc Chelator Activity in a Model of Acute Lymphoblastic Leukemia and Ex Vivo Acute Leukemia Cells through Oxidative Stress and Mitochondria Caspase-3- and AIF-Dependent Pathways ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012: 313275. https://doi.org/10.1155/2012/313275.

Meng, Chao, Yongping He, Zhaoqiang Wei, Yulin Lu, Fu Du, Guofang Ou, Nan Wang, et al. 2018. « MRTF-A Mediates the Activation of COL1A1 Expression Stimulated by Multiple Signaling Pathways in Human Breast Cancer Cells ». *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 104 (août): 718-28. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.092.

Meng, Xiao-Ming, David J. Nikolic-Paterson, et Hui Yao Lan. 2016. « TGF-β: The Master Regulator of Fibrosis ». *Nature Reviews. Nephrology* 12 (6): 325-38. https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.48.

Mergault, Coralie, Fanny Lisée, Victor Tiroille, Mélia Magnien, Christelle Parent, Woodys Lenga Mabonda, Damien Sizaret, et al. 2021. « Inhibition of the Arp2/3 Complex Represses Human Lung Myofibroblast Differentiation and Attenuates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis ». *British Journal of Pharmacology*, août. https://doi.org/10.1111/bph.15675.

Miralles, Francesc, Guido Posern, Alexia-Ileana Zaromytidou, et Richard Treisman. 2003a. « Actin Dynamics Control SRF Activity by Regulation of Its Coactivator MAL ». *Cell* 113 (3): 329-42. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00278-2.

———. 2003b. « Actin Dynamics Control SRF Activity by Regulation of Its Coactivator MAL ». *Cell* 113 (3): 329-42. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00278-2.

Miranda, Maria Zena, Janne Folke Bialik, Pam Speight, Qinghong Dan, Tony Yeung, Katalin Szászi, Stine F. Pedersen, et András Kapus. 2017. « TGF-B1 Regulates the Expression and Transcriptional Activity of TAZ Protein via a Smad3-Independent, Myocardin-Related Transcription Factor-Mediated Mechanism ». *The Journal of Biological Chemistry* 292 (36): 14902-20. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.780502.

Mitsushima, Masaru, Kazuhiro Aoki, Miki Ebisuya, Shigeru Matsumura, Takuya Yamamoto, Michiyuki Matsuda, Fumiko Toyoshima, et Eisuke Nishida. 2010. « Revolving Movement of a Dynamic Cluster of Actin Filaments during Mitosis ». *The Journal of Cell Biology* 191 (3): 453-62. https://doi.org/10.1083/jcb.201007136.

Montesi, Sydney B., Pauline Désogère, Bryan C. Fuchs, et Peter Caravan. 2019. « Molecular Imaging of Fibrosis: Recent Advances and Future Directions ». *The Journal of Clinical Investigation* 129 (1): 24-33. https://doi.org/10.1172/JCI122132.

Moore, Chris B., Elizabeth H. Guthrie, Max Tze-Han Huang, et Debra J. Taxman. 2010. « Short Hairpin RNA (ShRNA): Design, Delivery, and Assessment of Gene Knockdown ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 629: 141-58. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-657-3_10.

Morali, O. G., V. Delmas, R. Moore, C. Jeanney, J. P. Thiery, et L. Larue. 2001. « IGF-II Induces Rapid Beta-Catenin Relocation to the Nucleus during Epithelium to Mesenchyme Transition ». *Oncogene* 20 (36): 4942-50. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204660.

Moreno-Vicente, Roberto, Dácil María Pavón, Inés Martín-Padura, Mauro Català-Montoro, Alberto Díez-Sánchez, Antonio Quílez-Álvarez, Juan Antonio López, et al. 2018. « Caveolin-1 Modulates Mechanotransduction Responses to Substrate Stiffness through Actin-Dependent Control of YAP ». *Cell Reports* 25 (6): 1622-1635.e6. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.024.

Munger, J. S., X. Huang, H. Kawakatsu, M. J. Griffiths, S. L. Dalton, J. Wu, J. F. Pittet, et al. 1999. « The Integrin Alpha v Beta 6 Binds and Activates Latent TGF Beta 1: A Mechanism for Regulating Pulmonary Inflammation and Fibrosis ». *Cell* 96 (3): 319-28. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80545-0.

Narita, Akihiro. 2020. « ADF/Cofilin Regulation from a Structural Viewpoint ». *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 41 (1): 141-51. https://doi.org/10.1007/s10974-019-09546-6.

Niwa, Ryusuke, Kyoko Nagata-Ohashi, Masatoshi Takeichi, Kensaku Mizuno, et Tadashi Uemura. 2002. « Control of Actin Reorganization by Slingshot, a Family of Phosphatases That Dephosphorylate ADF/Cofilin ». *Cell* 108 (2): 233-46. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00638-9.

Nobes, C. D., et A. Hall. 1995. « Rho, Rac, and Cdc42 GTPases Regulate the Assembly of Multimolecular Focal Complexes Associated with Actin Stress Fibers, Lamellipodia, and Filopodia ». *Cell* 81 (1): 53-62. https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90370-4.

Noguchi, Satoshi, Akira Saito, Yu Mikami, Hirokazu Urushiyama, Masafumi Horie, Hirotaka Matsuzaki, Hideyuki Takeshima, et al. 2017. « TAZ Contributes to Pulmonary Fibrosis by Activating Profibrotic Functions of Lung Fibroblasts ». *Scientific Reports* 7 (février): 42595. https://doi.org/10.1038/srep42595.

Noguchi, Satoshi, Akira Saito, et Takahide Nagase. 2018. « YAP/TAZ Signaling as a Molecular Link between Fibrosis and Cancer ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (11). https://doi.org/10.3390/ijms19113674.

Nusse, Roel, et Hans Clevers. 2017. « Wnt/β-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities ». *Cell* 169 (6): 985-99. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.016.

Olsen, Abby L., Steven A. Bloomer, Erick P. Chan, Marianna D. A. Gaça, Penelope C. Georges, Bridget Sackey, Masayuki Uemura, Paul A. Janmey, et Rebecca G. Wells. 2011. « Hepatic Stellate Cells Require a Stiff Environment for Myofibroblastic Differentiation ». *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 301 (1): G110-118. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00412.2010.

Padrick, S. B., L. K. Doolittle, C. A. Brautigam, D. S. King, et M. K. Rosen. 2011. « Arp2/3 Complex Is Bound and Activated by Two WASP Proteins ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (33): E472-79. https://doi.org/10.1073/pnas.1100236108.

Pan, Meng-Hao, Xiang Wan, Hong-Hui Wang, Zhen-Nan Pan, Yu Zhang, et Shao-Chen Sun. 2020. « FMNL3 Regulates FASCIN for Actin-Mediated Spindle Migration and Cytokinesis in Mouse Oocytes ». *Biology of Reproduction*, mars. https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa033.

Panayiotou, Richard, Francesc Miralles, Rafal Pawlowski, Jessica Diring, Helen R Flynn, Mark Skehel, et Richard Treisman. s. d. « Phosphorylation acts positively and negatively to regulate MRTF-A subcellular localisation and activity ». *eLife* 5. Consulté le 12 mai 2020. https://doi.org/10.7554/eLife.15460.

Parisis, Nikolaos, Liliana Krasinska, Bethany Harker, Serge Urbach, Michel Rossignol, Alain Camasses, James Dewar, Nathalie Morin, et Daniel Fisher. 2017. « Initiation of DNA Replication Requires Actin Dynamics and Formin Activity ». *The EMBO Journal* 36 (21): 3212-31. https://doi.org/10.15252/embj.201796585.

Pegoraro, Adrian F., Paul Janmey, et David A. Weitz. 2017. « Mechanical Properties of the Cytoskeleton and Cells ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9 (11). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022038.

Pellegrin, S., et H. Mellor. 2007. « Actin stress fibres ». *Journal of Cell Science*. https://doi.org/10.1242/jcs.018473.

Pfleger, Cathie M. 2017. « The Hippo Pathway: A Master Regulatory Network Important in Development and Dysregulated in Disease ». *Current Topics in Developmental Biology* 123: 181-228. https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.12.001.

Piersma, Bram, Ruud A. Bank, et Miriam Boersema. 2015. « Signaling in Fibrosis: TGF-β, WNT, and YAP/TAZ Converge ». *Frontiers in Medicine* 2: 59. https://doi.org/10.3389/fmed.2015.00059.

Pines, J., et T. Hunter. 1991. « Human Cyclins A and B1 Are Differentially Located in the Cell and Undergo Cell Cycle-Dependent Nuclear Transport ». *The Journal of Cell Biology* 115 (1): 1-17. https://doi.org/10.1083/jcb.115.1.1.

Pinto-Costa, Rita, et Mónica M. Sousa. 2020. « Profilin as a Dual Regulator of Actin and Microtubule Dynamics ». *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 77 (3-4): 76-83. https://doi.org/10.1002/cm.21586.

Pipes, G. C. Teg, Esther E. Creemers, et Eric N. Olson. 2006. « The Myocardin Family of Transcriptional Coactivators: Versatile Regulators of Cell Growth, Migration, and Myogenesis ». *Genes & Development* 20 (12): 1545-56. https://doi.org/10.1101/gad.1428006.

Plantier, Laurent, Aurélie Cazes, Anh-Tuan Dinh-Xuan, Catherine Bancal, Sylvain Marchand-Adam, et Bruno Crestani. 2018. « Physiology of the Lung in Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *European Respiratory Review* 27 (147). https://doi.org/10.1183/16000617.0062-2017.

Plantier, Laurent, Hélène Renaud, Renaud Respaud, Sylvain Marchand-Adam, et Bruno Crestani. 2016. « Transcriptome of Cultured Lung Fibroblasts in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Meta-Analysis of Publically Available Microarray Datasets Reveals Repression of Inflammation and Immunity Pathways ». *International Journal of Molecular Sciences* 17 (12). https://doi.org/10.3390/ijms17122091.

Pocaterra, Arianna, Giulia Santinon, Patrizia Romani, Irene Brian, Andrea Dimitracopoulos, Andrea Ghisleni, Alejandro Carnicer-Lombarte, et al. 2019. « F-Actin Dynamics Regulates Mammalian Organ Growth and Cell Fate Maintenance ». *Journal of Hepatology*, mars. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.02.022.

Pokutta, S., et W. I. Weis. 2000. « Structure of the Dimerization and Beta-Catenin-Binding Region of Alpha-Catenin ». *Molecular Cell* 5 (3): 533-43. https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80447-5.

Pokutta, Sabine, Frauke Drees, Soichiro Yamada, W. James Nelson, et William I. Weis. 2008. « Biochemical and structural analysis of α-catenin in cell–cell contacts ». *Biochemical Society Transactions* 36 (Pt 2): 141-47. https://doi.org/10.1042/BST0360141.

Pollard, Thomas D., et Gary G. Borisy. 2003. « Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments ». *Cell* 112 (4): 453-65. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00120-x.

Pollard, Thomas D., et Robert D. Goldman. 2018. « Overview of the Cytoskeleton from an Evolutionary Perspective ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10 (7). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030288.

Pollard, Thomas D., et Ben O'Shaughnessy. 2019. « Molecular Mechanism of Cytokinesis ». *Annual Review of Biochemistry* 88 (1): 661-89. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012530.

Puthawala, Khalid, Nicos Hadjiangelis, Steven C. Jacoby, Emmanuel Bayongan, Zhicheng Zhao, Zhiwei Yang, Mary Louise Devitt, et al. 2008. « Inhibition of Integrin Alpha(v)Beta6, an Activator of Latent Transforming Growth Factor-Beta, Prevents Radiation-Induced Lung Fibrosis ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 177 (1): 82-90. https://doi.org/10.1164/rccm.200706-806OC.

Qi, Xiu-Jie, Wei Ning, Feng Xu, Hong-Xing Dang, Fang Fang, et Jing Li. 2015. « Fasudil, an inhibitor of Rho-associated coiled-coil kinase, attenuates hyperoxia-induced pulmonary fibrosis in neonatal rats ». *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8 (10): 12140-50.

R, Kaunas, Nguyen P, Usami S, et Chien S. 2005. « Cooperative Effects of Rho and Mechanical Stretch on Stress Fiber Organization ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (44). https://doi.org/10.1073/pnas.0506041102.

Rajasekaran, Subbiah, Narsa M. Reddy, Wei Zhang, et Sekhar P. Reddy. 2013. « Expression Profiling of Genes Regulated by Fra-1/AP-1 Transcription Factor during Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis ». *BMC Genomics* 14 (juin): 381. https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-381.

Rao, Donald D., John S. Vorhies, Neil Senzer, et John Nemunaitis. 2009. « SiRNA vs. ShRNA: Similarities and Differences ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (9): 746-59. https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.04.004.

Ricard-Blum, Sylvie. 2011. « The Collagen Family ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (1). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978.

Ridley, Anne J. 2015. « Rho GTPase Signalling in Cell Migration ». *Current Opinion in Cell Biology* 36 (octobre): 103-12. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.08.005.

Ridley, Anne J., Martin A. Schwartz, Keith Burridge, Richard A. Firtel, Mark H. Ginsberg, Gary Borisy, J. Thomas Parsons, et Alan Rick Horwitz. 2003. « Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back ». *Science (New York, N.Y.)* 302 (5651): 1704-9. https://doi.org/10.1126/science.1092053.

Robertson, Ian B., Masahito Horiguchi, Lior Zilberberg, Branka Dabovic, Krassimira Hadjiolova, et Daniel B. Rifkin. 2015. « Latent TGF-β-Binding Proteins ». *Matrix Biology* 47 (septembre): 44-53. https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.05.005.

Robertson, Ian B., et Daniel B. Rifkin. 2013. « Unchaining the Beast; Insights from Structural and Evolutionary Studies on TGFβ Secretion, Sequestration, and Activation ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 24 (4): 355-72. https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2013.06.003.

Rodgers, Laurel S., M. Tanner Beam, James M. Anderson, et Alan S. Fanning. 2013. « Epithelial Barrier Assembly Requires Coordinated Activity of Multiple Domains of the Tight Junction Protein ZO-1 ». *Journal of Cell Science* 126 (Pt 7): 1565-75. https://doi.org/10.1242/jcs.113399.

Rosenbloom, Joel, Edward Macarak, Sonsoles Piera-Velazquez, et Sergio A. Jimenez. 2017. « Human Fibrotic Diseases: Current Challenges in Fibrosis Research ». In *Fibrosis: Methods and Protocols*, édité par Laure Rittié, 1-23. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8_1.

Rottner, K., A. Hall, et J. V. Small. 1999. « Interplay between Rac and Rho in the Control of Substrate Contact Dynamics ». *Current Biology* 9 (12): 640-S1. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80286-3.

Rottner, Klemens, Jan Faix, Sven Bogdan, Stefan Linder, et Eugen Kerkhoff. 2017. « Actin Assembly Mechanisms at a Glance ». *Journal of Cell Science* 130 (20): 3427-35. https://doi.org/10.1242/jcs.206433.

Rouiller, Isabelle, Xiao-Ping Xu, Kurt J. Amann, Coumaran Egile, Stephan Nickell, Daniela Nicastro, Rong Li, Thomas D. Pollard, Niels Volkmann, et Dorit Hanein. 2008. « The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex ». *The Journal of Cell Biology* 180 (5): 887-95. https://doi.org/10.1083/jcb.200709092.

Roy, F. van, et G. Berx. 2008. « The Cell-Cell Adhesion Molecule E-Cadherin ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 65 (23): 3756-88. https://doi.org/10.1007/s00018-008-8281-1.

Ruwanpura, Saleela M., Belinda J. Thomas, et Philip G. Bardin. 2020. « Pirfenidone: Molecular Mechanisms and Potential Clinical Applications in Lung Disease ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 62 (4): 413-22. https://doi.org/10.1165/rcmb.2019-0328TR.

Sandbo, Nathan, et Nickolai Dulin. 2011. « Actin Cytoskeleton in Myofibroblast Differentiation: Ultrastructure Defining Form and Driving Function ». *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 158 (4): 181-96. https://doi.org/10.1016/j.trsl.2011.05.004.

Santucci, Matteo, Tatiana Vignudelli, Stefania Ferrari, Marco Mor, Laura Scalvini, Maria Laura Bolognesi, Elisa Uliassi, et Maria Paola Costi. 2015. « The Hippo Pathway and YAP/TAZ-TEAD Protein-Protein Interaction as Targets for Regenerative Medicine and Cancer Treatment ». *Journal of Medicinal Chemistry* 58 (12): 4857-73. https://doi.org/10.1021/jm501615v.

Sauvanet, Cécile, Jessica Wayt, Thaher Pelaseyed, et Anthony Bretscher. 2015. « Structure, Regulation, and Functional Diversity of Microvilli on the Apical Domain of Epithelial Cells ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 31 (1): 593-621. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100814-125234.

Schafer, Marissa J., Thomas A. White, Koji Iijima, Andrew J. Haak, Giovanni Ligresti, Elizabeth J. Atkinson, Ann L. Oberg, et al. 2017. « Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease ». *Nature Communications* 8 (février). https://doi.org/10.1038/ncomms14532.

Schlaepfer, D. D., S. K. Hanks, T. Hunter, et P. van der Geer. 1994. « Integrin-Mediated Signal Transduction Linked to Ras Pathway by GRB2 Binding to Focal Adhesion Kinase ». *Nature* 372 (6508): 786-91. https://doi.org/10.1038/372786a0.

Sechi, Antonio, S. 2004. « ENA/VASP Proteins: Multifunctional Regulators of Actin Cytoskeleton Dynamics ». *Frontiers in Bioscience* 9 (1-3): 1294. https://doi.org/10.2741/1324.
Selden, L. A., H. J. Kinosian, J. E. Estes, et L. C. Gershman. 1999. « Impact of Profilin on Actin-Bound Nucleotide Exchange and Actin Polymerization Dynamics ». *Biochemistry* 38 (9): 2769-78. https://doi.org/10.1021/bi981543c.

Shan, Liang, Zhenni Liu, Leilei Ci, Chen Shuai, Xiongwen Lv, et Jun Li. 2019. « Research Progress on the Anti-Hepatic Fibrosis Action and Mechanism of Natural Products ». *International Immunopharmacology* 75 (octobre): 105765. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105765.

Shao, Songjun, Xiangning Zhang, Lingdi Duan, Haiyan Fang, Shanshan Rao, Weijia Liu, Bing Guo, et Xiangyan Zhang. 2018. « Lysyl Hydroxylase Inhibition by Minoxidil Blocks Collagen Deposition and Prevents Pulmonary Fibrosis via TGF-B_1/Smad3 Signaling Pathway ». *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 24 (novembre): 8592-8601. https://doi.org/10.12659/MSM.910761.

Shimizu, Y., K. Dobashi, K. Iizuka, T. Horie, K. Suzuki, H. Tukagoshi, T. Nakazawa, Y. Nakazato, et M. Mori. 2001. « Contribution of Small GTPase Rho and Its Target Protein Rock in a Murine Model of Lung Fibrosis ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 163 (1): 210-17. https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.1.2001089.

Shimizu-Hirota, Ryoko, Hiroyuki Sasamura, Mari Kuroda, Emi Kobayashi, Matsuhiko Hayashi, et Takao Saruta. 2004. « Extracellular Matrix Glycoprotein Biglycan Enhances Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration ». *Circulation Research* 94 (8): 1067-74. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000126049.79800.CA.

Sisson, Thomas H., Iyabode O. Ajayi, Natalya Subbotina, Amos E. Dodi, Eva S. Rodansky, Lauren N. Chibucos, Kevin K. Kim, et al. 2015. « Inhibition of Myocardin-Related Transcription Factor/Serum Response Factor Signaling Decreases Lung Fibrosis and Promotes Mesenchymal Cell Apoptosis ». *The American Journal of Pathology* 185 (4): 969-86. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.12.005.

Skoble, J., V. Auerbuch, E. D. Goley, M. D. Welch, et D. A. Portnoy. 2001. « Pivotal Role of VASP in Arp2/3 Complex-Mediated Actin Nucleation, Actin Branch-Formation, and Listeria Monocytogenes Motility ». *The Journal of Cell Biology* 155 (1): 89-100. https://doi.org/10.1083/jcb.200106061.

Small, Eric M., Jeffrey E. Thatcher, Lillian B. Sutherland, Hideyuki Kinoshita, Robert D. Gerard, James A. Richardson, J. Michael Dimaio, Hesham Sadek, Koichiro Kuwahara, et Eric N. Olson. 2010. « Myocardin-Related Transcription Factor-a Controls Myofibroblast Activation and Fibrosis in Response to Myocardial Infarction ». *Circulation Research* 107 (2): 294-304. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223172.

Sokolova, Olga S., Angelina Chemeris, Siyang Guo, Salvatore L. Alioto, Meghal Gandhi, Shae Padrick, Evgeniya Pechnikova, Violaine David, Alexis Gautreau, et Bruce L. Goode. 2017. « Structural Basis of Arp2/3 Complex Inhibition by GMF, Coronin, and Arpin ». *Journal of Molecular Biology* 429 (2): 237-48. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.11.030.

Sorushanova, Anna, Luis M. Delgado, Zhuning Wu, Naledi Shologu, Aniket Kshirsagar, Rufus Raghunath, Anne M. Mullen, et al. 2019. « The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development ». *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)* 31 (1): e1801651. https://doi.org/10.1002/adma.201801651.

Spagnolo, P., G. Rossi, A. Cavazza, M. Bonifazi, I. Paladini, F. Bonella, N. Sverzellati, et U. Costabel. 2015. « Hypersensitivity Pneumonitis: A Comprehensive Review ». *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology* 25 (4): 237-50; quiz follow 250.

Spagnolo, Paolo, Oliver Distler, Christopher J. Ryerson, Argyris Tzouvelekis, Joyce S. Lee, Francesco Bonella, Demosthenes Bouros, Anna-Maria Hoffmann-Vold, Bruno Crestani, et Eric L. Matteson. 2021. « Mechanisms of Progressive Fibrosis in Connective Tissue Disease (CTD)-Associated Interstitial Lung Diseases (ILDs) ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 80 (2): 143-50. https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-217230.

Steen, Emily H., Xinyi Wang, Swathi Balaji, Manish J. Butte, Paul L. Bollyky, et Sundeep G. Keswani. 2020. « The Role of the Anti-Inflammatory Cytokine Interleukin-10 in Tissue Fibrosis ». *Advances in Wound Care* 9 (4): 184-98. https://doi.org/10.1089/wound.2019.1032.

Suda, Jo, Don C. Rockey, et Serhan Karvar. 2016. « Akt2-Dependent Phosphorylation of Radixin in Regulation of Mrp-2 Trafficking in WIF-B Cells ». *Digestive Diseases and Sciences* 61 (2): 453-63. https://doi.org/10.1007/s10620-015-3905-4.

Sun, Li, Limei Qu, David R Brigstock, Hongyan Li, Yanyan Li, et Runping Gao. 2020. « Biological and Proteomic Characteristics of an Immortalized Human Pancreatic Stellate Cell Line ». *International Journal of Medical Sciences* 17 (1): 137-44. https://doi.org/10.7150/ijms.36337.

Sun, Li, Ming Xiu, Shuhua Wang, David R. Brigstock, Hongyan Li, Limei Qu, et Runping Gao. 2018. « Lipopolysaccharide Enhances TGF-B1 Signalling Pathway and Rat Pancreatic Fibrosis ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 22 (4): 2346-56. https://doi.org/10.1111/jcmm.13526.

Sun, Yu Bo Yang, Xinli Qu, Georgina Caruana, et Jinhua Li. 2016. « The Origin of Renal Fibroblasts/Myofibroblasts and the Signals That Trigger Fibrosis ». *Differentiation; Research in Biological Diversity* 92 (3): 102-7. https://doi.org/10.1016/j.diff.2016.05.008.

Svitkina, Tatyana M. 2018a. « Ultrastructure of the Actin Cytoskeleton ». *Current Opinion in Cell Biology* 54: 1-8. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.02.007.

———. 2018b. « ULTRASTRUCTURE OF THE ACTIN CYTOSKELETON ». *Current opinion in cell biology* 54 (octobre): 1-8. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.02.007.

Swaney, Kristen F., et Rong Li. 2016. « Function and Regulation of the Arp2/3 Complex during Cell Migration in Diverse Environments ». *Current Opinion in Cell Biology* 42: 63-72. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.04.005.

Taciak, B., I. Pruszynska, L. Kiraga, M. Bialasek, et M. Krol. 2018. « Wnt Signaling Pathway in Development and Cancer ». *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society* 69 (2). https://doi.org/10.26402/jpp.2018.2.07.

Taniguchi, Leandro Utino, Elia Garcia Caldini, Irineu Tadeu Velasco, et Elnara Márcia Negri. 2010. « Cytoskeleton and Mechanotransduction in the Pathophysiology of Ventilator-Induced Lung Injury ». *Jornal Brasileiro De Pneumologia: Publicacao Oficial Da Sociedade Brasileira De Pneumologia E Tisilogia* 36 (3): 363-71. https://doi.org/10.1590/s1806-37132010000300015.

Tapial Martínez, Paula, Pilar López Navajas, et Daniel Lietha. 2020. « FAK Structure and Regulation by Membrane Interactions and Force in Focal Adhesions ». *Biomolecules* 10 (2). https://doi.org/10.3390/biom10020179.

Tojkander, Sari, Gergana Gateva, et Pekka Lappalainen. 2012. « Actin Stress Fibers--Assembly, Dynamics and Biological Roles ». *Journal of Cell Science* 125 (Pt 8): 1855-64. https://doi.org/10.1242/jcs.098087.

Tsukui, Tatsuya, Kai-Hui Sun, Joseph B. Wetter, John R. Wilson-Kanamori, Lisa A. Hazelwood, Neil C. Henderson, Taylor S. Adams, et al. 2020. « Collagen-Producing Lung Cell Atlas Identifies Multiple Subsets with Distinct Localization and Relevance to Fibrosis ». *Nature Communications* 11 (1): 1920. https://doi.org/10.1038/s41467-020-15647-5.

Tzavlaki, Kalliopi, et Aristidis Moustakas. 2020. « TGF-β Signaling ». *Biomolecules* 10 (3): E487. https://doi.org/10.3390/biom10030487.

Uemura, Yasunori, Kenji Hagiwara, et Katsuya Kobayashi. 2017. « The intratracheal administration of locked nucleic acid containing antisense oligonucleotides induced gene silencing and an immune-stimulatory effect in the murine lung ». *PLoS ONE* 12 (11): e0187286. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187286.

Uemura, Yasunori, et Katsuya Kobayashi. 2019. « Targeting murine alveolar macrophages by the intratracheal administration of locked nucleic acid containing antisense oligonucleotides ». *Drug Delivery* 26 (1): 803-11. https://doi.org/10.1080/10717544.2019.1648589.

Upagupta, Chandak, Chiko Shimbori, Rahmah Alsilmi, et Martin Kolb. 2018. « Matrix Abnormalities in Pulmonary Fibrosis ». *European Respiratory Review* 27 (148): 180033. https://doi.org/10.1183/16000617.0033-2018.

Van Itallie, Christina M., et James M. Anderson. 2014. « Architecture of Tight Junctions and Principles of Molecular Composition ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 36 (décembre): 157-65. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.08.011.

Vartiainen, Maria K., Sebastian Guettler, Banafshe Larijani, et Richard Treisman. 2007. « Nuclear Actin Regulates Dynamic Subcellular Localization and Activity of the SRF Cofactor MAL ». *Science (New York, N.Y.)* 316 (5832): 1749-52. https://doi.org/10.1126/science.1141084.

Velasquez, Lissette S., Lillian B. Sutherland, Zhenan Liu, Frederick Grinnell, Kristine E. Kamm, Jay W. Schneider, Eric N. Olson, et Eric M. Small. 2013. « Activation of MRTF-A–Dependent Gene Expression with a Small Molecule Promotes Myofibroblast Differentiation and Wound Healing ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (42): 16850-55. https://doi.org/10.1073/pnas.1316764110.

Verjee, L. S., J. S. N. Verhoekx, J. K. K. Chan, T. Krausgruber, V. Nicolaidou, D. Izadi, D. Davidson, M. Feldmann, K. S. Midwood, et J. Nanchahal. 2013. « Unraveling the Signaling Pathways Promoting Fibrosis in Dupuytren's Disease Reveals TNF as a Therapeutic Target ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (10): E928-37. https://doi.org/10.1073/pnas.1301100110.

Vogel, Viola, et Michael Sheetz. 2006. « Local Force and Geometry Sensing Regulate Cell Functions ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 7 (4): 265-75. https://doi.org/10.1038/nrm1890.

Waisberg, Daniel Reis, João Valente Barbas-Filho, Edwin Roger Parra, Sandra Fernezlian, Carlos Roberto Ribeiro de Carvalho, Ronaldo Adib Kairalla, et Vera Luiza Capelozzi. 2010. « Abnormal Expression of Telomerase/Apoptosis Limits Type II Alveolar Epithelial Cell Replication in the Early Remodeling of Usual Interstitial Pneumonia/Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *Human Pathology* 41 (3): 385-91. https://doi.org/10.1016/j.humpath.2009.08.019.

Walklate, Jonathan, Zoltan Ujfalusi, et Michael A. Geeves. 2016. « Myosin Isoforms and the Mechanochemical Cross-Bridge Cycle ». *The Journal of Experimental Biology* 219 (Pt 2): 168-74. https://doi.org/10.1242/jeb.124594.

Wang, Yu, Xiao-Mei Li, et Hai-Yan Wang. 2002. « [IL-1beta stimulates alpha-smooth muscle actin expression through JNK/p38 signal pathway in cultured rat mesangial cells] ». *Sheng Li Xue Bao: [Acta Physiologica Sinica]* 54 (3): 244-50.

Wang, Yuan, et Thomas D. Gilmore. 2003. « Zyxin and Paxillin Proteins: Focal Adhesion Plaque LIM Domain Proteins Go Nuclear ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1593 (2-3): 115-20. https://doi.org/10.1016/s0167-4889(02)00349-x.

Wang, Zhen, Li Sun, Shuang Liang, Zan-Chao Liu, Zeng-Yi Zhao, Jie Yang, Defeng Wang, et Da-Qing Yang. 2019. « GPER Stabilizes F-Actin Cytoskeleton and Activates TAZ via PLCβ-PKC and Rho/ROCK-LIMK-Cofilin Pathway ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 516 (3): 976-82. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.06.132.

Watts, Jonathan K., et David R. Corey. 2012. « Gene silencing by siRNAs and antisense oligonucleotides in the laboratory and the clinic ». *The Journal of pathology* 226 (2): 365-79. https://doi.org/10.1002/path.2993.

Weed, Scott A., Andrei V. Karginov, Dorothy A. Schafer, Alissa M. Weaver, Andrew W. Kinley, John A. Cooper, et J. Thomas Parsons. 2000. « Cortactin Localization to Sites of Actin Assembly in Lamellipodia Requires Interactions with F-Actin and the Arp2/3 Complex ». *The Journal of Cell Biology* 151 (1): 29-40.

Weidenfeld, Joel, Weiguo Shu, Lili Zhang, Sarah E. Millar, et Edward E. Morrisey. 2002. « The WNT7b Promoter Is Regulated by TTF-1, GATA6, and Foxa2 in Lung Epithelium ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (23): 21061-70. https://doi.org/10.1074/jbc.M111702200.

Weng, Chih-Ming, Chung-Chi Yu, Min-Liang Kuo, Bing-Chang Chen, et Chien-Huang Lin. 2014. « Endothelin-1 Induces Connective Tissue Growth Factor Expression in Human Lung Fibroblasts by ETAR-Dependent JNK/AP-1 Pathway ». *Biochemical Pharmacology* 88 (3): 402-11. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.01.030.

Wherlock, Matthew, et Harry Mellor. 2002. « The Rho GTPase Family: A Racs to Wrchs Story ». *Journal of Cell Science* 115 (Pt 2): 239-40.

Wioland, Hugo, Berengere Guichard, Yosuke Senju, Sarah Myram, Pekka Lappalainen, Antoine Jégou, et Guillaume Romet-Lemonne. 2017. « ADF/Cofilin Accelerates Actin Dynamics by Severing Filaments and Promoting Their Depolymerization at Both Ends ». *Current Biology: CB* 27 (13): 1956-1967.e7. https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.048.

Wioland, Hugo, Emiko Suzuki, Luyan Cao, Guillaume Romet-Lemonne, et Antoine Jegou. 2020. « The Advantages of Microfluidics to Study Actin Biochemistry and Biomechanics ». *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 41 (1): 175-88. https://doi.org/10.1007/s10974-019-09564-4.

Wipff, Pierre-Jean, Daniel B. Rifkin, Jean-Jacques Meister, et Boris Hinz. 2007. « Myofibroblast Contraction Activates Latent TGF-Beta1 from the Extracellular Matrix ». *The Journal of Cell Biology* 179 (6): 1311-23. https://doi.org/10.1083/jcb.200704042.

Wollin, Lutz, Isabelle Maillet, Valérie Quesniaux, Alexander Holweg, et Bernhard Ryffel. 2014. « Antifibrotic and Anti-Inflammatory Activity of the Tyrosine Kinase Inhibitor Nintedanib in Experimental Models of Lung Fibrosis ». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 349 (2): 209-20. https://doi.org/10.1124/jpet.113.208223.

Wollin, Lutz, Eva Wex, Alexander Pautsch, Gisela Schnapp, Katrin E. Hostettler, Susanne Stowasser, et Martin Kolb. 2015. « Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis ». *The European Respiratory Journal* 45 (5): 1434-45. https://doi.org/10.1183/09031936.00174914.

Wolters, Paul J., Timothy S. Blackwell, Oliver Eickelberg, James E. Loyd, Naftali Kaminski, Gisli Jenkins, Toby M. Maher, et al. 2018. « Time for a Change: Is Idiopathic Pulmonary Fibrosis Still Idiopathic and Only Fibrotic? » *The Lancet. Respiratory Medicine* 6 (2): 154-60. https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30007-9.

Wozniak, Michele A., Katarzyna Modzelewska, Lina Kwong, et Patricia J. Keely. 2004. « Focal Adhesion Regulation of Cell Behavior ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1692 (2-3): 103-19. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.04.007.

Xie, Ting, Yizhou Wang, Nan Deng, Guanling Huang, Forough Taghavifar, Yan Geng, Ningshan Liu, et al. 2018. « Single-Cell Deconvolution of Fibroblast Heterogeneity in Mouse Pulmonary Fibrosis ». *Cell Reports* 22 (13): 3625-40. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.010.

Xu, Huihui, Xiaoyan Wu, Hao Qin, Wenfang Tian, Junliang Chen, Lina Sun, Mingming Fang, et Yong Xu. 2015. « Myocardin-Related Transcription Factor A Epigenetically Regulates Renal Fibrosis in Diabetic Nephropathy ». *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 26 (7): 1648-60. https://doi.org/10.1681/ASN.2014070678.

Yoon, Yae Jin, Young-Min Han, Jiyeon Choi, Yu-Jin Lee, Jieun Yun, Su-Kyung Lee, Chang Woo Lee, et al. 2019a. « Benproperine, an ARPC2 Inhibitor, Suppresses Cancer Cell Migration and Tumor Metastasis ». *Biochemical Pharmacology* 163 (mai): 46-59. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.01.017.

———. 2019b. « Benproperine, an ARPC2 inhibitor, suppresses cancer cell migration and tumor metastasis ». *Biochemical Pharmacology* 163 (mai): 46-59. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.01.017.

You, Eunae, Yun-Hyun Huh, Jieun Lee, Panseon Ko, Jangho Jeong, Seula Keum, Jaegu Kim, Ahreum Kwon, Woo Keun Song, et Sangmyung Rhee. 2019. « Downregulation of SPIN90 Promotes Fibroblast Activation via Periostin-FAK-ROCK Signaling Module ». *Journal of Cellular Physiology* 234 (6): 9216-24. https://doi.org/10.1002/jcp.27600.

Zavadil, J., M. Bitzer, D. Liang, Y. C. Yang, A. Massimi, S. Kneitz, E. Piek, et E. P. Bottinger. 2001. « Genetic Programs of Epithelial Cell Plasticity Directed by Transforming Growth Factor-Beta ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (12): 6686-91. https://doi.org/10.1073/pnas.111614398.

Zettl, Markus, et Michael Way. 2002. « The WH1 and EVH1 Domains of WASP and Ena/VASP Family Members Bind Distinct Sequence Motifs ». *Current Biology* 12 (18): 1617-22. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01112-0.

Zhang, Chen, Long Hai, Meng Zhu, Shengping Yu, Tao Li, Yu Lin, Bo Liu, et al. 2017. « Actin cytoskeleton regulator Arp2/3 complex is required for DLL1 activating Notch1 signaling to maintain the stem cell phenotype of glioma initiating cells ». *Oncotarget* 8 (20): 33353-64. https://doi.org/10.18632/oncotarget.16495.

Zhang, Huanyu, Zhe Zhang, Yonghao Huang, Siyuan Qin, Li Zhou, Ningna Weng, Jiayang Liu, et al. 2021. « Repurposing Antitussive Benproperine Phosphate against Pancreatic Cancer Depends on Autophagy Arrest ». *Molecular Oncology* 15 (2): 725-38. https://doi.org/10.1002/1878-0261.12854.

Zhang, Shaosong, Carla Weinheimer, Michael Courtois, Attila Kovacs, Cindy E. Zhang, Alec M. Cheng, Yibin Wang, et Anthony J. Muslin. 2003. « The Role of the Grb2-P38 MAPK Signaling Pathway in Cardiac Hypertrophy and Fibrosis ». *The Journal of Clinical Investigation* 111 (6): 833-41. https://doi.org/10.1172/JCI16290.

Zhang, Xiaoli, Luis R. Flores, Michael C. Keeling, Kristina Sliogeryte, et Núria Gavara. 2020. « Ezrin Phosphorylation at T567 Modulates Cell Migration, Mechanical Properties, and Cytoskeletal Organization ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (2). https://doi.org/10.3390/ijms21020435.

Zhang, Ying E. 2009. « Non-Smad Pathways in TGF-Beta Signaling ». *Cell Research* 19 (1): 128-39. https://doi.org/10.1038/cr.2008.328.

———. 2017. « Non-Smad Signaling Pathways of the TGF-β Family ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9 (2). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022129.

Zhang, Yuanyuan, Yingmei Zhang, et Haiyan Xu. 2019. « LIMCH1 Suppress the Growth of Lung Cancer by Interacting with HUWE1 to Sustain P53 Stability ». *Gene* 712 (septembre): 143963. https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.143963.

Zhao, Bin, Xin Ye, Jindan Yu, Li Li, Weiquan Li, Siming Li, Jianjun Yu, et al. 2008. « TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control ». *Genes & Development* 22 (14): 1962-71. https://doi.org/10.1101/gad.1664408.

Zhao, Hongxia, Markku Hakala, et Pekka Lappalainen. 2010. « ADF/Cofilin Binds Phosphoinositides in a Multivalent Manner to Act as a PIP2-Density Sensor ». *Biophysical Journal* 98 (10): 2327-36. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.01.046.

Zhou, Kang, Andrew Muroyama, Julie Underwood, Rebecca Leylek, Samriddha Ray, Scott H. Soderling, et Terry Lechler. 2013. « Actin-Related Protein2/3 Complex Regulates Tight Junctions and Terminal Differentiation to Promote Epidermal Barrier Formation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (40): E3820-29. https://doi.org/10.1073/pnas.1308419110.

Zhou, Yong, Xiangwei Huang, Louise Hecker, Deepali Kurundkar, Ashish Kurundkar, Hui Liu, Tong-Huan Jin, Leena Desai, Karen Bernard, et Victor J. Thannickal. 2013a. « Inhibition of Mechanosensitive Signaling in Myofibroblasts Ameliorates Experimental Pulmonary Fibrosis ». *The Journal of Clinical Investigation* 123 (3): 1096-1108. https://doi.org/10.1172/JCI66700.

———. 2013b. « Inhibition of mechanosensitive signaling in myofibroblasts ameliorates experimental pulmonary fibrosis ». *The Journal of Clinical Investigation* 123 (3): 1096-1108. https://doi.org/10.1172/JCI66700.

Zhou, Yong, Xiangwei Huang, Louise Hecker, Deepali Kurundkar, Ashish Kurundkar, Hui Liu, Tong-Huan Jin, Leena Desai, Karen Bernard, et Victor J Thannickal. 2013c. « Inhibition of Mechanosensitive Signaling in Myofibroblasts Ameliorates Experimental Pulmonary Fibrosis ». *The Journal of Clinical Investigation* 123 (3): 1096-1108. https://doi.org/10.1172/JCI66700.

Zhu, Y., C. Soderblom, V. Krishnan, J. Ashbaugh, J. R. Bethea, et J. K. Lee. 2015. « Hematogenous Macrophage Depletion Reduces the Fibrotic Scar and Increases Axonal Growth after Spinal Cord Injury ». *Neurobiology of Disease* 74 (février): 114-25. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.10.024.

Zihni, Ceniz, Clare Mills, Karl Matter, et Maria S. Balda. 2016. « Tight Junctions: From Simple Barriers to Multifunctional Molecular Gates ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 17 (9): 564-80. https://doi.org/10.1038/nrm.2016.80.

Zuidscherwoude, Malou, Hannah L.H. Green, et Steven G. Thomas. 2018. « Formin proteins in megakaryocytes and platelets: regulation of actin and microtubule dynamics ». *Platelets* 30 (1): 23-30. https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1481937.

Coralie MERGAULT

Ciblage de régulateurs du cytosquelette d'actine dans le traitement de la fibrose pulmonaire

Résumé

La fibrose est un processus pathologique caractérisé par l'accumulation de matrice extracellulaire conduisant à la déformation physique et à la perte de la fonctionnalité d'un tissu. La différenciation des cellules mésenchymateuses, incluant l'expression accrue de COL1 et d'ACTA2, est un mécanisme majeur de la fibrose pulmonaire. Notre hypothèse est que le cytosquelette d'actine joue un rôle important dans la différenciation des cellules mésenchymateuses au cours de la fibrose pulmonaire, et que ces régulateurs moléculaires représentent une cible thérapeutique accessible. Pour explorer cette hypothèse, trois axes de recherche ont été étudiés. Tout d'abord, nous avons montré 1) que le complexe Arp2/3, acteur de la polymérisation branchée de l'actine, était surexprimé par les fibroblastes pulmonaires exposés au TGFβ1 et dans le poumon de souris exposées à la bléomycine, 2) que l'inhibition du complexe Arp2/3 par le CK666 et des siRNA ciblant *ARP2* et *ARP3* prévenait l'expression de COL1 et ACTA2 dans les fibroblastes pulmonaires *in vitro,* à l'état basal et après stimulation par le TGFβ1 et 3) que le CK666 prévenait la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris. Ensuite, nous avons montré que la répression de LIMCH1, un composant des fibres de stress, réduisait l'expression basale de COL1 et ACTA2 dans les fibroblastes pulmonaires. L'expression de LIMCH1 par les fibroblastes n'était pas modulée *in vitro* par des agents pro ou antifibrosants. Enfin, nous avons montré la faisabilité de l'administration trachéale d'ASO de 3^{e} génération pour réprimer l'expression de l'ARNm *Limch1* dans le poumon des souris exposées à la bléomycine. L'index thérapeutique des ASO était étroit.

Mots clés : Fibrose pulmonaire, cytosquelette d'actine, oligonucléotides antisens.

Résumé en anglais

Fibrosis is a disease process characterized by buildup of extracellular matrix leading to physical deformation and loss of function of tissue. Profibrotic differentiation of lung mesenchymal cells, including increased expression of COL1 and ACTA2 is a major mechanism of pulmonary fibrosis. Our hypothesis is that the actin cytoskeleton plays an important role driving differentiation of mesenchymal cells during pulmonary fibrosis, and that its molecular regulators can be targeted therapeutically. We focused on the Arp2/3 complex, the main driver of branched actin polymerization, and LIMCH1, a component of actin stress fibers. First, we showed 1) that the Arp2/3 complex was overexpressed by pulmonary fibroblasts treated with TGFβ1 and in the lungs of bleomycin-exposed mice, 2) that inhibition of the Arp2/3 complex with CK666 and with siRNAs targeting *ARP2* and *ARP3* reduced the expression of COL1 and ACTA2 in pulmonary fibroblasts *in vitro*, at baseline and after stimulation with TGFβ1 and 3) that CK666 prevented bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. Next, we showed that repression of LIMCH1 reduced basal expression of COL1 and ACTA2 in lung fibroblasts. LIMCH1 expression by fibroblasts was not modulated *in vitro* by pro- or antifibrotic agents. Finally, we showed that tracheal delivery of 3rd generation ASO repressed *Limch1* mRNA expression in the lungs of bleomycin-treated mice. The therapeutic index of airway-delivered ASOs was narrow.

Key words : Pulmonary fibrosis, actin cytoskeleton, antisens oligonucleotides.