

TITRE DU PROJET (limité chacun à 255 caractères) Rôle d'HSPB1 et d'HSPB5 dans la composition des vésicules extracellulaires : implication dans les stratégies diagnostiques et thérapeutiques de la fibrose pulmonaire.

1) Renseignements administratifs sur la direction de thèse¹ (1 page maximum) :

Directeur de thèse HDR :

Nom : Bonniaud

Prénom : Philippe

Section CNU : 51.01

Grade : PU-PH

HDR : Date de soutenance 09/11/2006 Discipline : Pneumologie

L'HDR devra être soutenue, ou sa soutenance autorisée, au moment du dépôt du présent projet.

Coordonnées (adresse, courriel, téléphone) : CHU de Dijon, 14, rue Gaffarel. 21000 Dijon
philippe.bonniaud@chu-dijon.fr / 03 80 39 32 84

Unité d'appartenance (intitulé, label, n°, directeur) : INSERM U1231 (directeur Pr François Ghiringhelli) – Equipe HSP-Pathies (directrice Dr Carmen Garrido)

Co-directeur de thèse éventuel :

Nom : Beltramo

Prénom : Guillaume

Section CNU : 51.01

Grade : MCU-PH

HDR : non ☒ ; oui ☐ Date de soutenance..... Discipline :

Coordonnées (adresse, courriel, téléphone) : CHU de Dijon, 14, rue Gaffarel. 21000 Dijon.
guillaume.beltramo@chu-dijon.fr

Unité d'appartenance (intitulé, label, n°, directeur) : INSERM U1231 (directeur Pr François Ghiringhelli) – Equipe HSP-Pathies (directrice Dr Carmen Garrido)

2) Descriptif du projet de thèse (devra inclure les rubriques suivantes) :

- nom et label de l'unité de recherche (ainsi que l'équipe interne s'il y a lieu) : **UMR 1231 Inserm-Université de Bourgogne, Equipe HSP-Pathies (responsable Dr C Garrido)**
- localisation : **UFR Sciences de Santé, 7 Bd Jeanne d'Arc 21079 Dijon Cedex**
- nom du directeur de thèse : **Pr Philippe Bonniaud**
- nom du co-directeur de thèse : **Dr Guillaume Beltramo**
- adresse courriel du contact scientifique : **philippe.bonniaud@chu-dijon.fr**

¹ ATTENTION : selon l'article 16 de l'arrêté du 25 mai 2016, le total d'encadrants ne peut pas dépasser 2, sauf si l'un des encadrants appartient au monde socio-économique, qui peut venir en sus, ou en cas de co-tutelle; Le décompte des co-encadrements se fera au prorata du nombre d'encadrants : 1 pour 1 encadrant, ½ pour deux encadrants.

- titre du projet : **Rôle d'HSPB1 et de HSPB5 dans la composition des vésicules extracellulaires : implication dans les stratégies diagnostiques et thérapeutiques de la fibrose pulmonaire.**

- description du projet (2 pages maximum)

La **fibrose pulmonaire idiopathique (FPI)** est une maladie pulmonaire chronique, progressive et létale avec une médiane de survie de 3-5 ans après diagnostic [1]. Les traitements approuvés pour la FPI permettent de ralentir la maladie mais n'arrêtent pas sa progression. Actuellement, il n'existe pas de biomarqueurs permettant de prédire ni de suivre la progression du processus fibrosant. Bien que la physiopathologie de la FPI reste largement incomprise, le modèle d'étude actuel repose sur une communication intercellulaire anormale entre les types cellulaires constituant le poumon [2, 3]. Des lésions de l'épithélium alvéolaire induiraient une activation anormale de ces cellules, conduisant à une dérégulation locale du système immunitaire et à l'activation de (myo)fibroblastes. Ces derniers sont des acteurs clés de la fibrose, responsables de la production d'une matrice extracellulaire anormale caractérisant la fibrose [2].

Parmi les mécanismes de la communication intercellulaire dérégulés pendant la fibrose pulmonaire, l'équipe du Pr Bonniaud étudie les **vésicules extracellulaires** (ou *Extracellular Vesicles*, **EVs**). Les EVs, qui incluent les exosomes, sont des nanovésicules lipidiques sécrétées par toutes les cellules. De taille comprise entre 50 à 500 nm de diamètre, elles contiennent des protéines, des acides nucléiques et des lipides qui sont transportés vers une cellule cible [4]. Le rôle des EVs dans les maladies pulmonaires chroniques et la fibrose pulmonaire est un domaine actif de recherche [5]. Nous avons montré que des EVs s'accumulent dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire (LBA) de patients avec FPI et dans les modèles animaux de fibrose pulmonaire [6]. Fonctionnellement, ces EVs exacerbent les mécanismes de la fibrose [7, 8]. Leur profil protéomique particulier révèle un enrichissement en protéines appartenant aux voies de signalisation WNT/ β -caténine, ou liées à l'organisation de la matrice extracellulaire et au processus de cicatrisation des plaies [7]. Nous étudions l'intérêt des EVs comme source de biomarqueurs d'efficacité des traitements de la fibrose.

Les **protéines de choc thermique** (ou *Heat Shock Proteins*, **HSPs**) sont des protéines chaperonnes produites par les cellules en situation de stress (hypoxie, inflammation, etc...). Dans la FPI, plusieurs HSPs sont surexprimées et régulent la voie de signalisation pro-fibrosante du TGF- β 1, la stabilisation du facteur de transcription Snail ou la synthèse de collagène [9-12]. Nous avons montré dans des modèles murins de fibrose pulmonaire, que l'inhibition des petites HSPs, HSPB1 et HSPB5, permet une diminution de la fibrose [10, 12, 13]. Nous avons breveté l'action anti-fibrosante de l'inhibition d'HSPB1 (US2012294846) et d'HSPB5 (EP 24305745.2). Les HSPs peuvent s'associer à des lipides structuraux et avoir un rôle de régulation des membranes cellulaires [14]. De plus, plusieurs études montrent qu'HSPB5 est liée à la génération des EVs [15-18] et nos données préliminaires suggèrent que la délétion d'HSPB5 entraînerait une diminution de la sécrétion des EVs dans le LBA de souris traitées par bléomycine.

Hypothèse et objectifs du projet : Notre hypothèse de travail est que les cellules participant au processus de fibrose pulmonaire sécrètent des EVs avec une activité pro-fibrotique. Ces vésicules transportent des médiateurs spécifiques et sont à ce titre, des cibles thérapeutiques et marqueurs pronostiques de choix. Leur synthèse et leur sécrétion sont régulées et la modulation de HSPB1 et HSPB5 pourraient en limiter les effets. A travers ce projet, nous voulons tester le potentiel des EVs comme source de biomarqueurs de l'efficacité de thérapies anti-fibrosantes ciblant les petites HSP via 4 objectifs comme décrit ci-dessous.

Objectif 1. Caractériser l'impact de la modulation d'HSPB5 ou d'HSPB1 dans la composition des EVs lors de la fibrose pulmonaire (0-12 mois). Des souris avec inhibition d'HSPB1 (injection d'OGX-427) ou HSPB5 (SV129 délétés pour le gène *Hspb5*), et des souris contrôles (injection d'ASO contrôle, souris SV129 wildtype), seront exposées par voie intra-trachéale à la bléomycine pour induire une fibrose pulmonaire [19]. Nous étudierons la sécrétion d'EVs dans les LBA des souris à différents temps après injection de bléomycine correspondant aux phases d'inflammation (J7), de fibrose (J14) et de résolution

(J28). Chaque souris aura également une mesure de fonction pulmonaire au moment de la récupération du LBA. Les EVs seront isolées des LBA suivant des protocoles du laboratoire [6, 20] et seront caractérisées par quantification - Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) - et protéomique en spectrométrie de masse. En parallèle, des fibroblastes MLg, avec ou sans surexpression stable d'HSPB5 ou d'HSPB1, seront cultivés en présence ou non de la cytokine pro-fibrotique TGF- β 1. Les milieux conditionnés de ces cellules seront collectés pour analyse de la sécrétion d'EVs comme décrit pour les LBA.

Objectif 2. Identifier la communication cellulaire médiée par les EVs sécrétées par les cellules surexprimant HSPB5 ou HSPB1 (0-24 mois). Nous avons des données montrant que les fibroblastes sont les sécréteurs majeurs des EVs et qu'ils surexpriment HSPB1 et HSPB5 lors de la fibrose pulmonaire. Nous utiliserons les fibroblastes MLg avec surexpression stable d'HSPB5 ou d'HSPB1. Ces cellules seront utilisées pour produire des EVs qui seront marquées par fluorescence et injectées par voie intra-trachéale à des souris naïves. Le tissu pulmonaire de ces souris sera étudié par histologie et cytométrie en flux avec des marqueurs spécifiques des types cellulaires majeurs du poumon. Une étude de biodistribution à plus long terme sera réalisée après marquage des EVs avec un traceur radioactif ainsi qu'un suivi du devenir des EVs de façon longitudinale par imagerie *in vivo*.

Objectif 3. Etudier l'importance d'HSPB5 et d'HSPB1 dans les effets fonctionnels des EVs (6-28 mois). Nous utiliserons des EVs isolées de LBA de souris *Hspb5*^{+/+} ou *Hspb5*^{-/-}, ou de souris injectées avec l'OGX-427 ou un ASO contrôle, et exposées à la bléomycine. Ces EVs seront utilisées sur plusieurs modèles expérimentaux. *In vivo* dans le modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, les EVs seront injectées par voie intra-trachéale de J10 à J16 et le développement de la fibrose sera analysé à J21 par plusieurs techniques : histologie, dosage de collagène, séquençage d'ARN à cellule unique (single cell RNA sequencing). Les résultats de ces expériences seront confirmés en utilisant des EVs de fibroblastes +/- surexpression d'HSPB5 sur des modèles expérimentaux humains dérivés de patients : fibroblastes pulmonaires primaires humains, tranches de tissu pulmonaire (*precision-cut lung slices*, PCLS) cultivées *ex vivo* et organoïdes.

Objectif 4. Développer des biomarqueurs compagnons d'une thérapie anti-fibrosante ciblant HSPB1 et HSPB5 (12-30 mois). Nous utiliserons les données générées dans les objectifs précédents (protéines dans les EVs régulées par HSPB1 ou HSPB5, voie(s) de signalisation activée(s) par des EVs dans des cellules cibles). La variation de ces paramètres sera étudiée dans plusieurs modèles murins de fibrose pulmonaire (bléomycine, surexpression de TGF- β). Ces souris recevront ou non les inhibiteurs d'HSPB1 ou d'HSPB5, seuls ou en combinaison avec le nintédanib, un des deux traitements validés de la FPI.

Ce projet s'inscrit dans l'axe de recherche développé par l'équipe sur le rôle des vésicules extracellulaires dans la fibrose pulmonaire. Ce travail sera collaboratif entre le laboratoire HSP-Pathies de l'Inserm 1231, l'Institut Universitaire du Poumon Dijon-Bourgogne et le Centre de Référence des Maladies Pulmonaires Rares de l'Adulte du CHU de Dijon. Les infrastructures pour les modèles animaux et *ex vivo*, ainsi que pour l'isolation/caractérisation des EVs sont opérationnelles dans l'U1231. Les analyses protéomiques seront réalisées en collaboration avec le Pr E Boncoeur (CEA Grenoble), le scRNAseq et l'imagerie *in vivo* avec les plateformes de génomique haut-débit (Dr R Boidot) et d'imagerie et radiothérapie précliniques (Dr PS Bellaye, Dr B Collin) du CGFL à Dijon. Les modèles cellulaires dérivés de patients (fibroblastes humains primaires, PCLS et organoïdes) seront réalisés en collaboration avec le Pr PB Pages (CHU Dijon) et le Pr M Lehmann (University of Marburg, Allemagne).

Références: **1)** Lederer, D J, *et al.*, N Engl J Med, 2018. PMID 29742380. **2)** Martinez, F J, *et al.*, Nat Rev Dis Primers, 2017. PMID 29052582. **3)** Burgy, O, *et al.*, Curr Opin Pulm Med, 2020. PMID 32769673. **4)** van Niel, G, *et al.*, Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. PMID 29339798. **5)** Burgy, O, *et al.*, J Thorac Dis, 2018. PMID 30310685. **6)** Martin-Medina, A, *et al.*, Am J Respir Crit Care Med, 2018. PMID 30044642. **7)** Burgy, O, *et al.*, JCI Insight, 2024. PMID 39315549. **8)** Parimon, T, *et al.*, JCI Insight, 2019. PMID 31393853. **9)** Bellaye, P S, *et al.*, Pharmacol Ther, 2014. PMID 24582969. **10)** Bellaye, P S, *et al.*, J Pathol, 2014. PMID 24307592. **11)** Bonniaud, P, *et al.*, Eur Respir J, 2017. PMID 28232414. **12)** Wettstein, G, *et al.*, FASEB J, 2013. PMID 23288928. **13)** Boutanquoi, P M, *et al.*, Br J Pharmacol, 2025. PMID 40033950. **14)** Balogi, Z, *et al.*, Prog Lipid Res, 2019. PMID 30710597. **15)**

Bhat, S P, *et al.*, Commun Integr Biol, 2011. PMID 22446542. **16)** Kowal, J, *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. PMID 26858453. **17)** Sreekumar, P G, *et al.*, PLoS One, 2010. PMID 20949024. **18)** Reddy, V S, *et al.*, Cell Stress Chaperones, 2018. PMID 29086335. **19)** Burgy, O, *et al.*, Sci Transl Med, 2016. PMID 26888428. **20)** Coughlan, C, *et al.*, Curr Protoc Cell Biol, 2020. PMID 32633898.

- Financement du projet – partie Recherche (montants acquis, type de contrat)

Financement ANR-25-CE17-3558 (450K€)

Financement dans le cadre du Centre de Référence Constitutif des Maladies Pulmonaires rares de l'Adultes (un financement de 20 000 €/ an sera dédié aux frais de fonctionnement du projet).

- connaissances et compétences requises

Maitrise de la culture cellulaire et des analyses de biologie cellulaire et moléculaire modernes.

Pratique de l'expérimentation animale (souris).

Compétences d'organisation, rigueur et communication.

Notions sur les processus de fibrogenèse/cicatrisation et notions sur l'anatomie pulmonaire.

Notions d'informatique.

Résumé en français (limité chacun à 1800 caractères)

La fibrose pulmonaire (FP) idiopathique est une maladie progressive avec une médiane de survie de 3-5 ans. Les options thérapeutiques permettent uniquement de ralentir la maladie. Il n'existe pas de biomarqueurs pour suivre la progression de la fibrose. La communication intercellulaire, comme celle médiée par les vésicules extracellulaires (EVs), est un mécanisme majeur de la fibrose, sa dérégulation étant clé dans la FP. Notre équipe développe des inhibiteurs des petites HSP, HSPB1 et HSPB5, impliquées dans la FP.

Objectif : Tester le potentiel des EVs comme source de biomarqueurs de l'efficacité d'une thérapie anti-fibrosante ciblant HSPB5 ou HSPB1.

Méthodes : Des EVs seront collectées à partir 1) de liquides broncho-alvéolaires de souris soumises à l'inhibition des petites HSP (injections d'OGX-427, souris Hspb5-/-) et à un traitement par bléomycine et 2) de cellules surexprimant HSPB5 ou HSPB1. Ces vésicules seront caractérisées par quantification et analyse protéomique. Elles seront marquées, injectées à des souris avec FP induite, et suivies *in vivo*. Les effets fonctionnels de ces vésicules seront étudiés *in vivo* par analyse transcriptomique haut débit et avec des modèles cellulaires dérivés de patients (fibroblastes pulmonaires, tissus pulmonaires cultivés *ex vivo*, organoïdes). Les paramètres identifiés (effets fonctionnels des EVs, voies de signalisation, médiateurs transportés par les EVs etc) seront recherchés dans des modèles expérimentaux de FP après injection d'inhibiteurs d'HSPB1 ou d'HSPB5.

Résultats attendus : Nous pensons que ces travaux permettront d'identifier des marqueurs (biomarqueurs, mécanismes) de l'effet anti-fibrosant des inhibiteurs d'HSPB1 ou d'HSPB5 développés dans l'équipe et d'ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques.

Résumé en anglais (limité à 1800 caractères)

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive condition of the lung with a median survival of 3 to 5 years. Therapeutic options are limited and only slow down disease progression. The field lacks biomarkers to monitor IPF progression. Inter-cellular communication, such as the one mediated by extracellular vesicles (EVs), is a seminal mechanism of fibrosis. Its dysregulation is an IPF hallmark. Our lab has developed inhibitors of small HSP, HSPB1 and HSPB5 (which are involved in FP), with anti-fibrotic potential.

Our aim is to test the potential of EVs as source of biomarkers to assess the efficacy of anti-fibrotic therapies targeting HSPB1 or HSPB5.

Methods: EVs will be collected from 1) broncho-alveolar lavage from wild-type or Hspb5 deficient mice with or without bleomycin-induced pulmonary fibrosis and 2) cells overexpressing HSPB1 or HSPB5. These vesicles will be characterized by quantification and proteomic analysis. EVs will be labelled with fluorescence, injected back into mice with pulmonary fibrosis or controls and their fate will be tracked *in vivo*. Functional effects of these EVs will be studied *in vivo* by single cell RNA sequencing as well as with cellular *in vitro* models using patients-derived samples (lung fibroblasts, *ex vivo* cultured pulmonary tissue, organoids). Identified parameters (functional effects, activated signaling, mediators transported by EVs) will be investigated in experimental *in vivo* models after injection of our HSPB1 or HSPB5 inhibitor.

Expected results: We believe this work would identify biomarkers or/and mechanisms involved in the anti-fibrotic effects of our HSPB1 or HSPB5 inhibitor. The data generated would lead to the development of a prognostic tool for pulmonary fibrosis and to potential therapeutic approaches to IPF.

Préciser le domaine de compétence dans la liste ci-dessous :

- Santé, médecine humaine, vétérinaire

Indiquez quelques mots clés concernant votre sujet) :

Fibrose pulmonaire, Exosomes, Vésicules Extracellulaires, Heat Shock Proteins