

UNIVERSITÉ PARIS 13 – VILLETANEUSE BOBIGNY SAINT-DENIS

ÉCOLE DOCTORALE GALILÉE
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

THÈSE DE DOCTORAT DE BIOLOGIE

Menée au sein du laboratoire EA2363 'Hypoxie et Poumon'
et soutenue publiquement le 17 décembre 2018 par

Eva Delbrel

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR

**IMPLICATION DE L'HYPOXIE ET DU STRESS DU RÉTICULUM
ENDOPLASMIQUE DANS L'ALTÉRATION PHÉNOTYPIQUE DES
CELLULES ÉPITHÉLIALES ALVÉOLAIRES**

Directeur de recherches : **Pr Carole PLANÈS**
Co-directeur de recherches : **Dr Emilie BONCOEUR**

Membres du jury :

Président	Pr Dominique LEDOUX	Université Paris XIII
Rapporteur	Pr Emmanuelle BROCHIERO	Université de Montréal
Rapporteur	Dr Loïc GUILLOT	Université Paris VI
Examineur	Pr Bernard MAITRE	Université Paris XII
Examineur	Dr Arnaud MAILLEUX	Université Paris V
Directeur	Pr Carole PLANÈS	Hôpital Avicenne, Université Paris XIII
Co-directeur	Dr Emilie BONCOEUR	Université Paris XIII

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chacun des membres du jury d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer ces travaux de thèse : le professeur Emmanuelle Brochiero et le docteur Loïc Guillot, le professeur Bernard Maitre et le docteur Arnaud Mailleux ainsi que le professeur Dominique Ledoux.

Je tiens également à remercier le *Fonds de Recherche en Santé Respiratoire*, l'organisme qui a financé l'ensemble du projet de recherche réalisé au cours de ces 3 ans, et qui par son soutien apporté aux chercheurs et médecins du domaine respiratoire, fait grandement et sûrement avancer la Recherche pulmonaire.

Un grand merci à *THELLIE*, et plus particulièrement à Jean-Christophe Descieux, d'avoir financé l'initiation d'un projet annexe qui permettra, j'en suis sûre, d'aboutir à une avancé certaine dans le pronostic de la FPI. Vous favorisez, avec une grande conviction et beaucoup d'humilité (et peut être même sans vous en rendre réellement compte...), la visibilité du monde de la Recherche française auprès du grand public ainsi que sa valorisation. Merci à *chacun des contributeurs* d'avoir porté un si grand intérêt au projet !

Au professeur Carole Planès, merci de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire, merci d'avoir, au cours de ces 3 années, toujours fait preuve de ce pragmatisme bienveillant si rassurant, qui a permis de redresser cette ligne de conduite souvent un peu oubliée. Merci pour votre patience.

Il m'est malheureusement obligatoire de remercier mon encadrante, qui durant ce doctorat déjà très douloureux, a été un vrai tyran... C'est souvent ce que pensent les doctorants à l'issue de leur 3 années de doctorat. Emilie, je peux sans aucun doute assurer que scientifiquement, intellectuellement et humainement, je n'aurai pu être mieux encadrée. Vous êtes brillante (du peu de référence que j'ai certes, mais quand même !) et êtes un excellent manager. Merci pour toutes ces choses que vous m'avez enseignées sur le monde de la Recherche. Merci d'avoir fait de ce doctorat, un vrai bonheur, et presque un jeu. Merci de m'avoir faite évoluer comme vous l'avez fait.

Je remercie les nombreux étudiants ayant âprement participé au projet de recherche, Adnan Naguez, Geoffrey Tremblais, Rabab Label, et Abdoulaye Soumare. Mon petit Abdou, ta force de caractère et ton amour pour la Recherche te mènerons là où tu veux vraiment aller, ne lâche pas.

Chers membres titulaires du laboratoire EA2363, le climat convivial, chaleureux et protecteur que vous avez instauré permet aux étudiants de s'épanouir à leur convenance. Merci

à chacun de vous. Merci Nicolas Voituron pour votre bonne humeur et vos conseils toujours avisés dans de nombreux domaines, Merci Valérie Besnard pour vos questions toujours pertinentes qui poussent sans cesse à se remettre en question et permettent de progresser, Merci Patricia Quidu pour le ravitaillement en caramel beurre salé, Nutella® et autres gourmandises toujours sucrées, tant essentielles à la survie d'un thésard, Merci Nicolas Dard de m'avoir appris à relativiser, Merci Professeur Richalet d'avoir mangé tout mon Nutella® enfin, et non sans importance, Merci à Dominique Marchant, pour votre calme et votre sérénité à toute épreuve, qui me réconfortaient jusque dans mes terreurs nocturnes.

Merci à tous les protagonistes de l'hôpital Avicenne ayant participé de près ou de loin à la concrétisation de ces travaux de recherche, et plus particulièrement au Pr Jean-François Bernaudin, au Dr Yurdagül Uzunhan, au Dr Thomas Gille...

Les loulous... Abdallah Fergani, Liasmine Haine, Céline-Hivda Yégen, Florence Jeny, Simon Chauveau, Florine Jeton, Merci de m'avoir supportée, encouragée, grondée, restaurée, rassurée... Abdallah, chouchou, celui dont l'arrivée tous les matins me mettait du baume au cœur, éblouissant par sa chevelure parfaite et ses yeux marrons couleur Nutella®. Merci pour ton soutien quotidien. Je te sacre « testeur officiel de pancakes » de la pancakerie **CHOPHIF**. Tu auras droit à 2% de remise sur les brunches du lundi entre 16h et 16h15. Liasmine et Céline, les « twins », Merci d'avoir toujours rigolé à mes blagues, qui, il faut être honnête sont à 96,2% pourries. Florence, Merci pour ces discussions scientifiques, pour ces représentations schématiques toujours ~~(pas)~~ très claires mais aussi pour ces nombreux coups échangés lors de nos moments de « craquage » total, tu as été une compagne de bureau parfaite !

Je tiens également à remercier la fine équipe d'étudiants du laboratoire U1148, Kévin Bassand, Amena Butt, Nesrine Mouhoubi, Hadjer Mamoune. Aména, tu es incroyablement forte et es une véritable source d'inspiration. Mon petit Kévinou, garde cette passion pour la recherche scientifique et pour toutes ces causes sociales que tu défends. Par ailleurs, je te prie d'accepter mes excuses, pour ces nombreux « oui oui, je t'envoie ça tout à l'heure ... ». Vous êtes juste géniaux !

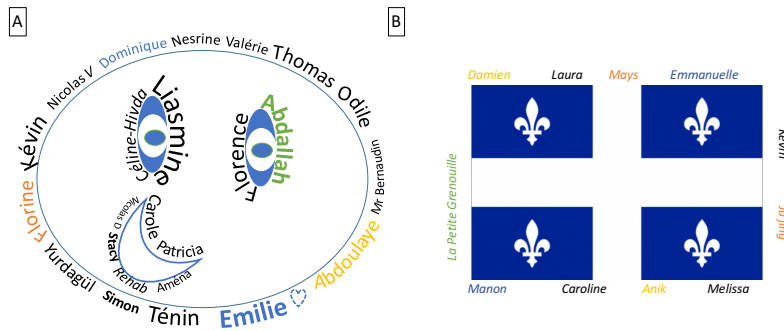


Figure 0 : représentation iconographique des remerciements. Les personnes du laboratoire (A). Les fifous de l'équipe du professeur Emmanuelle Brochiero et autres protagonistes du Québec. Merci professeur Brochiero de m'avoir si gentiment accueillie au sein de votre superbe et très dynamique équipe. Merci à Mays, Laura, Damien, Caroline, Anik, Manon et Mélissa d'avoir accepté ma présence durant ces 3 superbes mois... (B).

Je tiens enfin à remercier ma famille et mes potes qui tout au long de ces années, m'ont TOUJOURS soutenue quelles que fussent les voies que j'eusse choisies d'entreprendre, et ont souvent fait semblant de comprendre les projets que je défendais (vraiment très mal, je peux vous le dire maintenant). Vous êtes des warriors !

À Maman et Papa

À Tatie parce que « *quand on veut, on peut* »

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

4-PBA : 4-phenylbutyrate	PHD : prolyl Hydroxylase
AARE : amino acid response element	PI : pneumocytes de type I
AQP : aquaporine	PIDC : pneumopathies Interstitielles diffuses chroniques
ARNT : aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	PIC : pneumopathie interstitielle commune
ATF : activating transcription factor	PII : pneumocytes de type II
BAPTA : acide 1,2-bis(2 aminophénoxy)éthane N,N,N',N'-tétraacétique	IL- : interleukine
BH : Bcl-2 homology domain	KGF : keratinocyte growth factor
bHLH : basic helix loop helix	MAPK : mitogen-activated protein kinases
Ca ²⁺ : calcium	MDA : malonaldéhyde
CBP/p300 CREB-binding protein/E1A Binding Protein P300	MEC : matrice extracellulaire
CHOP : C/EBP homologous protein	MMP : matrix metalloprotease
CEA : cellules épithéliales alvéolaires	NRF2 : nuclear factor-like2
CFTR : cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	PERK : PERKR-like er kinase
CNG : cyclic nucleotide-gated ion channel	PDI : protein disulfide isomerase
Cx : connexine	pVHL : Von Hippel-Lindau protein
CXCL8 : chemokine (C-X-C motif) ligand-8	RE : réticulum endoplasmique
CXCR1 : chemokine (C-X-C Motif) Receptor 1	ROS : reactive oxygen species
DISC : death inducing signaling complex	SMA : smooth muscle actin
EGF : epidermal growth factor	SOD : superoxide dismutase
ENaC : epithelial sodium (Na ⁺) channel	SP- : surfactant protein
ERSE : endoplasmic reticulum stress response element	SRP : signal recognition particle
ERO-1 : endoplasmic reticulum oxydoreductase 1	SUMO : small ubiquitin-related modifier
Fe : fer	TEM : transition épithélio-mésenchymateuse
FIH : factor inhibiting HIF	TERC : telomerase rna component
FLIP : FADD-like IL-1 β -converting enzyme inhibitory protein	TERT : telomerase reverse transcriptase
FPI : fibrose pulmonaire idiopathique	TGF- β : transforming growth factor-beta
GPX : glutathion peroxydase	TLR : toll-like receptor
GRP : glucose-related protein	TNF- α : tumor necrosis factor-alpha
HDAC : histone désacétylase	TOLLIP : TOLL interacting protein
HGF : hepatocyte growth factor	TRAIL : tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand
HIF : hypoxia-inducible factor	TTF1 : tyroid transcription factor
HRE : hypoxia response element	TUNEL : terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
IRE1 : inositol requiring enzyme	UPR : unfolded protein response
IP ₃ : inositol 1,4,5 tri-phosphate	XO : xanthine oxidase
MUC5B : Mucin 5B	XBP1 : X-box binding protein
NAC : N-acétylcystéine	ZEB : Zinc finger E-box-binding homeobox
NAD : N-terminal activation domain	ZO : zonula occludens
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide	
NFkb : nuclear factor kappa B	
ODDD : oxygen-dependant degradation domain	
PAI-1 : plasminogen activator inhibitor-1	
PAS : PER-ARNT-SIM	
PDGF : platelet derived growth factor	
PGE2 : prostaglandine E2	

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	1
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	5
SOMMAIRE	6
LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES TABLES	10
RÉSUMÉ	11
ABSTRACT	12
INTRODUCTION	13
I. Physiologie de l'épithélium alvéolaire	13
1. Les alvéoles	13
2. L'épithélium alvéolaire	14
a) Les pneumocytes de type I	14
b) Les pneumocytes de type II	15
c) Les jonctions cellulaires	15
3. Les fonctions de l'épithélium alvéolaire	17
a) L'hématose	17
b) La production de surfactant	18
c) Maintien de l'équilibre des fluides alvéolaires	20
d) Rôle dans l'homéostasie tissulaire	21
i. L'agression	21
ii. La phase inflammatoire	22
° Le rôle du surfactant dans la défense de l'hôte	22
° La production de cytokines pro-inflammatoires par les pneumocytes de type II	23
iii. La ré-épithélialisation	25
° Une nouvelle matrice produite par les fibroblastes	25
° La prolifération des pneumocytes de type II	26
° La trans-différenciation des PII en PI	26
° Le rétrocontrôle de l'activité des fibroblastes par les pneumocytes de type II	29
II. La fibrose pulmonaire idiopathique : une maladie liée à une réparation aberrante de l'épithélium alvéolaire	29
1. Histoire et classification de la fibrose pulmonaire idiopathique	29
2. Epidémiologie de la fibrose pulmonaire idiopathique	30
3. Diagnostic de la fibrose pulmonaire idiopathique	30
4. Traitements actuels de la FPI	32
5. Les facteurs de susceptibilité : facteurs environnementaux et génétiques	35
a) Facteurs environnementaux	35
b) Prédisposition génétique	35
6. La physiopathologie de la fibrose pulmonaire idiopathique	36
a) La dérégulation du dialogue entre pneumocytes de type II et fibroblastes	37
b) L'apoptose et la transition épithélio-mésenchymateuse des pneumocytes de type II dans la FPI	38
i. L'apoptose : généralités	39
° La voie intrinsèque	39
° La voie extrinsèque	40
ii. L'apoptose des pneumocytes de type II dans la FPI	41
iii. La transition épithélio-mésenchymateuse : généralités	43

° Les modifications phénotypiques lors de la transition épithélio-mésenchymateuse	44
° Les facteurs de transcription de la transition épithélio-mésenchymateuse	45
° La transition épithélio-mésenchymateuse au cours du processus de réparation et de fibrose	46
iv. La TEM des pneumocytes de type II dans la FPI	50
° Le TGF- β et Wnt : principales voies impliquées dans la TEM des pneumocytes de type II	50
° Le rôle de la matrice extracellulaire dans la TEM des pneumocytes de type II	52
III. Le stress du réticulum endoplasmique dans la FPI : un rôle crucial dans la dysfonction des pneumocytes de type II	52
1. Le réticulum endoplasmique : généralités	52
a) La biosynthèse protéique et son contrôle	53
i. La prise en charge des protéines néo-synthétisées	53
° Les protéines cytosoliques	54
ii. Repliement protéique au sein du RE	55
° Les protéines chaperonnes	55
° La formation des ponts disulfures	56
iii. Le système de dégradation associé au RE	57
b) Le stockage du calcium et la régulation de son flux	58
2. Le stress du RE	61
a) Les senseurs	61
b) Les voies de l'UPR	62
i. La voie PERK : régulation de la synthèse protéique <i>de novo</i> et action antioxydante	62
ii. La voie ATF6 α : désengorgement du RE	63
iii. La voie IRE1 : conservation de l'UPR	64
3. Le stress du RE dans la dysfonction des PII dans la FPI	64
a) Le stress du RE dans l'apoptose	65
i. Le rôle de CHOP dans l'apoptose	66
° Description générale de CHOP	66
° La régulation de CHOP	67
° Le rôle de CHOP dans l'induction de l'apoptose	68
ii. Rôle du stress du RE dans l'apoptose des pneumocytes de type II dans la FPI	69
b) Le stress du RE dans la TEM	70
i. Rôle du stress du RE dans la TEM des pneumocytes de type II dans la FPI	71
IV. L'hypoxie alvéolaire : un rôle dans la pathogenèse de la FPI ?	71
1. Définition et l'hypoxie alvéolaire dans la FPI	71
2. Les facteurs inductibles à l'hypoxie	73
a) La régulation de HIF- α	75
i. Régulation de HIF- α par les PHDs	75
ii. Régulation de HIF- α par FIH	76
iii. Régulation du profil d'expression de HIF-1 ou HIF-2	77
iv. Régulation de HIF- α par la voie non canonique	77
b) L'hypoxie et HIF-1 : rôle dans la dysfonction des pneumocytes de type II	79
i. L'hypoxie et HIF-1 sur la production de ROS	79
ii. L'hypoxie, HIF-1 et apoptose des pneumocytes de type II	80
iii. L'hypoxie, HIF-1 et la TEM des pneumocytes de type II	80
c) L'hypoxie : inducteur d'un stress du RE	81
HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS GÉNÉRAUX DU TRAVAIL DE THÈSE	83
MATÉRIELS ET MÉTHODES	84
1. Modèle de rat exposé à une hypoxie aigue	84
2. Prélèvement humain	84
3. Immunohistochimie	85
a) Préparation des coupes	85
b) Protocole d'immunohistochimie suivie d'une révélation dans le visible	85
c) Protocole d'immunohistochimie suivie d'une révélation en fluorescence	86
4. Etude des lésions d'ADN	87

5.	Culture cellulaire	87
a)	Pneumocytes de type II primaires de rat	87
i.	Isolement des CEAs	87
ii.	Exposition à l'hypoxie et traitements	88
b)	A549	89
6.	Transfection	89
a)	Présentation des plasmides	89
b)	Amplification des plasmides	90
i.	Transfection par électroporation des pneumocytes de type II	91
ii.	Analyse de l'activité des luciférases	91
c)	Stratégie siRNA	92
i.	Hybridation des séquences	92
ii.	Transfection par liposome	92
7.	Analyse de l'expression de protéines par western blotting	93
a)	Extraction et dosage protéique	93
b)	Western blotting	93
8.	Analyse de l'expression de gènes par RT-qPCR	94
a)	Extraction d'ARN	94
b)	Rétro-transcription	95
c)	PCR quantitative en temps réel	95
9.	Immunocytofluorescence	96
10.	Etude de l'activité des caspases effectrices 3 et 7	97
11.	Analyses statistiques	97

RÉSULTATS **98**

I. Rôle de l'hypoxie et de HIF-1 sur le stress du RE et l'apoptose des pneumocytes de type II **98**

1.	Objectifs de l'étude	98
2.	Résumé des résultats	110
3.	Discussion	115
a)	Choix des modèles <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	115
i.	<i>In vivo</i>	115
ii.	<i>In vitro</i>	116
b)	La régulation des voies de l'UPR et de CHOP en hypoxie	116
i.	Régulation de l'UPR par l'hypoxie	116
ii.	Régulation de CHOP par l'UPR	117
iii.	Régulation de CHOP par HIF-1	118
iv.	Autres régulateurs de l'expression des voies de l'UPR et de CHOP	120
c)	Effet des voies de l'UPR et de CHOP sur l'apoptose des pneumocytes de type II	120
d)	Expression de HIF-1 α et CHOP dans la fibrose pulmonaire	121

II. Implication du stress du RE dans la TEM des pneumocytes de type II induite par l'hypoxie **124**

1.	Objectifs de l'étude	124
2.	Résumé des résultats	146
3.	Discussion	146
a)	Limite du modèle utilisé <i>in vivo</i>	146
b)	Effet d'un stress du RE sur l'induction de la TEM en réponse à l'hypoxie	147
i.	Les voies de l'UPR régulent la TEM des pneumocytes de type II en hypoxie	147
ii.	Le calcium régule l'activation des voies de l'UPR et la TEM des pneumocytes de type II en hypoxie	149
c)	Rôle du stress du RE sur la stabilisation de HIF-1 α	149

CONCLUSION GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES **151**

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES **155**

CURRICULUM VITAE **183**

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1. Représentation schématique simplifiée du poumon distal.</i>	14
<i>Figure 2. Image de la surface d'une alvéole de poumon humain observée en microscopie électronique à balayage.</i>	15
<i>Figure 3. Représentation schématique des jonctions entre deux CEAs et la MEC.</i>	16
<i>Figure 4. Représentation schématique de la diffusion des gaz à travers la barrière alvéolo-capillaire.</i>	18
<i>Figure 5. Représentation simplifiée de la biogenèse du surfactant dans un PII.</i>	19
<i>Figure 6. Représentation simplifiée de la régulation de l'homéostasie liquidienne alvéolaire.</i>	21
<i>Figure 7. Représentation simplifiée des phases induites en réponse à une agression et leur évolution dans le temps.</i>	22
<i>Figure 8. Représentation simplifiée de la réponse pro-inflammatoire régulée par les PII à la suite d'une agression de l'épithélium alvéolaire.</i>	24
<i>Figure 9. Représentation simplifiée de la phase inflammatoire à la suite d'une agression de l'épithélium alvéolaire.</i>	25
<i>Figure 10. Représentation simplifiée du processus de ré-épithélialisation de l'épithélium alvéolaire à la suite d'une agression.</i>	28
<i>Figure 11. Le diagnostic de FPI : l'examen radiologique.</i>	31
<i>Figure 12. Le diagnostic de la FPI : l'examen histologique présentant le profil PIC.</i>	32
<i>Figure 13. Représentation simplifiée des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la FPI.</i>	38
<i>Figure 14. Présentation des facteurs apoptotiques de la voie intrinsèque et leurs interactions.</i>	39
<i>Figure 15. Représentation simplifiée de la voie apoptotique intrinsèque.</i>	40
<i>Figure 16. Représentation simplifiée de la voie apoptotique extrinsèque.</i>	41
<i>Figure 17. Représentation simplifiée des voies apoptotiques induites dans les PII dans la FPI.</i>	43
<i>Figure 18. Représentation de l'évolution de l'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux au cours de la TEM.</i>	44
<i>Figure 19. Schéma présentant les facteurs de transcription de la TEM et leurs cibles.</i>	46
<i>Figure 20. Représentation simplifiée de la voie de signalisation canonique de Wnt impliquée dans la TEM.</i>	48
<i>Figure 21. Représentation des voies de signalisation canonique et non canonique du TGF-β impliquée dans la TEM.</i>	49
<i>Figure 22. Représentation simplifiée des différentes voies conduisant à la TEM de PII dans la FPI.</i>	52
<i>Figure 23. Pourcentage d'articles par année concernant les organelles.</i>	53
<i>Figure 24. Représentation du contrôle du repliement des protéines.</i>	56
<i>Figure 25. La production de ROS dans le RE lors de la formation de ponts disulfures.</i>	57
<i>Figure 26. Présentation des principaux canaux impliqués dans la régulation des flux calciques du RE.</i>	58
<i>Figure 27. Présentation simplifiée du processus de réplétion du RE.</i>	60
<i>Figure 28. Présentation simplifiée des flux calciques au sein des espaces entre le RE et la mitochondrie (MAMs).</i>	60
<i>Figure 29. Présentation simplifiée du processus de la régulation des senseurs du RE.</i>	61
<i>Figure 30. Présentation des voies d'activation de l'UPR.</i>	63
<i>Figure 31. Représentation simplifiée de l'induction de l'apoptose par les voies de l'UPR.</i>	65
<i>Figure 32. Régulation du promoteur de CHOP par les facteurs de l'UPR.</i>	67
<i>Figure 33. Présentation des différentes cibles apoptotiques de CHOP.</i>	69
<i>Figure 34. Présentation des mécanismes pouvant expliquer la présence d'une hypoxie des PII dans la FPI.</i>	73
<i>Figure 35. Présentation des facteurs de transcription HIFs et de leurs domaines.</i>	74
<i>Figure 36. Présentation de la régulation des facteurs HIFs en hypoxie.</i>	76
<i>Figure 37. Présentation des différents contextes de stabilisation de HIF-α non hypoxiques.</i>	78
<i>Figure 38. Production de ROS par la chaîne respiratoire mitochondriale.</i>	79
<i>Figure 39. HIF-1α est impliqué dans l'expression de CHOP dans les pneumocytes de type II exposés à l'hypoxie.</i>	119
<i>Figure 40. Le traitement à la N-acétylcystéine (NAC) ne module pas les voies de l'UPR en hypoxie.</i>	120
<i>Figure 41. Le salubrinal prévient partiellement l'effet de l'hypoxie sur l'apoptose des pneumocytes de type II.</i>	121
<i>Figure 42. La caspase 12 est activée en hypoxie in vivo et in vitro.</i>	121
<i>Figure 43. Schéma récapitulatif des résultats des travaux de recherche</i>	152

LISTE DES TABLES

<i>Table 1. Présentation de modèles de fibrose pulmonaire induite communément utilisés.</i>	34
<i>Table 2. Données cliniques des patients.</i>	85
<i>Table 3. Liste des anticorps utilisés pour l'étude protéique in vivo par immunohistochimie chez l'humain et le rat.</i>	86
<i>Table 4. Liste des traitements chimiques utilisés pour les différentes études.</i>	89
<i>Table 5. Liste des plasmides utilisés pour les études d'activité transactivatrice et de promoteur.</i>	90
<i>Table 6. Liste des plasmides utilisés pour les études de surexpression de protéines.</i>	90
<i>Table 7. Liste des siRNA utilisés pour les études de sous expression de CHOP et HIF-1α.</i>	92
<i>Table 8. Liste des anticorps utilisés pour l'étude protéique des pneumocytes de type II murins et humains.</i>	94
<i>Table 9. Liste des séquences des gènes étudiés dans les pneumocytes de type II murins et humains.</i>	96
<i>Table 10. Liste des anticorps utilisés pour l'étude protéique des pneumocytes de type II de rat.</i>	96

RÉSUMÉ

La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie rare, au pronostic sombre, pour laquelle il n'existe aucun traitement curatif. Elle se caractérise par un remodelage du poumon distal, avec le remplacement progressif mais irréversible du parenchyme alvéolaire en un tissu fibreux. L'épithélium alvéolaire, soumis à de nombreuses micro-agressions (polluants, virus...) assure un processus de ré-épithélialisation non contrôlé. Cette perturbation est associée à une dysfonction des cellules progénitrices de l'épithélium, les cellules épithéliales alvéolaires (CEAs) de type II ou pneumocytes de type II (PII).

Chez les patients atteints de FPI, l'activation des voies hypoxiques est attestée par l'expression du facteur de transcription hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). Par ailleurs, la présence d'un stress du RE est observé par l'activation des voies de l'unfolded protein pathway (UPR) ainsi que par l'expression de CHOP.

La première partie des travaux de thèse caractérise la réponse des CEAs à l'hypoxie aigue *in vivo* dans un modèle de rat et *in vitro* dans des CEAs de rat. L'apoptose a été évaluée et l'implication des acteurs de l'UPR dans l'activation des voies apoptotiques en hypoxie a été mise en évidence. Le contrôle de HIF-1 dans l'induction des voies de l'UPR a également été démontré.

Dans une seconde partie, le rôle des voies de l'UPR dans l'acquisition de caractéristiques mésenchymateuses a été décrit. Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette régulation ont été caractérisés.

Ces travaux mettent en exergue le rôle primordial des voies de l'UPR dans l'altération phénotypique des CEAs en hypoxie et suggèrent HIF/UPR comme un axe majeur de la pathogenèse de la FPI.

ABSTRACT

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic, progressive and deadly lung disease characterized by a usual interstitial pneumonia (UIP) pattern associating fibrotic remodeling. This fibrotic process is related to repeated micro-injuries on alveolar epithelium leading to alveolar epithelial cells (AECs) dysfunction. The majors well-defined events in the pathogenic process in IPF are AECs apoptosis and EMT, orchestrating a progressive loss of epithelial phenotype IPF. These phenomena play a critical in the dysregulated cross-talk with subjacent interstitial fibroblasts conducting in their activation and resulting in an excessive and irreversible extracellular matrix production.

In lung biopsy of pulmonary fibrosis, hypoxic microenvironment has been reported by the use of pimonidazole probe but also through expression of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1). Another cellular event, the ER stress activation, has been described by the induction of the unfolded protein response (UPR) transcription factors ATF4 and ATF6N. Moreover, the pro-apoptotic transcription factor CHOP, a common target of these UPR actors, is also observed in AECs of patients.

In our work, we study the connection between hypoxic and UPR pathways and its specific role in the process of AECs alteration.

We characterized *in vivo* in an hypoxic rat lung model, *in vitro* in primary rat AECs exposed to hypoxia and *ex vivo* in lung biopsy, the molecular mechanism involved in ER stress induction. We demonstrated the implication of the UPR pathways in the hypoxic induction of apoptosis. In this context, we demonstrated the major role of HIF-1 in the control of UPR actor's expression and in CHOP regulation.

Moreover, we evaluated the involvement of UPR pathways in the induction of EMT feature in hypoxia. Molecular mechanisms involved in these regulation has been characterized.

Our work highlight the cutting role of UPR pathways in AECs phenotype alteration in hypoxic microenvironment and point out HIF-1/UPR as a new major axis in IPF pathogenesis.

INTRODUCTION

I. Physiologie de l'épithélium alvéolaire

1. Les alvéoles

Les alvéoles pulmonaires, terminaisons de l'arbre bronchique, sont des dilatations remplies d'air, de forme polyédrique d'environ 200 μm où s'effectuent les échanges gazeux (Figure 1). Elles sont composées de collagène et de fibres élastiques leur conférant la capacité de distension lors de l'inspiration et de contraction passive lors de l'expiration. Le poumon comporte 400 millions d'alvéoles offrant une surface d'échanges gazeux considérable (environ 100 m^2), avec les capillaires qui tapissent la paroi des sacs alvéolaires (*Crapo et al., 1982*).

Les sacs alvéolaires sont formés d'environ 20 à 30 alvéoles, chacune d'entre elles sont séparées par une cloison interalvéolaire composée :

- d'un épithélium alvéolaire constitué de cellules épithéliales alvéolaires (CEAs), qui représentent un quart des cellules de l'alvéole,
- d'une membrane basale formée de laminine, fibronectine, héparane sulfate, élastine et collagène de type I et IV mais dont la proportion diffère selon le type de CEAs qui la surplombent (*Sannes, 1984*),
- d'un interstitium septal sous-jacent aux CEAs composé de fibres de collagène de type III, de cellules résidentes telles des fibroblastes et quelques cellules inflammatoires,
- d'une monocouche de cellules endothéliales recouvrant la surface du capillaire,
- de macrophages, au nombre approximatif de 1 pour 3 alvéoles, qui sont localisés dans la lumière de l'alvéole au contact des CEAs et qui contrôlent l'élimination d'éventuelles sources étrangères à l'alvéole ou de débris cellulaires (*Westphalen et al., 2014*).

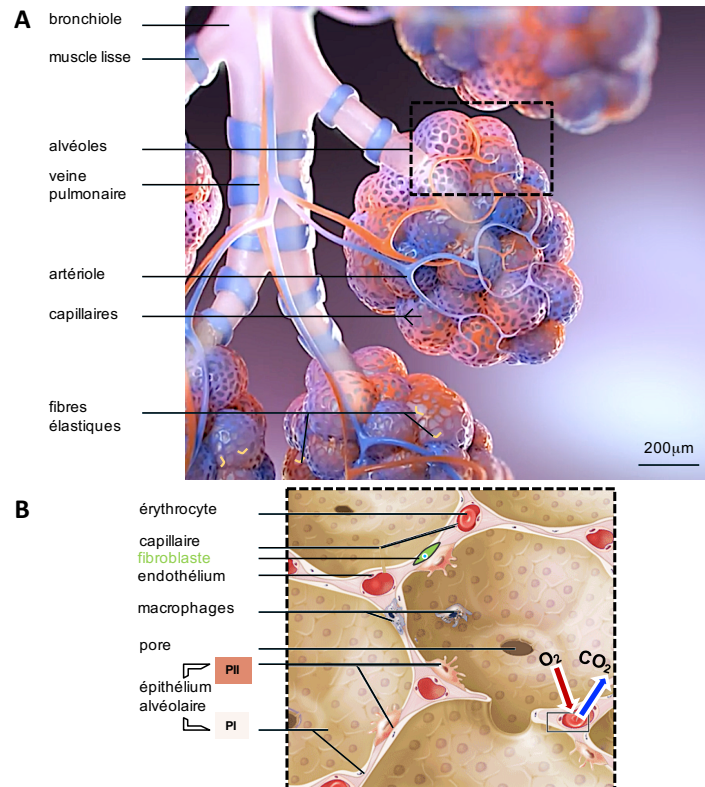


Figure 1. Représentation schématique simplifiée du poumon distal. Vue externe du poumon distal présentant plusieurs sacs alvéolaires composés d'alvéoles en contact avec les capillaires (A). Vue interne d'une partie d'un sac alvéolaire composée de 5 alvéoles, des différents types cellulaires et leurs interactions (B). PI : pneumocyte de type I. PII : pneumocyte de type II. Modifié d'après Elsevier (A) et Junquiera's basic histology, 12^{ème} édition (B).

2. L'épithélium alvéolaire

L'épithélium alvéolaire est un épithélium pavimenteux simple, composé de deux types de cellules épithéliales alvéolaires (CEAs). Ces cellules ont des morphologies et des fonctions distinctes mais sont étroitement liées par des jonctions serrées à leur pôle apical (*Low, 1953*).

a) Les pneumocytes de type I

Les cellules alvéolaires de type I, ou pneumocytes de type I (PI), représentent 34% des CEAs, soit environ 40 PI par alvéole, mais recouvrent 95 à 98% de la surface d'une alvéole (*Crapo et al., 1982*). Ces cellules aplaties possèdent un noyau central et un cytoplasme périphérique très fin qui s'étend sur plus de 15 capillaires soit une surface de près de $1300 \mu\text{m}^2$. Ce nombre peu important de CEAs à la morphologie étalée et au système de jonctions serrées complexe permet de faciliter les échanges gazeux et d'assurer la performance de la barrière alvéolo-capillaire (*Weibel, 2015*) (Figure 2).

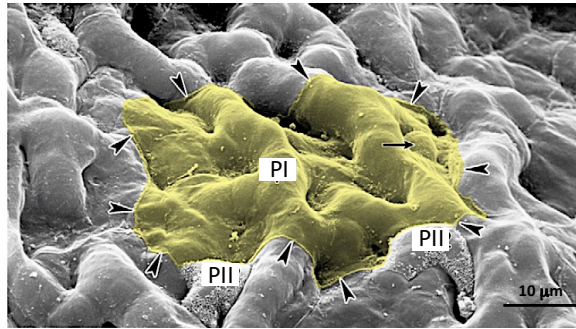


Figure 2. Image de la surface d'une alvéole de poumon humain observée en microscopie électronique à balayage. Une cellule épithéliale de type I (P1) (jaune) recouvre les capillaires (renflements tubulaires). Le corps cellulaire du pneumocyte de type I (flèche) est suivi par un large et fin prolongement cytoplasmique qui se termine par des jonctions intercellulaires (bouts de flèche). Les cellules épithéliales alvéolaires de type II (P2) sont nichées de façon éparsée dans le réseau de capillaires. D'après (Weibel, 2015).

Fibres du cytosquelette, microtubules et vésicules de transport sont les seules organelles observées dans leur cytoplasme. Les PI sont le premier bouclier de l'organisme contre les agents extérieurs tels les particules, les toxines et les microorganismes (Maynard *et al.*, 2012). Ces cellules participent notamment au maintien de l'équilibre des fluides alvéolaires déréglé lors d'une agression de l'épithélium alvéolaire.

b) Les pneumocytes de type II

Les cellules alvéolaires de type II, ou pneumocytes de type II (PII) sont au nombre de 77 par alvéole et considérant leur taille et leur forme cuboïde, recouvrent seulement 2 à 5% de la surface de l'épithélium (Figure 2). Leur forme particulière est étroitement liée à la présence de nombreux corps lamellaires, des structures sécrétoires tubulo-vésiculaires impliquées dans l'excrétion des lipides du surfactant (développé dans le paragraphe 1.3.b). Leur cytoplasme riche en réticulum endoplasmique (RE) et en appareil de Golgi complètent les caractéristiques propres aux cellules sécrétrices. Les PII ont un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium alvéolaire lié à leur fonction de cellules progénitrices (Adamson and Bowden, 1974).

c) Les jonctions cellulaires

L'homéostasie de l'épithélium alvéolaire est, comme tout épithélium, régie par la présence des jonctions cellulaires qui assurent l'attachement des cellules entre elles ainsi qu'avec la matrice extracellulaire (MEC). Outre leur rôle architectural, les jonctions assurent la communication et la transmission de signaux des cellules avec les cellules avoisinantes. Elles sont de plusieurs types :

les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les jonctions communicantes et les jonctions avec la matrice extracellulaire (Figure 3).

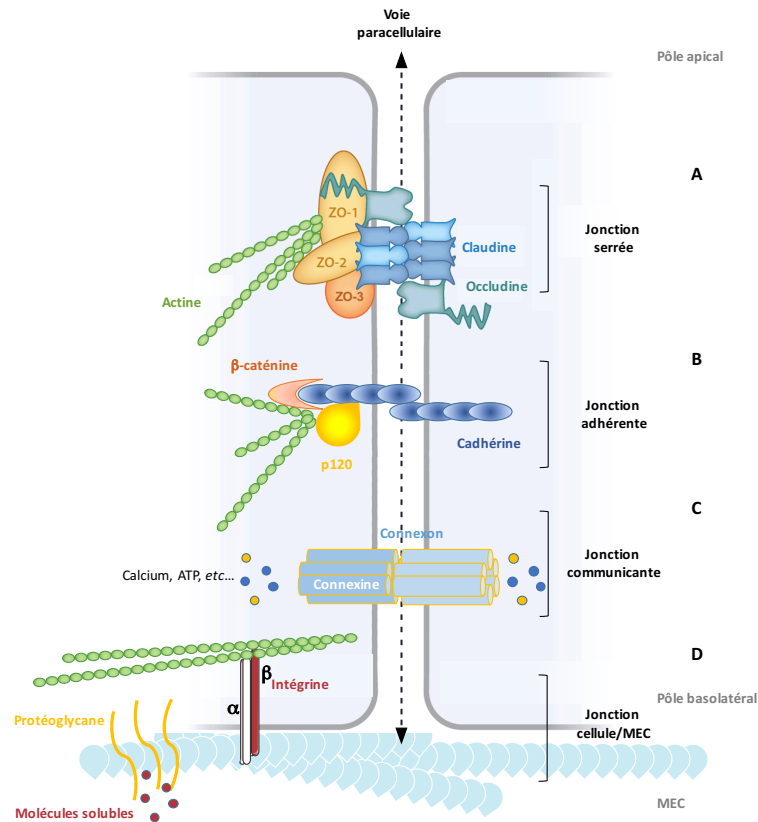


Figure 3. Représentation schématique des jonctions entre deux CEAs et la MEC. Présentation d'une jonction serrée (A). Représentation des différents éléments d'une jonction adhérente (B). Représentation d'un connexon hétérotypique formé de deux types de connexines (couleurs différentes) (C). Présentation brève de jonctions entre cellules et MEC (D). *Modifié d'après (Koval, 2013).*

Les jonctions serrées sont impliquées dans la polarité cellulaire, et assurent l'imperméabilité aux macromolécules tout en permettant la diffusion paracellulaire d'ions ou de solutés (*Overgaard et al., 2012*). Elles sont formées de complexes protéiques membranaires comprenant les claudines et les occludines. Le domaine extracellulaire de ces protéines interagit avec la cellule adjacente. Leur domaine intracellulaire recrute des protéines échafaudages telles les zonula occludens (ZO), ZO1, ZO2, ZO3 qui permettent l'interaction avec le cytosquelette d'actine (Figure 3A). **Les jonctions adhérentes** ont pour fonction d'initier et de stabiliser l'adhésion entre cellules. Elles sont composées de protéines transmembranaires, les cadhérines, qui permettent l'adhésion à une cellule voisine par leur domaine extracellulaire. Leur domaine intracellulaire quant à lui est stabilisé par les protéines d'ancrage, p120 caténine et β-caténine qui forment l'interface avec le réseau de microtubules et le cytosquelette d'actine (*Hartsock and Nelson, 2008*) (Figure 3B). **Les jonctions communicantes** sont impliquées dans le transfert sélectif de molécules dont la taille est inférieure à 1kDa tels les ions, l'AMP cyclique ou l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) facilitant la

propagation des signaux entre cellules. Elles se définissent comme des canaux formés par deux connexons composés chacun de 6 connexines (Cx) (Figure 3C). Les PI et les PII expriment les isoformes Cx32, Cx43 et Cx46 et peuvent former des connexons hétérotypiques (*Abraham et al., 2001*). Les pneumocytes peuvent communiquer entre eux (*Adamson et al., 1990; Sirianni et al., 2003*) ou avec les fibroblastes de l'interstitium à travers des pores de la membrane basale. (*Adamson, 1992; Woodward et al., 1998*). **Les jonctions entre CEAs et la matrice extracellulaire (MEC)** sont complexes et dépendent de la composition en protéines de la MEC (*Ross, 1998*). Elles font notamment intervenir les intégrines, une super famille de glycoprotéines aux multiples isoformes. Les intégrines s'assemblent en hétérodimères formés d'une sous-unité α qui confère la spécificité des ligands et d'une sous-unité β qui permet l'interaction aux filaments d'actine par l'intermédiaire de protéines échafaudages. Leur domaine extracellulaire reconnaît la séquence spécifique arginine-glycine-acide aspartique présente dans les protéines de la MEC (*Pierschbacher and Ruoslahti, 1984; Feldinghabermann and Cheresh, 1993*) (Figure 3D).

La formation de ces différentes jonctions est régulée par des messagers intracellulaires tels le calcium ou le pH. Le stress mécanique cyclique appliqué lors de l'inspiration, les forces de frottement engendrées par les tensions de surface ainsi que l'écoulement sanguin sont également impliqués dans la modulation de ces jonctions (*Waters et al., 2012*).

3. Les fonctions de l'épithélium alvéolaire

a) L'hématose

Le mécanisme physiologique assurant la transformation du sang veineux pauvre en dioxygène (O_2) en sang artériel riche en O_2 est appelé hématose. Lors de ce processus, le CO_2 produit par la respiration cellulaire ainsi que l' O_2 de l'air diffusent en sens inverse à travers la barrière alvéolo-capillaire. Trois éléments clefs interviennent : la ventilation, qui est la circulation de l'air dans les alvéoles, la perfusion, définie comme la circulation du sang dans les capillaires, et la diffusion, qui représente les échanges gazeux à travers la paroi alvéolo-capillaire.

La diffusion passive de l' O_2 et du CO_2 , à travers la barrière alvéolo-capillaire, repose sur l'existence d'un gradient de pression partielle de ces gaz entre les deux compartiments. Un gaz diffuse d'une zone à forte pression partielle vers une zone à faible pression partielle. La pression partielle de l' O_2 (PO_2) dans les alvéoles de 100 mmHg conduit au déplacement des molécules gazeuses des alvéoles vers les capillaires pulmonaires dans lesquelles la PO_2 est de 40mmHg. *A contrario*, la

PCO₂ des capillaires induit une diffusion de CO₂ des capillaires vers les alvéoles (Figure 4). L'oxygénation optimale des tissus dépend *inter alia* de la qualité de l'hématose.

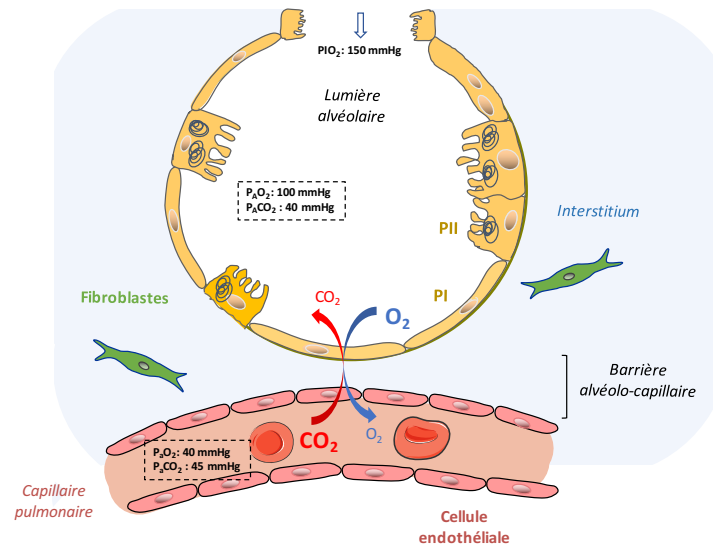


Figure 4. Représentation schématique de la diffusion des gaz à travers la barrière alvéolo-capillaire. Le gradient des pressions partielles en O₂ et en CO₂ dans l'alvéole et le compartiment sanguin (P_AO₂/P_ACO₂ et P_aO₂/P_aCO₂ respectivement) conduit à la diffusion de l'O₂ dans le compartiment artériel et à la diffusion de CO₂ dans le compartiment alvéolaire.

b) La production de surfactant

Bien que leur composition soit la même, les alvéoles ont de légères différences de diamètre. Afin d'éviter le phénomène d'affaissement des alvéoles qui résulterait de la vidange de l'air des petites vers les grandes alvéoles et fin d'expiration, les pneumocytes de type II (PII) produisent un tensioactif, le surfactant, qui permet d'égaliser les pressions entre les alvéoles en réduisant les tensions superficielles (*Buckingham and Avery, 1962*). Le surfactant s'étend sur toute la surface de l'épithélium et constitue l'interface entre l'air et l'hypophase définie comme un espace riche en eau, en glycoprotéines, en acide hyaluronique et en électrolytes.

Le surfactant est un film de surface formé d'une couche de DPPC suivie par un ensemble de bicouches lipidiques et de myéline tubulaire. Il est composé de :

- 80% de glycérophospholipides et plus particulièrement le dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) et de phosphatidylcholine, responsables de la génération d'une tension de surface quasi nulle (*Veldhuizen et al., 1998*)
- 10% de cholestérol qui confère la fluidité au surfactant
- 10% de protéines : surfactant protein A (SP-A), B (SP-B), C (SP-C) et D (SP-D)

Le multi-couche de lipides ainsi que la myéline tubulaire, localisées dans l'hypophase, permettent le renouvellement rapide de la couche de DPPC (*Orgeig et al., 2015*). Cette organisation lipidique

est contrôlée par les pressions engendrées lors des différentes phases du cycle respiratoire mais également par SP-A, B, C et D (Figure 5).

La phase lipidique du surfactant nécessite le transport de la dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) et la phosphatidylcholine du réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi (*Fagone and Jackowski, 2009*) vers les corps lamellaires grâce au transporteur ATP binding cassette subfamily A member 3 (ABCA3). Les corps lamellaires sont sécrétés au pôle apical des PII par exocytose. Les protéines SP-A, SP-B, SP-C et SP-D, sont codées par les gènes *SFTPA*, *SFTPB*, *SFTPC* et *SFTPD* respectivement dont l'expression est sous la dépendance du facteur de transcription thyroïd transcription factor 1 (TTF1) (*Zhou et al., 1996*). Ces protéines transitent par le RE avant d'être modifiées dans l'appareil de Golgi pour adopter leur forme active puis sont sécrétées (*Weaver, 1998*).

Une fois excrétés, les corps lamellaires sont transformés en myéline tubulaire avec l'aide de SP-A qui permet la structuration rapide des couches lipidiques du surfactant (*Amrein et al., 1997; Knebel et al., 2002*). Le caractère hydrophobe des protéines SP-B et SP-C leur permet d'interagir avec la phosphatidylcholine de la multicouche, et de faciliter ainsi l'adsorption des DPPC dans la monocouche. Le rôle précis de SP-D dans le métabolisme des phospholipides du surfactant reste, quant à lui, à définir (*Ikegami et al., 2000*).

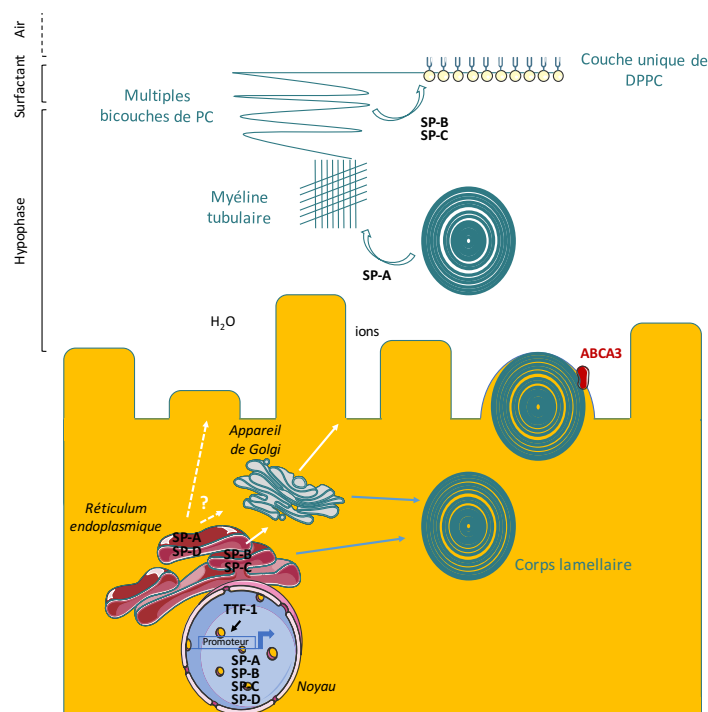


Figure 5. Représentation simplifiée de la biogenèse du surfactant dans un PII. Les corps lamellaires sont composés de phospholipides (PC) provenant du réticulum endoplasmique (RE) et de l'appareil de Golgi. Leur exocytose au pôle apical des PII nécessite l'intervention de la protéine ABCA3. Les protéines du surfactant SP-A, SP-B, SP-C et SP-D sont synthétisées, transportées dans le RE puis sécrétées selon différentes voies (flèches blanches). La formation de myéline tubulaire à partir des corps lamellaires requière SP-A, alors que SP-B et SP-C participent au renouvellement la couche de (DPPC). Modifié d'après (*Lopez-Rodriguez et al., 2017*).

c) Maintien de l'équilibre des fluides alvéolaires

L'efficacité des échanges gazeux dépend de la capacité de l'épithélium alvéolaire à conserver une hypophase relativement fine ne devant pas excéder 0,5 μm d'épaisseur (*Bastacky et al., 1995*). Lors d'une agression alvéolaire, un excès de liquide dans l'espace alvéolaire provenant de l'interstitium, appelé œdème, est observé et conduit à une dérégulation des échanges gazeux (*Saumon, 1999*). Les pneumocytes de type I (PI) et II (PII) orchestrent alors une réponse adaptative, la clairance liquidienne. Celle-ci favorise la réabsorption d'eau de la lumière alvéolaire vers l'interstitium et les vaisseaux sanguins par la mise en place d'un gradient osmotique établi grâce à des transports ioniques (*Goodman and Crandall, 1982; Matthay et al., 2002*) (Figure 6A). Les principaux ions impliqués dans le rétablissement de l'homéostasie liquidienne alvéolaire sont le sodium (Na^+), le chlore (Cl^-) et le potassium (K^+) (Figure 6).

Le rôle du Na^+ a été mis en évidence dans la résorption de l'œdème par l'utilisation d'inhibiteurs de canaux Na^+ tels l'amiloride (*Olivera et al., 1994*). Le Na^+ transite au pôle apical des pneumocytes par le canal sodique épithélial (ENaC) sensible à cette drogue. Ce canal est composé de 4 sous-unités dont l'oligomérisation confère au canal une réponse spécifique à l'amiloride, modulant ainsi sa capacité d'ouverture et sa sélectivité ionique. Des études en électrophysiologie ont également démontré le passage des ions Na^+ par les canaux cationiques non sélectifs régulés par les nucléotides cycliques (CNG). Afin de maintenir l'osmose cellulaire, le Na^+ est extrudé vers l'interstitium alvéolaire par la pompe Na-K-ATPase située au pôle basolatéral des cellules. La force motrice générée par ce transport transépithélial de Na^+ est à l'origine d'un mouvement d'eau du pôle apical au pôle basolatéral des pneumocytes. Ce transport d'eau peut se faire *via* les jonctions serrées ou fait intervenir dans une moindre mesure des canaux tels que les aquaporines (AQP) 1 et 3 exprimées dans les PII et AQP5 dans les PI (*Ma et al., 2000*).

L'électroneutralité de l'hypophase est maintenue par les ions Cl^- qui diffusent dans l'interstitium par voie paracellulaire ou *via* des canaux ioniques. Parmi ces derniers, le régulateur transmembranaire de conductance mis en évidence dans la mucoviscidose (CFTR) joue un rôle crucial dans le transport de chlore. Il est situé au pôle apical des pneumocytes (*Brochiero et al., 2004; Johnson et al., 2006*).

Le potentiel de membrane et la conservation du gradient électrochimique sont quant à eux assurés par différents canaux potassiques. Parmi ces canaux peuvent être cités les canaux voltage dépendants (K_v) ou activés par le calcium (K_{Ca}) localisés aux pôles apical et basolatéral des PII (*Hollenhorst et al., 2011*), ainsi que les canaux potassiques à rectification entrante, inhibés par l'ATP (K_{ir}) qui sont exprimés au pôle basolatéral des PII (*Bardou et al., 2012, 2009*).

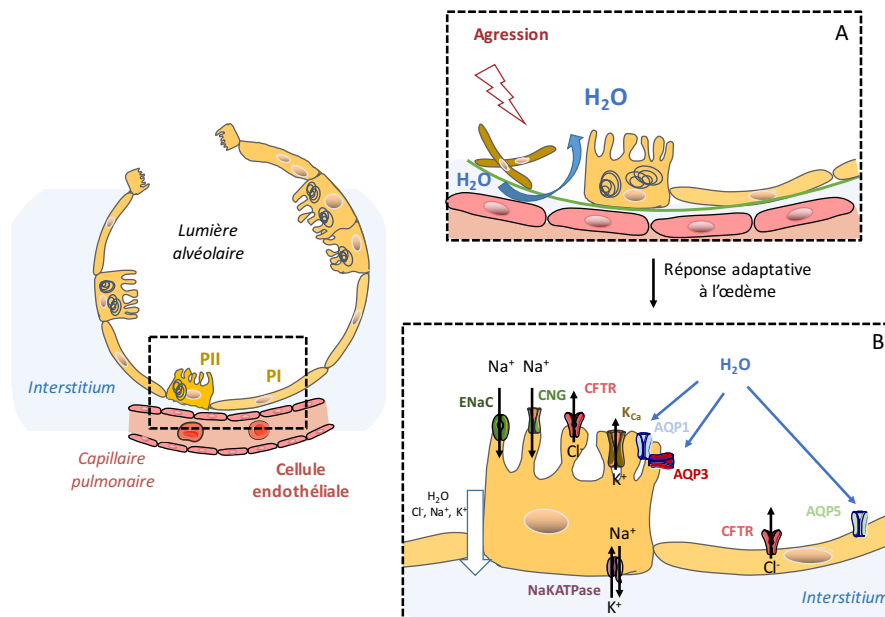


Figure 6. Représentation simplifiée de la régulation de l'homéostasie liquidienne alvéolaire. Après agression, la dénudation de l'épithélium conduit à l'inondation de l'espace alvéolaire (A). La résorption de l'œdème met en jeu des courants ioniques engendrant un gradient osmotique à l'origine de la réabsorption d'H₂O par voie paracellulaire (flèche blanche) ou *via* des transporteurs (B).

d) Rôle dans l'homéostasie tissulaire

i. L'agression

Toute particule d'un diamètre inférieur à 5 µm, qui a contourné les défenses présentes dans les conduits des voies aériennes proximales et distales, va être piégée dans le surfactant et l'hypophase de l'épithélium alvéolaire. Cet épithélium est donc la première barrière de l'organisme contre les virus ou les bactéries inhalés, les gaz et particules polluants (ozone, fumées de cigarette, diesel, *et cetera desunt*), mais également contre les micro-inhalations répétées de liquide gastrique acide. Ces agressions peuvent conduire à la mort des pneumocytes aboutissant à une dénudation progressive de l'épithélium alvéolaire. De nombreux travaux investiguant l'exposition à la fumée de cigarette, à l'ozone ou encore à une infection bactérienne ont mis en évidence une forte sensibilité des pneumocytes de type I (PI) aux agressions par rapport aux PII (Wang *et al.*, 2006; Kosmider *et al.*, 2011; Jansing *et al.*, 2017). Cette différence de sensibilité, qui se traduit par une perte précoce des PI, peut être attribuée à leur morphologie très étalée, offrant une large surface d'exposition. Par ailleurs, la résistance des PII aux agressions pourrait être liée à la production des protéines du surfactant SP-A et SP-D, qui ont des propriétés cytoprotectives (Zeng *et al.*, 2016).

Lors d'une agression de l'épithélium alvéolaire, différents mécanismes de défense se mettent en place afin de rétablir l'homéostasie de l'épithélium (Zeng *et al.*, 2016). Dès les

premières heures après l'agression, une réponse inflammatoire localisée fait intervenir les macrophages alvéolaires résidents mais également des polynucléaires neutrophiles (PNN) provenant de la circulation sanguine qui exsudent à travers l'épithélium endommagé. Après 2 jours, les PII entament une phase de migration et de prolifération. Ces cellules vont également se trans-différencier en PI. L'ensemble de ces événements conduit, 7 jours post-agression, à la restauration du taux de pneumocytes, donc au recouvrement de l'intégrité de l'épithélium alvéolaire (Figure 7).

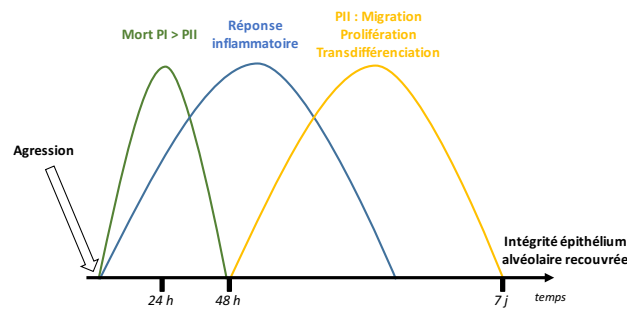


Figure 7. Représentation simplifiée des phases induites en réponse à une agression et leur évolution dans le temps. Lors d'une agression de l'épithélium alvéolaire, dès les premières heures, la mort des pneumocytes de type I (PI) est augmentée et une réponse inflammatoire est activée. Après 48 h, les pneumocytes de type II (PII) entament une phase de prolifération, de migration et de trans-différenciation en PI afin de rétablir un épithélium fonctionnel. *D'après (Zeng et al., 2016).*

ii. La phase inflammatoire

De nombreux travaux investiguant l'effet d'agressions sur l'épithélium alvéolaire ont mis en évidence le rôle crucial des pneumocytes de type II (PII) dans la défense de l'hôte et dans l'immunité locale grâce aux protéines du surfactant et à la production de cytokines pro-inflammatoires respectivement.

° Le rôle du surfactant dans la défense de l'hôte

Les protéines SP-A et SP-D, constituantes du surfactant, ont la capacité d'interagir avec les oligosaccharides situés à la surface des bactéries, des virus ou des champignons grâce à leur domaine leptine en partie C-terminale. Ce phénomène favorise la reconnaissance des pathogènes par les macrophages et leur élimination (*Chuquimia et al., 2013; Wright, 2003*). Des études menées *in vivo* et *in vitro* mettent en exergue le rôle de la protéine SP-B dans la clairance bactérienne. Son domaine de type saposine interagit avec la paroi bactérienne, ce qui favorise d'une part la phagocytose par les macrophages et d'autre part inhibe la croissance bactérienne dont le processus reste encore à établir (*Yang et al., 2010*). Enfin, des souris déficientes pour le gène codant SP-C spécifiquement dans les PII et exposées au virus respiratoire syncytial

présentent une réponse inflammatoire exacerbée suggérant un rôle protecteur de cette protéine lors d'infections virales (*Glasser et al., 2009*).

° La production de cytokines pro-inflammatoires par les pneumocytes de type II

Suite à une agression, les PII participent à la réponse inflammatoire de l'épithélium alvéolaire. Ils perçoivent des signaux de danger extracellulaires grâce à leurs récepteurs toll-like (TLR) puis sécrètent des protéines chémoattractantes favorisant le recrutement des cellules inflammatoires telles les polynucléaires neutrophiles et les macrophages.

La perception du signal via les récepteurs de type toll (TLR) :

Les TLR sont classiquement exprimés à la surface ou dans les cellules de l'immunité innée, comme les macrophages et les cellules dendritiques, mais sont également exprimés par des cellules non immunes telles les fibroblastes et les PII (*Droemann et al., 2003; Schneberger et al., 2013*) (Figure 8). Les TLR reconnaissent les profils moléculaires spécifiques des micro-organismes (PAMPS). Ils reconnaissent également les alarmines, des molécules aux fonctions diverses au sein de la cellule qui sont sécrétées lors d'une agression. Les PAMPS sont représentés par les lipopolysaccharides (LPS) et les lipopéptides de la paroi bactérienne ou encore les ARN simples ou double brins des virus (*Armstrong et al., 2004*). Les alarmines telles l'ATP, la protéine high-mobility group box 1 (HMGB-1), l'IL-1 α ou l'IL-33, exprimées dans différents compartiments cellulaires sont libérées lors d'une agression chimique, physique ou mécanique. La fixation de ces ligands sur les TLR membranaires ou cytoplasmiques induit une cascade de signalisation conduisant à la translocation nucléaire des facteurs de transcription activator protein-1 (AP-1), nuclear factor κ -B (NF κ -B) ou interferon regulatory factor 3. Ces derniers régulent l'expression de gènes codant des cytokines qui contrôlent la réponse inflammatoire (Figure 8).

La production de cytokines inflammatoires par les pneumocytes de type II :

L'activation des TLR2 et des TLR4 des PII par le virus de la grippe (*Stegemann-Koniszewski et al., 2016*), par des helminthes ou par de la chitine (le composant majoritaire de l'exosquelette des insectes) (*Wang et al., 2017*) conduit à la production de chimiokines telles CXCL5, CXCL9 et CXCL10 et d'autres molécules pro-inflammatoires telles le tumor necrosis factor- α (TNF- α), l'interferon- α , l'IL-6 et l'IL-33. L'activation des TLR4 par les alarmines induit la production d'IL-33 (*Chang et al., 2017*). L'ensemble de ces molécules participent au recrutement des macrophages

et de polynucléaires neutrophiles (PNN) ainsi qu'à leur activation (Glasser et al., 2009; Thorley et al., 2007) (Figure 9).

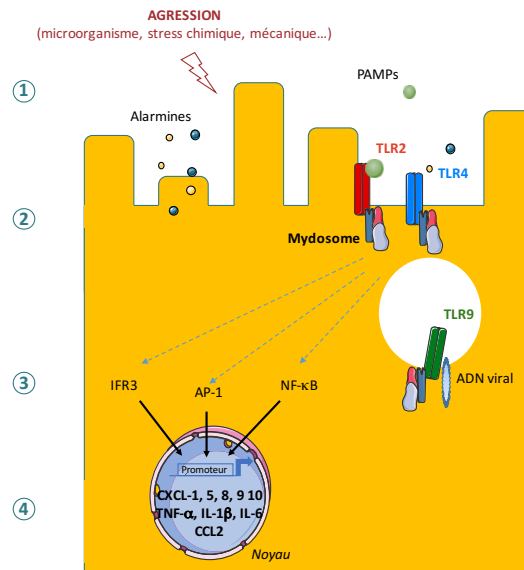


Figure 8. Représentation simplifiée de la réponse pro-inflammatoire régulée par les PII à la suite d'une agression de l'épithélium alvéolaire. Lors d'une agression mécanique ou chimique, ou bien lors d'une infection microbienne, les alarmines excrétées ou les PAMPs respectivement (1) se lient aux TLR conduisant au recrutement d'un complexe protéique, le mydosome. Ce dernier est formé de Myd88, de kinases IRAK, et de la protéine d'interaction avec les TLR (TOLLIP). Selon le type de TLR, différentes voies de signalisation sont induites (2) et activent des facteurs de transcription (3). Les gènes induits codent pour des chimiokines permettant le recrutement des cellules inflammatoires ou d'autres cytokines pro-inflammatoires (4). L'expression du TLR9 par les PII a été décrite mais sa fonction dans la réponse inflammatoire n'est actuellement pas définie.

Recrutement des neutrophiles et des macrophages :

Dès les premières heures suivant l'agression de l'épithélium (Figure 9.1), et suite à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les PII (Figure 8 et 9.2-3), les macrophages et les neutrophiles sont recrutés et activés afin d'éliminer les éléments étrangers et amorcer le processus de ré-épithélialisation (Figure 9). Les macrophages alvéolaires résidents, éliminent les diverses particules par phagocytose (Figure 9.4). Le recrutement et l'activité phagocytaire des macrophages dépendent d'une interaction physique avec les PII et de la mise en place d'un signal calcique *via* les connexons. Le transfert de calcium entre ces deux types cellulaires par ces jonctions communicantes conduit à la sécrétion de cytokines par les PII (Westphalen et al., 2014). Les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont recrutés au sein de l'épithélium alvéolaire depuis la circulation sanguine. Au cours de leur transmigration à travers l'épithélium alvéolaire, ces cellules dégradent des composants de la matrice extracellulaire ainsi que la membrane basale déjà endommagée et participent à la dérégulation des jonctions adhérentes des pneumocytes favorisant ainsi leur propre infiltration (Zemans et al., 2011). Les PNN assurent le recouvrement d'un espace propre et lisse au site lésionnel (Hyde et al., 1999) et favorisent également la

prolifération des PII (Paris et al., 2016), deux étapes importantes du processus de ré-épithélialisation (Figure 9.4).

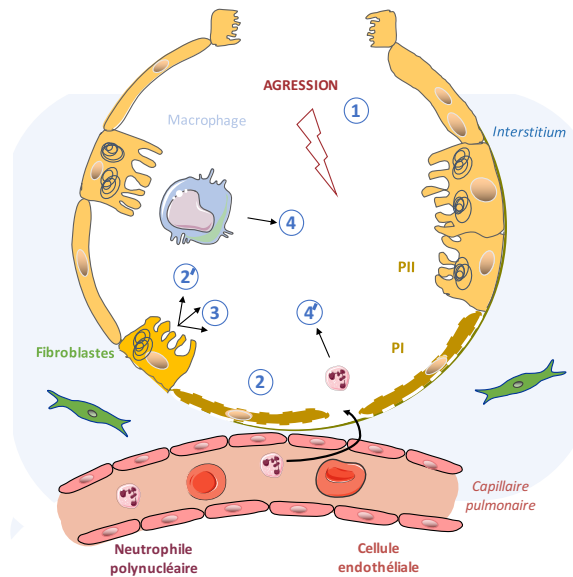


Figure 9. Représentation simplifiée de la phase inflammatoire à la suite d'une agression de l'épithélium alvéolaire. Lors d'une agression (1), les PI, les CEAs les plus vulnérables meurent (2) alors que les PII participent à la défense de l'hôte notamment grâce à SP-A et SP-B qui favorisent la phagocytose des éléments étrangers par les cellules immunitaires (2'). Les PII suite à l'activation des TLR, produisent différentes cytokines pro-inflammatoires (3) telles des chimiokines qui recrutent des macrophages ou des neutrophiles (flèche noire courbée) (4). D'autres cytokines pro-inflammatoires favorisent le processus de clairance alvéolaire. Les macrophages très actifs, phagocytent des éléments étrangers et les polynucléaires neutrophiles lissent l'espace de la membrane basale dénudée (4').

iii. La ré-épithélialisation

La ré-épithélialisation de l'épithélium alvéolaire est définie comme le rétablissement d'un épithélium intègre après dénudation suite à une agression. Elle fait intervenir l'acquisition de propriétés migratoires et prolifératives des PII et leur trans-différenciation en PI. Les mécanismes moléculaires mis en jeu dans ces différentes étapes dépendent de facteurs solubles produits par les pneumocytes, les cellules inflammatoires mais également les fibroblastes de l'interstitium attirés aux sites lésionnels (Figure 10).

° Une nouvelle matrice produite par les fibroblastes

Suite à l'action des neutrophiles au site lésionnel, une nouvelle matrice intègre est produite afin de fournir un support pour la prolifération et la migration des PII. Cette nouvelle matrice est sécrétée par les fibroblastes interstitiels sous-jacents aux PII (Bradley et al., 1980; Fukuda et al., 1985). Elle est composée de fibrine, de fibronectine mais également d'élastine et de collagène de type I. Les PII peuvent également participer à l'établissement de cette matrice par la production de fibronectine (Rannels et al., 1987).

° La migration des pneumocytes de type II

Le processus migratoire des PII nécessite l'intervention d'enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire (MEC), les métalloprotéinases (MMP), que ces cellules sécrètent. Sous l'action des MMP et notamment les MMP1 (*Herrera et al., 2013*), MMP2 et MMP14 (*Ghosh et al., 2012; Kanter et al., 2015*), les intégrines (paragraphe I.2.c) se détachent des éléments de la MEC permettant ainsi l'avancée de la cellule (*Kim et al., 1996*). Par ailleurs, les MMP peuvent activer des facteurs pro-migratoires tels le transforming growth factor- β (TGF- β) (*Yu and Stamenkovic, 2000*) et l'epidermal growth factor (EGF) (*Schenk et al., 2003*). L'expression des MMP par les PII est régulée par des facteurs produits par les neutrophiles, les fibroblastes et les PII eux-mêmes. C'est le cas des facteurs de croissance tels le keratinocyte growth factor (KGF), l'hepatocyte growth factor (HGF) et le TGF- β sécrétés par les PII et les fibroblastes (*Mason et al., 1994; Yano et al., 2000*). Les neutrophiles sont également une source majeure de HGF (*Jaffré et al., 2002*) (Figure 10.A-B).

° La prolifération des pneumocytes de type II

La sécrétion des différents facteurs favorisant la migration des PII est également impliquée dans leur prolifération. Par exemple, *in vitro*, la prolifération et la migration des PII sont augmentées en présence de milieu conditionné de fibroblastes. Cet état de fait est à mettre en relation avec la production de KGF, HGF et TGF- β par les fibroblastes (*Kelley et al., 1991; Panos et al., 1993*).

La prolifération des PII liée à l'intervention des neutrophiles est due à leur production de HGF d'une part (*Jaffré et al., 2002*) et à la synthèse d'élastase d'autre part. Cette enzyme clive la E-cadhérine localisée au niveau des jonctions adhérentes des PII conduisant à la dissociation du complexe E-cadhérine/ β -caténine (paragraphe I.2.c). La translocation de la β -caténine dans le noyau promeut ainsi la prolifération des PII par l'activation des gènes *Wisp1* et *Cy61* (*Zemans et al., 2013*).

° La trans-différenciation des PII en PI

En s'appuyant sur de simples observations morphologiques, *Kapanci et al.* puis *Adamson et al.* suggèrent, que, suite à la prolifération et à la migration des PII, les cellules non détruites se trans-différencient en PI (*Adamson and Bowden, 1974; Kapanci et al., 1969*). Quarante ans plus tard, les travaux de *Barkauskas et al.* démontrent, par des techniques de traçage génétique, que

lors de lésions de l'épithélium alvéolaire, les PII possèdent la capacité de se trans-différencier en PI (*Barkauskas et al., 2013*). Les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus de différenciation sont encore peu connus. La sécrétion du TGF- β par les PII semble être un élément clef dans leur trans-différenciation en PI (*Bhaskaran et al., 2006; Zhao et al., 2013*) (Figure 10.F).

Il est cependant à noter que la réplétion de l'épithélium alvéolaire n'est pas seulement due à l'action des PII. Des études révèlent que les PI non détruits lors de l'agression peuvent se différencier en PII et participer ainsi à la régénération de l'épithélium (*Jain et al., 2015; Yang et al., 2016; Wang et al., 2018*). D'autres études ont mis en évidence une population rare de cellules souches localisées dans des niches de voies aériennes distales et les alvéoles qui peuvent migrer, proliférer et se différencier en PII ou PI (*Kajstura et al., 2011*). La proportion de ces cellules souches étant de 1 cellule pour 30 000 cellules alvéolaires subodore toutefois une implication relative dans le phénomène de régénération épithéliale.

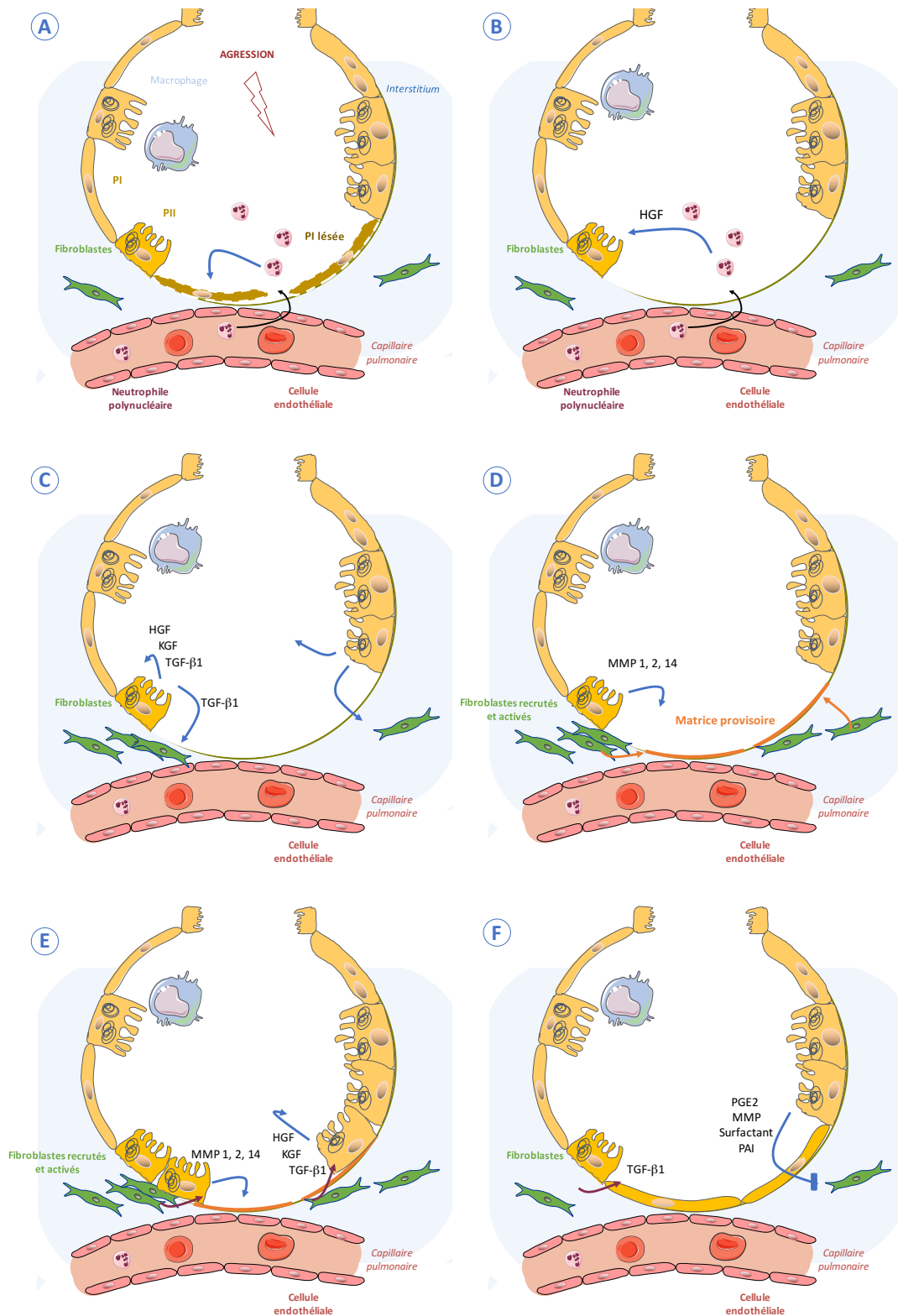


Figure 10. Représentation simplifiée du processus de ré-épithélialisation de l'épithélium alvéolaire à la suite d'une agression. Les polynucléaires neutrophiles (PNN) et les macrophages alvéolaires participent à l'élimination des débris cellulaires (A). Les PNN produisent du HGF afin de favoriser la prolifération des PII (B). Les PII sécrètent des facteurs de croissance permettant leur prolifération et migration et le recrutement des fibroblastes (C) afin de d'établir une matrice intègre (D). La production de métalloprotéases (MMP) permet aux PII d'assurer leur migration (E). Les PII se transdifférencient en PI afin de rétablir l'homéostasie de l'épithélium alvéolaire (F). Un dialogue continu entre les PII et les fibroblastes permet de conserver l'intégrité de l'épithélium (F). *Modifié d'après la planche gentiment donnée par le Pr Carole Planès et le Dr Thomas Gille.*

° Le rétrocontrôle de l'activité des fibroblastes par les pneumocytes de type II

Suite à la réparation de l'épithélium alvéolaire, les PII sécrètent des molécules tels la prostaglandine E2 (PGE2), le surfactant, le plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) et les MMP (Adamson, 1992; Adamson et al., 1989; Klien and Adamson, 1989; Moore et al., 2003). Celles-ci limitent la prolifération des fibroblastes et leur activation en myofibroblastes, cellules à haute capacité de sécrétion de composants de la matrice extracellulaire. Cette production de molécules inhibitrices de la croissance des fibroblastes est également régulée par la stimulation des fibroblastes eux-mêmes notamment par le TGF- β (Epa et al., 2015) (Figure 10.F). Ce rétrocontrôle évite une réparation excessive.

II. La fibrose pulmonaire idiopathique : une maladie liée à une réparation aberrante de l'épithélium alvéolaire

1. Histoire et classification de la fibrose pulmonaire idiopathique

Entre 1931 et 1944, quatre cas de « fibrose pulmonaire interstitielle diffuse » ont été décrits par Louis Hamman and Arnold Rich mentionnant une prolifération progressive du tissu alvéolaire (Hamman and Rich, 1944). Vingt-cinq ans plus tard, l'autrichien Averill Abraham Liebow et l'américain Charles Black Carrington proposent la première classification des pneumopathies infiltrantes diffuses (PID) (Liebow and Carrington, 1969). En 1998, Anna-Luise Katzenstein et Jeffrey Myers suggèrent de donner le terme de fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) à toutes PID d'origine inconnue présentant un profil histopathologique de pneumopathie interstitielle commune (PIC) (Katzenstein and Myers, 1998).

Plusieurs classifications des PID se sont succédées pour définir à l'heure actuelle 4 grands groupes : secondaire de cause connue, secondaire particulière, granulomatose et idiopathique. Parmi les PID idiopathiques sont répertoriées : les rares, les inclassables et les classiques dont fait partie la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI), qui, par sa fréquence (55%) et sa mortalité en fait la forme prépondérante des PID (American Thoracic Society and European Respiratory Society, 2002).

La FPI est une maladie caractérisée par une atteinte progressive et irréversible de l'interstitium pulmonaire dont l'étiologie reste encore inconnue. Selon la définition du Parlement Européen, c'est une maladie rare et orpheline c'est à dire que le nombre de cas est inférieur à 5 pour 10 000 habitants, qu'elle est mortelle et chroniquement invalidante et qu'aucun traitement curatif n'est encore disponible (Le Parlement Européen and Le Conseil de L'UE, 2000).

2. Epidémiologie de la fibrose pulmonaire idiopathique

Depuis une vingtaine d'années, des communautés de pneumologues associés à des praticiens de médecine générale ont conduit des études en Amérique du Nord, en Europe, en Asie et en Océanie afin de déterminer les critères épidémiologiques propres à la FPI (*Nalysnyk et al., 2012; Raghu et al., 2016; Duchemann et al., 2017*). La prévalence (1,25-23,4/100000 habitants selon les pays) et l'incidence (4,6-8,8/100000 habitants/an selon les pays) augmentent au cours du temps (*Hutchinson et al., 2015*), et sont d'autant plus élevées que le patient est âgé et qu'il est un homme (*Harari et al., 2016*). La survie varie de 1 à 5 ans selon les études de cohortes et est indépendante de l'âge du patient (*Koo et al., 2016; Raghu et al., 2016*). La cause immédiate de la mort est majoritairement (66-77%) liée à une insuffisance respiratoire (*Daniels et al., 2008; Rajala et al., 2016*). Actuellement, l'âge moyen de la pose du diagnostic est de 68 ans (*Garcia, 2011; Fernandez et al., 2012*).

3. Diagnostic de la fibrose pulmonaire idiopathique

Le diagnostic repose sur l'association de données cliniques, radiologiques et histologiques. Les manifestations cliniques se matérialisent par une toux sèche, des difficultés respiratoires à l'effort, un râle crépitant à la fin de l'inspiration. Ce dernier est détecté lors de l'auscultation pulmonaire et, dans 60% des cas, le patient présente un hippocratisme digital probablement dû à une mauvaise oxygénation des tissus. Des explorations fonctionnelles respiratoires mettent en évidence un syndrome restrictif lié à une diminution de la capacité vitale forcée (CVF) ainsi qu'à une altération de la diffusion des gaz dans le sang se traduisant par une diminution du transfert du monoxyde de carbone (DLCO).

L'examen radiologique, réalisé par tomographie à haute résolution, révèle des lésions hétérogènes du poumon droit et gauche avec une prédominance sous-pleurale. Parmi celles-ci sont mises en évidence des opacités réticulées, des dilatations et distorsions irréversibles des bronches liées à la fibrose, appelées bronchectasies de traction. Des structures en rayons de miel peuvent également être observées (Figure 11).

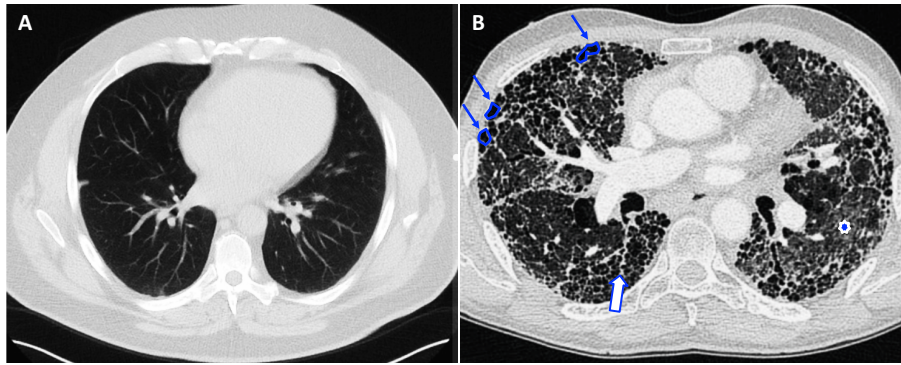


Figure 11. Le diagnostic de FPI : l'examen radiologique. Image obtenue par tomographie assistée par ordinateur thoracique à haute résolution de patients témoins (A) et FPI (B). La présence à prédominance sous-pleurale de lésions kystiques en forme de rayon de miel (flèches simples + contours), de bronchectasies par traction (flèche pleine), et les réticulations (étoile) pose le diagnostic sans équivoque de FPI (B). Rares sont les patients présentant cette multiplicité de lésions, des examens complémentaires sont alors à réaliser pour affirmer le diagnostic. D'après (Cottin *et al.*, 2014).

L'étude histologique, réalisée à partir d'une biopsie pulmonaire, révèle un profil de pneumopathie interstitielle commune (PIC) caractérisé par une répartition inégale de zones denses de fibrose entourées de zones de parenchyme sain. Des rayons de miel, ces dilatations anormales des espaces aériens entourées par une paroi composée d'un tissu fibreux, sont reconnaissables. Des structures particulières, les foyers fibroblastiques, composés d'une agrégation de fibroblastes et de myofibroblastes sont également présents. De récents travaux ont mis en évidence la complexité structurale du foyer fibroblastique et la répartition éparse et non interconnectée de l'ensemble des foyers appuyant le caractère hétérogène des lésions dans la FPI. Une corrélation négative entre la densité des foyers fibroblastiques et la CVF des patients FPI a été rapportée (Jones *et al.*, 2016) (Figure 12).

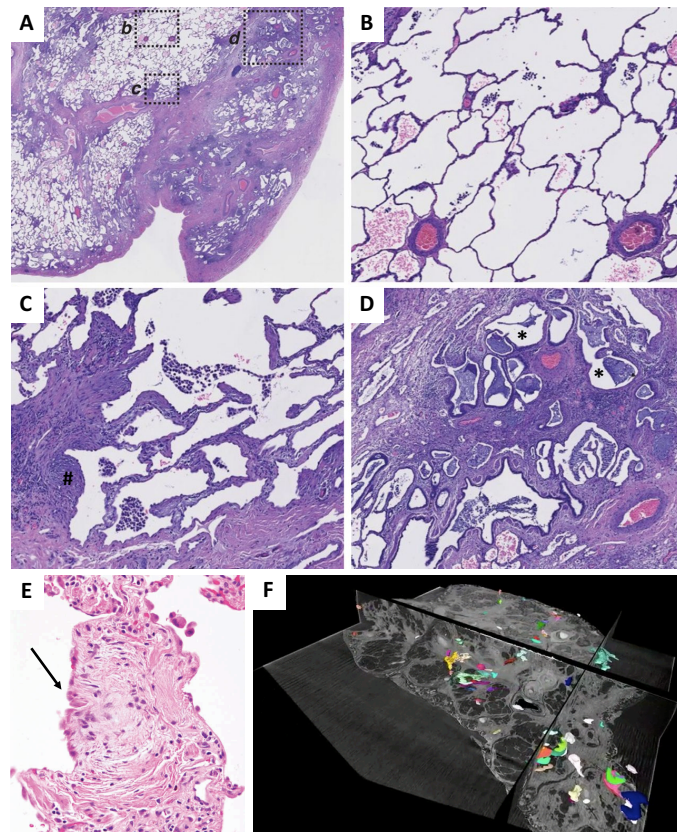


Figure 12. Le diagnostic de la FPI : l'examen histologique présentant le profil de PIC. Microphotographie d'une coupe de poumon d'un patient atteint de FPI contre-colorée à l'éosine-hématoxyline (A-D). L'apparence histologique du poumon est hétérogène, avec des zones saines (B) et des zones de lésions sous pleurales (C et D). Présence de zones en transition caractérisées par une structure d'apparence normale mais avec un épaissement de la paroi alvéolaire juxtaposée à un foyer fibroblastique (#) (C) et des zones de dépôt de collagène excessifs caractéristiques de la fibrose accolée à des rayons de miel (*) (D). Un foyer fibroblastique est formé de cellules fusiformes, les fibroblastes, et peut être limité par des cellules épithéliales alvéolaires hyperplasiques (flèche) (E). La répartition hétérogène des foyers fibroblastiques (couleurs) dans les poumons de patients est visible par reconstruction 3D (F). D'après (DePianto et al., 2015) (A-D) et (Jones et al., 2016)(F).

4. Traitements actuels de la FPI

Depuis 2014, deux traitements sont prodigués aux patients ; la pirféridone et le nintedanib (King et al., 2014; Richeldi et al., 2014). L'effet de ces molécules a été étudié au préalable sur des modèles animaux de fibrose pulmonaire (Table 1). Le modèle communément utilisé consiste à l'injection intra-trachéale de la bléomycine, un antibiotique induisant la rupture du brin d'ADN.

La pirféridone est un immunosuppresseur dont l'action pharmacodynamique n'est pas encore bien comprise. *In vitro*, la pirféridone inhibe la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (Kurita et al., 2017). En 1995, l'effet anti-fibrotique de cette molécule est observé dans un modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, chez le hamster (Iyer et al., 1995). Le traitement des patients avec la pirféridone limite le déclin de la fonction respiratoire de 50% et diminue, 6 mois après la prise du traitement, le taux de mortalité d'environ 17% (Nathan et al., 2016). Le nintedanib est un inhibiteur des récepteurs tyrosine kinase. *In vitro*, son action

augmente la dégradation de la matrice extracellulaire et diminue la sécrétion de collagène de type I par les fibroblastes. Les résultats sur les fonctions respiratoires et le taux de survie sont similaires à la pirféridone (*Tepede and Yogarathnam, 2017*). Cependant, ces traitements n'arrêtent pas la progression de la maladie. L'idée de combiner l'utilisation des deux traitements (pirféridone et nintedanib) a donné lieu à l'essai clinique INJOURNEY™ trial. Cependant, d'après les premières observations, bien que limitant les effets secondaires, cette stratégie thérapeutique ne semble pas augmenter l'efficacité du traitement unique (*Vancheri et al., 2018*).

D'autres essais cliniques ciblent les reflux de liquides gastriques acides par le traitement d'anti-acides, des inhibiteurs de pompes à protons tel l'omeprazol. *In vitro*, ces molécules limitent la prolifération des fibroblastes et réduit également le processus de fibrose induit en réponse à la bléomycine dans un modèle murin (*Ghebremariam et al., 2015*). Cependant, une étude analysant l'ensemble des essais cliniques révèle des résultats très contradictoires quant à l'efficacité de ces anti-acides (*Tran and Suissa, 2018*).

Quel que soit le traitement, bien que la progression de la maladie soit ralentie et la qualité de vie améliorée, aucune modification histologique n'est avérée. En 2016, Serrano-Mollar *et al.* ont réalisé la première transplantation de pneumocytes de type II (PII) chez 16 patients (*Serrano-Mollar et al., 2016*). Les résultats prometteurs révèlent une absence de déclin des fonctions respiratoires 1 an après l'intervention. Ces résultats confirment le rôle prépondérant des PII dans la pathologie de la FPI.

A l'heure actuelle, la transplantation pulmonaire est le seul traitement curatif proposé à certains patients de moins de 65 ans (*Bennett et al., 2015*). Le nombre de patients grandissant, le taux de mortalité d'environ 30% durant l'attente de greffe et la médiane de survie post-transplantation de 4,5 ans (*Kumar et al., 2018*) nécessitent la mise en place de nouvelles cibles thérapeutiques.

Modèle de fibrose pulmonaire induite	Avantage du modèle	Inconvénients et limites du modèle	Utilisation de la pirfénidone et du nintedanib (ou imatinib, un autre inhibiteur des récepteurs tyrosine kinase)
Bléomycine	Apparition de la fibrose rapide (14 jours après le début du protocole). Lésions semblables à celles de la FPI : prédominance des lésions sous-pleurales, présence de cellules épithéliales alvéolaires hyperplasiques.	Phase inflammatoire importante jusqu'au 9 ^{ème} jour. Résorption progressive de la fibrose après 21 jours chez les souris jeunes. Taux de mortalité important.	Pirfénidone (Iyer et al., 1995) Nintedanib (Wollin et al., 2013)
Silice	Apparition de la fibrose rapide (21 jours après le début du protocole). Persistance des lésions.	Reproductibilité contestable. Absence de profil de PIC.	Nintedanib (Wollin et al., 2014)
Amiante	Lésions semblables à celles de la FPI : prédominance des lésions sous-pleurales, présence de foyers fibroblastiques et de rayons de miel.	Apparition tardive de la fibrose (1 mois après début du protocole). Nécessite une chambre d'inhalation	Pirfénidone (Margolin et al., 1982) Imatinib (Vuorinen et al., 2007)
Isothiocyanate fluorescent	Permet d'étudier facilement la mise en place de la fibrose par le suivi de la fluorescence.	Absence de profil de PIC. Phase inflammatoire très importante. Préparation de la solution	-
Radiation	Étude de l'effet d'un stress oxydant. Faible taux de mortalité.	Apparition tardive de la fibrose (24 semaines après le début du protocole). Lésions périvasculaire.	Pirfénidone (Qin et al., 2018) Nintedanib (De Ruyscher et al., 2017)
Surexpression de TGF- β à l'aide d'un adénovirus	Apparition de la fibrose rapide (14 jours après le début du protocole). Lésions semblables à celles de la FPI : prédominance des lésions sous-pleurales, présence de foyers fibroblastiques et de rayons de miel.	Nécessite une animalerie adaptée à l'hébergement des animaux infectés par l'adénovirus.	Imatinib (Bonniaud et al., 2005)

Table 1. Présentation de modèles de fibrose pulmonaire induite communément utilisés.

5. Les facteurs de susceptibilité : facteurs environnementaux et génétiques

a) Facteurs environnementaux

Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la maladie, des études épidémiologiques se sont intéressées aux facteurs de risques associés au développement, à la progression et/ou à l'évolution de la FPI. Très nombreuses sont celles qui soulignent l'importance de sources potentielles d'agressions de l'épithélium alvéolaire telle l'exposition à la fumée de cigarette (*Antoniou et al., 2008; Baumgartner et al., 1997*) pour laquelle le risque de développer la maladie et son pronostic sont corrélés positivement au nombre de paquet-année (*Samara et al., 2011*). D'autres facteurs peuvent également être cités : les reflux de liquide gastrique acide dont la survenue augmente chez plus de 90% des patients (*Raghu et al., 2006*), les infections virales (*Moore and Moore, 2015*) et bactériennes (*Molyneaux et al., 2014*) mais également l'ozone et les particules dont le diamètre est inférieur à 2,5 μm (*Sesé et al., 2018*).

b) Prédisposition génétique

Des études génomiques ont désigné de nombreuses variations génétiques comme facteur de risque majeur dans la survenue de la FPI. L'existence d'une forme familiale de FPI, qui représente environ 20% des cas (*Hodgson, 2002*) a poussé à aborder l'aspect génétique de la maladie. Les principales mutations décrites dans les formes familiales ou sporadiques concernent des gènes impliqués dans la stabilité et l'intégrité de l'épithélium alvéolaire et plus particulièrement dans la fonction des pneumocytes de type II (PII) :

- *ABCA3* qui code pour la protéine du même nom régulant le transport des lipides aux corps lamellaires (*Young et al., 2008; Campo et al., 2014*),
- *SFTPC* dont plusieurs mutations ont été rapportées et qui sont responsables de la modification du domaine BRICHOS en position C-terminale de la protéine SP-C. Ceci induit un mauvais repliement de cette protéine et son accumulation dans le réticulum endoplasmique (RE),
- *SFTPA1* et *SFTPA2* qui code pour une protéine SP-A dont différentes mutations conduisent à son accumulation dans le RE (*Selman et al., 2003; Maitra et al., 2010*).

De nombreuses mutations affectant la composition de la télomérase, enzyme impliquée dans la conservation de la taille des chromosomes, ont été détectées chez les patients. Ces mutations conduisent à un raccourcissement précoce des télomères, favorisant le vieillissement cellulaire. Ce phénomène est observé dans environ 30% des patients (*Cronkhite et al., 2008*). De façon

intéressante, les cellules ayant les plus grandes modifications de taille des télomères sont les PII localisés à proximité des foyers fibroblastiques (*Snetselaar et al., 2017*). Les mutations décrites sont :

- Des mutations des gènes *TERT* et *TERC* codant pour la sous unité protéique à activité transcriptase inverse de la télomérase et pour sa sous unité ARN respectivement (*Wang and Zhou, 2016*),
- Un variant génétique du gène *RTEL1*, codant pour une hélicase de l'ADN impliquée dans la fonction, l'élongation et la stabilité des télomères,
- Un variant génétique portant sur le gène *PARN* qui code pour une protéine régulant la maturation de la télomérase.

D'autres mutations moins spécifiques des cellules épithéliales alvéolaires ont par ailleurs été observées.

Des variations génétiques concernant des gènes codant pour des protéines de l'inflammation tels TLR3 et TOLLIP ont été corrélées à la prolifération accrue des fibroblastes chez les patients (*O'Dwyer et al., 2013*). Mais également la présence de variations génétiques de gènes impliqués dans la régulation de la matrice extracellulaire tels *MMP1*, *MMP19*, *LAMA3* dont les conséquences cellulaires restent encore à définir (*Deng et al., 2018*).

Enfin, l'équipe de Whisett a également mis en évidence une augmentation d'expression de la mucine 5B (*MUC5B*), une protéine du mucus produit par les cellules des voies aériennes distales et proximales, dans les régions alvéolaires. Cette observation souligne le phénomène de bronchiolisation dans la FPI, *id est* la migration progressive de cellules bronchiolaires et le remplacement des pneumocytes (*Xu et al., 2016*). En ce sens, un variant commun du promoteur de *MUC5B* induisant une surexpression du gène a récemment été mise en évidence dans la FPI (*Helling et al., 2017*).

6. La physiopathologie de la fibrose pulmonaire idiopathique

La fibrose est définie comme étant le remplacement d'une matrice extracellulaire (MEC) riche en élastine par une matrice fibreuse plus rigide, riche en collagène de type I et en fibronectine (*Jones, 2011*). Dans la FPI comme dans de nombreuses maladies telles la cirrhose du foie, ce processus est excessif et irréversible. Les principaux acteurs de ce dépôt démesuré de MEC sont les fibroblastes et les myofibroblastes. L'hypothèse de la pathogenèse de la FPI cible un défaut de réparation de l'épithélium alvéolaire consécutif à de multiples agressions répétées à

l'origine d'une dérégulation de la communication entre cellules épithéliales alvéolaires et fibroblastes (*Selman et al., 2001*).

a) La dérégulation du dialogue entre pneumocytes de type II et fibroblastes

Les prédispositions génétiques et les expositions environnementales agressives des PII conduisent à une altération du phénotype de ces cellules (Figure 13A). Alors qu'une portion de PII meurt par apoptose, d'autres cellules, les PII hyperplasiques, prolifèrent de façon excessive et adoptent un profil sécrétoire modifié. Des PII peuvent également acquérir des caractéristiques de cellules mésenchymateuses par le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et ainsi participer à l'accumulation de fibroblastes. L'ensemble de ces changements concourent à la réparation aberrante et non contrôlée de l'épithélium alvéolaire (Figure 13).

La disparition de PII normaux conduit à une diminution du taux de PGE2 et à une modification de la composition du surfactant au sein de l'alvéole (*Günther et al., 1999*). Ceci est à l'origine de la perte de l'effet initialement inhibiteur des PII sur l'activation des fibroblastes (*Adamson, 1992*). Par ailleurs, les PII hyperplasiques produisent de nombreux facteurs tels le TGF- β , le TNF- α , le platelet-derived growth factor (PDGF) et le connective tissue growth factor (CTGF) qui conduisent à la prolifération des fibroblastes et à leur différenciation en myofibroblastes. Ces derniers sont des cellules à très forte capacité de synthèse du collagène de type I aux propriétés contractiles avérées et particulièrement résistantes à l'apoptose (*Yanai et al., 2015; Romero et al., 2016*). D'autre part, les PII sécrètent la chimiokine CXCL12 qui permet le recrutement de fibrocytes sanguins, cellules progénitrices de fibroblastes (Figure 13B). En outre, le TGF- β contrôle la différenciation des fibrocytes en myofibroblastes (*Hong et al., 2007*) (Figure 13C).

Dans cet environnement de PII altérés, le profil sécrétoire des fibroblastes est modifié, avec une augmentation de production de TGF- β 1, PDGF, et IL-1 β molécules impliquées dans leur propre différenciation en myofibroblastes (Figure 13D). Les myofibroblastes activés produisent des MMP2 et MMP9 qui dégradent la membrane basale des pneumocytes. Cette modification de la composition de la matrice extracellulaire (MEC) exacerbe le phénomène d'altération du phénotype des PII, qui produisent à leur tour des MMP3 et MMP7 mais sont également la cible du processus de transition épithélio-mésenchymateuse. Ce processus favorise la production de médiateurs propres aux cellules mésenchymateuses tel le collagène de type I (*Zuo et al., 2002; Yamashita et al., 2011*) (Figure 13C). La sécrétion de ces nombreux médiateurs pro-fibrosants et la modification progressive de la MEC (*Parker et al., 2014*) promeuvent la pérennité de l'environnement fibrosant et sa propagation (Figure 13E).

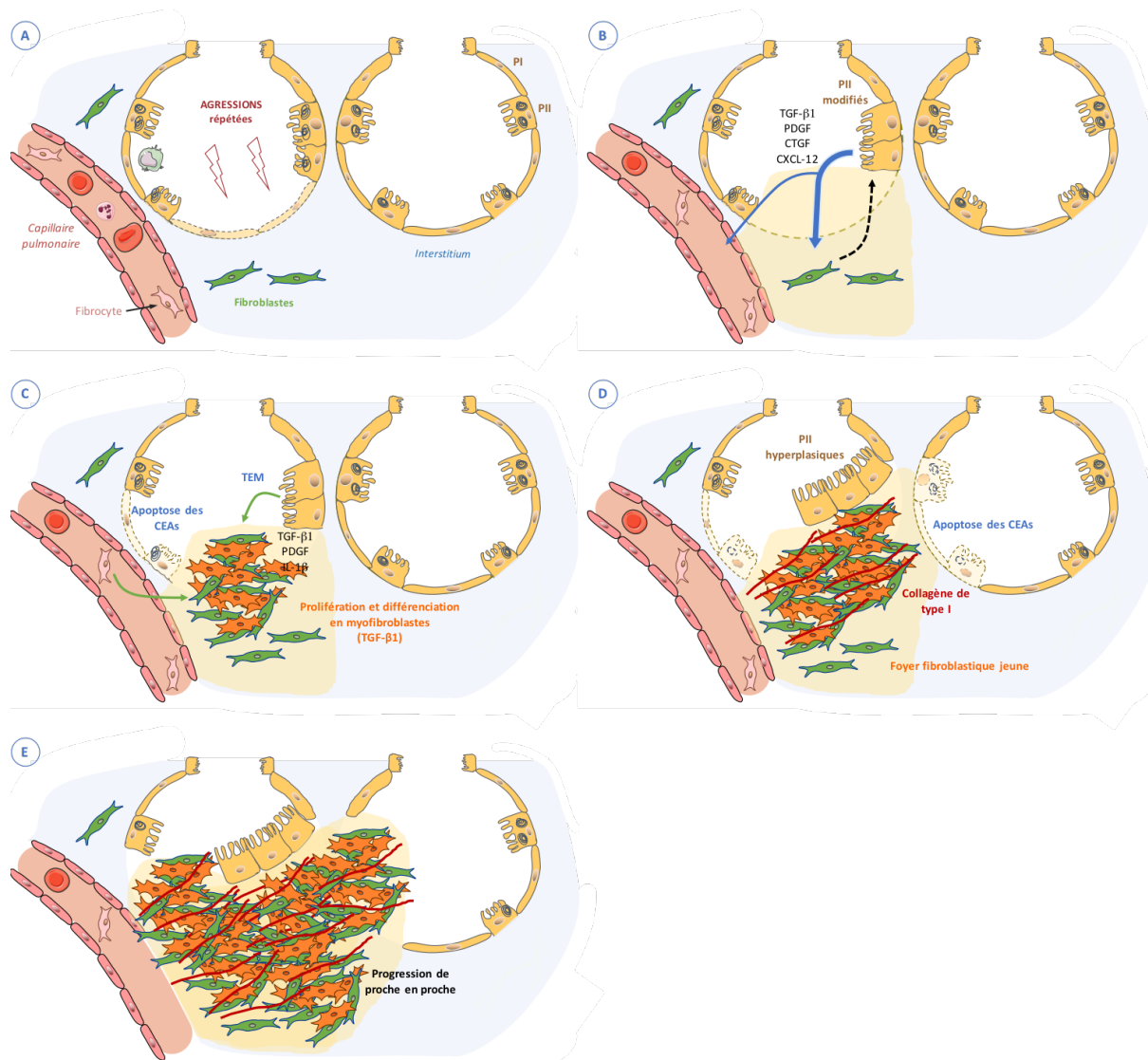


Figure 13. Représentation simplifiée des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la FPI. A la suite de micro-agressions répétées et sur un fond de prédispositions génétiques, (A) le phénotype des PII est modifié et conduit à la sécrétion de facteurs pro-fibrosants (B). Alors que certains PII meurent par apoptose, d'autres subissent une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et participent ainsi à l'accumulation de fibroblastes. Sous l'action des facteurs solubles produits par les PII altérées, les fibroblastes prolifèrent et se différencient en myofibroblastes et produisent à leur tour des facteurs favorisant l'hyperplasie des PII (C). Les myofibroblastes produisent du collagène de type I en excès (D). L'environnement fibrosant est maintenu et s'expand dans tout l'interstitium (E). *Modifié d'après la planche gentiment donnée par le Dr Thomas Gille.*

b) L'apoptose et la transition épithélio-mésenchymateuse des pneumocytes de type II dans la FPI

Au cours de la FPI, le devenir des PII semblent être conditionné à une modification de leur phénotype. Les deux processus les plus représentés et les plus étudiés sont : l'apoptose et la transition épithélio-mésenchymateuse des PII.

i. L'apoptose : généralités

L'apoptose est le type de mort cellulaire programmée le plus étudié. C'est un processus cellulaire complexe qui se produit lors du développement embryonnaire, ou dans le phénomène de renouvellement tissulaire à l'âge adulte. Elle consiste en une succession d'étapes (l'initiation, l'exécution et la dégradation) étroitement coordonnées et contrôlées. Lors de perturbations cellulaires prolongées ou trop intenses, nommées stress, les réponses adaptatives ne sont plus assurées. Ces stress peuvent être intracellulaires comme lors d'un mauvais repliement de protéines retenues dans le réticulum endoplasmique (RE) ou à la suite de lésions de l'ADN, ou encore extracellulaires. Les voies de signalisation activées, qu'elles soient intrinsèques ou extrinsèques, conduisent à une cascade d'activation de protéases à cystéines particulières, nommées les caspases, qui peuvent être initiatrices (2, 4, 8, 9 et 10) ou effectrices (3, 6 et 7). L'activation des caspases effectrices conduit à la fragmentation nucléaire, au réagencement du cytosquelette et à la formation de corps apoptotiques (*Alnemri et al., 1996*). Ces derniers seront phagocytés.

° La voie intrinsèque

La voie intrinsèque fait intervenir l'interaction complexe de différentes protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques présentant des domaines caractéristiques homologues (BH) à la protéine B-cell lymphoma 2 (BCL-2) (Figure 14A). Une balance entre la stabilisation des facteurs pro et anti-apoptotiques conditionne la décision de mort ou de survie de la cellule (Figure 14B).

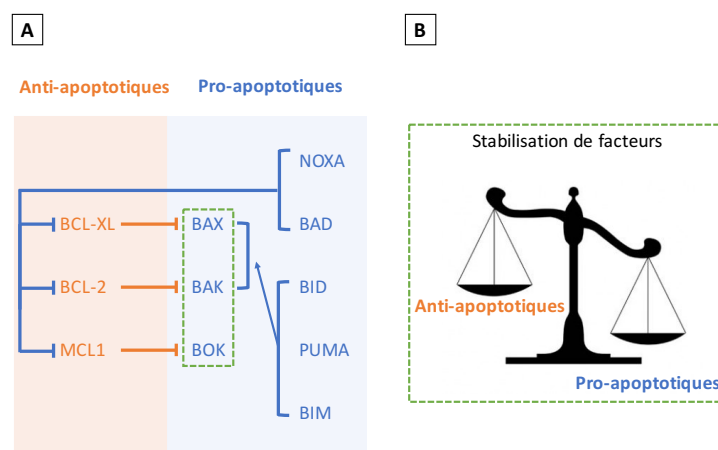


Figure 14. Présentation des facteurs apoptotiques de la voie intrinsèque et leurs interactions. Les facteurs anti-apoptotiques inhibent les facteurs pro-apoptotiques par interaction physique (flèches oranges). Les facteurs BAX, BAK et BOK jouent un rôle primordial dans l'initiation de l'apoptose (A). Lors d'un signal apoptotique, l'expression des facteurs anti-apoptotiques est diminuée et des modifications post-traductionnelles participent à la stabilisation des facteurs pro-apoptotiques (flèches bleues). Ceci conduit à la régulation des facteurs BAX, BAK et BOK (B).

En condition de survie, le facteur pro-apoptotique BAK est majoritairement présent dans la membrane externe mitochondriale (MOM) où il est inhibé par la protéine anti-apoptotique BCL-2 (Willis *et al.*, 2005a). La protéine pro-apoptotique BAX est quant à elle séquestrée dans le cytosol par la protéine anti-apoptotique BCL-XL. Lors de l'activation de la voie intrinsèque suite à une agression (Figure 15.1), un jeu de modifications post-traductionnelles tels des phosphorylations ou des clivages par protéolyse, conduit à l'inhibition des interactions des protéines anti-apoptotiques aux protéines pro-apoptotiques et ainsi à la relocalisation de ces dernières (Hsu *et al.*, 1997). BAX est transloqué à la membrane externe mitochondriale où il s'oligomérisé avec BAK pour former des pores, ce processus est appelé mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) (Wei *et al.*, 2001) (Figure 15.2). La perméabilisation de la membrane mitochondriale conduit à la libération du cytochrome C dans le cytoplasme, jusqu'alors contenu dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie (Figure 15.3). Le cytochrome C libre se lie à la protéase apoptotic protease activating factor 1 (APAF1), et à la pro-caspase 9 pour former un complexe actif, l'apoptosome (Figure 15.4). Ce complexe hydrolyse l'adénosine triphosphate (ATP) conduisant à l'activation de la caspase 9 qui clive à son tour les pro-caspases effectrices 3, 6 et 7 (Figure 15.5).

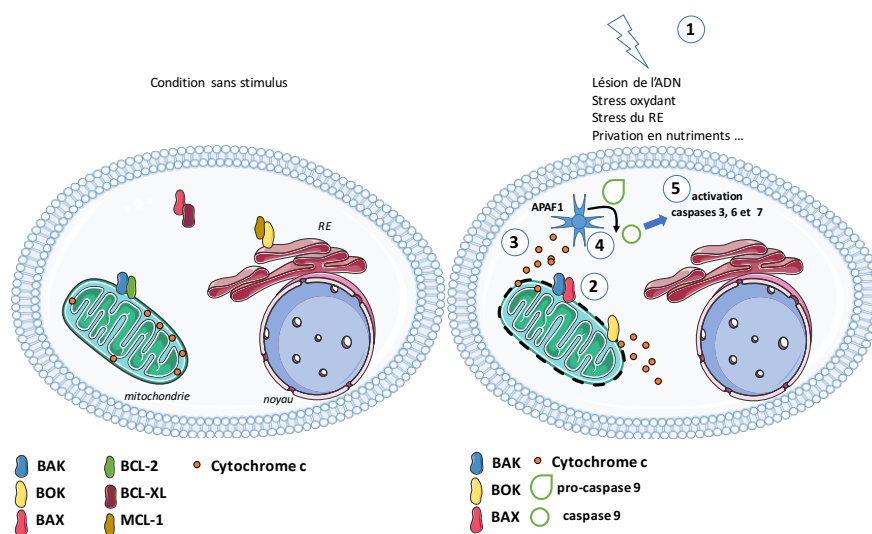


Figure 15. Représentation simplifiée de la voie apoptotique intrinsèque. En condition basale, les facteurs anti-apoptotiques inhibent les facteurs pro-apoptotiques (à gauche). Lors d'un stress cellulaire intense (1), l'expression des facteurs anti-apoptotiques est diminuée et les facteurs pro-apoptotiques subissent des modifications post-traductionnelles favorisant leur stabilisation. BAK et BAX s'oligomérisent au sein de la membrane externe de la mitochondrie et créent des pores *ad instar* BOK (2). Le cytochrome C est libéré et pris en charge par APAF1 ce qui conduit à l'activation de la caspase 9 (3). La caspase 9 clive à son tour les pro-caspases 3, 6 et 7 pour induire l'activation des caspases effectrices (4).

° La voie extrinsèque

Cette voie fait intervenir la superfamille des récepteurs du tumor necrosis factor (TNF), localisés à la membrane plasmique des cellules. Ces récepteurs de mort, FAS (DR2), TNF-R1 (DR1),

TNF-R2, TRAMP (DR3), TRAILR1 (DR4), TRAILR2 (DR5) et DR6 (*Chicheportiche et al., 1997; Peter and Kramer, 1998; Rubio-Moscardo, 2005; Suleiman et al., 2001*) contiennent :

- un domaine CRD extracellulaire riche en cystéine conférant la spécificité du ligand,
- un domaine de mort intracellulaire, le death domain (DD) (*Ashkenazi and Dixit, 1998*).

La formation du couple ligand/récepteur induit un recrutement de protéines adaptatrices *via* leur DD respectifs, FADD et TRADD qui mobilisent à leur tour les pro-caspases 8 et 10 qui s'activent par clivage auto-protéolytique puis dimérisation (*Kischkel et al., 1995; Schleich et al., 2016*). Les caspases 8 et 10 activent alors les caspases effectrices 3, 6 et 7.

La voie extrinsèque peut également amplifier l'activation des voies apoptotiques par la régulation de la voie mitochondriale. En effet, la caspase 8 clive le facteur pro-apoptotique BID conduisant ainsi à l'oligomérisation de BAX et BAK au sein de la membrane mitochondriale, à la libération du cytochrome C et *in fine* à l'activation des caspases effectrices (*Luo et al., 1998*) (Figure 16).

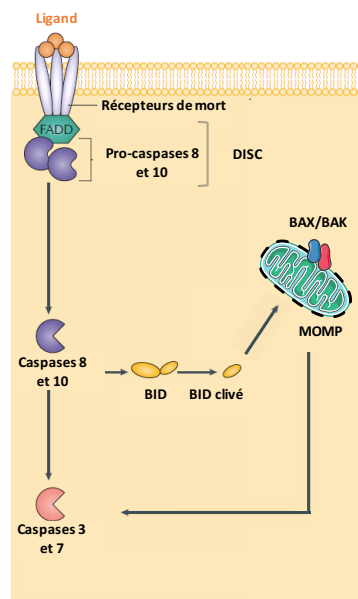


Figure 16. Représentation simplifiée de la voie apoptotique extrinsèque. La liaison d'un ligand aux récepteurs de mort conduit à la formation du complexe DISC composé *inter alia* des pro-caspase 8 et 10. Ces pro-caspases, activées par auto-protéolyse clivent les pro-caspase 3 et 7 conduisant à l'activation des caspases effectrices. Cet effet est amplifié par la modulation de BID impliqué dans l'oligomérisation de BAK et BAX. S'en suit alors la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP), la libération du cytochrome C et l'activation des caspases effectrices. *Modifié d'après (Ichim and Tait, 2016).*

ii. L'apoptose des pneumocytes de type II dans la FPI

Le rôle de l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires (CEAs) en temps qu'évènement initial dans la pathogenèse de la FPI a été pour la première fois suggéré dans des modèles animaux. Dans différents modèles murins de fibrose, l'apoptose des CEAs est observée avant les manifestations des premiers signes de fibrose. En effet, Hagimoto *et al.* démontrent que

l'apoptose des CEAs est antérieure à l'apparition de la fibrose dans le modèle murin de bléomycine ou dans un modèle murin qui médie le phénomène de mort cellulaire programmée (*Naoki Hagimoto et al., 1997; N Hagimoto et al., 1997*).

Chez les patients atteints de FPI, les ruptures du brin d'ADN, observées lors de l'apoptose des cellules, ont été mise en évidence dans les pneumocytes de type II (PII) (*Kuwano et al., 1996*) grâce à la technique du terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL). Plus particulièrement, une augmentation considérable du nombre de PII en apoptose est observée dans les zones de fibrose des patients (*Plataki et al., 2005*). Cette apoptose est la résultante de l'activation des voies extrinsèques et intrinsèques. L'apoptose des PII proches des zones de fibrose est associée à l'expression des récepteurs FAS (*Kuwano et al., 1999*) et à la signalisation résultant de leur activation (*Maeyama et al., 2001*) mais également à l'expression des récepteurs TRAILR1 et TRAILR2. Les ligands de ces récepteurs, FASL et TRAIL, sont produits par les myofibroblastes et les PII eux-mêmes (*Akram et al., 2014; Golan-Gerstl et al., 2007*). Par ailleurs, les PII sains qui produisent du PGE2 sont protégées de l'apoptose dépendante de la voie FAS/FASL. Le défaut de sécrétion de PGE2 par les PII dans la FPI conduit à une sensibilité à l'activation de la voie extrinsèque du récepteur FAS (*Maher et al., 2010*). Les PII proches des zones de fibrose expriment également des marqueurs d'activation de la voie intrinsèque. En effet, l'expression des facteurs pro-apoptotiques BAK et BAX ainsi que l'activation de la caspase 3 clivée est augmentée alors que l'expression du facteur anti-apoptotique BCL-2 est diminuée (*Nakashima, 2005; Plataki et al., 2005*).

L'activation des voies apoptotiques dans les PII de patients atteints de FPI fait intervenir le TGF- β . En effet, la présence d'un anticorps bloquant du TGF- β limite l'apoptose des PII observée lors d'une culture avec du lavage broncho-alvéolaire de patients atteints de FPI (*Hagimoto et al., 2002*). La liaison du TGF- β à son récepteur participe d'une part à la régulation de la voie FAS/FASL par un mécanisme encore mal compris (*Hagimoto et al., 2002; Santiago et al., 2004; Wheaton et al., 2017*) et conduit d'autre part à une voie de signalisation dépendante des protéines mothers against decapentaplegic homolog (SMAD) qui régule la transcription de gènes pro-apoptotiques tels *BIM* ou *BAX* (*Ramesh et al., 2009*) (Figure 17).

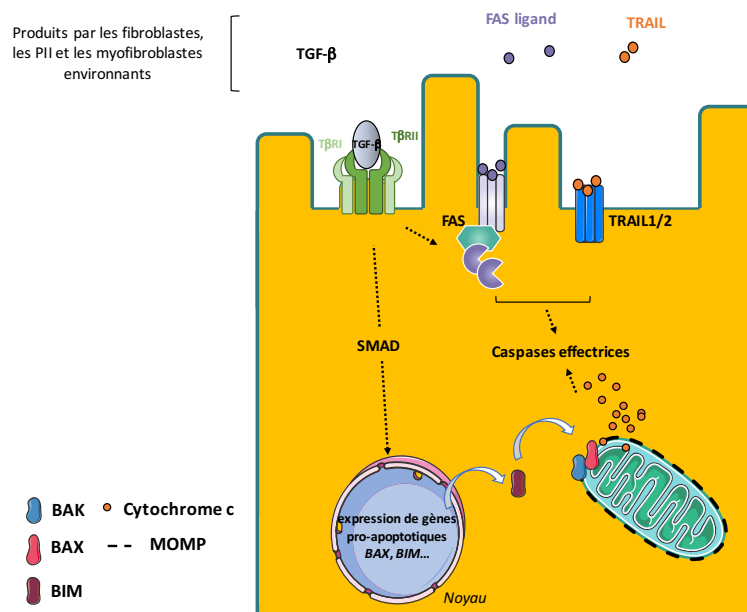


Figure 17. Représentation simplifiée des voies apoptotiques induites dans les PII dans la FPI. L'expression des facteurs pro-apoptotiques BAK, BAX et BIM est augmentée *via* l'activation de la voie du TGF-β faisant intervenir les SMAD. La production de différents ligands des récepteurs de morts par les cellules avoisinantes conduit à l'activation de voies apoptotiques extrinsèques.

Outre son rôle dans l'apoptose, le TGF-β peut également induire la perte du phénotype épithélial au profit d'un phénotype mésenchymateux. Cette dualité d'effets pro-apoptotiques ou pro-TEM est dépendante de la composition de la matrice extracellulaire dans laquelle évolue la cellule (Leight *et al.*, 2012; Wheaton *et al.*, 2016). *In vitro*, des PII exposés au TGF-β subissent une apoptose en culture sur une matrice relativement souple, alors qu'une matrice riche en collagène de type I induit préférentiellement une TEM, participant ainsi au maintien d'un environnement pro-fibrosant (Kim *et al.*, 2006).

iii. La transition épithélio-mésenchymateuse : généralités

En 1995, dans sa revue bibliographique, Hay propose le terme de transformation épithélio-mésenchymateuse (TEM) pour définir le processus au cours duquel les cellules épithéliales perdent leur phénotype pour acquérir des propriétés propres aux cellules mésenchymateuses. En effet, les cellules épithéliales perdent leur polarité basale-apicale et leurs protéines d'adhérence. Par ailleurs, leur cytosquelette est réorganisé pour adopter un phénotype de cellule motile, à la capacité d'invasion de la matrice extracellulaire et résistante à l'apoptose. Le terme de « transition » sera préféré au terme de « transformation », plus approprié pour décrire le caractère dynamique, réversible et progressif de ce phénomène cellulaire. Cette modification de comportement est étroitement régulée et fait intervenir des mécanismes moléculaires complexes (Figure 18).

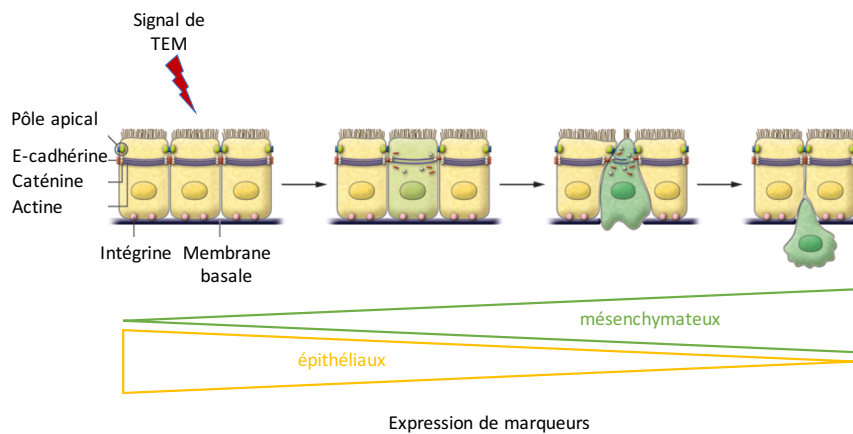


Figure 18. Représentation de l'évolution de l'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux au cours de la TEM. Modifié d'après (Acloque et al., 2009).

La transition d'un phénotype épithélial vers un phénotype mésenchymateux est un processus qui peut être complet, c'est à dire que les cellules n'expriment plus de marqueurs épithéliaux. Il existe également de nombreux états hybrides possédant l'expression de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux. Les mécanismes contrôlant ces états sont encore mal connus mais très étudiés puisqu'ils conditionnent le devenir d'une cellule et sa participation aux différentes pathologies faisant intervenir le processus de TEM.

° Les modifications phénotypiques lors de la transition épithélio-mésenchymateuse

La désorganisation des jonctions cellulaires et la migration des cellules représentent deux étapes majeures observées au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).

La première phase de la TEM consiste à la déstructuration des jonctions cellulaires par dégradation ou relocalisation des protéines de jonction. Les jonctions adhérentes sont dérégulées, principalement par le clivage et la dégradation de la E-cadhérine qui est remplacée par la N-cadhérine (Shih and Yamada, 2012). Ces nouvelles jonctions adhérentes sont moins résistantes et facilitent l'interaction préférentiellement avec les cellules mésenchymateuses avoisinantes par liaison homophile des N-cadhérines (Katsamba et al., 2009). Les jonctions serrées sont également perturbées. Cet événement est associé à la relocalisation cytoplasmique de ZO1 suite à sa phosphorylation (Kaihara et al., 2003). Concernant les jonctions communicantes, l'expression des connexines (Cx) et plus particulièrement de la Cx43 est diminuée lors de l'initiation de la TEM (Yu et al., 2014) permettant de limiter la communication entre les cellules et faciliter leur dissociation (Meng et al., 2013; Guo et al., 2016; James et al., 2018).

La migration des cellules est la seconde phase de la TEM. Elle nécessite une modification morphologique rapide et implique un changement de l'organisation du cytosquelette mais également de la composition de la membrane plasmique. La cytokératine est progressivement remplacée par des filaments de vimentine impliqués dans le recrutement de protéines de motilité (*Mendez et al., 2010*), et l'expression de l'actine du muscle lisse, l'alpha smooth muscle actin (α -SMA) est augmentée. L' α -SMA permet aux cellules de générer des forces de tractions nécessaires à leur migration (*Chen et al., 2007*). Par ailleurs, les membranes plasmiques des cellules en cours de TEM s'enrichissent en cholestérol. Ce phospholipide confère la fluidité aux membranes et favorise ainsi les propriétés migratoires et invasives des cellules.

° Les facteurs de transcription de la transition épithélio-mésenchymateuse

L'acquisition de propriétés mésenchymateuses par les PII, et notamment la régulation de l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans les jonctions et la motilité cellulaires, dépend de l'activation de facteurs de transcription bien décrits. Les principaux facteurs de transcription impliqués dans le processus de TEM sont Snail family transcriptional repressor 1 (SNAIL1), SNAIL2, Zinc finger E-box-binding homeobox 1 (ZEB1), Twist family BHLH transcription factor 1 (TWIST1) et le facteur serum-response factor (SRF) (Figure 19).

Les facteurs SNAIL1, ZEB1 et TWIST1 régulent l'expression de gènes impliqués dans la voie de synthèse du cholestérol (*Morandi et al., 2017*). SNAIL1, SNAIL2, ZEB1 et TWIST1 inhibent l'expression de la E-cadhérine (*Vesuna et al., 2008*) et de ZO1 (*Ikenouchi, 2003*). SNAIL1 inhibe également l'expression du gène codant la Cx43 (*Lim et al., 2009*). La diminution d'expression de ces molécules de jonction conduit à une perte d'adhésion permettant d'enclencher le processus de migration. TWIST1 et ZEB1 régulent l'expression du gène codant la vimentine (*Dou et al., 2014*), et SRF l'expression du gène codant l' α -SMA (*Kim et al., 1997*).

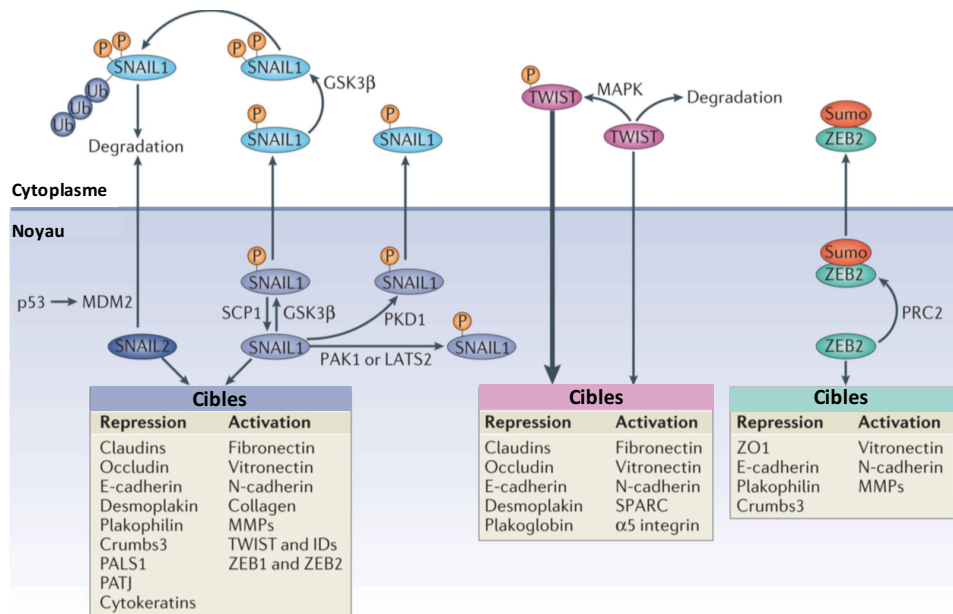


Figure 19. Schéma présentant les facteurs de transcription de la TEM et leurs cibles. D'après (Lamouille et al., 2014).

Au cours de congrès tenus en 2007 et 2008 en Pologne et aux Etats-Unis respectivement, il a été convenu de classer la TEM en 3 types (Kalluri and Weinberg, 2009; Zeisberg and Neilson, 2009). Le type I intervient au cours de l'embryogenèse, le type II est observé lors du processus de réparation ou de fibrose et le type III correspond au phénomène de progression tumorale.

° La transition épithélio-mésenchymateuse au cours du processus de réparation et de fibrose

La TEM de type II est observée lors du processus de réparation épithéliale et au cours du phénomène de fibrose. Suite à l'agression épithéliale, les cellules inflammatoires sécrètent au niveau du site lésionnel des médiateurs favorisant l'inhibition de contact et l'acquisition de propriétés migratoires des cellules épithéliales. L'objectif est d'assurer la ré-épithélialisation (Figure 13).

Le phénomène de réparation épithéliale est souvent étudié *in vivo* suite à la réalisation de petites lésions sur la peau de souris et *in vitro* après la réalisation d'une brèche sur un tapis de cellules épithéliales. A l'aide de ces méthodologies, les modifications morphologiques des cellules épithéliales de la peau et leur capacité migratoire ont été observées. Il a notamment été décrit dans les cellules en migration, une diminution d'expression de la E-cadhérine (Kawahara et al., 2001) et l'induction de l'expression de la vimentine et de la protéine 1 spécifique des fibroblastes (FSP1) (Yan et al., 2010). De manière intéressante, à la suite d'une agression physique de la trachée, la ré-épithélialisation des sites lésionnels nécessite l'expression de la N-cadhérine et l'acquisition de propriétés migratoires par les cellules épithéliales de la trachée (Kardia et al.,

2017). Dans ce cas de réparation, la TEM n'est que partielle, les cellules co-expriment des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux. Le facteur de transcription le plus décrit dans ce processus de TEM est SNAIL2. Son rôle a été observé dans un modèle *ex vivo* de peau (Arnoux et al., 2008) et dans un modèle de souris déficientes pour le gène *Snail2* sur lesquelles sont réalisés de petites plaies (Hudson et al., 2009) et dont le processus de réparation est fortement perturbé.

Chez des patients atteints de fibrose rénale, hépatique ou pulmonaire, les cellules épithéliales expriment à la fois des marqueurs épithéliaux associés et des marqueurs mésenchymateux. Dans différentes études, il a été observé que les cellules épithéliales perdent totalement l'expression de marqueurs épithéliaux et seraient une source de myofibroblastes. C'est notamment le cas dans les contextes de fibrose du foie (Zeisberg et al., 2007), du rein (Iwano et al., 2002; Rastaldi et al., 2002) ou encore du poumon (Tanjore et al., 2009). Cette hypothèse est basée sur des études de traçage génétique *in vivo* permettant de suivre spécifiquement le devenir des cellules épithéliales dans des modèles de fibrose induite. Cependant, les résultats sont souvent contradictoires comme dans la fibrose du rein (Humphreys et al., 2010) et la proportion de cellules épithéliales alvéolaires déterminée comme source de myofibroblastes est relativement faible (Mederacke et al., 2013). Dans le processus de fibrose, un des enjeux majeurs est de déterminer si la TEM est complète ou partielle.

Dans les contextes de fibrose mais également dans la réparation de l'épithélium, les voies les plus documentées dans cette TEM de type II sont celles de Wnt (Figure 19) et du TGF- β (Figure 20).

L'induction de la voie Wnt, *id est* la liaison de Wnt sur le récepteur frizzled, conduit à la stabilisation de la β -caténine. Celle-ci est transloquée dans le noyau où elle s'associe avec T cell factor (TCF) pour réguler l'expression des gènes codant les facteurs de transcription SNAIL2, TWIST1 et ZEB1 qui à leur tour induisent l'expression de protéines contrôlant les modifications phénotypiques (Figure 20).

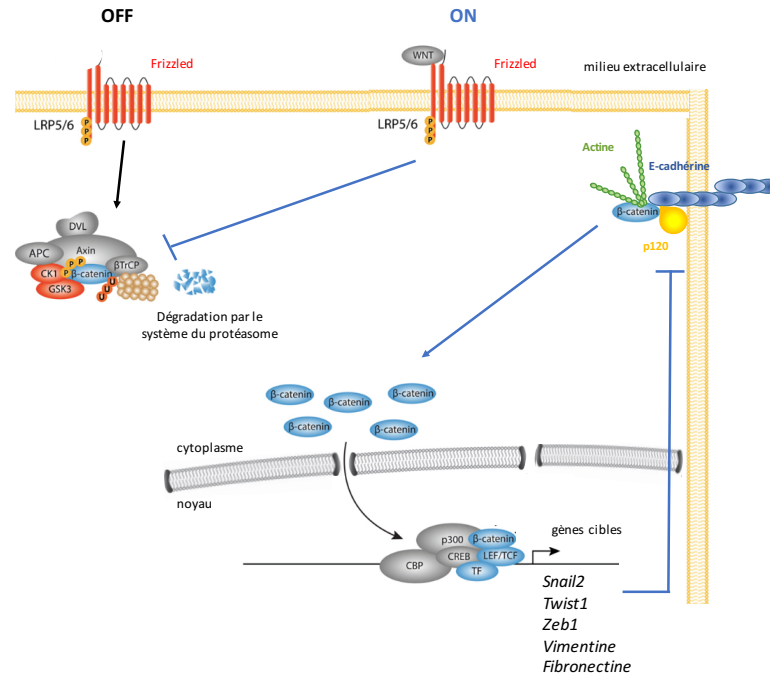


Figure 20. Représentation simplifiée de la voie de signalisation canonique de Wnt impliquée dans la TEM. Lorsque le récepteur frizzled est libre, la β -caténine est phosphorylée puis dégradée par le protéasome ou alors elle est intégrée dans les jonctions serrées. Lors de la fixation de wnt sur son récepteur, le complexe inhibiteur de la β -caténine est désassemblé induisant la translocation de cette dernière dans le noyau. Son association avec T cell factor (TCF) induit la régulation de nombreux gènes inducteurs de la TEM. *Modifié d'après (Menezes, 2014; Piersma et al., 2015).*

La voie du TGF- β augmente d'une part les propriétés migratoires des cellules épithéliales et d'autre part participe à la production de collagène de type I (Miettinen et al., 1994; Kaimori et al., 2007). Le TGF- β 1, est un membre de la famille du TGF- β qui est composée de 3 isoformes. Ce médiateur soluble, dès lors qu'il est produit et sécrété par les cellules, est séquestré dans un complexe latent inactif. Le mécanisme d'activation du TGF- β 1 fait intervenir l'interaction avec des intégrines exprimées par les cellules épithéliales (Mu et al., 2002; Ludbrook et al., 2003) mais également un processus de protéolyse réalisé par les métalloprotéase (MMP) (Yu and Stamenkovic, 2000). Une fois libéré, le TGF- β 1 se lie au récepteur thréonine-kinase 2 du TGF- β (T β RII). Ce récepteur se dimérise avec le récepteur 1 (T β RI) qu'il active par phosphorylation (Wrana et al., 1994).

Deux voies de signalisation du TGF- β sont décrites dans le processus de la TEM : la voie canonique dépendante des SMAD et la voie non canonique (Figures 21). L'activation du T β RI par phosphorylation, induit le recrutement des SMAD2 et SMAD3 ainsi que leur phosphorylation. SMAD2 et SMAD3 sont pris en charge par SMAD4 permettant leur translocation dans le noyau. SMAD3 se lie à l'ADN sur l'élément de réponse de SMAD. SMAD2 et SMAD4 jouent le rôle de

régulateur de la transcription de gènes codant pour les facteurs de transcription pro-TEM SNAIL1, SNAIL2 et ZEB1 mais également des gènes codant pour des protéines pro-fibrosantes tels le CTGF, la fibronectine, le collagène de type I et le TGF- β 1 (Van Obberghen-Schilling et al., 1988; Arciniégas et al., 1992) (Figure 21). SMAD3 interagit également avec le facteur SRF induisant l'expression du gène codant l' α -SMA (Qiu et al., 2003) (Figure 21A).

Le TGF- β peut également induire la TEM par l'activation de voies indépendantes des SMAD (Figure 21B). C'est le cas des voies des mitogen-activated protein (MAP) kinases qui, par un jeu de phosphorylations, activent les kinases extracellulaire signal-regulated kinases (ERK), p38 et c-Jun N-terminal kinases (JNK). Ces kinases phosphorylent à leur tour des co-facteurs des SMAD favorisant leur activité transactivatrice (Bhowmick et al., 2001; Davies et al., 2005; Zhou et al., 2017). La voie de signalisation non canonique du TGF- β impliquée dans la TEM lors du processus de fibrose peut être amplifiée par l'action de l'EGF et de CTGF qui lors de l'activation de leur récepteur participent à l'induction de ERK (Song et al., 2007; Buonato et al., 2015; Rayego-Mateos et al., 2018) (Figure 21B).

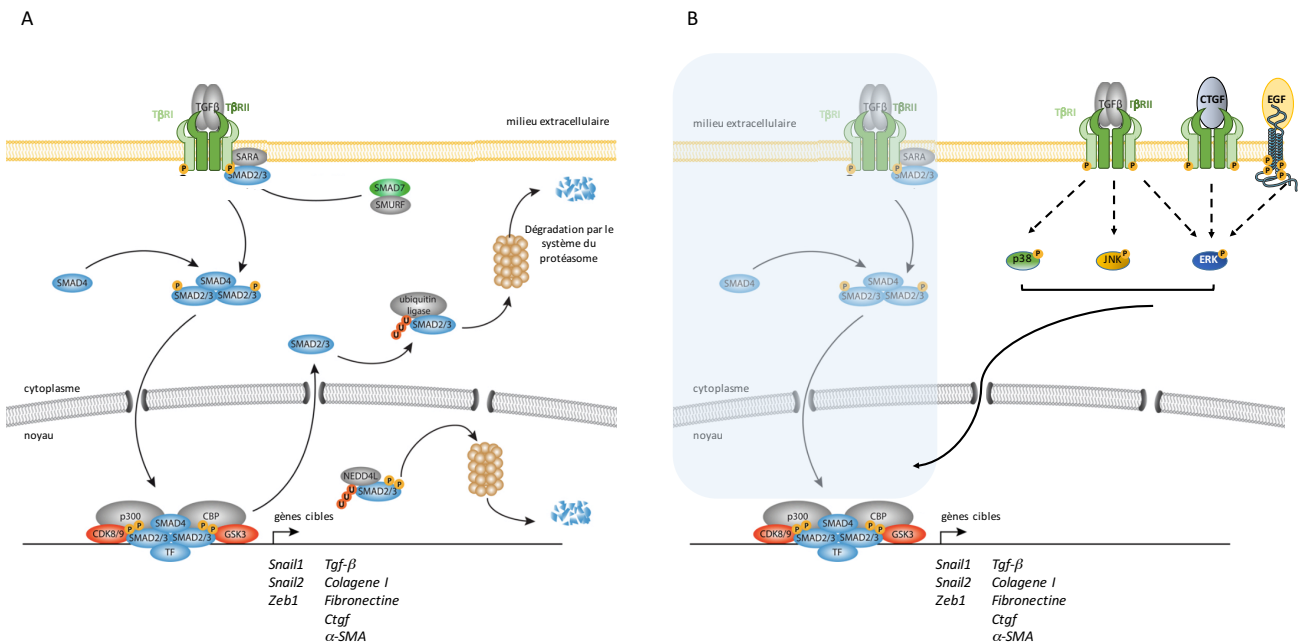


Figure 21. Représentation des voies de signalisation canonique et non canonique du TGF- β impliquée dans la TEM. L'activation des deux dimères des récepteurs T β RI et T β RII par la liaison du TGF- β induit la voie des SMAD. SMAD2 et SMAD3 phosphorylés sont transloqués dans le noyau pour réguler des gènes impliqués dans la TEM et dans la fibrose (A). L'activation des deux dimères des récepteurs par la liaison du TGF- β induit la voie des MAP kinases (flèches discontinues) et à l'activation de p38, JNK et ERK qui participent à la régulation génique médiée par les SMAD. CTGF et EGF participent à l'amplification de la réponse au TGF- β en induisant ERK. D'après (Menezes, 2014; Piersma et al., 2015) (A) et (Menezes, 2014; Piersma et al., 2015) (B).

iv. La TEM des pneumocytes de type II dans la FPI

Pour Lesur *et al.*, la capacité proliférative et de différenciation des PII en PI ne peut expliquer à elle seule la rapidité du processus de ré-épithélialisation (Adamson and Bowden, 1974; Evans *et al.*, 1973). Portés par les travaux de Barrandon *et al.* en 1987 qui montrent que les cellules épithéliales de la peau, les kératinocytes, migrent en présence de facteurs de croissance (Barrandon and Green, 1987), les travaux de Lesur *et al.* mettent en exergue la capacité des PII à acquérir des propriétés migratoires et le changement de forme qui apparaît lors de ce phénomène (Lesur *et al.*, 1996). L'expression par les PII de marqueurs mésenchymateux, tels l' α -SMA, a été observée à plusieurs reprises chez les patients atteints de FPI (Willis *et al.*, 2005b; Yamada *et al.*, 2008; Marmai *et al.*, 2011).

L'implication de la TEM des PII dans la fibrogénèse est très débattue et deux hypothèses s'opposent. La première hypothèse décrit les PII comme une source potentielle de myofibroblastes. Afin de vérifier ce postulat, une lignée de souris transgéniques a été développée permettant de tracer spécifiquement les PII, par le suivi de l'expression du promoteur du gène codant la protéine SP-C. L'exposition de ces souris au TGF- β (Kim *et al.*, 2006) ou à la bléomycine (Tanjore *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009; Rock *et al.*, 2011) induisant une fibrose pulmonaire conduit à une augmentation de cellules exprimant à la fois la protéine du surfactant SP-C, spécifique des PII mais également l' α -SMA ou la vimentine. Cependant, selon les travaux, les résultats décrivent un nombre de cellules en TEM variant de 4 à 30%, suggérant ainsi un rôle limité dans la différenciation en fibroblastes. La seconde hypothèse suggère quant à elle, que l'acquisition de propriétés propres aux cellules mésenchymateuses contribue simplement à l'environnement fibrosant, favorisant ainsi la pérennité et la propagation de la fibrose. En effet, *in vitro* la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes est conditionnée par la production de matrice extracellulaire et plus particulièrement le collagène I et le TGF- β par les PII (Yao *et al.*, 2018).

° Le TGF- β et Wnt : principales voies impliquées dans la TEM des pneumocytes de type II

Des analyses transcriptomiques révèlent que parmi les voies de signalisation induites chez les patients de FPI, celles du TGF- β et de Wnt sont les plus actives (Gangwar *et al.*, 2017; Vukmirovic *et al.*, 2017) (Figure 22). D'autres travaux observent dans les PII, une localisation nucléaire de la β -caténine (Chilosi *et al.*, 2003; Königshoff *et al.*, 2008; Rydell-Törmänen *et al.*, 2016), une augmentation de l'expression de la protéine WISP1 (régulée par la voie canonique de Wnt) mais également l'expression de JNK et p38 (Yoshida *et al.*, 2002) (Figure 22).

L'implication de voies du TGF- β et de Wnt dans la TEM des PII a été vérifiée dans des modèles animaux de fibrose induite et *in vitro*. Alors qu'une exposition au TGF- β 1 conduit à une modification morphologique des PII (Ask *et al.*, 2008) associée à une fibrose, la déficience du récepteur T β RII spécifiquement dans les PII limite leur entrée en TEM et ainsi les dommages induits par la bléomycine (M. Li *et al.*, 2011). *In vitro*, l'exposition de PII au TGF- β 1 induit la voie des SMAD et conduit à la diminution de l'expression de la E-cadhérine en faveur de marqueurs mésenchymateux tels l' α -SMA et la vimentine mais également de marqueur pro-fibrosant comme la fibronectine, le CTGF et le collagène de type I (Kasai *et al.*, 2005).

L'étude de la voie Wnt dans l'induction de la TEM des PII a été réalisée par l'utilisation de modèle murin transgénique permettant le suivi d'un gène rapporteur dont le promoteur contient les éléments de réponse au facteur TCF (Figure 20). Les souris transgéniques exposées à la bléomycine présentent une augmentation de l'activité de la voie Wnt dans l'épithélium alvéolaire proche de zones de fibrose (Liu *et al.*, 2009). Par ailleurs, l'inhibition pharmacologique de cette voie limite la fibrose induite par la bléomycine corrélée à l'absence d'expression de marqueurs mésenchymateux par les pneumocytes (Wang *et al.*, 2014). Le rôle de la voie Wnt dans la TEM est confirmé *in vitro*. La stimulation des PII en culture avec WISP1 conduit à leur migration et à la modulation des gènes *Mmp7* et *9*, signes de la mise en place du processus de TEM (Königshoff *et al.*, 2008; Rydell-Törmänen *et al.*, 2016).

Dans le processus de TEM des PII, les voies du TGF- β et de Wnt sont interconnectées. En effet, l'activation du récepteur frizzled exacerbe la phosphorylation des SMAD et leur translocation dans le noyau (Xu *et al.*, 2017).

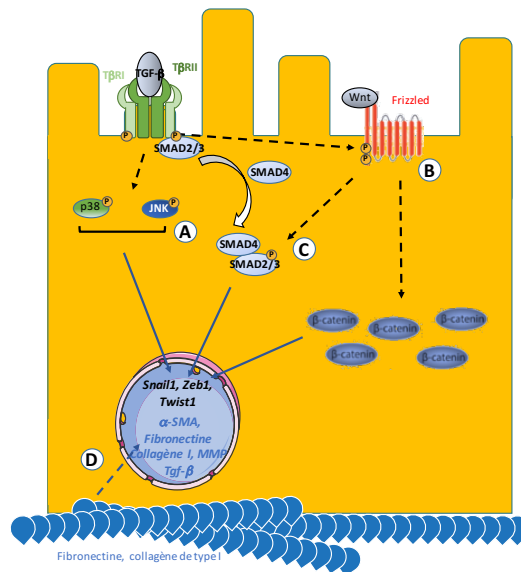


Figure 22. Représentation simplifiée des différentes voies conduisant à la TEM de PII dans la FPI. Les voies du TGF- β canonique et non canonique (A), la voie Wnt (B), l'interaction de ces voies (C) et la modification de la composition de la matrice extracellulaire (D) conduisent à l'activation de gènes pro-TEM et pro-fibrosants.

° Le rôle de la matrice extracellulaire dans la TEM des pneumocytes de type II

Le remodelage de la matrice extracellulaire ainsi que sa composition sont des éléments clés dans la modification phénotypique des PII dans la FPI (Figure 22). En effet dans leurs études *in vitro*, Kim *et al.* et Marmai *et al.* démontrent que le processus de TEM induit par le TGF- β est favorisé lorsque les PII sont cultivés sur une matrice riche en fibronectine et collagène de type I (Kim *et al.*, 2006; Marmai *et al.*, 2011). Par ailleurs, l'expression de facteurs de transcription pro-TEM SNAIL-1 (Jayachandran *et al.*, 2009), ZEB1 (Yao *et al.*, 2018) et TWIST1 (Pozharskaya *et al.*, 2009) a majoritairement été observée dans les PII hyperplasiques, à proximité des foyers fibroblastiques, zone de profond remaniement de la matrice extracellulaire.

Les modifications phénotypiques des PII induites en réponse à des agressions de l'épithélium alvéolaire, à des médiateurs pro-fibrosants mais également au remodelage de la matrice extracellulaire, sont associées à un autre événement cellulaire observé chez les patients atteints de FPI : le stress du réticulum endoplasmique (RE).

III. Le stress du réticulum endoplasmique dans la FPI : un rôle crucial dans la dysfonction des pneumocytes de type II

1. Le réticulum endoplasmique : généralités

Observé pour la première fois en 1945 en microscopie électronique par le canadien Keith Robert Porter, le belge Albert Claude et l'américain Ernest Fullam (Porter, 1945), le réticulum

endoplasmique (RE) est décrit comme un réseau de tubules et de feuillettes dont la lumière est délimitée par une membrane lipidique en continuité avec la membrane nucléaire externe (*Palade and Porter, 1954*). Deux parties du RE, bien qu'en continuité, sont distinguables morphologiquement par la présence ou non de ribosomes, le RE rugueux et le RE lisse respectivement. Les fonctions du RE sont spécifiquement assurées par l'une et/ou l'autre de ces structures. La complexité structurelle et fonctionnelle du RE, les multiples interactions qu'il entretient avec les composants cellulaires, et son implication dans de nombreuses maladies font du RE l'une des organelles les plus étudiées. En effet, le pourcentage de publications scientifiques relatant du RE depuis 1990 est en constante augmentation (recherche Pubmed au 28 août 2018) (Figure 23).

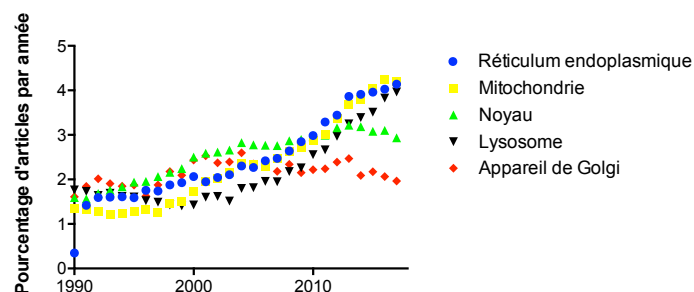


Figure 23. Pourcentage d'articles par année concernant les organelles. Recherche Pubmed du 28 août 2018.

a) La biosynthèse protéique et son contrôle

Dans les années 1980, le laboratoire de Günter Blobel s'intéresse au mécanisme de biosynthèse des protéines et plus particulièrement à la place du RE dans ce processus. En 1981, Walter *et al.* découvrent une molécule particulière, la signal recognition particle (SRP), qui permet l'adressage au RE des peptides nouvellement synthétisés dont le devenir est d'être sécrétés ou localisés dans les membranes (*Walter and Blobel, G., 1981*). Bien que le RE fut dès lors décrit comme spécifique de la génération de ce type de protéines, de récents travaux redéfinissent la fonction primordiale de cette organelle dans la synthèse protéique et mettent à jour les mécanismes impliqués.

i. La prise en charge des protéines néo-synthétisées

° Les protéines sécrétées et membranaires

Le processus de synthèse protéique, appelée traduction, fait intervenir des complexes ribonucléoprotéiques, les ribosomes, localisés dans le cytosol, sur la membrane du RE et des mitochondries. La proportion de ribosomes dans chacun de ces compartiments dépend du type

cellulaire. Dans les cellules sécrétrices, plus de 80% des ribosomes sont associés à la membrane du RE.

A la sortie du ribosome, la région N-terminale d'une chaîne polypeptidique nouvellement synthétisée et le ribosome qui lui y est associé sont reconnus par le complexe SRP. Cette molécule est formée de 6 protéines ; SRP9, 14, 19, 59, 68 et 72 et d'un petit ARN, 7SL. Son récepteur SRP receptor (SR) est un hétérodimère localisé au sein de la membrane du RE qui facilite l'encrage du complexe ribosome/polypeptide et permet l'entrée de la chaîne polypeptidique dans le RE *via* un canal, le translocon. Ce dernier est un complexe de protéines Sec dont le canal est formé par la protéine Sec61. De récents travaux de cryomicroscopie électronique et de cristallographie ont mis en évidence la conformation complexe établie lors de l'interaction ribosome/SRP/SR et décrivent l'implication de la guanosine triphosphate (GTP) dans le mécanisme de translocation du polypeptide (*Jomaa et al., 2017; Kobayashi et al., 2018*). L'ouverture du canal est stabilisée par les segments hydrophobes de la chaîne polypeptidique naissante. En effet, la translocation de cette dernière fait intervenir les forces de tractions générées par les protéines du translocon, les protéines chaperonnes et l'environnement lipidique (*Niesen et al., 2018*) (Figure 24).

L'étude de délétion de SRP réalisée par *Costa et al.* a mis en évidence son rôle dans le contrôle de l'adressage des protéines sécrétées ou membranaires au RE. L'absence de SRP induit une relocalisation de ces protéines vers la mitochondrie et une dysfonction de cette organelle (*Costa et al., 2018*).

° Les protéines cytosoliques

Le RE est également impliqué dans la prise en charge des protéines à destination cytosolique. En 2012, Reid et Nicchitta proposent qu'un grand nombre d'ARNm codant des protéines cytosoliques sont associés aux ribosomes du RE (*Reid and Nicchitta, 2012*). Basés sur cette étude, les travaux de *Voigt et al.* confirment la présence d'ARNm codant des protéines cytosoliques juxtaposés au RE. Ils décrivent une traduction dépendante du RE qui, par un mécanisme encore inconnu, nécessite l'entrée puis la sortie des chaînes polypeptidiques néoformées du RE (*Voigt et al., 2017*).

ii. Repliement protéique au sein du RE

Afin d'obtenir sa structure tertiaire et/ou quaternaire, le polypeptide nouvellement formé par le ribosome va subir une étape de maturation dans le RE. Au cours de ce processus, des modifications de conformation de la chaîne polypeptidique vont s'opérer comprenant le repliement et la formation de ponts disulfures. Ces événements sont contrôlés par des protéines chaperonnes et des oxydoréductases. Si ces protéines ne parviennent pas à octroyer la conformation optimale au polypeptide, alors ce dernier est pris en charge par un système de dégradation.

° Les protéines chaperonnes

En fonction de son statut de glycosylation, le polypeptide néosynthétisé est pris en charge par le système calnexine/calréticuline (CNX)/(CRT) (*Hammond et al., 1994; Hebert et al., 1995*) ou par la glucose-related protein 78 (GRP78). Ces chaperonnes prennent en charge les chaînes naissantes lors de leur translocation à travers la membrane du RE (*Haßdenteufel et al., 2018; Whitley and Nilsson, 1996*). Les CNX/CRT reconnaissent les glycosylations alors que GRP78, la plus représentée des chaperonnes, reconnaît les domaines hydrophobes des polypeptides. L'activité de ces protéines chaperonnes, dépendante de la présence de calcium et d'ATP (*Lamb et al., 2006; Wijeyesakere et al., 2015*), induit de fins changements de conformation du polypeptide (*Blond-Elguindi et al., 1993*). L'interaction des chaperonnes avec des co-chaperonnes et des oxydoreductases permet la formation de ponts disulfures nécessaires à la conformation mature du polypeptide (Figure 24).

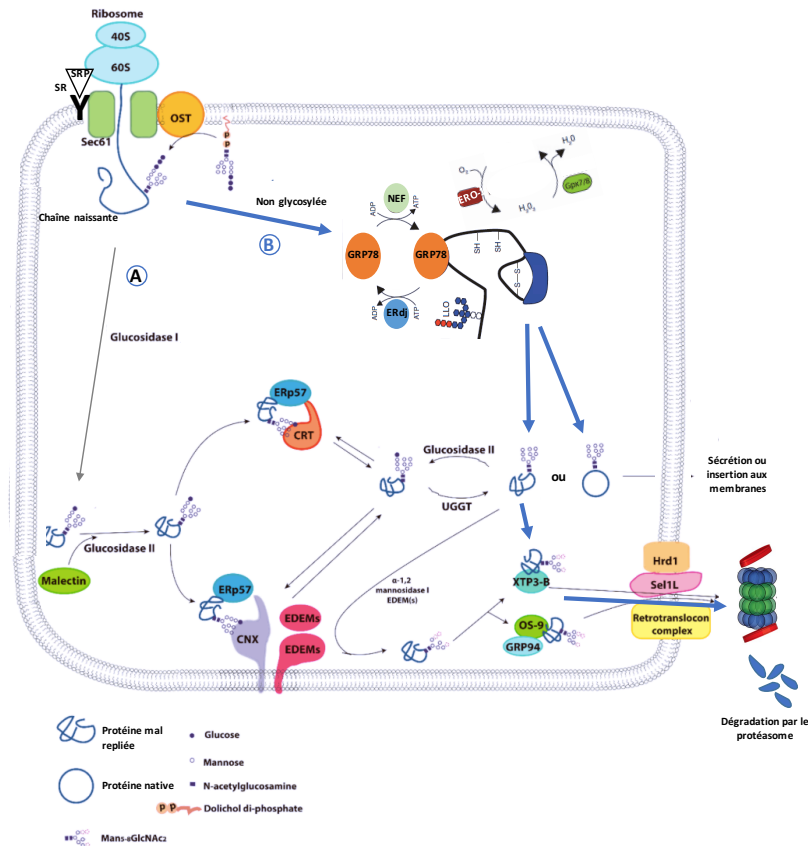


Figure 24. Représentation du contrôle du repliement des protéines. Les protéines au devenir de sécrétion ou endomembranaires sont reconnues par le peptide signal (SRP) qui se lie à son récepteur (SR) et envoie le polypeptide néoformé au translocon du RE. Présentation de la prise en charge d'une protéine glycosylée par le système calnexine/calreticuline (CNX/CRT) (A). Présentation de la prise en charge d'une protéine non glycosylée par la protéine chaperone GRP78 (B). Les protéines PDI et ERO-1 assurent la formation de ponts disulfures. Si les protéines n'adoptent pas leur conformation fonctionnelle, elles sont rétrotransloquées, ubiquitinylées puis dégradées dans le cytosol par le protéasome. *Modifié d'après (Q. Wang et al., 2015).*

° La formation des ponts disulfures

Le repliement des protéines est assuré par la formation de ponts disulfures contrôlés par l'enzyme endoplasmic reticulum oxydase 1 (ERO-1) et la protein disulfide isomerase (PDI). La PDI oxyde les fonctions thiols des protéines non natives et transfère transitoirement les électrons issus de cette oxydation sur les disulfides (S-S) présents dans leur propre site catalytique. En présence d'O₂, le retour des PDI à un état oxydé actif est médié par ERO-1, au dépend de la production d'H₂O₂, une espèce réactive à l'oxygène (ROS). L'état d'oxydoréduction du RE, participe à l'état d'oxydoréduction de la cellule. Les ROS produits au sein du RE, sont alors rapidement éliminés pour rétablir l'équilibre d'oxydoréduction cellulaire (Figure 25).

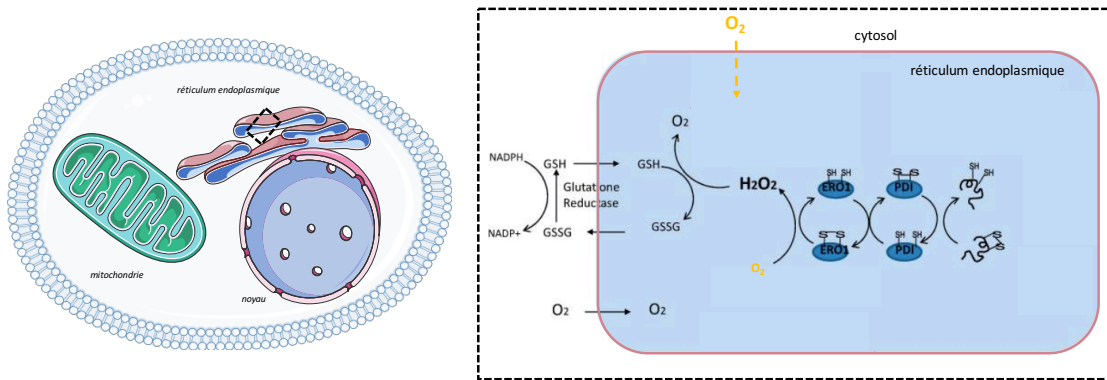


Figure 25. La production de ROS dans le RE lors de la formation de ponts disulfures. Les protéines au devenir membranaires ou sécrétées transitent dans le RE où elles subissent des changements de conformation par la mise en place de ponts disulfures. Ce processus fait intervenir la protein disulfide isomerase (PDI) et l'endoplasmic reticulum oxydoreductase 1 (ERO-1). L' H_2O_2 résultant est rapidement éliminé. *Modifié d'après (Zeeshan et al., 2016).*

A l'issue cette prise en charge par les chaperonnes et les oxydoréductases, les protéines qui ont adopté leur structure tertiaire et ou quaternaire sont ensuite transportées vers l'appareil de Golgi, où elles poursuivront leur maturation. Cependant, les chaperonnes peuvent échouer dans la réalisation du repliement des protéines. C'est notamment le cas lors de mutations ponctuelles conférant une conformation anormale de la protéine, ou encore suite à une erreur lors de la transcription ou de la traduction de la protéine. Le processus de dégradation associé au RE, endoplasmic reticulum-associated protein degradation (ERAD) se met alors en place afin de corriger ces erreurs.

iii. Le système de dégradation associé au RE

Lors de la non-conformité du repliement des protéines, le système complexe de dégradations ERAD se met en place et fait intervenir :

- des protéines OS9 et XTP3B qui vérifient le repliement des peptides (*Hosokawa et al., 2008*),
- une ubiquitine ligase E3 (*Jomaa et al., 2017*),
- un canal permettant la rétrotranslocation des protéines ciblées.

Les protéines mal repliées sont identifiées et séquestrées par la chaperonne GRP78 et la protéine ER dégradation-enhancing α -mannosidase-like protein (EDEM). Le complexe chaperonne/protéine ainsi formé permet la prise en charge de la protéine mal repliée par OS9 et XTP3B qui s'assure de son mauvais repliement (*Christianson et al., 2012; Hosokawa et al., 2008*). S'en suit une reconnaissance entre OS9/XTP3B et la protéine SEL1 luminale du rétrotranslocon et un adressage du complexe à la protéine transmembranaire HRD1. Lors du passage du complexe dans le rétrotranslocon, HRD1 polyubiquitinye la protéine mal repliée et l'adresse ainsi au

protéasome (*Christianson et al., 2012*). Cette machinerie depuis la prise en charge de la protéine mal repliée jusqu'à sa dégradation va permettre de limiter l'accumulation de protéines dans le RE et les effets délétères associés (*Hwang et al., 2017*) (Figure 24).

b) Le stockage du calcium et la régulation de son flux

Le calcium est un messager secondaire impliqué dans la régulation de la transcription de gènes ainsi que la traduction, la migration, la prolifération et la sécrétion de protéines. A l'état basal, la concentration calcique intracellulaire est maintenue à une concentration de l'ordre de 10^{-7} M. De nombreux signaux, qu'ils soient mécaniques ou chimiques, induisent des flux calciques intercellulaires rapides par les jonctions communicantes (*Toyofuku et al., 1998*), mais également au sein de la cellule depuis le milieu extracellulaire ou entre les compartiments cellulaires. Au sein de la membrane plasmique, plusieurs types de canaux calciques permettent l'entrée de calcium (Figure 26). Chaque stimulus induit une réponse calcique avec des acteurs, une amplitude et une fréquence qui lui est propre.

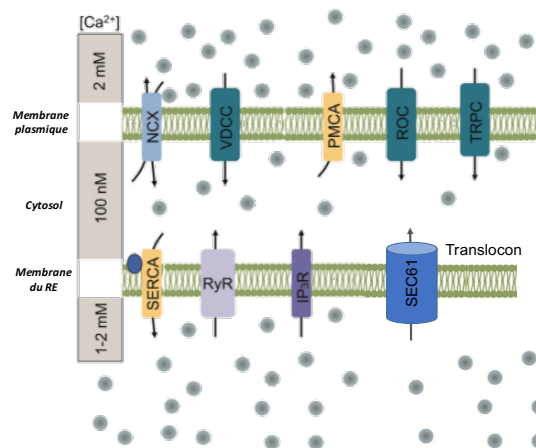


Figure 26. Présentation des principaux canaux impliqués dans la régulation des flux calciques du RE. La membrane plasmique comporte de nombreux canaux calciques tels les sodium-calcium exchanger (NCX), voltage-dependent calcium channel (VDCC), plasma membrane calcium ATPase (PMCA), receptor operated channels (ROC) et transient receptor potential channel (TRPC), dont l'expression varie selon les types cellulaires. Au sein de la membrane du RE, les flux calciques vers le cytosol sont dépendants des ryanodine receptor (RyR), inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) et dans une moindre mesure du translocon alors que la pompe sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) permet la réplétion du RE depuis le calcium du milieu extracellulaire. *Modifié d'après* (Görlach et al., 2015).

Le RE est la principale réserve de calcium intracellulaire, avec une concentration luminale de 10^{-4} M. Il permet de conserver un gradient de concentration calcique important pour la mise en place de réponses rapides. Les flux calciques émanant de cette organelle s'effectuent principalement vers le cytosol mais également vers la mitochondrie. Lorsque la concentration calcique du RE dépasse un seuil, le calcium peut diffuser depuis la lumière du RE vers le cytosol par le translocon (*Coppenolle et al., 2004; Ong et al., 2007*) ou encore par la protéine

transmembrane and coiled-coil domains 1 (*Wang et al., 2016*). La réplétion de calcium du RE depuis le cytosol est possible grâce à la pompe sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) et le calcium du milieu extracellulaire transite jusque dans le RE par les protéines stromal interaction molecule (STIM) . A l'inverse, la libération de calcium depuis le RE vers le cytosol fait intervenir le ryanodine receptor (RYR), l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3)-receptor (IP₃R) et dans une moindre mesure, le canal du translocon.

L'activité des canaux du RE est régulée par l'interaction des protéines résidentes du RE comme les chaperonnes. En effet, l'IP₃R est maintenu inactif par son interaction avec ERp44 et s'ouvre lors d'une interaction avec GRP78 (*Higo et al., 2010*). Les pompes SERCA sont régulées par l'interaction avec la calnexine et la calréticuline (*Li and Camacho, 2004*). Ces régulations sont dépendantes des changements de conformation des chaperonnes, de leur activité et de l'état oxydatif dans le RE qui en découle. L'IP₃R est aussi activé par l'IP₃ produit suite à l'activation de certains récepteurs de la membrane plasmique tels les récepteurs à activité tyrosine kinase et les récepteurs purinergiques.

Lors d'une déplétion calcique du RE, le processus de réplétion, se met en place afin de rétablir l'homéostasie calcique du RE. Les protéines STIM du RE transloquent au niveau des jonctions entre la membrane du RE et la membrane plasmique pour former des *punctae* (*Liou et al., 2005; Wu et al., 2006*) et s'oligomèrisent (*Liou et al., 2007*). STIM oligomérisé, interagit avec le canal calcique ORAI de la membrane plasmique, ce qui conduit à son activation et à l'entrée de calcium dans la lumière du RE (Figure 27).

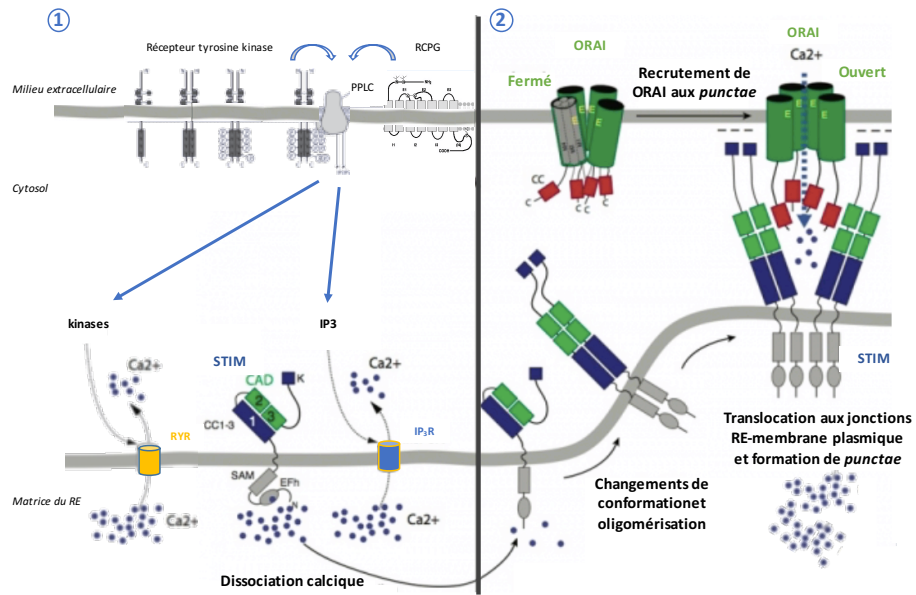


Figure 27. Présentation simplifiée du processus de réplétion du RE. La libération du calcium du RE vers le cytosol est observée lors d'un signal intracellulaire ou extracellulaire conduisant à l'activation des récepteurs à l'IP₃ (IP₃R) ou les récepteurs à la ryanodine (RyR) (1). La déplétion conduit à une dissociation calcique du STIM engendrant des modifications de conformation. Les STIM s'oligomérisent et sont transloqués aux jonctions entre la membrane plasmique et le RE où ils forment des *punctae*. S'en suit une interaction avec le canal ORAI à l'origine de son ouverture et à un influx du calcium directement dans le RE (2). *Modifié d'après (Feske et al., 2012)*.

Les modulations calciques du RE peuvent perturber la fonction de la mitochondrie. En effet, le RE et la mitochondrie possèdent des contacts étroits appelés mitochondria-associated membrane (MAM) de 10 nm (Csordás et al., 2010). Ces MAM sont riches en IP₃R et RyR sur la membrane du RE ainsi qu'en voltage-dépendant anion channel (VDAC) et en mitochondrial calcium uniport (MCU) sur la membrane externe de la mitochondrie. Lors du relargage du calcium par le RE *via* les RyR et les IP₃R, la mitochondrie le capture dans le microenvironnement confiné que sont les MAM, par les VDAC et le MCU (Figure 28). L'influx calcique mitochondrial participe à la régulation des enzymes du cycle de Krebs, mais également à l'apoptose.

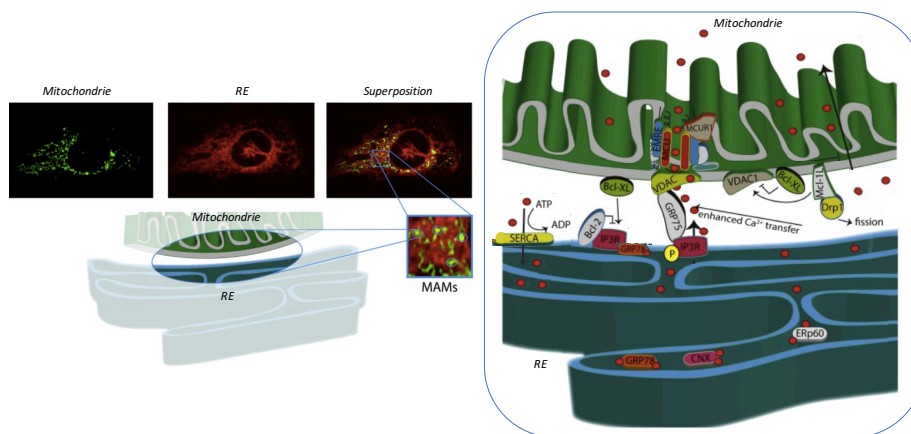


Figure 28. Présentation simplifiée des flux calciques au sein des espaces entre le RE et la mitochondrie (MAMs). Le récepteur à l'IP₃R du RE interagit avec le voltage-dépendant activated channel (VDAC) de la mitochondrie grâce à la protéine GRP75, facilitant le flux calcique du RE vers la mitochondrie. *Modifié d'après (Marchi et al., 2018)*.

2. Le stress du RE

a) Les senseurs

Le stress du RE est défini comme toute perturbation de l'équilibre calcique, oxydatif et lipidique conduisant à l'accumulation de protéines mal repliées. Au sein de sa membrane, le RE possède des senseurs dont l'activation induit différentes voies de signalisation nécessaires au rétablissement de l'homéostasie du RE. Cette réponse est l'unfolded protein response (UPR) (Walter and Ron, 2011). Ces senseurs transmembranaires sont l'inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), PRKR-like ER kinase (PERK) et l'activating transcription factor 6 α (ATF6 α).

En condition basale, une fraction des protéines chaperonnes GRP78 interagit avec la partie luminaire de ces 3 protéines (Bertolotti et al., 2000; Chen et al., 2002) et inhibe leur activation. L'interaction et l'inhibition de IRE1 et PERK semblent être dépendantes du domaine ATPase de GRP78 (Carrara et al., 2015b), alors que le mécanisme d'inhibition d'ATF6 α semble être lié au masquage de séquences signal induisant sa rétention dans le RE sous sa forme inactive (Shen et al., 2002). L'interaction entre GRP78 et IRE1 nécessite la présence de la co-chaperonne ERdj4 (Amin-Wetzel et al., 2017) (Figure 29).

Lors d'un stress du RE, les complexes, GRP78/PERK, GRP78/ATF6 α et GRP78/IRE1 sont rompus conduisant à l'activation des 3 protéines transmembranaires. Ceci se traduit par l'activation des voies de signalisation situées en aval, selon des cinétiques différentes. L'induction de ces voies a pour finalité le contrôle de la réponse antioxydante, le désengorgement du RE, ou alors le maintien de l'UPR.

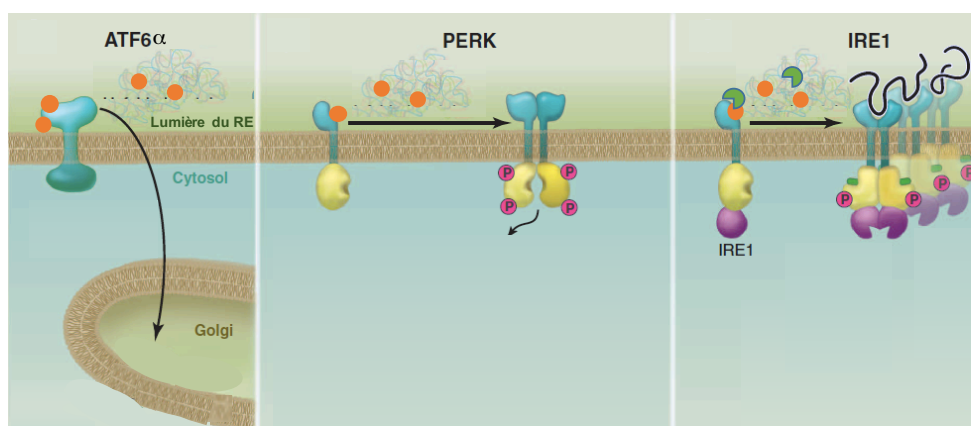


Figure 29. Présentation simplifiée du processus de la régulation des senseurs du RE. Les protéines transmembranaires ATF6 α , PERK et IRE1 sont inhibées par leur interaction avec la chaperonne GRP78 (rond orange) ou la co-chaperonne ERdj4 (packman vert). Lors de l'accumulation de protéines mal repliées, les chaperonnes se dissocient des senseurs qui sont alors activés par autophosphorylation pour PERK et IRE1 ou pas translocation dans l'appareil de Golgi pour ATF6 α . Modifié d'après (Walter and Ron 2011).

b) Les voies de l'UPR

i. La voie PERK : régulation de la synthèse protéique *de novo* et action antioxydante

PERK est une protéine à activité sérine/thréonine kinase. La dissociation entre GRP78 et PERK induit un changement conformationnel, sa tétramérisation et l'autophosphorylation de son domaine kinase (Carrara *et al.*, 2015a; K. Ma *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2008). L'oxydation de la protéine disulfide isomérase (PDI), qui régule la formation des ponts disulfures, participe à l'activation de PERK (Kranz *et al.*, 2017). Une fois activée, PERK conduit à l'activation de 2 facteurs de transcription : ATF4 et nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NRF2) (Figure 29A). PERK phosphoryle la sérine 51 du facteur de traduction eIF2 α conduisant à la répression de la formation du complexe d'initiation de la traduction et *in fine* à la réduction de la production de protéines nouvellement synthétisées (Marciniak *et al.*, 2006). Paradoxalement, la phosphorylation de eIF2 α conduit également à la traduction de certains ARNm. Un mécanisme récemment proposé, met en évidence la régulation spécifique d'ARNm possédant plusieurs cadres de lecture, codant notamment pour l'activating factor transcription 4 (ATF4) (Young *et al.*, 2016a), GRP78 (Starck *et al.*, 2016) et la protéine C/EBP homologous protein (CHOP) (Young *et al.*, 2016b) (Figure 30A).

ATF4 est un facteur de transcription de 60 kDa à domaine bZIP, de la famille des CREB/ATF qui peut s'homodimériser ou interagir avec des protéines de la famille C/EBP composée de 6 membres ; C/EBP α , β , γ , δ , ϵ et ζ (= CHOP). Le processus d'homodimérisation et d'hétérodimérisation conditionne la reconnaissance des gènes cibles assurant ainsi une large variabilité de réponses (Podust *et al.*, 2001). ATF4 a été décrit dans la régulation de gènes dont les promoteurs possèdent l'élément de réponse CCAAT/enhancer binding protein-ATF (CARE) qui, en contexte de privation nutritive est appelé amino acid response element (AARE) avec pour séquence consensus 5'-ATTGCATCA-3' (Bruhat *et al.*, 2002). ATF4 régule l'expression des gènes mitochondriaux mais également la biosynthèse du glutathion, un puissant antioxydant (Huggins *et al.*, 2016) et la régulation du gène codant ERO-1. ATF4 induit également l'expression des gènes codant GRP78 (Luo *et al.*, 2003) et CHOP (Averous *et al.*, 2004; Fawcett *et al.*, 1999).

Les travaux de Cullinan *et al.* décrivent également une autre cible post-traductionnelle majeure de PERK, la protéine régulatrice antioxydante NRF2. En condition basale, NRF2 est séquestrée dans le cytosol puis ubiquitinylée par la ligase E3 Kelch ECH-associating protein 1 (KEAP1) et enfin dégradée par le système du protéasome ubiquitine dépendant (Itoh *et al.*, 1999; McMahon *et al.*, 2003). L'activation de PERK va permettre la phosphorylation de KEAP1,

et son inhibition. NRF2 est ainsi stabilisée puis transloquée dans le noyau (Cullinan et al., 2003). Ce facteur de transcription à domaine bZIP régule l'expression de gènes dont le promoteur possède l'antioxydant response element (ARE) à la séquence consensus 5'- A/GTGACTCAGCA-3'. NRF2 régule des systèmes antioxydants ainsi que la transcription du gène codant ATF4 (Miyamoto et al., 2011).

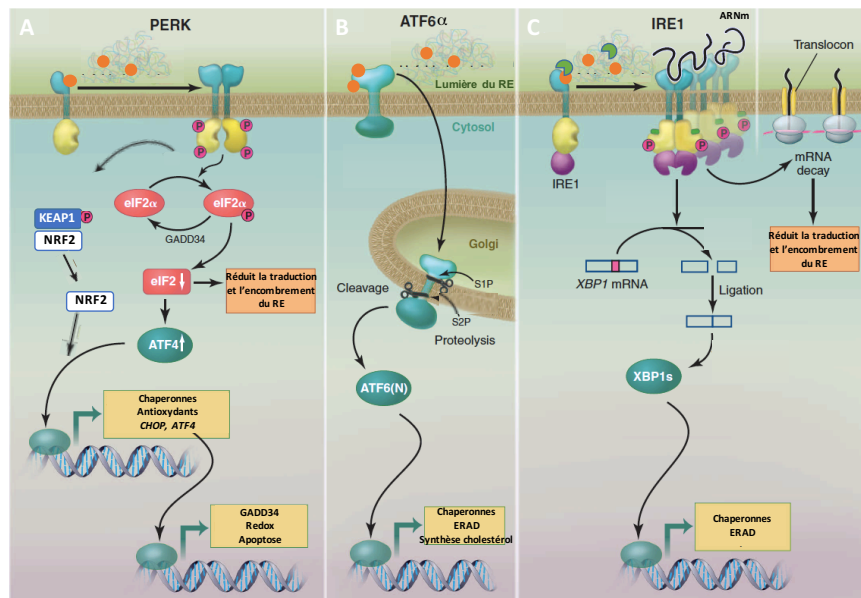


Figure 30. Présentation des voies d'activation de l'UPR. L'activation de PERK conduit à des voies de signalisation régulant l'état oxydatif de la cellule (A). L'activation de ATF6 α induit la synthèse de chaperonnes afin de limiter l'engorgement du RE(B). L'activation de IRE1 conduit à l'activation du système de dégradation des protéines associé au RE (ERAD) (C). D'après (Walter and Ron 2011).

ii. La voie ATF6 α : désengorgement du RE

ATF6 α est une glycoprotéine transmembranaire de 90 kDa dont la région N-terminale cytosolique possède une activité de facteur de transcription à domaine bZIP. ATF6 α peut être retenue dans le RE via GRP78 ou la calréticuline (Hong et al., 2004). Sa dissociation de GRP78 en condition de stress conduit au démasquage de deux séquences signal spécifiques de l'appareil de Golgi, GLS1 et GLS2 et à sa translocation dans cette organelle (Shen et al., 2002). Dans l'appareil de Golgi, deux protéases conduisent à son activation : la site 1 protéase (S1P) et la site 2 protéase (S2P) (Ye et al., 2000). S1P clive la région C-terminale luminale et dans un second temps S2P clive la région transmembranaire. La nouvelle protéine ATF6N de 50 kDa qui est alors fonctionnelle, transloque dans le noyau où elle active ses gènes cibles (Chen et al., 2002). ATF6N reconnaît l'élément de réponse endoplasmic reticulum stress element (ERSE) avec pour séquence consensus 5'-CCAATN₉CCAGC-3'.

Afin d'assurer un espace assez large pour l'accumulation du RE, la membrane du RE s'expend grâce à l'augmentation de lipides d'environ 18% en son sein (Bakunts et al., 2017). ATF6N

est impliqué dans la biogenèse lipidique et plus particulièrement dans celle du cholestérol *via* son rôle de co-régulateur sur le facteur de transcription sterol regulatory element-binding proteins (SREBP) (Zeng et al., 2004) (Figure 30B).

L'activation d'ATF6 α permet également la régulation de gènes contrôlant l'ERAD. En effet, les gènes possédant les séquences ERSE codent pour les chaperonnes GRP78 et GRP94 (Wooden et al., 1991; Yoshida et al., 1998; Wang et al., 2000) et la protéine du système ERAD SEL1L (Horimoto et al., 2013), favorisant ainsi le désencombrement des protéines mal repliées du RE.

iii. La voie IRE1 : conservation de l'UPR

IRE1 est une protéine serine/thréonine kinase qui possède en région cytosolique N-terminale une activité endoribonucléase. Cette voie est tardivement activée (Yamamoto et al., 2007; Yoshida et al., 2003). L'autophosphorylation des régions cytoplasmique d'IRE1 conduit à l'activation de son domaine ARNase permettant ainsi l'épissage d'ARNm codant des protéines sécrétées (Hollien and Weissman, 2006). Sa localisation à proximité du translocon (Plumb et al., 2015) permet à IRE1 d'accéder facilement aux ARNm et de favoriser son action d'endoribonucléase. Parmi ses cibles, IRE1 clive l'ARNm de X-box binding protein 1 (XBP1) conduisant à son épissage c'est à dire le retrait d'un intron de 26 paires de base. Cette modification post-traductionnelle permet la traduction d'un facteur de transcription XBP1 épissé (XBP1s), pourvu d'une activité transactivatrice et résistant à la dégradation, ce qui le différencie de sa forme native. XBP1s reconnaît la séquence ERSE tout comme ATF6N (Misiewicz et al., 2013). Il régule la transcription de son propre gène, de gènes codant les co-chaperonnes ERdj4, des PDI (Lee et al., 2003), des protéines de l'ERAD comme HDR1 (Yamamoto et al., 2008) (Lee et al., 2003) mais également des enzymes impliquées dans la synthèse des phospholipides (Sriburi et al., 2004) (Figure 30C).

3. Le stress du RE dans la dysfonction des PII dans la FPI

Chez les patients atteints de FPI de forme familiale ou sporadique (Lawson et al., 2004, 2008; Maitra et al., 2010), des PII hyperplasiques ou présentant l'activation des voies apoptotiques (Korfei et al., 2008a), expriment les facteurs des voies de l'UPR. Ceci suggère un lien entre l'induction d'un stress du RE et la dysfonction des PII.

a) Le stress du RE dans l'apoptose

La régulation de l'apoptose par le stress du RE fait intervenir 4 voies distinctes : une voie activatrice de la caspase 4 chez l'homme (= caspase 12 chez le murin) sur la membrane du RE, une voie dépendante du calcium, une voie dépendante du senseur IRE1, et une voie impliquant le facteur CHOP. Ces voies sont responsables de l'activation de caspases initiatrices, de la régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle des gènes de la famille BCL-2 et fait intervenir la signalisation calcique vers la mitochondrie (Figure 31).

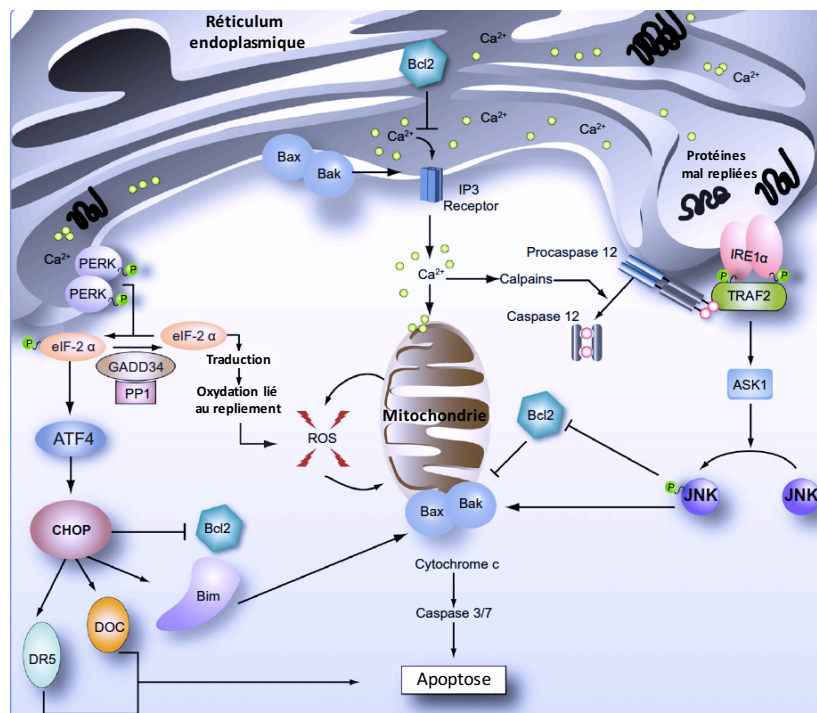


Figure 31. Représentation simplifiée de l'induction de l'apoptose par les voies de l'UPR. 4 types de voies apoptotiques sont observées en réponse à un stress du RE. La protéine transmembranaire IRE1 induit l'activation des kinases c-jun N-terminal (JNK) qui régulent la stabilisation de protéines apoptotiques. La déplétion du calcium depuis le RE vers le cytosol conduit également à l'activation de voies apoptotiques. La calpaïne peut, lors d'une dérégulation de la concentration calcique intracellulaire, activer la caspase initiatrice 4/12 (humain/murin). Enfin, la protéine C/EBP homologous protein (CHOP) participe à la régulation d'expression de facteurs pro et anti-apoptotiques et par ailleurs module également la production de d'espèces réactives à l'O₂ (ROS). D'après (Malhi and Kaufman 2011).

La caspase 4 est localisée spécifiquement dans la membrane du RE (Hitomi et al., 2004). Elle peut être activée par le clivage de la caspase 7. Par un mécanisme encore inconnu, la caspase 7 est recrutée dans le RE et interagit avec GRP78 et la caspase 4 (Rao et al., 2002). Un mécanisme dépendant du calcium médie la dimérisation de la caspase 4 et son auto-protéolyse (Karki et al., 2007). Son activation conduit au clivage des caspases effectrices 3 et 9 et à l'apoptose cellulaire (Kamada et al., 1997; Yamamuro et al., 2011).

Une diminution de la concentration calcique du RE est impliquée dans le contrôle de l'apoptose. La libération du calcium du RE vers le cytosol ou la mitochondrie va conduire à

l'induction des voies de signalisations apoptotiques. La libération du calcium dans le cytoplasme conduit à l'activation de la calpaïne, une protéase à cystéine dont l'activité dépend du calcium. Son activation conduit au clivage des protéines de la famille BCL-2 ; BCL-2 (*Gil-Parrado et al., 2002*), BCL-xL (*Karki et al., 2007*), BAX (*Wood et al., 1998*) et BID (*Oh et al., 2004*) et à l'activation des caspases effectrices. De plus, la capture du calcium intracellulaire par l'unitransporteur de calcium situé sur la membrane externe mitochondriale va favoriser la formation de pore par BAX. Ceci induit la libération de cytochrome C dans le cytosol, déclenchant la réponse apoptotique (*D. Zhang et al., 2008*).

Le senseur IRE1 joue un rôle primordial dans l'induction de l'apoptose. Le recrutement de la protéine TRAF2 cytosolique conduit à une cascade d'activation de kinase par l'apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) et *in fine* à l'activation de la MAP kinase JNK (*Urano et al., 2000*). JNK active par phosphorylation la protéine pro-apoptotique BAK et régule l'inhibition de la transcription du facteur anti-apoptotique BCL-2.

L'activation des voies de l'UPR IRE1, ATF6 α et PERK conduit à l'expression de la protéine CHOP. Son expression est observée dans de nombreux types cellulaires exposés à différents inducteurs du stress du RE (*Puthalakath et al., 2007*) et est impliqué dans l'induction de l'apoptose.

i. Le rôle de CHOP dans l'apoptose

° Description générale de CHOP

CHOP, aussi connu sous le nom de C/EBP ζ , growth arrest and DNA damage-inducible gene 153 (GADD153) ou encore DNA damage induced transcript 3 (DDIT3), est un facteur de transcription bZIP de 29 kDa. Il est exprimé de façon ubiquitaire dans les cellules mais son expression est faible dans les cellules en conditions de non stress (*Ron and Habener, 1992*). Dans ce contexte, CHOP est localisé préférentiellement dans le cytosol où il est majoritairement dégradé par le protéasome (*Ohoka et al., 2007*). Une modification de l'environnement de la cellule, telle une privation en glucose conduisant à un stress du RE, favorise la translocation de CHOP dans le noyau (*Wang and Ron, 1996*). L'activité de CHOP sur la régulation de gènes cibles nécessite son hétérodimérisation avec des protéines de la famille des C/EBP. Cet hétérodimère reconnaît la séquence consensus TGCAAT(A/C)CCC qui diffère de la séquence commune des C/EBP (*Ubeda et al., 1996*). L'interaction avec les protéines C/EBP permet à CHOP d'une part, d'inhiber

l'activité transactivatrice de ces dernières et d'autres part d'activer ses propres gènes cibles impliqués dans la réponse au stress cellulaire et plus particulièrement lors d'un stress du RE (Wang *et al.*, 1996).

° La régulation de CHOP

Les nombreuses séquences régulatrices présentes dans le promoteur de CHOP font de cette protéine un élément central dans la réponse médiée lors de l'activation des voies de l'UPR (Fusakio *et al.*, 2016) (Figure 32). La composition de ce promoteur a largement été décrit notamment par Bruhat *et al.*. Dans leurs travaux d'études d'activité de promoteur en condition d'apport restreint en acides aminés, ils mettent en évidence des séquences régulatrices des protéines C/EBP, la séquence AARE (Bruhat *et al.*, 2000). Les travaux de Ma *et al.* ont complété la description des séquences régulatrices du promoteur de CHOP. Un stress du RE conduit à l'expression du gène de *CHOP* via la régulation de son promoteur par ATF4 mais également par le facteur ATF6N qui interagit avec la séquence ERSE (Ma *et al.*, 2002). Enfin, l'élément de réponse du complexe AP-1 à la séquence consensus 5'-TGAG/CTCA-3' (Rauscher *et al.*, 1988) a été mis en évidence dans le promoteur de *CHOP* de cellules soumises à un stress oxydant (Guyton *et al.*, 1996). Le promoteur de *CHOP* contient d'autres séquences régulatrices, telles l'élément de réponse à la specificity protein 1 (SP1), protéine impliquée dans la réparation de l'ADN (Torabi *et al.*, 2018), l'élément de réponse à l'IL-6 ou encore des éléments de réponse aux facteurs inductibles à l'hypoxie (HIF) (Yoo *et al.*, 2014).

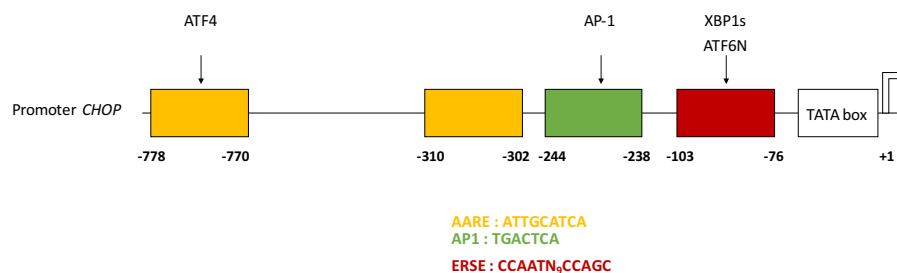


Figure 32. Régulation du promoteur de CHOP par les facteurs de l'UPR. De nombreuses séquences régulatrices sont présentes dans le promoteur de CHOP. Parmi celles-ci l'acid amino response element (AARE) site de liaison du facteur ATF4, de l'élément de réponse à l'activator protein 1 (AP-1) et l'endoplasmic reticulum stress element (ERSE), site de liaison de ATF6N et XBP1s.

Le facteur de transcription CHOP est la cible de modifications post-traductionnelles qui modulent son activité transactivatrice. L'induction d'un stress du RE par privation en glucose ou suite à l'exposition à la tunicamycine, un inhibiteur d'une enzyme impliquée dans la première étape de la biosynthèse glycoprotéique, induit la phosphorylation de deux sérines de CHOP par la

protéine kinase p38 (*Wang and Ron, 1996*). Ces phosphorylations ne modulent pas la dimérisation de CHOP avec les protéines C/EBP mais potentialisent son activité transactivatrice.

° Le rôle de CHOP dans l'induction de l'apoptose

Le rôle de CHOP dans l'induction de l'apoptose est communément admis. Dans des modèles murins soumis à un stress du RE, quel que soit le type cellulaire étudié, l'induction de l'apoptose est limitée par une sous expression de CHOP (*Marciniak et al., 2004; Puthalakath et al., 2007*). Les souris knockdown (KO) pour le gène *CHOP* présentent une apoptose cellulaire moindre du fait de l'absence d'expression de la protéine pro-apoptotique BIM, régulée par CHOP (*Tsutsumi et al., 2004; Puthalakath et al., 2007*). Par ailleurs, la surexpression de CHOP *in vitro* dans différents types cellulaires conduit à la dérégulation de l'expression du gène codant la protéine anti-apoptotique BCL-2 (*Matsumoto et al., 1996; McCullough et al., 2001*). Lors de l'induction d'un stress du RE, CHOP participe également à l'expression des récepteurs de mort tels TRAIL induisant ainsi une exacerbation de l'apoptose induite par les voies intrinsèques (*Yamaguchi and Wang, 2004*).

En plus de moduler l'expression de protéines apoptotiques, CHOP peut initier les voies de signalisation apoptotiques en régulant la production d' H_2O_2 ou la régulation de la signalisation calcique. L'induction d'un stress du RE conduit à l'expression du gène codant CHAC1 impliqué dans la dégradation du glutathion (*Kumar et al., 2012*). L'axe ATF4/CHOP est le seul axe de l'UPR à avoir été mis en évidence dans le contrôle de l'expression de CHAC1 dont le rôle pro-apoptotique a récemment été observé (*Mungrue et al., 2009*). CHOP participe également à l'expression du gène codant l'oxydoréductase ERO-1, qui lors du repliement des protéines participe à la production d' H_2O_2 (*Marciniak et al., 2004*). Les travaux de *Li et al.* révèlent par des études menées *in vivo* et *in vitro* que CHOP régule l'expression de ERO-1. Ce facteur participe à son tour à l'activation des récepteurs à l' IP_3 localisés à la membrane du RE et ainsi à la libération du calcium vers le cytosol (*Li et al., 2009*), nécessaire à l'induction de l'apoptose (*Tombal et al., 2002*). Lors de l'induction des voies de l'UPR, la traduction est arrêtée. CHOP participe à la reprise de la synthèse des protéines conduisant, dans ce contexte de stress, à une augmentation d'espèces réactives à l' O_2 (ROS) et *in fine* à l'apoptose. En effet, son interaction avec ATF4, conduit à l'expression du gène codant la protéine growth arrest DNA damage 34 (GADD34) (*Ma and Hendershot, 2003*). GADD34 assure l'activation de la protéine phosphatase 1, qui déphosphoryle eIF2 α (*Brush et al., 2003; Novoa et al., 2003*). La reprise de la traduction est ainsi effective et conduit à augmenter

l'accumulation de protéines au sein du RE, à l'activité accrue de ERO-1, à la production d'H₂O₂ et *in fine* à l'apoptose (Figure 33).

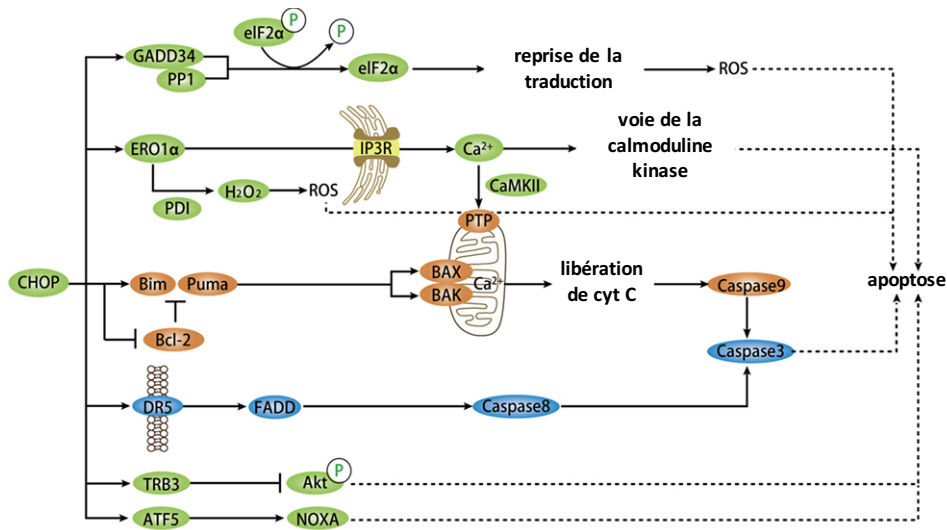


Figure 33. Présentation des différentes cibles apoptotiques de CHOP. CHOP participe à la modulation de voies pro-oxydantes et de la signalisation calcique (vert). CHOP participe également à la régulation de protéines anti et pro-apoptotiques de la voie intrinsèque (orange) et de la voie extrinsèque (bleu). D'après (Lei et al., 2017).

ii. Rôle du stress du RE dans l'apoptose des pneumocytes de type II dans la FPI

En 2008, Korfei *et al.* observe l'activité de la caspase 3 dans les PII hyperplasiques des patients atteints de FPI sporadique exprimant les marqueurs du stress du RE, ATF6N, ATF4, CHOP (Korfei *et al.*, 2008a).

L'implication du stress du RE dans l'apoptose des PII a été observée *in vivo* dans différents modèles de fibrose induite. L'exposition de souris à la tunicamycine, un inducteur des voies de l'UPR, exacerbe la fibrose induite par la bléomycine (Lawson *et al.*, 2011). Cet effet amplificateur du stress du RE dans le développement de la fibrose induite par la bléomycine est également observé dans un modèle de souris exprimant le mutant BRICHOS (Lawson *et al.*, 2011; Burman *et al.*, 2018). De manière intéressante, la tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) qui limite l'expression de GRP78 et de CHOP, prévient l'apoptose des pneumocytes ainsi que la fibrose des souris exposées à la bléomycine (Tanaka *et al.*, 2015). Par ailleurs, des souris déficientes pour le gène codant la protéine CHOP prévient également l'apoptose des pneumocytes induite par la bléomycine (Tanaka *et al.*, 2015; Yao *et al.*, 2016).

L'implication de mutations du domaine BRICHOS de la protéine SP-C dans l'apoptose des PII a été vérifié *in vitro*. La mutation BRICHOS L188Q conduit à l'augmentation de l'expression de

GRP78 ainsi que l'activation des voies de l'UPR rapportée par l'expression de XBP1 épissé (*Mulugeta et al., 2005*). Elle est à l'origine de l'activation de la caspases 3 ainsi qu'à la libération cytosolique du cytochrome C et donc à l'apoptose des PII (*Mulugeta et al., 2007*). Ces résultats sont confirmés par les travaux de Lawson *et al.* utilisant une démarche scientifique similaire. Par la technique du TUNEL, les auteurs mettent en lien les lésions de l'ADN dans les PII exprimant le mutant L188Q (*Lawson et al., 2008*). Par ailleurs, l'utilisation du 4-phenylbutyrate (4-PBA), un inhibiteur chimique d'histone désacétylase dont le mécanisme d'inhibition du stress du RE a été rapporté à plusieurs reprises, limite l'effet du mutant BRICHOS sur l'apoptose de PII (*Nguyen and Uhal, 2016*).

b) Le stress du RE dans la TEM

Quelques études se sont intéressées au rôle du stress du RE dans la régulation de la TEM. C'est le cas dans le processus d'embryogenèse (*Suzuki et al., 2010*), le processus métastatique (*Feng et al., 2014; Shen et al., 2015; Zeindl-Eberhart et al., 2014*), et dans le processus de fibrose dans lequel le stress du RE semble être initiateur (*Pang et al., 2016*). Dans le processus métastatique, les voies de l'UPR semblent avoir un lien dans le maintien de la TEM, alors qu'elles sont impliquées dans l'initiation de la TEM du processus de fibrose.

Le stress du RE est impliqué dans l'activation et la voie de signalisation du facteur pro-TEM, le TGF- β . Dans un contexte de production de ROS mitochondriaux induite par l'angiotensine sur des cellules mésangiales, le stress du RE engendre la sécrétion du TGF- β 1 (*T. N. Wang et al., 2015*). Par ailleurs, l'exposition de cellules mésothéliales à la thapsigargine, inducteur d'un stress du RE, conduit à la translocation de SMAD2 et SMAD3 ainsi qu'à l'expression du gène codant SNAIL1. Ceci favorise la dérégulation des jonctions serrées par la diminution d'expression de ZO1 et permet également l'acquisition du marqueur mésenchymateux, l' α -SMA (*Shin et al., 2015*).

Actuellement, peu de travaux ont étudié la modulation de gènes pro-TEM par le stress du RE. Cependant, une étude rapporte un rôle important du facteur XBP1, qui module l'activité du promoteur des gènes *Snail1*, *Twist 1* et *Zeb1* (*Chen et al., 2014; Li et al., 2015; Cuevas et al., 2017*). Le facteur ATF4, quant à lui, est impliqué dans la migration de cellules cancéreuses, par un mécanisme qui pourrait faire intervenir la sécrétion d'acides aminés (*Chen et al., 2017*). L'implication du facteur ATF6 α dans la TEM a été observé dans une seule étude (*Tang et al., 2015*). L'inhibition de ATF6 α par stratégie siRNA prévient l'effet d'un environnement oxydant sur l'expression de la vimentine.

De plus, l'acquisition d'un phénotype de cellule migratoire est dépendant de la modulation calcique. En effet, l'établissement du front de migration de la cellule fait intervenir une déplétion calcique du RE vers le cytosol (*Okeke et al., 2016*). Cet événement fait intervenir les RYR (*Matyash et al., 2002*), les IP₃R (*Okeke et al., 2016*) ainsi que la fuite du calcium par le translocon (*Linxweiler et al., 2013*). Par ailleurs, de récentes études rapportent que le calcium est nécessaire à l'induction de la TEM en réponse au TGF- β . La calréticuline, chaperonne localisée dans le RE, pourrait réguler l'activation des SMAD2 et SMAD3 lors de variations calciques. Ceci favorise l'expression des gènes impliqués dans la TEM tels *SNAIL1* conduisant à l'extinction de marqueur épithélial la E-cadhérine (*Y. Wu et al., 2017*).

i. Rôle du stress du RE dans la TEM des pneumocytes de type II dans la FPI

Le principal médiateur impliqué dans la TEM des PII dans la FPI est le TGF- β , produit en excès par les fibroblastes et les myofibroblastes (Figure 13) (*Kasai et al., 2005*).

En 2010, dans les lignées de CEAs de différentes espèces, *Tanjore et al.* mettent en évidence un lien entre la surexpression du mutant BRICHOS de SP-C, l'activation des voies de l'UPR et la diminution de marqueurs épithéliaux au profit de l'expression de marqueurs mésenchymateux (*Tanjore et al., 2011*). Les auteurs identifient l'implication du facteur de transcription ZEB1 dans l'induction de l'expression de marqueurs mésenchymateux par les pneumocytes. Cette étude met également en exergue les voies de signalisation du TGF- β , plus particulièrement la voie des SMAD et JNK. Des résultats similaires sont présentés la même année par l'équipe de Zea Borok (*Zhong et al., 2011*). *In vitro*, le traitement des PII avec l'inhibiteur du stress du RE, le 4-PBA limite l'induction de la TEM induite par le TGF- β 1 (*Lee et al., 2017*).

Bien que l'expression de marqueurs des voies de l'UPR soit observée dans les PII présentant des variations géniques, il en est de même pour les cellules exposées à des polluants ainsi qu'à des molécules pro-fibrosantes. Ceci suggère l'importance du microenvironnement des PII dans l'induction d'un stress du RE et son rôle clef dans la pathogenèse de la FPI.

IV. L'hypoxie alvéolaire : un rôle dans la pathogenèse de la FPI ?

1. Définition et l'hypoxie alvéolaire dans la FPI

L'hypoxie est définie comme une diminution de la biodisponibilité de l'O₂ aux tissus et aux cellules. Ce phénomène peut affecter l'organisme entier, un tissu ou un groupe restreint de

cellules. Quelques exemples de situations au cours desquelles l'organisme est en hypoxie peuvent être cités :

- l'altitude ; au sommet du Kilimandjaro, qui culmine à 5585 m, la pression partielle en O₂ est fortement réduite, la fraction d'O₂ disponible n'est plus de 20,9% mais de 10,5%,
- certaines maladies induisant une insuffisance respiratoire ou une insuffisance cardiaque limitent l'apport d'O₂ aux tissus.

Des mécanismes d'adaptation au niveau de l'organisme entier se mettent alors rapidement en place. En altitude, des chémorécepteurs localisés au niveau des carotides et de l'aorte sont activés par la diminution de PO₂ et conduisent à une hyperventilation de l'individu.

Dans la FPI, plusieurs études de transcriptomiques ont déterminé une signature de l'hypoxie dans le poumon des patients (*Kusko et al., 2016; Tzouvelekis et al., 2007*). L'activation des voies hypoxiques a également été observée dans PII des patients atteints de FPI. En effet, *Tzouvelekis et al.* ont mis en évidence l'expression du facteur inductible à l'hypoxie, le hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) dans les poumons de patients atteints de FPI (*Tzouvelekis et al., 2007*). Par ailleurs, dans le modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, le facteur HIF-1 est présent dans les PII proches des zones de fibrose (*Tzouvelekis et al., 2007*). De plus, l'utilisation du pimonidazole, une sonde fluorescente dont l'expression est corrélée négativement à la PO₂ (*Raleigh et al., 1999*), révèle des zones hypoxiques dans les lésions fibrotiques chez l'animal (*Weng et al., 2014*).

Des hypothèses sur l'origine de l'hypoxie alvéolaire proposent qu'elle pourrait être liée à une ventilation perturbée dans les alvéoles profondément remaniées par la fibrose. Elle pourrait également être observée lors des phases d'exacerbation aiguë, définies comme des périodes de détérioration soudaine des paramètres respiratoires des patients (*Collard et al., 2007*). Par ailleurs, des données obtenues dans les domaines de physique et de biochimie pourraient également expliquer la présence d'une hypoxie localisée dans le contexte de FPI (Figure 34). En effet, chez les patients atteints de FPI, l'altération du surfactant (*Aberg et al., 2010; Olmeda et al., 2010*), ainsi que la perturbation du métabolisme du cholestérol (*Angles et al., 2017*) résultant à des modifications de composition de la membrane plasmique des cellules (*Xu et al., 2016*) pourraient conduire à une diffusion moindre de l'O₂ au sein des PII. Par ailleurs, le remodelage profond de la MEC pourrait également moduler la diffusion et la consommation d'O₂ par ces cellules (*Colom et al., 2014*).

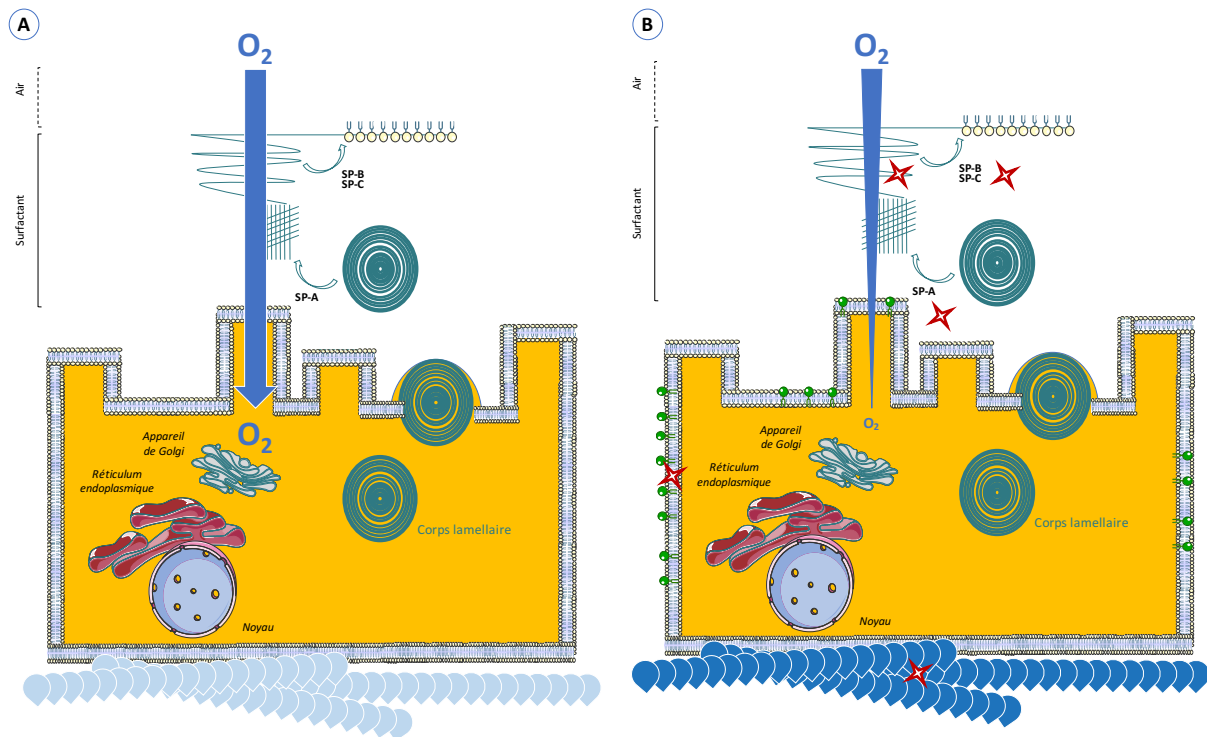


Figure 34. Présentation des mécanismes pouvant expliquer la présence d'une hypoxie des PII dans la FPI. Contexte sain (A). Dans la FPI, des éléments intrinsèques et extrinsèques aux PII (étoiles rouges), conduisent à une modification de la composition du surfactant et de la membrane plasmique (B). La diffusion réduite de l'O₂ résultant de ces modifications pourrait être à l'origine d'une hypoxie locale des CEAs.

2. Les facteurs inductibles à l'hypoxie

La famille des hypoxia-inducible factors (HIF), principaux médiateurs de la réponse à l'hypoxie, a été décrite dans les années 1990. En 1992, Semenza et Wang qui s'intéressaient à la régulation du gène de l'érythropoïétine en hypoxie (*Semenza and Wang, 1992*) découvrent le facteur HIF-1. Les facteurs HIF-2 et HIF-3 sont évoqués respectivement en 1996 et 1998 par deux groupes distincts de chercheurs (*Hirose et al., 1996; Takahata et al., 1998*). HIF-3 est très peu étudié et les rares travaux rapportent souvent un effet inhibiteur sur la capacité transactivatrice de HIF-1 et HIF-2 (*Hara et al., 2001*). Ces facteurs de transcription contrôlent l'expression de plus de 100 gènes impliqués dans l'adaptation à l'hypoxie et médient différents processus tels la prolifération cellulaire, l'angiogenèse ou encore le métabolisme glycolytique. Si cette régulation peut être redondante entre les facteurs, HIF-1, HIF-2 et HIF-3 ciblent chacun des gènes spécifiques selon le type cellulaire étudié (*Hu et al., 2003; Zhang et al., 2014*).

Les HIFs sont formés d'une sous-unité β , l'aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT), constitutivement exprimée et commune aux trois membres, et d'une sous-unité α soumise à régulation (Figure 35).

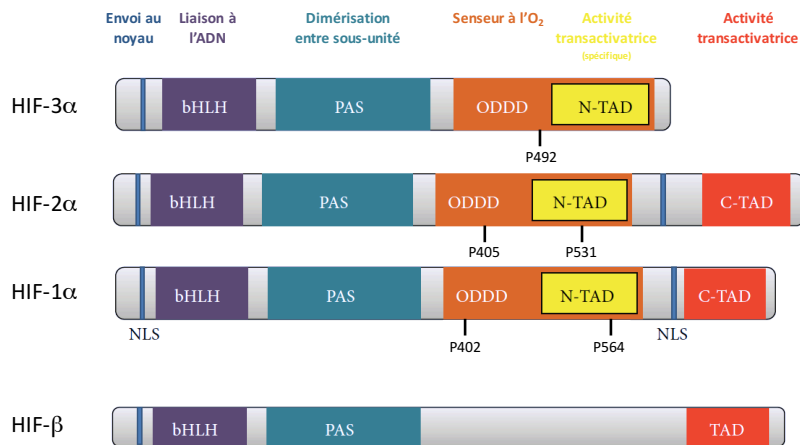


Figure 35. Présentation des facteurs de transcription HIFs et de leurs domaines. Period-ARNT-single-minded (PAS), basic helix loop helix (bHLH), oxygen-dependent-degradation domain (ODDD), N-ter and C-ter transcriptional activation domain (N-TAD and C-TAD) (NLS). D'après (Zimna and Kurpisz, 2015).

L'interaction entre les sous unités α et β est réalisée au niveau des deux domaines period-ARNT-single-minded (PAS) sur chacun des monomères (Huang et al., 1993; Yang et al., 2005).

Les protéines HIF-1 α et HIF-2 α possèdent deux signaux de localisation nucléaire (NLS) en région N et C-terminales alors que HIF-3 α et HIF- β n'en possèdent qu'un seul en région N-terminale. Le domaine PAS masque les séquences NLS, bloquant ainsi la reconnaissance et la liaison aux importines impliquées dans la translocation au noyau, engendrant ainsi une localisation cytoplasmique (Depping et al., 2008). Une fois dans le noyau, la liaison à la molécule d'ADN est réalisée par le domaine basic helix-loop-helix (bHLH) de chaque sous unité qui reconnaît la séquence consensus hypoxia response element (HRE) ; « G/ACGTG » (Semenza et al., 1996).

HIF-1 α et HIF-2 α , possèdent deux domaines de transactivation en position N-terminale (NAD) et C-terminale (CAD), HIF-3 α ne possède qu'une région NAD. La région NAD est responsable de la spécificité des gènes ciblés par ces facteurs de transcription (Hu et al., 2007), avec une homologie de séquence de 81% entre HIF-1 α et HIF-2 α . Elle est d'un peu moins de 60% entre HIF-3 α et les deux autres facteurs. CAD et NAD permettent le recrutement de co-activateurs de transcription communs aux HIFs comme la CRE binding protein (CBP) et E1A binding protein p300 (p300) qui jouent de concert (CBP/p300) (Kasper et al., 2005). Ils permettent aussi le recrutement de co-activateurs impliqués dans la régulation de gènes spécifiques (Pawlus et al., 2014) de HIF-1 α tels TIP60, CDK8 et STAT3 (Perez-Perri et al., 2016) ou spécifiques de HIF-2 α tels USF-2 (Pawlus et al., 2012).

a) La régulation de HIF- α

La stabilisation et la dégradation des sous unités HIF- α dépendent de la régulation de leur domaine oxygen-dependent-degradation (ODDD), sensible indirectement à l'O₂ (*Huang et al., 1998*). En effet en présence d'O₂, les prolyl hydroxylases (PHDs) modifient ces domaines conduisant à la dégradation de HIF.

i. Régulation de HIF- α par les PHDs

La famille des prolyl hydroxylases (PHD) regroupe les enzymes PHD1, 2 et 3 encodées par 3 gènes (*EGLN2, EGLN1 et EGLN3* respectivement). L'expression de ces protéines est ubiquitaire. Elles ont pour co-substrats l'O₂ ainsi que le 2-oxoglutarate et leur activité dépend de nombreux co-facteurs. L'ion ferreux (Fe²⁺) et la vitamine C favorisent leur activité enzymatique alors que l'ion ferrique (Fe³⁺) et le succinate, l'inhibent (*Pan et al., 2007*).

En condition normoxique, les sous unités HIF- α sont hydroxylées par les PHD, ubiquitinylées par la protéine von Hippel–Lindau (pVHL) et dégradées par le complexe du protéasome (*Jiang et al., 1996*). La première étape induisant la dégradation est l'hydroxylation médiée par les PHDs des prolines en position 402 et 564 pour HIF-1 α , en position 405 et 531 pour HIF-2 α et en position 492 pour HIF-3 α localisées dans leur ODDD. Des travaux menés sur la spécificité des PHDs pour l'hydroxylation des HIF- α ont révélé que HIF-1 α est hydroxylé préférentiellement par la PHD2 alors que la régulation de HIF-2 α est dépendante de PHD3 (*Berra, 2003; Appelhoff et al., 2004*). La localisation subcellulaire des PHDs est régulée par l'hypoxie. PHD1 et 3 sont localisées dans le noyau en normoxie et deviennent cytoplasmiques lors de la diminution du taux d'O₂. PHD2 est cytoplasmique quelle que soit la condition, suggérant un mécanisme de réponse immédiate (Figure 36).

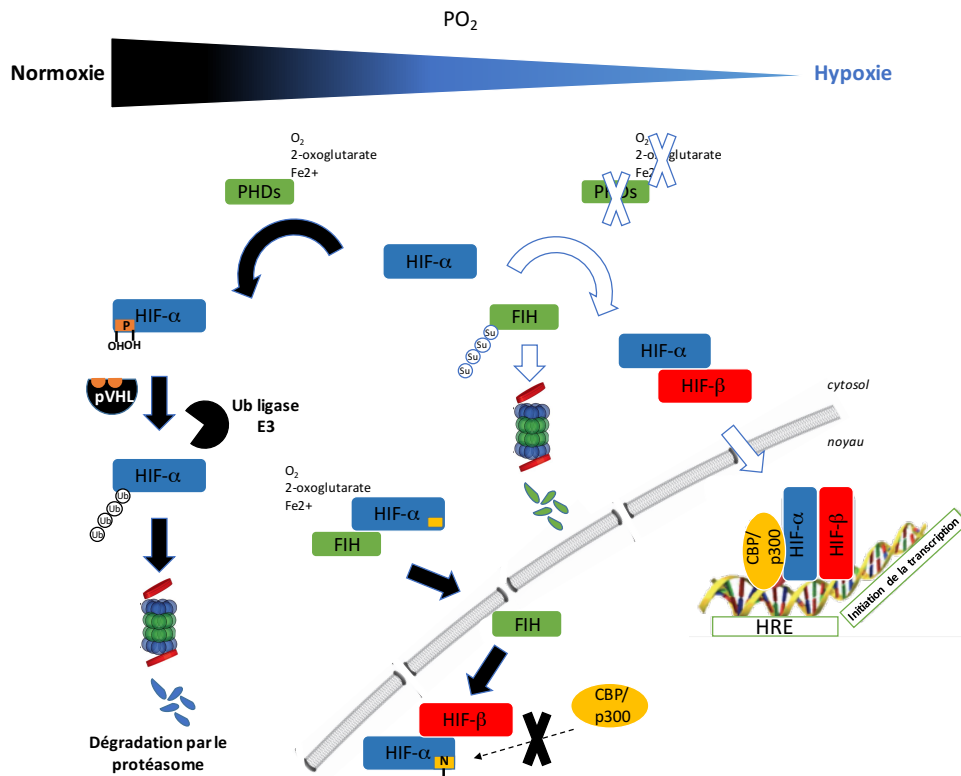


Figure 36. Présentation de la régulation des facteurs HIFs en hypoxie. En normoxie HIF- α est hydroxylé par les prolyl hydroxylase (PHD) conduisant à son ubiquitination (Ub) et à sa dégradation par le protéasome. Un second système permet d'inhiber l'activité transactivatrice des HIF-1 α . Le factor inhibiting HIF (FIH) hydroxyle HIF- α dans sa région transactivatrice limitant l'interaction avec les co-facteurs. En hypoxie, les substrats de ces deux enzymes sont rares, ce qui conduit à leur inactivation. FIH est la cible d'un ajout d'une protéine small ubiquitin related modifier (Su) induisant sa dégradation par le protéasome. *Modifié d'après (Rapisarda and Melillo, 2012).*

Dans un second temps, la protéine VHL se fixe à la sous-unité α hydroxylée puis s'associe au complexe ubiquitine ligase E3 formé de Culin 2, Ring box 1, Elongin B et de Elongin (*Huang et al., 2002*) qui poly-ubiquitine HIF- α . Cette sous unité est alors prise en charge par le protéasome afin d'être dégradée (*Salceda and Caro, 1997*).

En hypoxie, les PHDs sont inactivées par l'absence de leur co-substrat l' O_2 , les HIF- α non hydroxylés sont ainsi stabilisés, transloqués dans le noyau où ils forment un dimère avec la sous unité β , et interagissent avec les cofacteurs afin de transcrire leurs gènes cibles (*Chilov et al., 1999*). De façon intéressante, l'étude des promoteurs des gènes codant la PHD2 (*Metzen et al., 2005*) et la PHD3 (*Pescador et al., 2005*) a révélé la présence de HRE, supposant un rétrocontrôle par HIF- α de leur propre régulation.

ii. Régulation de HIF- α par FIH

Le factor-inhibiting HIF (FIH), régule également l'activité de HIF. L'activité de FIH, *ad instar* les PHDs, est dépendante de l' O_2 , du 2-oxoglutarate et du Fe^{2+} . FIH hydroxyle le résidu asparagine

en position 803 et 851 de HIF-1 α et HIF-2 α respectivement (Mahon, 2001). Ceci conduit à l'inhibition du recrutement de co-facteurs tels CBP/p300 (Lando, 2002) et à l'arrêt de la transcription de gènes cibles. Si de nombreuses études montrent une localisation prédominante de FIH dans le cytoplasme, son activité semble intervenir dans le noyau des cellules (Hyseni et al., 2011; Hirose et al., 2014) et sa translocation dépend de son interaction avec HIF- α (Liang et al., 2015). Une récente étude menée sur le placenta révèle qu'une hypoxie sévère induit l'ajout de la protéine small ubiquitin related modifier (SUMO) sur FIH conduisant à sa dégradation par le protéasome (Sallais et al., 2017) et *in fine* à la stabilisation de HIF-1 α (Figure 36).

iii. Régulation du profil d'expression de HIF-1 ou HIF-2

Au début des années 2000, des études *in vitro* dont l'une sur les cellules épithéliales alvéolaires humaines révèlent que l'activité de HIF-1 est plus précoce que celle de HIF-2 (Uchida et al., 2004; Bracken et al., 2006). Après une hypoxie prolongée, l'extinction de l'expression de HIF-1 α au profit de HIF-2 α est observée, ce processus est appelé « switch ».

Les travaux explorant ce phénomène sont nombreux et ont décrit le rôle d'une ubiquitine ligase E3, hypoxia-associated factor (HAF), dans la régulation spécifique de HIF-1 α et HIF-2 α . HAF interagit sur la séquence protéique d'acides aminés 298-400 de HIF-1 α conduisant à sa poly-ubiquitination et *in fine* à sa dégradation par le protéasome (Koh et al., 2008). *A contrario*, son interaction avec HIF-2 α augmente sa capacité transactivatrice. En hypoxie, cette interaction dépend de l'ajout de la protéine SUMO sur HAF (Koh et al., 2015). HAF favorise ainsi le switch entre le profil d'expression de gènes spécifiques de HIF-1 α et celui de HIF-2 α (Koh et al., 2011).

En hypoxie, le processus post-traductionnel de SUMOylation affecte également les protéines HIF-1 α et HIF-2 α . Cependant, selon le type cellulaire, elle peut être associée à la stabilisation et à l'augmentation de l'activité des HIFs (Bae et al., 2004; Carbia-Nagashima et al., 2007; Chan et al., 2011) ou bien conduire à leur dégradation par le protéasome (Berta et al., 2007; Cheng et al., 2007; van Hagen et al., 2010).

iv. Régulation de HIF- α par la voie non canonique

Les facteurs HIF- α sont également régulés indépendamment de la PO₂ (Figure 38). C'est le cas de stress extracellulaires tels un environnement inflammatoire dans un contexte infectieux (Guo et al., 2017) ou lors de contraintes mécaniques (Milkiewicz et al., 2007). HIF- α est également régulé lors d'un stress intracellulaire comme lors d'une accumulation de protéines dans le RE

dépendamment du type cellulaire étudié. Les voies de signalisation induites lors de ces différents stress conduisent à l'activation de kinases qui phosphorylent différents sites au niveau de l'ODDD ou des domaines NAD et CAD des sous-unités HIF- α (Dimova et al., 2009). Ces phosphorylations régulent la localisation nucléaire et augmentent la capacité transactivatrice des HIF- α (Kietzmann et al., 2016) (Figure 37).

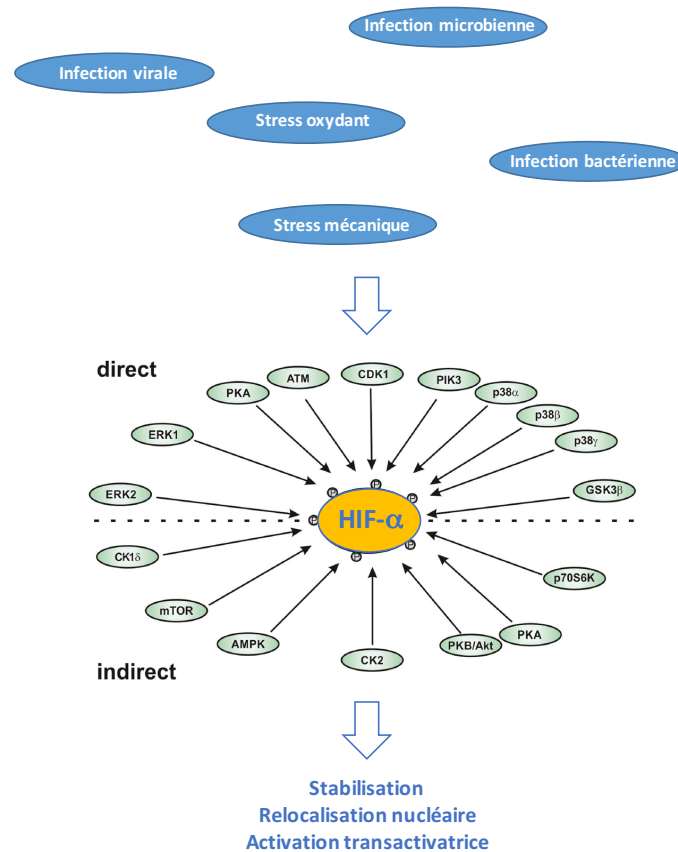


Figure 37. Présentation des différents contextes de stabilisation de HIF- α non hypoxiques. Différents stimuli peuvent conduire à des voies de signalisation induisant la phosphorylation des sous-unités HIF- α . La stabilisation, la relocalisation nucléaire et l'activation transactivatrice des HIFs sont des événements résultants de l'effet des kinases (bulles vertes). AMP-activated kinase (AMPK); ataxia and teleangiectasia mutated(ATM); casein kinase 1 (CK1); cyclin-dependent kinase 1 (CDK1); extracellular regulated kinase (ERK); glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β); protein kinase A (PKA); protein kinase B or Akt kinase (PKB/Akt); p38 mitogen activated protein kinase (p38); polo-like kinase-3 (Plk3). *Modifié d'après (Kietzmann et al., 2016).*

La production d'espèces réactives à l'O₂ ou reactive oxygen species (ROS) peut également réguler la stabilisation de HIF-1 α . Les ROS définissent l'anion superoxyde (O₂^{•-}), le radical hydroxyle (OH[•]) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Une production de ROS non contrôlée conduit à des dommages cellulaires et à l'instabilité génique qui surviennent suite à l'oxydation des acides nucléiques, des protéines et des lipides. Le site de production majeur des ROS est la mitochondrie, au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale (Figure 38). L'exposition à l'hypoxie conduit à une accumulation d'électrons à l'origine d'une production de ROS mitochondriaux en partie responsable de la régulation de HIF. En effet, dans les cellules p0, ne possédant pas d'ADN

mitochondrial, l'exposition à l'hypoxie n'induit pas d'expression des HIF- α (Chandel et al., 2000). Cette régulation fait intervenir d'une part la diminution de l'activité des PHD2 (Niecknig et al., 2012; Hagen, 2003) et d'autre part la phosphorylation de HIF-1 α suite à l'activation de différentes kinases (Jung et al., 2008), tels la MAP kinases ERK (Abe and Berk, 1999). Ces kinases participent à la synthèse de HIF-1 α , à sa stabilisation et à l'augmentation de son activité transactivatrice (Lamberti et al., 2017; Du et al., 2011; Kasuno et al., 2004) (Figure 38).

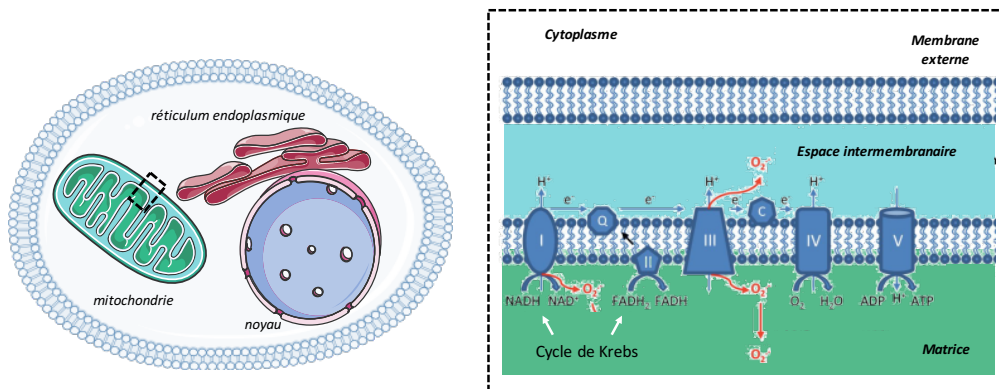


Figure 38. Production de ROS par la chaîne respiratoire mitochondriale. Les modifications de conformation des centres réactionnels d'oxydo-réduction des complexes I et III conduisent à l'accumulation d'électrons et à la production d'espèces réactives à l' O_2 . D'après (Li et al., 2013).

b) L'hypoxie et HIF-1 : rôle dans la dysfonction des pneumocytes de type II

i. L'hypoxie et HIF-1 sur la production de ROS

Lors d'une exposition à l'hypoxie, l'élévation de la concentration de ROS ne prend que quelques minutes (Hernansanz-Agustín et al., 2014) subodorant un mécanisme de production rapide par la chaîne respiratoire mitochondriale. L'utilisation de différents inhibiteurs des complexes I, II et III de la chaîne mitochondriale a permis de mettre en évidence le rôle de chacune de ces entités dans la production de ROS en réponse à l'hypoxie (Chandel et al., 2000; Wang et al., 2007). En hypoxie, l'inactivation progressive des complexes mitochondriaux serait la conséquence de discrètes modifications de la conformation des sous unités (Hernansanz-Agustín et al., 2017; Onukwufor et al., 2014). L'accumulation des électrons, résultante de la diminution d'activité de la chaîne mitochondriale, conduit à la formation accrue de ROS.

De nombreuses études décrivent HIF-1 comme un facteur de transcription aux propriétés antioxydantes (Rojas et al., 2018). HIF-1 limite la production de ROS en régulant des gènes impliqués dans l'expression d'une sous-unité du complexe III de la mitochondrie afin d'optimiser la respiration mitochondriale (Fukuda et al., 2007). De plus HIF-1 régule le gène codant BCL2/adonavirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3 (BNIP3) limitant la surproduction de

ROS via la mitophagie (H. Zhang *et al.*, 2008; Chourasia *et al.*, 2015; Sakellariou *et al.*, 2016). HIF-1 contrôle également l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme glycolytique permettant de limiter l'utilisation de la chaîne respiratoire et la production de ROS associée (J. Kim *et al.*, 2006). Enfin, HIF-1 favorise l'expression transcriptionnelle de gènes antioxydants codant pour les enzymes glutathion peroxydase GPX3 et 8 (Bierl *et al.*, 2004; Bosello-Travain *et al.*, 2015) mais également pour la superoxyde dismutase SOD1 (Tuller *et al.*, 2009).

Cependant, il est à noter que certaines études décrivent *a contrario* un rôle de HIF-1 dans le maintien de la réponse oxydante, en favorisant la transcription de gènes codant des protéines pro-oxydantes telles la xanthine oxydase ou encore la NADPH oxydase 4 (NOX4) (Hoidal *et al.*, 1997; Diebold *et al.*, 2010).

ii. L'hypoxie, HIF-1 et apoptose des pneumocytes de type II

En 2005, Krick *et al.* montrent pour la première fois que l'exposition de PII primaires de rat à une hypoxie induit l'apoptose. Ces travaux mettent en évidence *in vitro* le flip-flop des phospholipides membranaires, une diminution de 1,8% du nombre de cellules à 24h d'hypoxie, et l'activation du facteur pro-apoptotique BNIP3 (Krick *et al.*, 2005). L'induction de BNIP3 conduit à la séquestration des facteurs anti-apoptotiques BCL-2 et BCL-XL et *in fine* à l'apoptose (Ray *et al.*, 2000). Au laboratoire, nous avons démontré que l'inhibition de HIF-1 par le YC-1 (Chun *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2008), limite l'effet de l'hypoxie sur l'expression du facteur pro-apoptotique *Bnip3* et restaure l'expression du facteur anti-apoptotique *Bcl2* dans les PII (Bernard *et al.*, 2018a).

De façon intéressante, une résistance des PII à l'apoptose est observée après 24h de culture en hypoxie (Krick *et al.*, 2005). Cet effet pourrait être la résultante de l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux.

iii. L'hypoxie, HIF-1 et la TEM des pneumocytes de type II

En 2009, Zhou *et al.* montrent *in vitro*, qu'une exposition des PII à l'hypoxie pendant 4 jours induit une perte d'expression du marqueur épithélial, la E-cadhérine, au profit de celle des marqueurs mésenchymateux tels l' α -SMA et la vimentine (Zhou *et al.*, 2009). L'implication du facteur HIF-1 α dans le phénomène de TEM a été mise en évidence par la diminution des marqueurs mésenchymateux suite au contrôle de la production et/ou de la sécrétion de TGF- β 1. Les résultats du laboratoire complètent ces données et montrent une expression des facteurs de transcription SNAIL1 et TWIST1 dans des PII exposés à une hypoxie chronique (Uzunhan *et al.*,

2016). Les promoteurs des gènes encodant ces facteurs de transcription possèdent des éléments HRE et sont régulés par HIF-1 α (Luo *et al.*, 2011; M.-H. Yang *et al.*, 2008).

c) L'hypoxie : inducteur d'un stress du RE

Dans de nombreux organes, l'hypoxie induit l'activation des voies de l'UPR. La culture de fibroblastes en hypoxie révèle pour la première fois une augmentation d'expression des transcrits et des protéines chaperonnes (Koong *et al.*, 1994). Une étude *in vivo* menée en 2010 a corrélé la faible PO₂ au sein des tumeurs à l'activité de XBP1 épissé (Spiotto *et al.*, 2010). De même, le facteur de l'UPR ATF4, est préférentiellement localisé dans les zones hypoxiques de tumeurs de souris (Bi *et al.*, 2005).

Les cinétiques d'activation des voies de l'UPR en hypoxie diffèrent selon le type cellulaire. Dans un modèle de carcinome hépatique, dans lequel une hypoxie a été rapportée (Xiong *et al.*, 2017), des études évaluent durant 25 semaines, l'activation des voies de l'UPR. Dans ce modèle, l'activité de IRE1 est précocement observée alors que l'expression des acteurs des voies de l'UPR PERK et ATF6 α est plus tardive. Par ailleurs, l'expression génique de CHOP est antérieure à l'expression des voies de l'UPR, supposant un mécanisme de régulation dépendant de l'hypoxie mais indépendant des acteurs de l'UPR (Vandewynckel *et al.*, 2014). Dans d'autres types cellulaires, tels les cellules endothéliales, Yang *et al.* révèlent une augmentation de l'activité de PERK dans des cellules endothéliales exposées à 4h d'hypoxie et une augmentation d'expression de CHOP 2h plus tard (Yang *et al.*, 2014a). Dans des cellules du pancréas, l'hypoxie induit également les voies PERK et IRE1 dès 4h d'hypoxie (Zheng *et al.*, 2012).

Il est à noter que le TGF- β , dont l'expression et la sécrétion sont augmentées en hypoxie (Falanga *et al.*, 1991; Hung *et al.*, 2013) notamment dans les PII (Uzunhan *et al.*, 2016), conduit à l'induction d'un stress du RE. Les voies de signalisation rapportées sont peu décrites, mais semblent faire intervenir les SMAD, qui contrôlent l'expression d'ATF4 (González-González *et al.*, 2018).

En hypoxie, la signalisation calcique est étroitement associée à la production de ROS. Dans les PII placés en hypoxie, l'augmentation de concentration cytosolique est dépendante d'une libération de calcium du RE consécutive à une production de ROS mitochondriaux (Gusarova *et al.*, 2011). Des études réalisées dans la levure confirment que la production de ROS mitochondriaux augmente l'état oxydatif du RE (Leadsham *et al.*, 2013). La proximité de la

mitochondrie et du RE permet le passage des ROS mitochondriaux et plus particulièrement l'H₂O₂ par diffusion. Cette augmentation permet de proposer 2 mécanismes directs ou indirects de l'hypoxie dépendant de l'activation des récepteurs calciques présents à la membrane du RE. De manière directe, les ROS générés par la mitochondrie induiraient une S-gluthationylation des résidus cystéines des récepteurs à la ryanodine (RYR) et des récepteurs à l'IP₃ (IP₃R) (*Bánsághi et al., 2014; Donoso et al., 2011*), et de manière indirecte, les ROS produits dans le RE par ERO-1 et NOX4, activeraient IP₃R (*Li et al., 2009*) et RYR (*Sun et al., 2011*). En hypoxie, l'oxydation du canal calcique impliqué dans la réplétion du RE (SERCA) participe également à l'activation d'un stress du RE (*Pei et al., 2003; Dremina et al., 2007*). La déplétion calcique du RE par les RYR et les IP₃R, ainsi que l'inactivation des SERCA limitant la réplétion du RE en calcium, diminue l'activité des chaperonnes. Il en résulte donc une accumulation accrue de protéines au sein du RE et l'induction des voies de l'UPR.

Par ailleurs, la conformation mature des protéines dépend de la capacité des PDI à former des ponts disulfures (Figure 25). L'activité de cette enzyme dépend de l'oxydoréductase ERO-1 dont la fonction dépend de l'O₂. Une diminution de la PO₂ cellulaire conduit alors à l'inactivité d'ERO-1, à la non régénération de l'état actif des PDI, à la diminution de la formation des ponts disulfures et ainsi à l'accumulation de protéines non conformes au sein du RE résultant à l'activation des voies de l'UPR.

La caractérisation des mécanismes régulés par l'activation des voies hypoxiques d'une part et des voies de l'UPR d'autre part associée à leur description dans les cellules épithéliales alvéolaires altérées de patients atteints de FPI, suggère une interconnexion de ces voies dans la modulation de la dysfonction de ces cellules.

HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS GÉNÉRAUX DU TRAVAIL DE THÈSE

Bien que la présence d'une hypoxie alvéolaire et l'induction d'un stress du RE ont été rapportées à de nombreuses reprises dans les pneumocytes de type II (PII) de patients atteints de FPI de forme sporadique, aucune relation n'a été établie entre ces voies et la dysfonction des CEAs. Ainsi, nous proposons l'hypothèse générale selon laquelle **l'état hypoxique des PII induit l'activation des voies de l'UPR conduisant aux modifications phénotypiques de ces cellules.**

Ces travaux ont pour but de documenter l'implication de l'hypoxie et de HIF-1 dans la pathogénèse de la FPI en ciblant plus particulièrement son rôle dans l'induction d'un stress du RE. Deux parties sont présentées dans ce mémoire, correspondant à la soumission de deux articles originaux :

La première partie concerne le rôle du stress du RE sur l'apoptose des PII soumises à l'hypoxie et la mise en évidence des mécanismes moléculaires impliqués.

La seconde partie expose l'implication du stress du RE sur la perte du phénotype épithélial des PII soumis à l'hypoxie et la mise en évidence de son rôle central dans la régulation des voies hypoxiques.

La réalisation de ce travail a fait intervenir des études *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo* :

- *In vitro*, nous avons étudié les mécanismes moléculaires impliqués dans la dysfonction des cellules alvéolaires exposées à l'hypoxie, avec un modèle de cultures primaires de cellules épithéliales alvéolaires (CEAs) de rat, ou, pour des raisons techniques, des lignées de CEAs humaines.
- *In vivo*, nous avons exposé des rats à une hypoxie hypobare afin de confirmer les résultats *in vitro*. Nous avons confirmé les faits marquants de notre travail sur un modèle murin traité à la bléomycine pour induire une fibrose pulmonaire.
- *Ex vivo*, nous avons testé notre hypothèse dans des biopsies de patients atteints de FPI.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Modèle de rat exposé à une hypoxie aigue

Des rats Sprague-Dawley males de 4 semaines d'environ 150 g, fournis par le structure d'élevage Janvier (Le Genest St Isle, France), sont stabulés, dans le respect des directives européennes concernant la protection des animaux, au sein de l'animalerie de l'UFR SMBH de Paris 13 (agrément #C9300801). En accord avec le comité d'éthique local (C2EA-06 APAFIS #7846), les rats (n= 6-8) sont placés dans un caisson en polyméthacrylate de méthyle permettant de maintenir, grâce à une pompe à vide, une pression de 380 mmHg simulant une altitude de 5475 m soit une FiO_2 de 10,5% durant 16 h, 24 h, 48 h ou 72 h sans restriction de nourriture ni d'eau. Les rats « contrôles » (n=6) sont logés dans la même pièce que la chambre hypobare. A l'issue du protocole d'exposition, les animaux sont anesthésiés au pentobarbital par voie intra-péritonéale (60 mg/kg avec un volume de 100 ml/100 g), puis une dose létale est administrée avant exsanguination par section de l'artère abdominale.

Après trachéotomie et thoracotomie, une dérivation bronchique est réalisée. Par voie trachéale, du paraformaldéhyde (PFA) à 4% est instillé à une pression de 20 cm d' H_2O pour fixer le poumon gauche sans en altérer les structures internes qui sera utilisé pour des analyses immunohistologiques. Les lobes du poumon droit sont conservés dans de l'azote et seront utilisés pour des techniques de western blot et d'analyse de transcrits.

2. Prélèvement humain

Les services de pneumologie et d'anatomopathologie de l'Hôpital Avicenne collectent et traitent les biopsies pulmonaires de patients selon les protocoles acceptés par le comité d'éthique local (CLEA-2017-040). Le diagnostic des patients atteints de FPI a été établi selon les directives du conseil composé de l'American Thoracic Society (ATS), l'European Respiratory Society (ERS), la Japanese Respiratory Society (JRS), et la Latin American Thoracic Society (ALAT) (n=3) (Table 2). Des biopsies de zones à distance des lésions de patients atteints d'adénocarcinome sont utilisées comme « contrôle » (n=3). Les échantillons fournis étaient conservés en bloc de paraffine et selon la loi française, leur utilisation n'est pas soumise à l'obligation de consentement.

	Patient FPI 1	Patient FPI 2	Patient FPI 3	Control 1	Control 2	Control 3
Âge	68	57	59	70	72	56
Gender	Femme	Homme	Homme	Homme	Femme	Homme
Statut de fumeur* (Paquet-année)	10	10	30	32	60	60
Test de la fonction pulmonaire	CVF 58%	CVF 73%	CVF 68%	FEV1 96%	FEV1 98%	FEV1 71%
	DLCO 40%	DLCO 72%	DLCO 48%			
Profil histologique	PIC	PIC	PIC	Parenchyme éloigné de l'adénocarcinome	Parenchyme éloigné de l'adénocarcinome	Parenchyme éloigné de l'adénocarcinome

Table 2. Données cliniques des patients. Tout les patients étaient fumeurs. CVF: Capacité vitale forcée; DLCO: Diffusion capacity of the Lung for Carbon monoxide; FEV1: Forced Expiratory Volume in one second; PIC: Pneumopathie interstitielle commune.

3. Immunohistochimie

a) Préparation des coupes

Le lobe gauche des rats est déshydraté dans des bains successifs d'éthanol croissant (50%, 70%, 90%), dans du xylène puis inclus en paraffine. Des coupes sériées des blocs de paraffine de biopsie de patients ou des poumons de rats sont réalisés avec une épaisseur de 5 µm puis déposées sur des lames SuperFrost Plus™.

b) Protocole d'immunohistochimie suivie d'une révélation dans le visible

Après une étape de déparaffinage dans un bain de xylène puis d'hydratation avec des bains successifs d'éthanol de 100% à 50%, les coupes sont placées dans une solution de citrate à pH6 puis chauffées à 95°C pour démasquer les sites antigéniques. Les peroxydases endogènes sont inhibées par une solution de H₂O₂ (3%) pendant 10 min puis les sites aspécifiques sont saturés avec une solution de sérum de cheval et de bovin serum albumin (BSA) à 2%. Les lames sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire approprié sur la nuit à 4°C dans une chambre humide (Table 3). Une étape de lavage au PBS-Tween 0,1% (PBS-T) précède l'incubation d'une heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire adéquat. De nouveaux lavages sont réalisés puis les lames sont placées successivement dans :

- une solution de tris-acétate à pH 6 durant 5 min

- une solution de 3,3'diaminobenzidine (DAB) filtrée (1,6 g de NaCl, 2 g de nickel, 96 mg de DAB pour 200 ml de tampon) supplémentée avec H₂O₂ à 3,75% durant 4 min
- une solution tris saline à pH 7,4
- une solution de cobalt durant 4 min
- de l'eau distillée
- une solution de rouge nile pendant 2 min.

Après un rapide lavage dans de l'eau distillée, le montage des lames est effectué après des bains successifs d'éthanol croissant (50%, 70%, 90%) puis de xylène. La fixation de la coupe entre lame et lamelle est réalisée à l'aide d'un milieu de montage.

c) Protocole d'immunohistochimie suivie d'une révélation en fluorescence

Après déparaffinage selon le protocole exposé précédemment, les lames des coupes de poumon de rats sont incubées avec une solution de blocage des sites aspécifiques d'albumine de sérum bovin à 5% durant 45 min à température ambiante. Les lames sont ensuite incubées avec les anticorps primaires appropriés sur la nuit à 4°C dans une chambre humide (Table 3). Le lendemain, les lames sont lavées au PBS-T puis incubées 1 h avec une solution d'anticorps secondaires conjugués aux fluorochromes AlexaFluor™ 488 et 568 (Invitrogen).

Type d'échantillon traité	Anticorps (anti-)	Utilisation	Dilution	Fournisseur/Référence
Humain	CHOP	UV	1 :100	Novus, NB600-1335
	HIF-1 α	UV	1:250	Novus, NB100-479
	HIF-2 α	UV	1 :250	Novus, NB 100-132
Rat	CHOP	UV	1 :250	Santa Cruz Biotechnology, sc-575
	HIF-1 α	UV	1 :400	Novus, NB100-479
	α -SMA	IF	1:500	Sigma Aldrich, A2547
	TTF-1	IF	1:500	Seven hills, WRAB-1231

Table 3. Liste des anticorps utilisés pour l'étude protéique *in vivo* par immunohistochimie chez l'humain et le rat. UV : révélation dans le visible. IF : révélation par fluorescence

Après lavage, les lames sont incubées avec une solution de 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) à une concentration de 300 nM durant 8 min, puis scellés sous lamelle à l'aide de la solution Immun-Mount (Thermo Scientific). La prise d'image est réalisée avec un microscope à

épifluorescence Axio Observer D1 (Zeiss) connecté à une caméra Retiga 2000R CCD reliée au logiciel Image-proexpress 6.0 (QImaging).

4. Etude des lésions d'ADN

L'étude des lésions de l'ADN est effectuée sur les coupes de poumons de rat à l'aide du kit *In Situ* Cell Death Detection (Roche). Après déparaffinage selon le protocole exposé précédemment, les échantillons sont perméabilisés avec une solution de 20 µg/ml de protéinase K diluée dans du Tris-HCl à pH 8 pendant 30 min à température ambiante. Après lavages au PBS, les lames sont incubées 1 h à 37°C à l'abri de la lumière avec la solution TUNEL composée : de polymères de nucléotides marqué au fluorophore la fluorescéine (λ_{ex} 488- λ_{em} 520), et de l'enzyme désoxynucléotidyl transférase terminale qui catalyse la réaction de polymérisation des nucléotides sur les brins 3' libres de l'ADN, résultant de lésions. Après lavage, les lames sont incubées 8 min avec une solution de DAPI puis scellés sous lamelle à l'aide de la solution Immun-Mount (Thermo Scientific). Les images sont réalisées avec le microscope Axio Observer D1 puis traitées à l'aide du logiciel ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). L'analyse du taux de cellules apoptotiques dans les poumons de rat est effectuée sur 5 champs par coupes dans lesquels le nombre de cellules positives lors d'une excitation à λ_{488} est rapporté au nombre de noyaux total observé.

5. Culture cellulaire

a) Pneumocytes de type II primaires de rat

i. Isolement des CEAs

Les CEAs sont isolées à partir de poumon de rat selon un protocole respectueux des directives européennes concernant la protection des animaux et validé par le comité d'éthique local (C2EA-06 APAFIS #8150). Les animaux sont anesthésiés au pentobarbital par voie intra-péritonéal (60 mg/kg avec un volume de 100 ml/100 g), puis sont injectés en intra-péritonéal avec une solution d'héparine (2000U/ml, Panpharma). Une trachéotomie est réalisée afin d'insérer une canule au sein de la trachée. Une dose létale est administrée avant exsanguination par section de l'artère abdominale. Les poumons sont perfusés avec une solution de conservation (NaCl 5 mM, KCl 1 M, HEPES 1 M, tampon phosphate 0,2 M, EGTA, glucose). Pour ce faire, la canule trachéale est connectée à une seringue de 10 ml d'une part et une canule reliée à une seringue de 50 ml

contenant la solution de conservation est insérée dans le ventricule droit du cœur d'autre part. La solution de conservation est injectée en intra-cardiaque à débit constant de 300 ml/min et un volume d'air de 8 ml est insufflé dans les poumons jusqu'à ce que les poumons adoptent une couleur blanche. Le bloc cœur/poumon est prélevé puis rincé avec seconde solution (NaCl 5 mM, KCl 1 M, HEPES 1 M, tampon phosphate 0,2 M, MgSO₄, CaCl₂) puis de nouveau avec la solution de conservation. Les poumons sont ensuite perfusés avec 15 ml d'une solution d'élastase (4 U/ml) (Worthington) afin de digérer les composants de la matrice du poumon. Les poumons sont ensuite dissociés mécaniquement dans une solution de DNase (1 mg/ml) (Roche diagnostic). L'homogénat pulmonaire est filtré à travers une bande de gaze puis deux filtres aux pores d'un diamètre de 100 µm et 30 µm. Après centrifugation, les CEAs sont purifiées par adhérence différentielle pendant 45 min sur une boîte de Petri du fabricant Greiner, sur laquelle les CEAs n'adhèrent pas. Le surnageant est centrifugé puis les cellules sont mises en culture dans du Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplémenté avec 25 mM de D-glucose, 10 mM d'hepes, 23,8 mM de NaHCO₃, 2 mM de L-glutamine, 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 50 U/ml de pénicilline, 50 µg/ml de streptomycine, 10 µg/ml de gentamycine et 10 µg/ml d'amphotéricine B (Thermo Scientific) et placée dans un incubateur humide à 37°C avec 5 % de CO₂. Les CEAs sont cultivées dans ces conditions pendant 3 jours, temps nécessaire à l'acquisition de la caractéristique de production de surfactant. A l'issue des 3 jours, 95 % des CEAs présentent les caractéristiques de PII, *id est* produisent des corps lamellaires visibles par le marquage de la phosphorine 3R, expriment la protéine SP-C et forment une monochouche avec la présence de jonctions serrées mise en évidence par la localisation de ZO1 (Uzunhan et al., 2016).

ii. Exposition à l'hypoxie et traitements

Les cellules sontensemencées au jour 0 à une densité de $0,44 \times 10^6$ cellules/cm² en fond de plaque ou à une densité de 1×10^6 cellules/cm² sur filtre aux pores de 0,4 µm de diamètre (Corning™ Transwell™, Thermo Scientific). Au jour 3, le milieu de culture est retiré, les cellules sont lavées au PBS et les traitements (Table 4) dilués dans le milieu de culture des CEAs sont ajoutés. Les cellules sont placées dans une chambre en polyméthacrylate de méthyle possédant deux valves. L'une d'elle est connectée à une bouteille de milieux crystal (Air Liquide) contenant 95% d'azote et 5% de CO₂, la seconde est reliée à un oxymètre. A 1,5% d'O₂, les valves sont fermées et la chambre est placée dans un incubateur à 37°C. Les cellules contrôles sont placées dans un incubateur humide à 37°C avec 5 % de CO₂.

Traitements	Fonction	[finale]	Disposition	Référence
4-PBA	Inhibiteurs des voies de l'UPR	100 mM	aucune	Sigma Aldrich
Salubrinal		10 μ M	aucune	Santa Cruz
Thapsigargine	Inducteur des voies de l'UPR	20 μ M	aucune	Sigma Aldrich
YC-1	Inhibiteur de HIF-1 α	10 μ M	aucune	Sigma Aldrich
BAPTA-AM	Chélateur de calcium	1 μ M	6 h de prétraitement, retrait du milieu puis ajout de milieu frais	Sigma Aldrich

Table 4. Liste des traitements chimiques utilisés pour les différentes études. 4-phenylbutyrate (4-PBA) : inhibiteur des voies de l'UPR, salubrinal : inhibiteur de la voie d'activation d'ATF4, YC-1 : inhibiteur de HIF-1 α , (BAPTA-AM) : chélateur de calcium.

b) A549

La lignée de cellules alvéolaire humaines, les A549, fournis par le laboratoire ATCC, possède une efficacité de transfection 5 fois supérieure aux CEAs de rat, leur utilisation permet ainsi de contourner la difficulté rencontrée dans les cellules primaires, d'étudier l'effet d'une sous expression de gènes. Les A549 sontensemencées au jour 0 à une densité de 25 000 cellules/cm² dans du DMEM supplémenté avec 25 mM de D-glucose, 10 mM d'hepes, 23,8 mM de NaHCO₃, 2 mM de L-glutamine, 10 % de SVF, 50 U/ml de pénicilline, 50 μ g/ml de streptomycine, 10 μ g/ml de gentamycine et 10 μ g/ml d'amphotéricine B (Thermo Scientific) et placée dans un incubateur humide à 37°C avec 5 % de CO₂. Au jour 2, les cellules sont incubées avec les siRNA de *CHOP*, *HIF-1 α* ou le scramble puis placées au jour 3 dans une chambre en polyméthacrylate de méthyle et le taux d'O₂ est fixé à 0,5%.

6. Transfection

a) Présentation des plasmides

L'activité transactivatrice des différents éléments de réponse des facteurs HIF- α , des facteurs de l'UPR ATF4, ATF6N et XBP1s, du facteur antioxydant NRF2 ou l'activité du promoteur de *Chop* sont quantifiées par l'expression du gène rapporteur de la luciférase de *Photinus pyralis* cloné en aval des séquences des éléments de réponse ou du promoteur de *Chop*. Un contrôle minimisant la variabilité expérimentale est réalisé par co-transfection d'un plasmide possédant les séquences codant pour la luciférase de *Renilla Reniformis*. Les plasmides utilisés sont répertoriés dans la table 5.

Plasmide	Fonction	Fournisseur/Référence
pGL4-HRE	Elément de réponse de HIF- α	Promega, #9PIE400
pGL3-AARE	Elément de réponse d'ATF4	Généreusement donné par Mr le Pr Pierre Fournoux
pGL4-ERSE	Elément de réponse d'ATF6N/XBP1s	Promega, #9PIE366
pGL4-ARE	Elément de réponse de NRF2	Promega, #9PIE364
pGL3-pCHOP	Promoteur de <i>Chop</i>	Généreusement donné par Mr le Pr Pierre Fournoux
pRL-SV40	Contrôle de transfection : permet la normalisation de la réponse luciférase des différents éléments de réponse ou du promoteur de <i>Chop</i> à la luciférase de <i>Renilla Reniformis</i>	Promega, #E2231

Table 5. Liste des plasmides utilisés pour les études d'activité transactivatrice et de promoteur.

La surexpression des plasmides (Table 6) contenant les séquences des gènes codant les protéines de fusion CHOP-GFP, HIF-1 α -hémagglutinine (HA) ou un mutant de HIF-1 α (HIF-1 $\alpha\Delta$ -HA) incapable de transactiver. Le plasmide vide pCDNA3 est utilisé comme contrôle de transfection des plasmides HIF-1 α et HIF-1 $\alpha\Delta$ et le plasmide codant la GFP est utilisé comme contrôle de transfection du plasmide CHOP.

Plasmide	Fonction	Fournisseur/Référence
pGL3-CHOP-GFP	Surexpression de la protéine de fusion CHOP-GFP	Addgene, #21898
pGL3-GFP	Contrôle : surexpression de la protéine GFP	Clontech, #632370
pCDNA3-HIF-1 α -HA	Surexpression de la protéine de fusion HIF-1 α -HA	Addgene #18949
pCDNA3-HIF-1 $\alpha\Delta$ -HA	Surexpression d'une protéine HIF-1 α n'ayant pas la capacité de fixer l'ADN	Addgene #52215
pCDNA3	Contrôle de transfection de HIF-1 α et HIF-1 $\alpha\Delta$	Invitrogen

Table 6. Liste des plasmides utilisés pour les études de surexpression de protéines.

b) Amplification des plasmides

Les plasmides sont transformés puis amplifiés dans des bactéries compétentes *Escherichia coli* DH5 α .

Les bactéries sont décongelées sur glace puis 100 ng de plasmide y sont ajoutés. La transformation bactérienne est réalisée par choc thermique. Après 30 min sur glace, le mélange ADN/bactérie est

placé 30 secondes à 42°C, 2 min sur glace, supplémenté avec un milieu favorisant l'efficacité de la transformation (SOC) puis placé dans une étuve à 37°C pendant 1 h. Les bactéries sont ensuiteensemencées sur des boîtes de Petri contenant du milieu lysogeny broth (LB) agar supplémenté en antibiotique ; ampicilline ou kanamycine (100 µg/ml et 50 µg/ml respectivement) selon le gène de résistance présent dans les différents plasmides.

Une des colonies bactériennes est repiquée et mise en culture à 37°C pendant 24 h sous agitation dans du LB liquide supplémenté en antibiotique adéquat. La culture est centrifugée à 4000 rpm pendant 15 min. L'extraction plasmidique est réalisée à l'aide du kit QIAfilter (Qiagen) et la quantité d'ADN est évaluée par dosage au spectrophotomètre Biospec-Nano à 260 nm (Life Science, Shimadzu).

i. Transfection par électroporation des pneumocytes de type II

Afin d'étudier l'activité transactivatrice d'ATF4, ATF6N et HIF- α ainsi que l'activité du promoteur de CHOP, les PII sont transfectés par électroporation avec le système NEON™ (Invitrogen). Ce système permet d'appliquer un champ électrique dont la fréquence, l'amplitude et la durée sont contrôlés. Au jour 1 après isolement, les PII de rat sont décollés par traitement à la trypsine, centrifugés 8 min à 800 rpm et le culot est repris dans un tampon de resuspension (fournis avec le kit) dans lequel sont préalablement dilués les plasmides d'intérêt. L'ensemble est rapidement récupéré à l'aide d'une pipette qui est ensuite connectée dans la cuve d'électroporation. Notre protocole d'optimisation permettant d'obtenir une efficacité de transfection de 20% résulte des conditions suivantes : 44.10^4 cellules pour 0,5 µg d'ADN et concernant le système NEON™ 2 pulses de 20 ms à 1400 mV. Les cellules transfectées sont mises en culture dans du DMEM supplémenté avec 25 mM de D-glucose, 10 mM d'hepes, 23,8 mM de NaHCO₃, 2 mM de L-glutamine, sans sérum ni antibiotique. Au jour 2 post-transfection, les cellules sont exposées ou non à 1,5% d'O₂ et aux différents traitements et placées à 37°C.

ii. Analyse de l'activité des luciférases

Les activités des enzymes luciférase de *Photinus pyralis* des plasmides d'intérêt et de *Renilla Reniformis* du plasmide servant de contrôle de transfection sont évaluées à l'aide du kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega). A l'issue des différents traitements, les cellules sont lysées et l'homogénat cellulaire est réparti sur une plaque blanche de 96 puits. Le substrat de la luciférase de *Photinus pyralis* est ajouté et après une brève agitation, la

luminescence résultant de l'activité de cette luciférase est mesurée à l'aide du lecteur de luminescence Clarity™ (BioTek). Le substrat de la luciférase de *Renilla Reniformis* est ensuite ajouté et la luminescence est quantifiée. Les résultats sont exprimés par la luminescence de *Photinus pyralis* rapportée à celle de *Renilla Reniformis*.

c) Stratégie siRNA

i. Hybridation des séquences

Les séquences sens et antisens des siRNA sont fournies par Invitrogen (Table 7). Une solution de stock de chacun des brins sens et antisens est reprise dans de l'eau pour une concentration finale de 100 mM. Afin d'obtenir le siRNA fonctionnel, une étape d'hybridation des deux brins est réalisée. Pour ce faire, 30 µl de chacun des brins sont ajoutés à 15 µl du tampon d'hybridation (annealing solution) mis à disposition par le fournisseur. L'échantillon est incubé 2 min à 95°C puis laissé 1 h à température ambiante et stocké à -20°C. La concentration finale est de 100 mM. La vérification de l'hybridation est effectuée par migration sur gel d'agarose à 3% durant 30 min à 75V.

Cible	Séquence sens (5'-3')	Séquence anti-sens (5'-3')
<i>CHOP</i> #1	AAGAACAGCAGAGGUCACAA	UUGUGACCUCUGCUGGUUCUU
<i>CHOP</i> #2	GCCUGGUAUGAGGACCU GC	GCAGGUCCUCAUACCAGGC
<i>HIF-1α</i>	CUGAUGACCAGCAACUUGA	UCAAGUUGCUGGUCAUCAG

Table 7. Liste des siRNA utilisés pour les études de sous expression de *CHOP* et *HIF-1α*.

ii. Transfection par liposome

Au jour 2 après ensemencement sur des boîtes de Petri p60, les A549 sont transfectées avec les siRNA par la technique de lipofection selon le protocole de la Lipofectamine 2000 (Invitrogen). 1 µl de siRNA est dilué dans 75 µl de milieu OptiMEM. A cette solution sont ajoutés 15 µl de Lipofectamine et 60 µl d'OptiMEM. Cette solution de siRNA et Lipofectamine 2000 est vigoureusement mélangée et placée 5 min à température ambiante. Les cellules préalablement lavées au PBS sont recouvertes de 850 µl de DMEM sans antibiotique ni SVF puis incubées avec la solution de siRNA. Après 4 heures, du milieu DMEM supplémenté avec antibiotique et 5% de SVF est ajouté. Un contrôle de transfection est réalisé à l'aide d'une séquence aléatoire (scrambled) fournie par Invitrogen déjà hybridée.

7. Analyse de l'expression de protéines par western blotting

a) Extraction et dosage protéique

L'étude de l'expression des protéines dans le poumon de rats exposés à l'hypoxie est effectuée à partir d'une biopsie de 30 mg du poumon droit conservé à -80°C. La biopsie est lavée au PBS puis broyée dans un tampon composé de 20 mM de Tris base, 150 mM de NaCl, 1% de Triton X100, 1% de SDS, 0,5% de déoxycholate et 0.01% d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Thermo Scientific) à l'aide d'un homogénéiser Ultra-Turrax® (IKA) durant 3 minutes à 4°C.

L'étude de l'expression des protéines dans les pneumocytes de type II de rat ou humains, est effectuée à partir de cellules cultivées sur des plaques 6 puits exposées à l'hypoxie avec ou sans traitement. Les cellules sont lavées au PBS froid puis décollées à l'aide d'un grattoir dans un tampon de lyse contenant 62.5 mM de Tris-HCl (pH 6.8), 10% de glycerol, 2% de SDS and 0.01% d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases.

Les homogénats cellulaires obtenus *in vivo* et *in vitro* sont soumis à 3 cycles répétés de sonication et de congélation dans l'azote liquide puis centrifugés à 13000 g pendant 30 min à 4°C afin d'extraire les protéines. La quantité de protéines est évaluée par dosage colorimétrique basée sur la méthode de réaction de l'acide bicichonique (BCA) avec les ions cuivre oxydés à l'aide du kit Pierce™ BCA (Thermo Scientific).

b) Western blotting

Afin d'évaluer l'expression de protéines ciblées dans les différentes conditions, 30 µg de protéines totales sont prélevées et diluées dans le tampon de Laemmli contenant 60 mM de Tris-Cl à pH 6.8, 2% de SDS, 10% de glycerol, 5% de β-mercaptoethanol et 0,01% de bleue de bromophénol. Après dénaturation à 95°C pendant 6 min, les échantillons sont déposés sur gel d'acrylamide de 7,5% à 12%. La migration électrophorétique est réalisée à 90 V pendant 30 min puis 120 V pendant 1 h. Le transfert des protéines est effectué sur membrane de nitrocellulose à 90 V pendant 1 h 30 dans un tampon de transfert classique supplémenté de 20% d'éthanol. Après saturation des sites aspécifiques dans une solution de lait à 5%, la membrane est incubée avec les anticorps primaires sous agitation à 4°C toute une nuit (Table 8). Après plusieurs lavages au TBS-T, la membrane est incubée 1 h à température ambiante avec les anticorps secondaires conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) (Dako). A la suite de plusieurs lavages, la membrane est incubée

5 min avec une solution contenant le substrat de la HRP, Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermofisher).

La quantification du signal luminescent résultant de la réaction de l'HRP avec son substrat et la prise d'images sont réalisées à l'aide du système d'imagerie ChemiDoc™ MP (Bio-Rad) connecté au logiciel Image Lab™ (Bio-Rad). L'analyse des données repose sur la quantification des pixels à l'aide du logiciel Image Lab™. La β -actine est utilisée comme protéine de ménage.

Anticorps (anti-)	Dilution	Fournisseur/Référence
ATF4	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, sc-200
ATF6- α	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, sc-22799
XBP-1	1:1000	Sigma Aldrich, A37152
HIF-1 α	1:1000	Novus, NB100-479
CHOP	1:1000	Novus, NB600-1335
Caspase 12	1 :1000	Abnova, PAB8617
α -SMA	1:500	Sigma Aldrich, A2547
Vimentine	1:1000	Sigma Aldrich, V6389
β -actine	1:500	Sigma Aldrich, A2103

Table 8. Liste des anticorps utilisés pour l'étude protéique des pneumocytes de type II murins et humains.

8. Analyse de l'expression de gènes par RT-qPCR

a) Extraction d'ARN

L'étude de l'expression des transcrits dans le poumon de rats exposés à l'hypoxie est effectuée à partir d'une biopsie de 30 mg du poumon droit conservé à -80°C . L'extraction des ARN est réalisée à l'aide du kit GeneJet (Thermofisher). Brièvement, la biopsie est lavée au PBS, puis broyée dans le tampon de lyse fournis dans le kit. L'élimination des enzymes dégradant l'ARN est effectuée à l'aide d'une solution de protéinase K fournie. L'homogénat est centrifugé à 13000 rpm pendant 5 min puis traité selon les directives du protocole décrit par le fournisseur.

La concentration d'ARN extraits est évaluée par dosage au spectrophotomètre Biospec-Nano à 260 nm (Life Science, Shimadzu).

L'étude de l'expression des transcrits dans les pneumocytes de type II de rat ou humains est effectuée à partir de cellules cultivées sur des plaques 12 puits exposées à l'hypoxie avec ou sans traitement. Les cellules sont lavées au PBS froid, puis lysées dans le réactif TRIzol™ (Thermofisher) sous vive agitation durant 5 min. Le lysat est récupéré, complété avec 3 volumes de chloroforme puis centrifugé 15 min à 12000 g. Les acides nucléiques présents dans la phase

aqueuse sont précipités à l'isopropanol. Après une nouvelle centrifugation de 10 min à 12 000g et l'élimination du surnageant, un volume de 500 µl d'éthanol à 75% est ajouté. Les ARN sont repris dans 20 µl d'eau exempte de nucléase puis leur concentration est évaluée.

b) Rétro-transcription

La réaction de rétro-transcription ayant pour but d'obtenir des ADN complémentaires (ADNc) est réalisée à partir de 0,5 µg d'ARN totaux préalablement dosés. Cette étape est effectuée à l'aide du kit de synthèse d'ADNc Maxima™ (Thermofisher). Brièvement, 4 µl du mélange fournis de désoxy-ribonucléotides, d'amorce aléatoires d'hexamères, d'oligo désoxy thymine triphosphate, 0,8 µl d'enzyme transcriptase inverse est ajouté à l'ARN ainsi qu'un volume d'eau exempte de nucléase pour un volume final de 20 µl. Placés dans un cycleur thermique Techne Tc-512 (Thermofisher), les échantillons sont soumis au programme suivant : 5 minutes à 25°C, 30 minutes à 42°C, 5 minutes à 85°C puis conservés à -20°C.

c) PCR quantitative en temps réel

L'étude des transcrits est réalisée par l'utilisation de la technologie SYBR green I. Brièvement, 0,3 µl des mélanges d'amorces sens et anti sens de nos transcrits ciblés à une concentration de 10 µM sont mis en solution avec 5 µl de Absolute qPCR SybrGreen Rox (Thermofisher), 0,7 µl d'eau exempte de nucléase et de 4 µl d'ADNc préalablement dilué au 20^{ème}. Les échantillons sont placés dans un cycleur thermique StepOnePlus™ Real-time PCR System (Thermofisher), et soumis au programme suivant : 15 min à 95°C, puis 40 cycles selon les étapes 15 secondes à 95° C, 1 minute à 60° C. L'analyse des résultats est réalisée à l'aide du logiciel StepOnePlus™ selon la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$. L'expression relative des différents transcrits (Table 9) est en effet calculé comme suit et utilise la β-actine comme gène de ménage :

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{ARNm d'intérêt échantillon} - \beta\text{-actine échantillon}) - \Delta Ct (\text{ARNm d'intérêt contrôle} - \beta\text{-actine contrôle})$$

Espèce étudiée	Gènes	Séquence sens (5'-3')	Séquence anti sens (5'-3')
Rat	<i>Tgf-β1</i>	TGAGTGGCTGTCTTTTGACG	TGGGACTGATCCCATTGATT
	<i>Ctgf</i>	CCTAGCTGCCTACCGACTGG	CTTAGAACAGGGCGTCCACT
	<i>Zeb1</i>	CCGTAAGTTCAAGTGACCCG	GTGGGACTGCCACTGTGGAT
	<i>Twist1</i>	CTACGCCTTCTCCGTCTGGA	CAATGACATCTAGGTCTCCGGC
	<i>Xbp1</i>	GCTGAGGAGGAAACTGAAAAACA	AGAGGTGCACGTAGTCTGAG
	<i>Chop</i>	TGTTGAAGATGAGCGGGTGG	TGGACCGGTTTCTGCTTTCA
	<i>Bim</i>	TTACACGAGGAGGGCGTTTG	CCAGACCAGACGGAAGATGA
	<i>β-actin</i>	ACCGTGAAAAGATGACCCAGA	CACAGCCTGGATGGCTACGT
Humain	<i>HIF-1α</i>	AGAGTCAAGCCCAGAGTCAC	TGGGACTGTTAGGCTCAGGT
	<i>CHOP</i>	TTCTCTGGCTTGCTGACTG	CTGCGTATGTGGGATTGAGG
	<i>CHAC1</i>	CCTGAAGTACCTGAATGTGCGAGA	GCAGCAAGTATTCAAGGTTGTGGC
	<i>β-ACTIN</i>	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC	AAAGCCATGCCAATCTCATC

Table 9. Liste des séquences des gènes étudiés dans les pneumocytes de type II murins et humains.

9. Immunocytofluorescence

La localisation de HIF-1 α et CHOP est observée dans des PII de rats cultivés sur lamelle ronde de 14 mm placée en fond de plaque et exposées à 6 h d'hypoxie et l'expression de α -SMA et TTF1 est évaluée dans des PII de rats cultivés sur filtre et exposés 6 jours à l'hypoxie avec ou sans traitement chimique. Après traitement, les cellules sont fixées 10 min avec du PFA 4% puis les membranes sont perméabilisées avec une solution de Triton X100 à 0,1% durant 10 min sous agitation. Les PII sont ensuite incubés 30 min avec une solution de blocage des sites aspécifiques à 2% de BSA puis 1 h avec les anticorps primaires (Table 10). Après lavage au PBS-T, les cellules sont incubées 1 h avec une solution d'anticorps secondaires conjugués aux fluorochromes AlexaFluor™ 488 et 568 (Invitrogen) diluée au 1 :200.

Anticorps (anti-)	Dilution	Fournisseur/Référence
CHOP	1 :100	Novus, NB600-1335
HIF-1 α	1:100	Novus, NB100-479
ZO1	1 :200	Sigma Aldrich, AB2272
α -SMA	1:500	Sigma Aldrich, A2547
TTF1	1:200	Invitrogen, 180221

Table 10. Liste des anticorps utilisés pour l'étude protéique des pneumocytes de type II de rat.

Après lavage, les lames sont incubées avec une solution de 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) à une concentration de 300 nM durant 8 min, puis scellés sous lamelle à l'aide de la solution Immun-Mount (Thermo Scientific).

10. Etude de l'activité des caspases effectrices 3 et 7

L'activité des caspases dans les poumons de rat ou les PII en culture est évaluée à l'aide du kit Caspase-Glo® 3/7 (Promega). 40 µg d'extraits protéiques sont déposés dans des puits de plaque blanche de 96 puits. Une solution composée de luciférine modifiée contenant un domaine de clivage pour les caspases 3 et de luciférase est ajouté à volume égal dans chacun des puits. La plaque est ensuite placée dans un lecteur de luminescence Clarity™ (BioTek) et la lecture est renouvelée toutes les 30 min pendant 2 h. Les résultats obtenus pour chaque condition sont normalisés à leur condition contrôle.

11. Analyses statistiques

Les données brutes sont soumises au test de normalité Shapiro-Wilk. Les échantillons suivant une distribution selon une loi normale sont confrontés à un test paramétrique, et les échantillons non distribués selon une loi normale sont confrontés à un test non paramétrique. Dans le cas d'une comparaison entre deux conditions, le test de Student est appliqué comme test paramétrique et le test de Mann-Whitney comme test non paramétrique. Dans le cas d'une comparaison entre trois ou quatre conditions, une analyse de variance est appliquée comme test paramétrique et le test de Kruskal-Wallis comme test non paramétrique. Lorsque $P < 0,05$ alors la différence entre les conditions est considérée comme significative. * : $P < 0,05$, ** : $P < 0,01$ et *** : $P < 0,001$ représentent une différence significative à la condition contrôle.

RÉSULTATS

I. Rôle de l'hypoxie et de HIF-1 sur le stress du RE et l'apoptose des pneumocytes de type II

1. Objectifs de l'étude

L'expression de HIF-1 dans les pneumocytes de types II (PII) hyperplasiques des patients atteints de FPI (*Tzouvelekis et al., 2007*) mais également de modèles murins de fibrose pulmonaire induite à la bléomycine (*Weng et al., 2014*), a permis de faire émerger le concept de la présence d'une hypoxie alvéolaire localisée dans la fibrose pulmonaire. Par ailleurs, un stress du RE, observé par l'expression des marqueurs des voies de l'UPR et du facteur CHOP, est induit dans les pneumocytes situés dans les zones du poumon profondément remaniées (*Lawson et al., 2008, 2011*). De façon intéressante, *in vitro*, l'environnement hypoxique des PII et notamment HIF-1 (*Krick et al., 2005*) d'une part, ou l'induction d'un stress du RE et notamment CHOP d'autre part (*Kamp et al., 2013*) régulent des mécanismes moléculaires impliqués dans l'apoptose cellulaire. Dans des travaux menés sur différents types cellulaires, la stabilisation de HIF-1 lors d'une hypoxie gazeuse (*Zheng et al., 2012; Yang et al., 2014a*) ou chimique (*López-Hernández et al., 2015*) engendre un stress du RE et l'expression des voies apoptotiques. Des études révèlent que l'utilisation d'inhibiteurs des voies de l'UPR tels le 4-PBA, prévient l'effet de l'hypoxie sur l'apoptose des cellules (*Qi et al., 2004; Zhu et al., 2014*).

Cette étude a été menée afin de répondre à trois objectifs :

- caractériser l'effet de l'hypoxie sur les voies de l'UPR dans les PII,
- évaluer le rôle des voies de l'UPR dans l'apoptose de cellules en hypoxie,
- étudier la relation entre HIF-1 et les voies de l'UPR.

ARTICLE 1

HIF-1 α TRIGGERS ER STRESS AND CHOP-MEDIATED APOPTOSIS IN ALVEOLAR EPITHELIAL CELLS, A KEY EVENT IN PULMONARY FIBROSIS

Eva Delbrel¹, Abdoulaye Soumare¹, Adnan Naguez¹, Rabab Label¹, Olivier Bernard¹, Alain Bruhat³, Pierre Fafournoux³, Geoffrey Tremblais¹, Dominique Marchant¹, Thomas Gille^{1,2}, Jean-François Bernaudin^{1,2,4}, Patrice Callard⁴, Marianne Kambouchner², Emmanuel Martinod^{1,2}, Dominique Valeyre^{1,2}, Yurdagül Uzunhan^{1,2}, Carole Planès^{1,2}, Emilie Boncoeur¹

SCIENTIFIC
REPORTS



Accepté le 9 Novembre 2018

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

HIF-1 α triggers ER stress and CHOP-mediated apoptosis in alveolar epithelial cells, a key event in pulmonary fibrosis

Received: 7 August 2018
Accepted: 9 November 2018
Published online: 18 December 2018

Eva Delbrel¹, Abdoulaye Soumare¹, Adnan Naguez¹, Rabab Label¹, Olivier Bernard¹, Alain Bruhat³, Pierre Fafoux³, Geoffrey Tremblais³, Dominique Marchant¹, Thomas Gille^{1,2}, Jean-François Bernaudin^{1,2,4}, Patrice Callard⁴, Marianne Kambouchner², Emmanuel Martinod^{1,2}, Dominique Valeyre^{1,2}, Yurdagül Uzunhan^{1,2}, Carole Planès^{1,2} & Emilie Boncoeur¹

Endoplasmic Reticulum (ER) stress of alveolar epithelial cells (AECs) is recognized as a key event of cell dysfunction in pulmonary fibrosis (PF). However, the mechanisms leading to AECs ER stress and ensuing unfolded protein response (UPR) pathways in idiopathic PF (IPF) remain unclear. We hypothesized that alveolar hypoxic microenvironment would generate ER stress and AECs apoptosis through the hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α). Combining *ex vivo*, *in vivo* and *in vitro* experiments, we investigated the effects of hypoxia on the UPR pathways and ER stress-mediated apoptosis, and consecutively the mechanisms linking hypoxia, HIF-1 α , UPR and apoptosis. HIF-1 α and the pro-apoptotic ER stress marker C/EBP homologous protein (CHOP) were co-expressed in hyperplastic AECs from bleomycin-treated mice and IPF lungs, not in controls. Hypoxic exposure of rat lungs or primary rat AECs induced HIF-1 α , CHOP and apoptosis markers expression. In primary AECs, hypoxia activated UPR pathways. Pharmacological ER stress inhibitors and pharmacological inhibition or silencing of HIF-1 α both prevented hypoxia-induced upregulation of CHOP and apoptosis. Interestingly, overexpression of HIF-1 α in normoxic AECs increased UPR pathways transcription factors activities, and CHOP expression. These results indicate that hypoxia and HIF-1 α can trigger ER stress and CHOP-mediated apoptosis in AECs, suggesting their potential contribution to the development of IPF.

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), the most common and severe form of interstitial lung diseases, is pathologically characterized by a pattern of usual interstitial pneumonia (UIP) associating fibrotic remodelling leading to honeycombing and abnormal characteristics of the alveolar epithelial cells (AECs)¹. IPF is thought to be the consequence of repetitive micro-injuries of the alveolar epithelium, followed by inefficient repair and uncontrolled activation and proliferation of (myo) fibroblasts^{2,3}. Alveolar type II (ATII) cells, instead of proliferating to recover the denuded basal membrane, undergo apoptosis or a transformation through epithelial-mesenchymal transition (EMT)⁴. In addition, some AECs turn into hyperplastic cells with abnormal activation and production of pro-fibrotic factors⁵.

Interestingly, endoplasmic reticulum (ER) stress markers have been evidenced in AECs from patients with IPF, suggesting a potential role for ER stress in the pathogenesis of the disease^{6,7}. To compensate cell damage and disturbed folding of proteins in the ER, the Unfolded Protein Response (UPR) signaling is induced. The three branches of UPR, ATF4, spliced X-box binding protein 1 (XBP1s) and ATF6 α transcription factors are activated to inhibit protein translation, activate ER chaperone transcription and ER Activation Degradation (ERAD)⁸. If ER dysfunction is severe or prolonged, the UPR activation can result in fibrotic remodelling through induction of

¹Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire 'Hypoxie & Poumon' (EA 2363), F-93017, Bobigny, France. ²APHP, Hôpital Avicenne, F-93017, Bobigny, France. ³Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UMR-1019 Nutrition Humaine, Centre INRA Auvergne Rhône-Alpes, Clermont Auvergne Université, 63122, Saint Genès Champanelle, France. ⁴Sorbonne Université, Faculté de Médecine, 75013, Paris, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to E.B. (email: emilie.boncoeur@univ-paris13.fr)

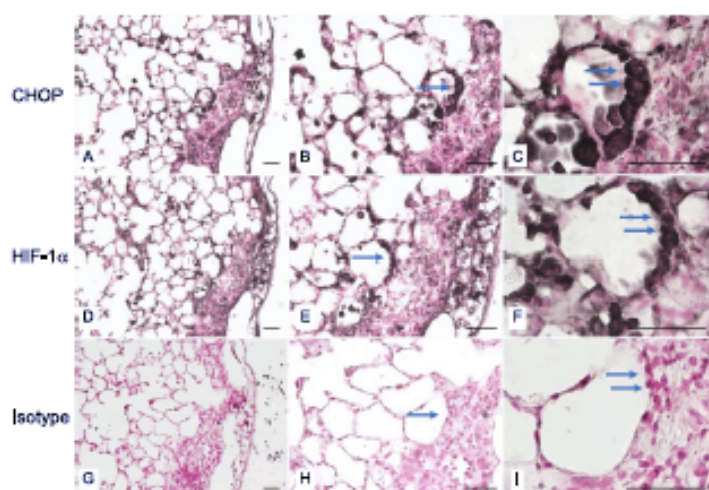


Figure 1. Coexpression of CHOP and HIF-1 α in alveolar epithelial cells of bleomycin-induced lung fibrosis in mice. CHOP (A–C) and HIF-1 α (D–F) are co-expressed (serial sections) in hyperplastic alveolar epithelial cells (AECs) in and close to areas of pulmonary remodelling (arrow). No labelling was observed with isotypic controls (G–I). Sections were counterstained with Nuclear Fast Red. BC are higher magnifications of A; EF of D and HI of G; Original magnification: objective X200 (A,D,G), x 400 (B,E,H) and x 1000 (C,F,I). Scale bars represent 50 μ m.

EMT or activation of pro-apoptotic pathways^{9,10} in part via the induction of the pro-apoptotic transcription factor C/EBP homologous protein (CHOP)¹¹ and regulation of its target genes *Bcl2*, *Bim* and *Chac-1*^{12–14}.

While in some familial forms of pulmonary fibrosis the induction of ER stress could likely be related to the accumulation of misfolded mutated surfactant proteins within the ER^{15,16}, the trigger(s) of ER stress induction in sporadic IPF is (are) still unknown. Considering the fact that hypoxia may promote ER stress in various organs^{17,18}, and that the expression of the hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) has been previously reported in AECs from IPF lungs¹⁹, we hypothesized that localized alveolar hypoxia and HIF-1 α could be relevant stressors inducing prolonged ER stress and subsequent apoptosis of AECs in sporadic IPF.

Therefore, the objectives of the present study were: (1) to determine whether HIF-1 α and CHOP proteins were co-expressed by AECs in lung tissue from IPF patients; (2) to evaluate whether micro-environmental hypoxia could activate the UPR pathways in rat AECs; (3) to decipher the molecular mechanisms linking hypoxia, HIF-1 α , ER stress and apoptosis in these cells. Our results show that HIF-1 α and CHOP proteins were both detected in hyperplastic AECs observed in IPF patients' lung biopsies and in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice as well as in AECs from rat exposed to acute hypoxia. *In vitro*, hypoxia-induced apoptosis was prevented by treatment with ER stress inhibitors salubrinal (SLB) and 4-phenylbutyrate (4-PBA) and by CHOP silencing. Finally, HIF-1 α involvement in the regulation of the transcriptional capacity of ATF4 and ATF6 α /XBP1s on their specific responsive elements, and CHOP expression was shown. Taken together, these results suggest that localized hypoxia of the alveolar milieu and expression of HIF-1 α could promote UPR pathways, CHOP expression and apoptosis in AECs, therefore contributing to alveolar cell dysfunction and finally promoting lung fibrosis.

Results

HIF-1 α and CHOP are expressed in alveolar epithelial cells from bleomycin-treated mice and in human IPF lung biopsies.

Immunostainings on serial sections of mouse lungs analyzed 21 days after bleomycin intratracheal instillation showed that both HIF-1 α and CHOP were expressed in AECs in and close to characteristic areas of alveolar and interstitial remodeling (Fig. 1A–F). No labelling was observed in the lung of control mice (data not shown). Analysis of lung biopsies from 3 IPF patients showed a characteristic UIP pattern associating fibrotic remodelling with modified epithelial cells covering the parenchymal air spaces (Fig. 2A–C, E–G, I–K). Expression patterns of HIF-1 α and CHOP were studied by immunostaining of serial sections of these biopsies and of control lung samples. HIF-1 α and CHOP were co-expressed in hyperplastic AECs located in fibrotic areas displaying a typical UIP pattern (Fig. 2A–C, E–G, I–K). More precisely, at higher magnification, a supranuclear localization of both HIF-1 α and CHOP was observed in these cells (Supplemental Fig. 1A, B, E, F). A more diffuse cytoplasmic distribution was also observed in reactive AECs in less fibrotic regions (Supplemental Fig. 1C, G). No significant labelling was observed for HIF-2 α in fibrotic areas (Fig. 1I–K). No immunostaining for CHOP, HIF-1 α or HIF-2 α was observed in alveolar or bronchiolar epithelial cells of normal control lung samples (Fig. 2D, H, J and Supplemental Fig. 1D, H) or in the preserved lung remote from pathological area.

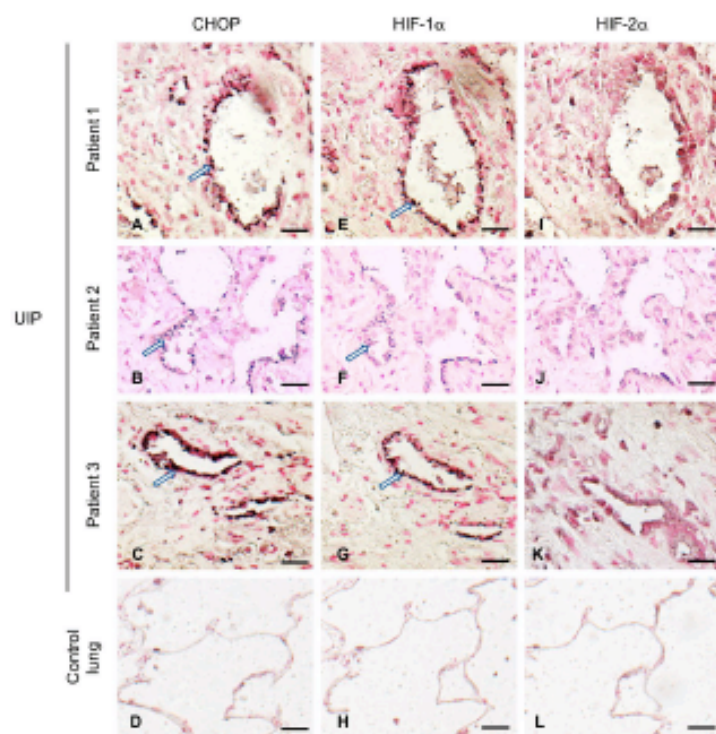


Figure 2. Co-expression of CHOP and HIF-1 α in alveolar epithelial cells of patients with IPF. CHOP and HIF-1 α are co-expressed in hyperplastic alveolar epithelial cells (arrow) in the UIP areas from 3 patients with IPF (UIP) (A–C, E–G). Expression of CHOP (A–C) and HIF-1 α (E–G) in the same epithelial cells from serial sections of IPF lungs presenting a fibrotic pattern; no labelling for HIF-2 α was observed (I–K). No labelling for CHOP (D), HIF-1 α (H) or HIF-2 α (L) was detected in normal control lung. Sections were counterstained with Nuclear Fast Red. Original magnification: objective X400. Scale bars represent 100 μ m.

Hypoxia induces CHOP and apoptosis in rat lung. Immunohistochemistry experiments on rat lung tissues revealed that exposure of rats to hypoxia (equivalent to 8% FIO₂) for 24 h induced HIF-1 α stabilization and CHOP protein expression specifically in the alveolar epithelium (Fig. 3A). The effect of hypoxia on apoptosis was studied by TUNEL assay. As shown in Fig. 2B, the presence of DNA strand breaks was detected in the lungs of rats exposed to hypoxia for 72 h, but not in normoxic rat lungs (58 ± 9 positive cells per field vs 0 in hypoxic and normoxic conditions, respectively). Moreover, there was a significant activation of effector caspase 3 (Fig. 3C) and the expression of the pro-apoptotic *Bim* mRNA (Fig. 3D) in lung homogenates of rat exposed 48 h to hypoxia ($P < 0.05$).

Hypoxia induces CHOP and apoptosis in primary rat alveolar epithelial cells. Primary rat AECs were exposed to 21% O₂ or 1.5% O₂ for 4 h to 24 h. HIF-1 α protein was detected by western blotting in hypoxic cells after 4 h of exposure and its expression level increased progressively thereafter (Fig. 4A). No signal was detected in normoxic AECs. Similarly, a 2-fold overexpression of CHOP protein was observed in AECs after a 4 h-hypoxic exposure ($P < 0.001$) (Fig. 4B). Immunostaining of HIF-1 α and CHOP in AECs exposed to hypoxia for 6 h revealed that these transcription factors were both localized in the nucleus (Fig. 4C). At 24 h of hypoxia, caspase 3 activity was significantly increased ($P < 0.001$) (Fig. 4D). *Bim* mRNA expression levels was markedly upregulated after 24 h of hypoxia (7.56 \pm 3.51-fold change as compared with normoxic condition, $P < 0.05$) (Fig. 4E).

ER stress is involved in hypoxia-induced apoptosis of alveolar epithelial cells through CHOP regulation. ER stress is involved in hypoxia-induced apoptosis of alveolar epithelial cells. As shown in Fig. 4, ATF4 protein level (expressed as the ATF4/ β -actin ratio) and ATF6 α /ATF6 ratio increased in a time-dependent manner under hypoxic condition. As compared to normoxic condition, a 6 h-hypoxic exposure induced a 8-fold increase in ATF4 and a 5-fold increase in ATF6 α /ATF6 ratio ($P < 0.05$) (Fig. 5A,B). The XBP1 spliced form/full-length protein (XBP1s/XBP1) ratio was significantly increased after 16 h hypoxia exposure (2-fold change as compared with normoxic condition, $P < 0.05$) (Fig. 5C). Control experiments showed that these proteins were also induced by tunicamycin (Supplemental data 2). A significant increase in the capacity of both ATF4 and

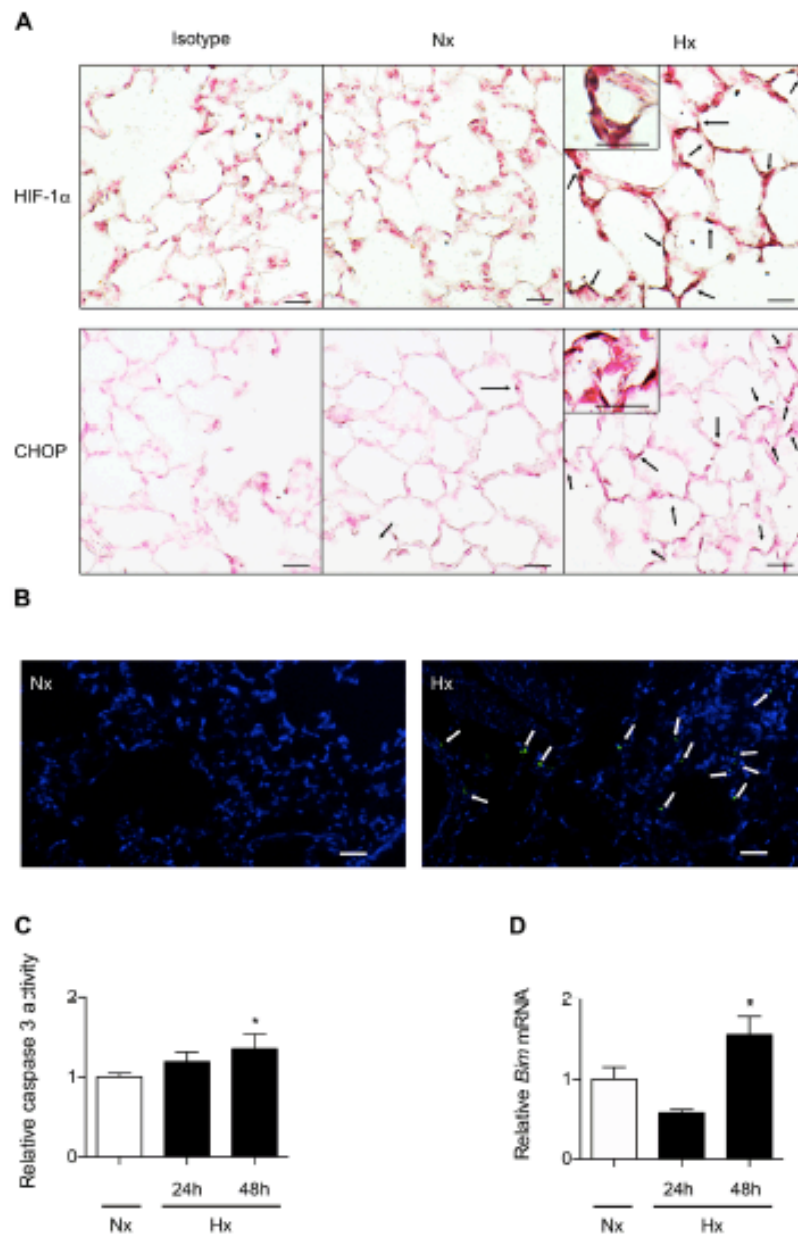


Figure 3. Hypoxia induces HIF-1 α , CHOP and apoptosis in rat lung exposed to hypoxia. Lungs of rats stabilized in normoxia (Nx) (21% of O₂) or exposed to hypoxia (Hx) (8% FiO₂-like) during 24 h, 48 h or 72 h were used for immunohistochemistry, TUNEL assay, apoptosis enzymatic assay and RT-qPCR analysis. Paraffin-embedded rat lung serial sections were immunostained for HIF-1 α or CHOP and counterstained with nuclear fast red. Original magnification: X400 (A). Rat lung sections have been TUNEL-labeled (green) (shown by arrow) and DAPI-stained (blue). Original magnification: X200, scale bars represent 100 μ m (B). The activity of effector caspase 3 was evaluated by enzymatic assay in rat lung homogenates (C). *Bim* mRNA expression levels were evaluated in rat lung homogenates by RT-qPCR (D). n = 6–8 rats per group. Data were submitted to a Kruskal–Wallis one-way analysis of variance followed by a Dunn’s multiple comparison tests with **P* < 0.05 representing a significant difference as compared with normoxic condition.

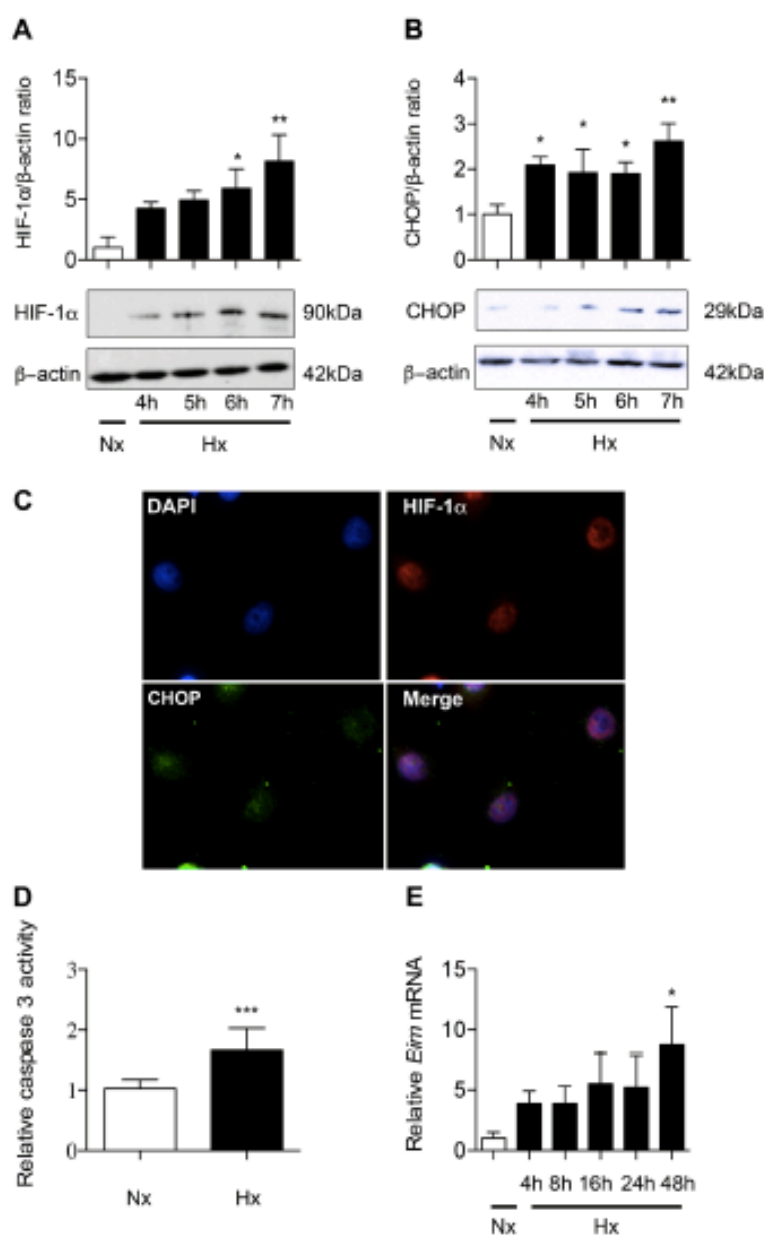


Figure 4. Hypoxia induces HIF-1 α , CHOP and apoptosis in alveolar epithelial cells exposed to hypoxia. Primary rat AECs were exposed to normoxia (Nx) (21% of O₂) or hypoxia (Hx) (1.5% of O₂) for increasing times (4–24 h). Protein levels of HIF-1 α (A) and CHOP (B) were evaluated by western blotting and were normalized to the corresponding β -actin signal. Rat AECs were exposed to 6 h-hypoxia and immunolabeled for HIF-1 α (red) and CHOP (green). DAPI was used to stained nucleus (blue) (C). The activity of effector caspase 3 was evaluated by enzymatic assay (D). Expression of the pro-apoptotic marker *Bim* was evaluated by RT-qPCR (E). n = at least 5 independent AECs cultures. Data were submitted to a Kruskal-Wallis one-way analysis of variance followed by a Dunn's multiple comparison tests. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ represent a significant difference as compared with normoxic condition.

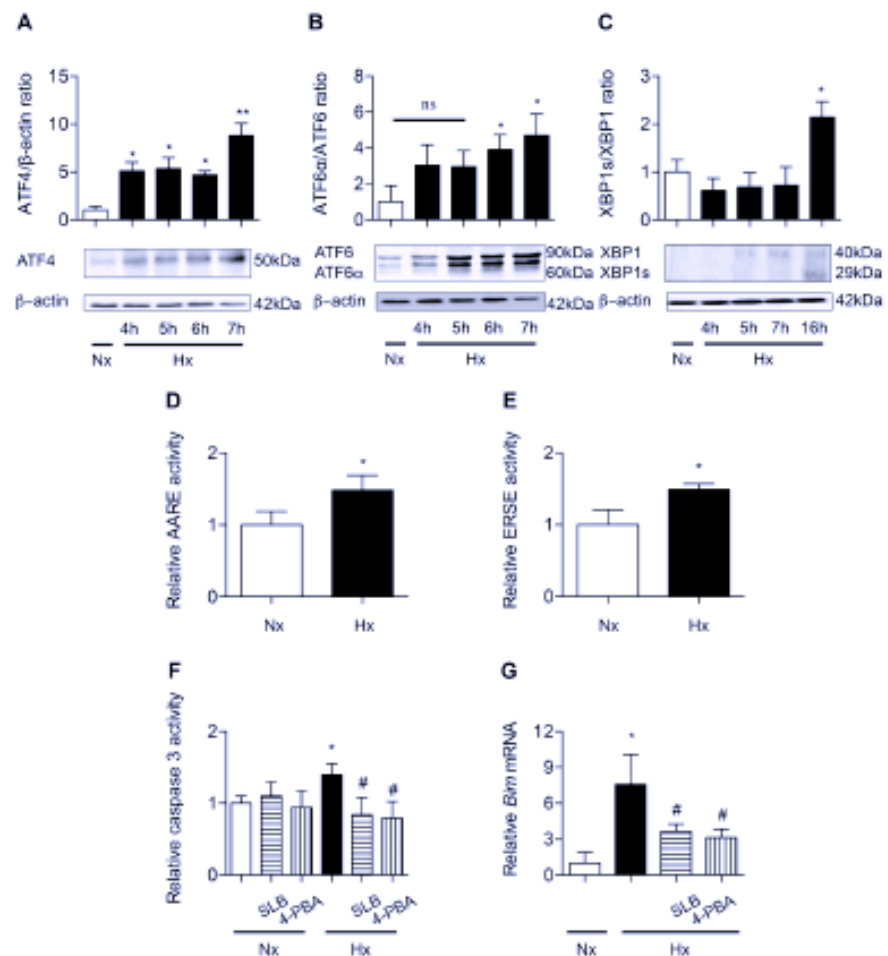


Figure 5. ER stress is involved in hypoxia-induced alveolar epithelial cells apoptosis. Primary rat AECs were placed in normoxia (Nx) (21% of O_2) or exposed to hypoxia (Hx) (1.5% of O_2) for increasing times (4–24 h). Protein levels of ATF4 (A), ATF6 α /ATF6 ratio (B) and XBP1s/XBP1 ratio (C) were evaluated by western blotting. Quantification has been done on at least 5 independent experiments, representing the densitometry analysis of each protein of interest reported to β -actin. Primary rat AECs were transfected with plasmids coding for luciferase reporter activity of ATF4 (the amino acid response element: AARE) (D) or ATF6 α /XBP1s (the endoplasmic reticulum response element: ERSE) (E) and exposed to hypoxia for 6 h. Primary rat AECs were placed in normoxia or exposed to hypoxia for 24 h in the presence or absence of ER stress modulators salubrinal (SLB, 100 μ M) or 4-phenylbutyrate (4-PBA, 100 mM). The activity of effector caspase 3 was evaluated by enzymatic assay (F), and expression of the pro apoptotic marker *Bim* was evaluated by RT-qPCR (G). $n =$ at least 5 independent experiments. Data were submitted to a Kruskal-Wallis one-way analysis of variance followed by a Dunn's multiple comparison tests, except for AARE and ERSE activity data submitted to a Mann-Whitney analysis. * $P < 0.05$, and ** $P < 0.01$: significantly different from control value in normoxic cells. # $P < 0.05$: significantly different from the value in untreated hypoxic cells. ns: non-significant difference between normoxic condition and hypoxic condition.

ATF6 α /XBP1s to transactivate their respective consensus responsive elements (AARE and ERSE) upstream the luciferase gene was shown after a 6 h-exposure to hypoxia, as compared with normoxic condition ($P < 0.05$) (Fig. 5D,E). To evaluate the implication of hypoxia-induced ER stress in apoptosis, AECs were treated with salubrinal (SLB) or 4-phenylbutyrate (4-PBA), two ER stress inhibitors^{20,21}, before exposure to hypoxia. SLB and 4-PBA had no effect on caspase 3 activity in normoxic cells. As shown in Fig. 5F, the increase in caspase 3 activity in response to a 24 h hypoxic exposure was fully prevented by SLB and 4-PBA treatment. Both SLB and 4-PBA blunted the hypoxia-induced increase in *Bim* expression ($P < 0.05$) (Fig. 5G).

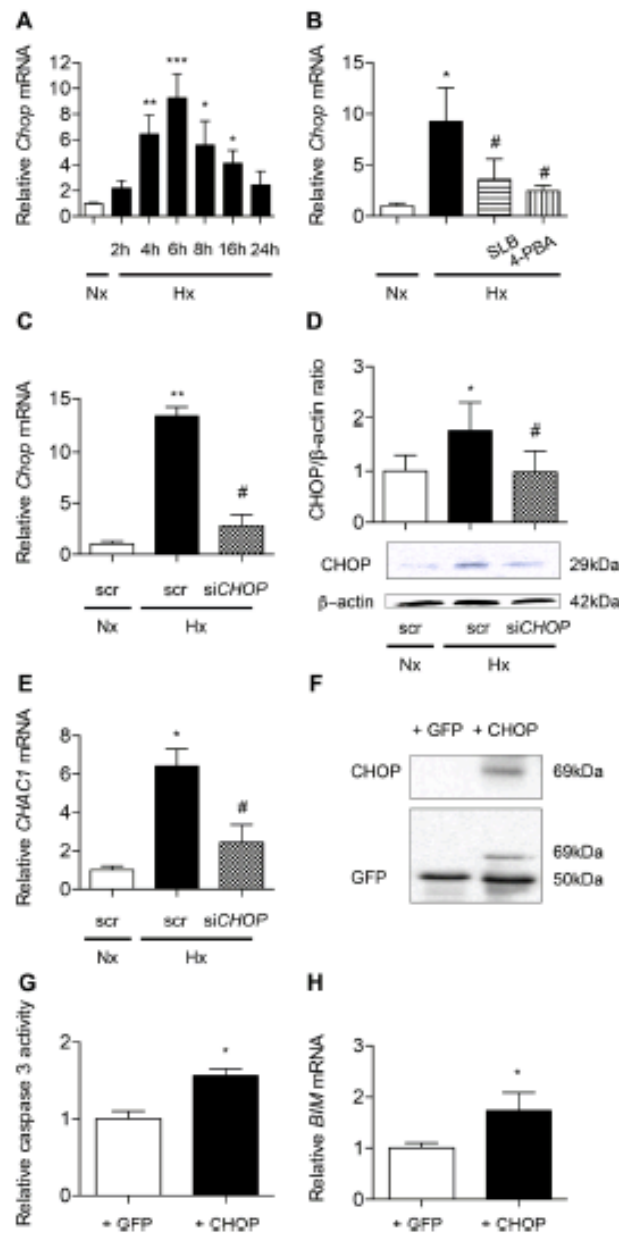


Figure 6. CHOP is involved in hypoxia-induced alveolar epithelial cells apoptosis. *Chop* mRNA expression was evaluated by RT-qPCR in primary rat AECs placed in normoxia (Nx) (21% of O_2) or exposed to hypoxia (Hx) (1.5% of O_2) for increasing times (4–24 h) (A). *Chop* mRNA expression was evaluated by RT-qPCR in primary rat AECs treated with 100 μ M salubrinal (SLB) or 100 mM 4-phenylbutyrate (4-PBA) and exposed 6 h to hypoxia (1.5% of O_2) (B). A549 cells were transfected with *CHOP* siRNA or scrambled (scr) siRNA. 24 h after transfection, A549 cells were placed for 24 h in hypoxia (0.5% of O_2). *CHOP* silencing was validated by evaluation of *CHOP* expression by RT-qPCR (C) and western blotting (D). Expression of the targeted *CHOP* pro-apoptotic marker *CHAC-1* was evaluated by RT-qPCR in transfected A549 (E). A549 cells were transfected with an empty GFP vector (+GFP) or a plasmid coding for *CHOP*-GFP protein fusion (+CHOP). Transfection efficiency was evaluated by western blotting (F). Activity of effector caspase 3 (G) and *BIM* mRNA expression (H) were evaluated after 24 h exposure to hypoxia (0.5% of O_2). $n =$ at least 5 independent experiments. Data were submitted to a Kruskal–Wallis one-way analysis of variance followed by a Dunn’s multiple comparison

tests, except for caspase 3 activity and *BIM* mRNA expression data submitted to a Mann-Whitney analysis. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$: significantly different from normoxic control value (A,B), from value in normoxic cells transfected with scrambled si-RNA (C-E) or from GFP-transfected cells value (G,H). * $P < 0.05$ significantly different from value in untreated hypoxic cells (B) or from value in hypoxic cells transfected with scrambled siRNA (C-E).

CHOP contributes to hypoxia-induced apoptosis of alveolar epithelial cells. As shown in Fig. 6A, *Chop* mRNA transcripts markedly increased under hypoxic condition with a peak corresponding to a 9-fold increase at 6 h of exposure, as compared with normoxic condition ($P < 0.001$). Interestingly, treatment of hypoxic AECs with SLB and 4-PBA prevented *Chop* mRNA upregulation (Fig. 6B) ($P < 0.05$). The silencing of *CHOP* was then achieved in A549. After verifying the efficiency of *CHOP* silencing on the mRNA and protein expression under hypoxic condition (Fig. 6C,D), we tested its impact on hypoxia-induced markers of apoptosis. *CHOP* silencing markedly blunted the hypoxia-induced increase in mRNA transcript levels of *CHAC1*, a *CHOP*-regulated pro-apoptotic gene (Fig. 6E). In a complementary experiment, *CHOP* was overexpressed in A549 cells by transfection of a *CHOP*-GFP protein expressing plasmid (Fig. 6F). Control has been made with the backbone GFP vector. Caspase 3 activity significantly increased in normoxic cells overexpressing *CHOP* as compared with the value observed in cells transfected with the GFP empty vector used as control ($P < 0.05$) (Fig. 6G). The same effect was observed for *BIM* mRNA ($P < 0.05$) (Fig. 6H).

HIF-1 α upregulates UPR pathways and CHOP in alveolar epithelial cells. We then documented the implication of HIF-1 α in the induction of apoptosis and UPR pathways regulation. First, we verified the efficiency of HIF-1 α pharmacological inhibitor YC-1 on the transcriptional activity of HIF-1 α (Supplemental data 3A). Second, we confirmed the capacity of A549 cells transfected with a plasmid coding for HIF-1 α to transactivate a minimal promoter containing HRE specific consensus upstream the luciferase gene (Supplemental data 3B). In Fig. 7A, we show that the increase in caspase 3 activity observed in hypoxic condition was completely abolished by YC-1. Interestingly, a significant increase in caspase 3 activity was observed in A549 cells overexpressing HIF-1 α , as compared to control condition, i.e. cells transfected with an pcDNA 3.1 empty vector ($P < 0.05$) (Fig. 7B). No significant change was observed with HIF-1 $\alpha\Delta$, a HIF-1 α mutant unable to transactivate²⁷.

In primary rat cells exposed to hypoxia, YC-1 treatment completely abolished the increase of the luciferase activity obtained after fixation of either ATF4 or ATF6 α /XBP1s on their minimal promoter containing AARE or ERSE specific consensus respectively (Fig. 7C,E). Moreover, the co-transfection of A549 cells with a plasmid encoding HIF-1 α in combination with the ATF4 responsive element or the ATF6 α /XBP1s responsive element upstream the luciferase gene resulted in a more than 2-fold increase in the luciferase activity compared to control condition ($P < 0.05$) (Fig. 7D,F). No significant change was observed with the inactive mutant HIF-1 $\alpha\Delta$.

Incubation of primary rat AECs with YC-1 significantly blunted hypoxia-induced upregulation of *Chop* mRNA expression ($P < 0.05$) (Fig. 7G). Conversely, transfection of normoxic A549 with HIF-1 α induced an 8-fold increase in *Chop* mRNA expression as compared with control (Fig. 7H). No significant change was observed with the inactive mutant HIF-1 $\alpha\Delta$. After we verified the efficiency of *HIF-1 α* silencing in A549 cells exposed to hypoxia for 24 h (Supplemental data 4), we demonstrated that *HIF-1 α* siRNA significantly reduced *CHOP* mRNA levels ($P < 0.05$) (Fig. 7I), as well as *CHOP* protein levels ($P < 0.05$) (Fig. 7J) in response to hypoxia.

Discussion

Expression of ER stress markers has been evidenced in hyperplastic AECs from pulmonary biopsies of sporadic IPF patients⁷, but the trigger(s) for epithelial ER stress in this context is (are) not clearly identified. Considering the fact that HIF-1 α protein is specifically expressed in AECs from IPF lungs or bleomycin-treated mouse lungs^{19,23}, we hypothesized that localized alveolar hypoxia and/or HIF-1 α may play a role in this process. The aim of the present study was therefore to investigate the potential involvement of hypoxia and/or HIF-1 α in the modulation of ER stress and the subsequent pro-fibrotic features of AECs in the context of pulmonary fibrosis^{5,9}. Our results provide evidence that a hypoxic microenvironment and the stabilization of HIF-1 α induce ER stress in AECs, the expression of *CHOP*, a pro-apoptotic factor currently used as a marker of ER stress in IPF⁷, and subsequent apoptosis.

In the present study, analysis of lung serial sections of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice as well as UIP areas in lung biopsies undertaken for IPF diagnosis evidenced the co-expression of HIF-1 α and *CHOP* in hyperplastic AECs covering the remodeled parenchymal air spaces. HIF-1 α and *CHOP* were not detected in the preserved lung at distance from pathological areas, as in normal control lungs. This observation is in agreement with two previous studies showing that the expression of HIF-1 α is mainly restricted to AECs located within fibrotic areas in IPF lungs^{19,23}. Because HIF-1 α protein is typically stabilized in case of oxygen deprivation, the expression of HIF-1 α observed in IPF lung could likely be due to localized alveolar hypoxia in remodeled parenchymal airspaces with compromised ventilation. In line with this hypothesis, *Burman et al.* recently proposed that localized hypoxia worsens pulmonary fibrosis and could contribute to *CHOP* overexpression in IPF lungs²⁴. However, the link between HIF-1 expression and the expression of ER stress markers and *CHOP* remained unclear²⁴. Alveolar hypoxia may also certainly be encountered during acute exacerbations of IPF. To the best of our knowledge, the presence of localized alveolar hypoxia has never been directly proven in human IPF, probably due to technical limitations. By contrast, experimentally, *Weng et al.* as *Burman et al.* demonstrated the presence of localized hypoxia (together with epithelial HIF-1 α expression) in fibrotic lung tissues from mice treated with bleomycin using the hypoxyprobe staining technique^{19,23,24}. However, it cannot be excluded that

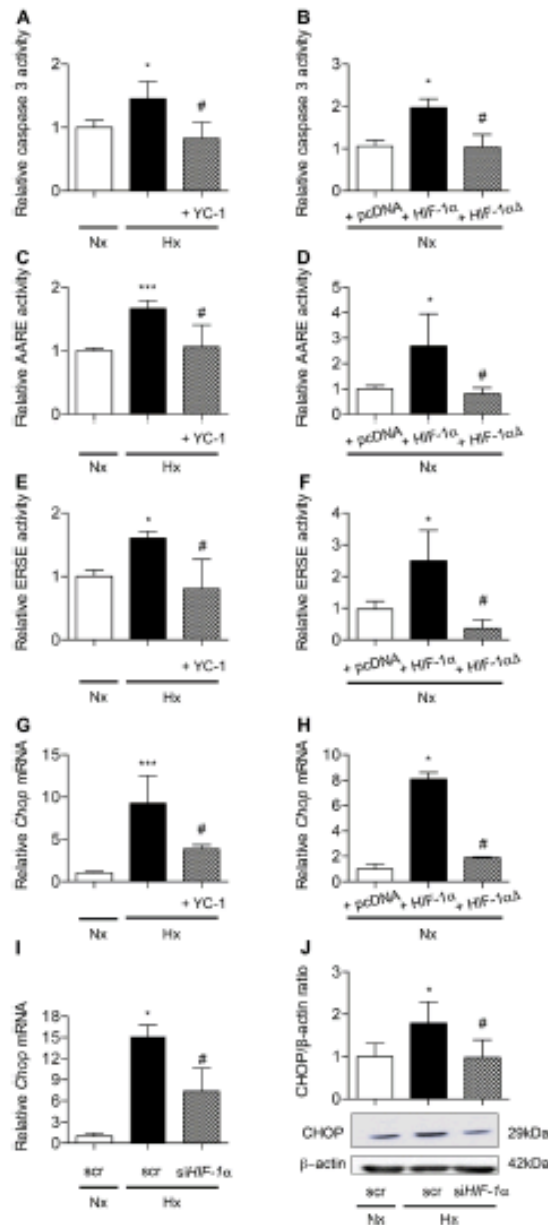


Figure 7. HIF-1 α is involved in ER-stress induced CHOP-dependent apoptosis in alveolar epithelial cells. Caspase 3 activity was evaluated in primary rat AECs treated or not with the HIF-1 α inhibitor YC-1 (10 μ M) and exposed to normoxia (Nx) (21% of O₂) or hypoxia (Hx) (1.5% of O₂) for 24 h (A). A549 cells were transfected with either an empty pcDNA3.1 vector or a plasmid encoding HIF-1 α or a mutated HIF-1 α (HIF-1 α Δ) unable to transactivate. Caspase 3 activity was measured 48 h after transfection (B). ATF4 (C) or ATF6 α /XBP1s (E) relative transcriptional activities were evaluated in primary rat AECs treated or not with YC-1 and exposed to normoxia or hypoxia for 6 h. In A549 cells co-transfected with either an empty pcDNA3.1 vector or a plasmid encoding HIF-1 α or a mutated HIF-1 α Δ , ATF4 (D) or ATF6 α /XBP1s (F) relative transcriptional activities were measured 48 h after transfection. CHOP mRNA expression was evaluated by RT-qPCR in primary rat AECs treated or not with YC-1 and exposed to normoxia or hypoxia for 6 h (G). CHOP mRNA expression was evaluated by RT-qPCR in A549 cells transfected with either an empty pcDNA3.1 vector or a plasmid encoding HIF-1 α or mutated HIF-1 α Δ 48 h post-transfection (H). A549 cells were transfected with

HIF-1 α siRNA or scrambled (scr) siRNA, and exposed to hypoxia (0.5% of O₂) for 24 h. CHOP expression was evaluated by RT-qPCR (I) and western blotting (J). n = at least 5 experiments. Data were submitted to a Kruskal-Wallis one-way analysis of variance followed by a Dunn's multiple comparison tests. *P < 0.05, **P < 0.001: significantly different from normoxic control value (A,C,E,G), from value in normoxic scrambled-transfected cells (I-J) or from value in normoxic pcDNA3.1-transfected cells (B,D,F,H). *P < 0.05, significantly different from value in untreated hypoxic cells (A,C,E,G), in hypoxic cells transfected with scrambled siRNA (I-J), or in hypoxic cells transfected with pcDNA3.1 (B,D,F,H).

HIF-1 α expression in IPF lungs might be due in some cases to non-hypoxic triggers, as previously described in other pathological conditions²⁵.

Whatever the cause of HIF-1 α stabilization in IPF lung, our immunostaining data suggest a link between HIF-1 α expression and ER stress, inasmuch as HIF-1 α -positive AECs appear to co-express the ER-stress marker CHOP. Supporting this hypothesis, we also observed in AECs from rats exposed to hypoxia the expression of both transcription factors, HIF-1 α and CHOP, as well as the induction of apoptosis as assessed by TUNEL and caspase 3 activation assays, and the expression of the pro-apoptotic marker *Bim*. *In vitro* experiments confirmed the *in vivo* results. First, exposure of primary rat AECs to hypoxia led to a time-dependent induction of HIF-1 α and CHOP expression, and both transcription factors were localized in the nucleus. Also, hypoxia induced caspase 3 activation and an increase in mRNA transcripts levels encoding *Bim*, as described *in vivo*. Next, our data strongly suggest that hypoxia-induced apoptosis was, at least in part, related to the induction of the UPR pathways. The three branches of the UPR pathways, ATF4, ATF6 α and XBP-1s, were clearly activated in primary rat AECs as a result of exposure to hypoxia. Indeed, treatment of AECs with 4-phenylbutyrate (4-PBA), a FDA-approved drug for the treatment of urea cycle disorder used as a chemical chaperone improving protein misfolding²¹, markedly prevented the hypoxia-induced increase in caspase 3 activity and *Bim* expression. Interestingly, other studies have also used this drug to attenuate the ER stress observed after injury resulting from a hypoxic environment in various situations, ie against hypoxia-induced pulmonary hypertension, hypoxia-induced cardiovascular damage²⁶ and more interestingly, EMT during bleomycin-induced fibrosis²⁷. Salubrinal (SLB), considered as a selective modulator of the ATF4 pathway during ER stress-mediated apoptosis²⁸, had the same effect as 4-PBA, highlighting the involvement of the UPR/ATF4 pathway in the induction of apoptosis in hypoxic AECs.

Our data also provide evidence that the transcription factor CHOP plays a critical role in hypoxia-induced apoptosis of AECs. CHOP, a target of ATF4 and ATF6 UPR pathways, is considered as one of the most important mediators of ER stress-induced apoptosis²⁹. One well-accepted mechanism proposed for the pro-apoptotic role of CHOP is that it can interact with transcriptional repressors, inhibiting the transcription of the anti-apoptotic *Bcl2* gene¹², and co-activating the transcription of the pro-apoptotic factor *Bim*¹³. CHOP was also shown to induce the pro-apoptotic factor *Chac-1*, the overexpression of which strongly induces apoptosis¹⁴. Here, we observed that the upregulation of CHOP induced by hypoxia in AECs was markedly blunted by the use of ER stress inhibitors, 4-PBA and SLB. In AECs exposed to normoxia, overexpression of CHOP induced caspase 3 activity and *BIM* expression. In AECs exposed to hypoxia, *CHOP* gene silencing clearly decreased *CHAC1* mRNA levels. Although these findings strongly suggest a major role of CHOP in hypoxia-induced apoptosis, we cannot exclude the involvement of additional pro-apoptotic pathways as JNK/AP-1 which transcriptional activity is known to participate in ER stress induced-cell apoptosis³⁰.

Finally, we investigated the specific role of HIF-1 α in hypoxia-induced ER stress and CHOP-mediated apoptosis in AECs, and whether HIF-1 α would be able *per se* to induce ER stress and CHOP-mediated apoptosis, independently of a hypoxic context. Hypoxia-induced apoptosis has been previously addressed in AECs and a role for the HIF pathway has been evoked^{31,32}. Specifically, we and other groups demonstrated *in vitro* the activation of the Bcl-2 family member *Bnip3*, a pro-apoptotic target of HIF-1 α , in hypoxic AECs^{32,33}. Our data confirm the major role of HIF signaling pathway in hypoxia-induced apoptosis, as over-expression of HIF-1 α was able to induce caspase 3 activity and *Bim* in normoxic AECs, whereas its pharmacological inhibition by YC-1 abolished the increase in caspase 3 activity in hypoxic AECs. We also provide evidence that HIF-1 α , in addition to its effect on *Bnip3*, can also induce apoptosis in AECs through the induction of UPR pathways and the up-regulation of CHOP. Our results show that overexpression of HIF-1 α increased ATF4 and ATF6 α /XBP1s transcriptional activities in normoxic AECs, as well as the expression levels of *Chop* mRNA transcripts. Also, pharmacological inhibition of HIF-1 α in hypoxic AECs completely abolished the hypoxia-induced increase in ATF4 and ATF6 α /XBP1s transcriptional activities. Finally, pharmacological inhibition of HIF-1 α or HIF-1 α gene silencing both markedly reduced the hypoxia-induced increase in *Chop* mRNA levels. It is well-known that CHOP is transcriptionally activated by the three pathways of the UPR signaling¹¹. Therefore, the upregulation of CHOP induced by HIF-1 α in AECs may likely be indirect, i.e. due to the upregulation of ATF4 and ATF6 α /XBP1s transcriptional activities. In a recently published study conducted on HIF1/2^{-/-} bleomycin-treated mice exposed to hypoxia, no modification of CHOP expression was observed, and the authors proposed that the regulation of CHOP expression is independent of HIF³⁴. However, as the effects of HIF deletion and/or hypoxic exposure on either ATF4 or ATF6/XBP1s expression were not documented in this latter study the question on the critical role of HIF-1 on CHOP regulation remained open. It is noteworthy that CHOP could also be a direct target of HIF-1 α , inasmuch as analysis of the CHOP promoter revealed the presence of at least 3 specific Hypoxic Response Elements sequences (-89/-93 pb, -330/-334 pb and -336/-340 pb upstream the transcription start site sequence)³⁴. It is interesting to note that the stimulatory effects of HIF-1 α on UPR pathways and CHOP expression we observed in AECs are relatively cell-specific and not necessarily reproduced in other cell types. For instance, in β -pancreatic cells, the pro-apoptotic effect of hypoxia and the hypoxic activation of the UPR signaling pathways appeared to be independent of HIF-1 α ³⁵. By contrast, in hepatocytes or in embryonic fibroblasts, inhibition of HIF-1 α was

	IPF patient 1	IPF patient 2	IPF patient 3	Control patient
Age	68	57	59	70
Gender	Female	Male	Male	Male
Smoking status* (Pack Year)	10	10	30	32
Pulmonary Function Tests	FVC 58%	FVC 73%	FVC 68%	FEV1 96%
	DLCO 40%	DLCO 72%	DLCO 48%	
Histology	Usual interstitial pneumonia	Usual interstitial pneumonia	Usual interstitial pneumonia	Lung parenchyma remote from lung adenocarcinoma

Table 1. Patient clinical data. All patients were ever-smokers. Abbreviations: FVC, Forced Vital Capacity; DLCO, Diffusion capacity of the Lung for Carbon monoxide; FEV1, Forced Expiratory Volume in one second.

shown to exacerbate lipopoptosis and to dramatically induce CHOP expression, as a consequence of the loss of HIF-1 α repressive activity on the CHOP promoter³⁶. These discrepancies demonstrating sometimes an activator or an inhibitor role for HIF-1 α on CHOP regulation highlight the cell type specificity of this relationship.

In conclusion, the present study demonstrates that hypoxia and HIF-1 α *per se* induce UPR pathways and CHOP-mediated apoptosis in AECs. Our results suggest that the localized alveolar hypoxia or at least the stabilization of HIF-1 α in AECs could trigger ER stress and related cell damages, thus contributing to the development of lung fibrosis. Strategies targeting the HIF/UPR/CHOP pathway could potentially represent a new therapeutic issue to limit the development of pulmonary fibrosis.

Materials and Methods

Statement. All experiments and methods were performed in accordance with relevant guidelines and regulations. Methods for collecting and handling human samples were approved by the local ethical committee (CLEA-2017-040). The requirement for signed informed consent was waived according to the French legislation. Model of rat exposed to acute hypoxia and AECs isolation experiments were approved by the ethical committee (C2EA-06, C9300801, APAFIS #7846 and C9300801, APAFIS #8150 respectively) and done in accordance with the European Communities Council for animal.

Human lung tissue samples. Formalin-fixed and paraffin embedded tissue samples were obtained from pulmonary biopsies of 3 IPF patients and normal lung areas in non IPF patients considered as controls (details in Table 1).

Animal models. *Bleomycin-induced lung fibrosis in mice.* A single intra-tracheal injection of bleomycin (3, 5 U/g body weight in 100 μ l saline) was performed on 8-weeks-old male C57BL/6J as previously described³⁷. Experiments were approved by our ethical committee (C2EA-06, C9300801 APAFIS #1258).

Model of rat exposed to acute hypoxia. 4-week old male Sprague-Dawley rats ($n = 6-8$ per group) were exposed for 16, 24, 48 or 72 h to hypobaric hypoxia in a Plexiglas chamber maintained at a pressure of 328 mmHg (simulating a 8% FIO₂).

Rat alveolar epithelial cell isolation and culture. AECs were isolated from 4-week old male Sprague-Dawley rats according to a procedure previously described³⁸. Isolated cells consisted of 92% of ATI cells, and cell viability was 95%³⁸. Cells were cultured in DMEM containing 25 mM D-glucose, 10 mM HEPES, 23.8 mM NaHCO₃, 2 mM L-glutamine, 10% foetal bovine serum (FBS), 50 U/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, 10 μ g/ml gentamycin, 10 μ g/ml amphotericin B (Thermo Scientific) and placed at 37 °C with 5% CO₂ in a humidified incubator. The human alveolar epithelial A549 cell line (ATCC) was used for gene silencing experiments.

Hypoxic exposure and drug treatments of alveolar epithelial cells. Three days after isolation, primary rat AECs were exposed to 1.5% O₂ (equivalent to a 45 mmHg oxygen tension in cell medium). 100 μ M salubrinal (Santa Cruz) or 100 mM 4-phenylbutyrate (4-PBA) (Sigma) were used to inhibit UPR pathways. 10 μ M of YC1 (Sigma) was used to inhibit HIF-1 α expression. A549 cells were exposed to 0.5% O₂ to obtain the same pattern as primary cells regarding UPR and apoptotic response to hypoxia^{36,40}.

Transient transfection of alveolar epithelial cells and luciferase assays. For each transcription factor, a plasmid coding for a firefly luciferase gene downstream tandem repetition of its specific responsive elements on the promoter region has been co-transfected with a pRL-SV40 plasmid (Promega). pRL-SV40 plasmid expressed renilla reniformis luciferase (RL) downstream the SV40 promoter and was used to normalize the luciferase response to the efficiency of the transfection. Primary rat AECs were transfected with plasmids containing the hypoxia response element (HRE) for the specific binding of HIF, the amino acid response element (AARE) for ATF4 or the endoplasmic reticulum stress response element (ERSE) for the binding of both ATF6 α and XBP1s, all cloned upstream the luciferase reporter gene. The plasmid encoding HIF-1 α (#181949, Addgene) was used to decipher the role of HIF-1 α in UPR pathways and CHOP induction. The plasmid encoding CHOP-GFP (#21898, Addgene) was used to decipher the role of CHOP in the induction of apoptosis. The empty plasmids pcDNA 3.1 (Invitrogen) or GFP (#632370, Clontech) were used as control.

Antibodies (anti-)	Immunogen	Dilutions	Manufacturer's reference
ATF4 (polyclonal rabbit)	C-ter human ATF4, cross-react with human, mouse, rat	1/1000*	sc-200 (Santa Cruz Biotechnology)
ATF6a (polyclonal rabbit)	Fused protein including residues 31–310 of human ATF6, cross-react with human, mouse, rat	1/1000*	sc-22799 (Santa Cruz Biotechnology)
XBP1 (polyclonal rabbit)	N-ter human XBP1, cross-react with human, mouse, rat	1/1000*	A37152 (Sigma Aldrich)
CHOP (mouse monoclonal)	Full length mouse CHOP, cross-react with human, mouse, rat	1/1000*	NB600-1335 (Novus)
HIF-1 α (rabbit polyclonal)	Fused protein including residues 530–825 of mouse HIF-1 α , cross-react with human, mouse, rat	1/1000*	NB 100-479 (Novus)
β -ACTIN (rabbit polyclonal)	Synthetic actin N-ter, cross-react with mouse, human, rat	1/5000*	A2103 (Sigma Aldrich)

Table 2. Antibodies used for western blot experiment.

Gene	Forward Primer	Reverse primer
Rat		
<i>Chop</i>	TGTTGAAGATGAGCGGGTGG	TGGACCGGTTTCTGCTTCA
<i>hif</i>	TTACACGAGGAGGGGCTTTG	CCAGACCAGACGGAAGATGA
β -Actin	ACCGTGAAAAGATGACCCAGA	CACAGCCTGGATGGCTACTG
Human		
<i>CHOP</i>	TTCTCTGGCTTGGCTGACTG	CTGGTATGTGGATTGAGG
<i>CHAC1</i>	CCTGAAGTACCTGAATGTGCGAGA	GCAGCAAGTATCAAGGTTGTGGC
β -ACTIN	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC	AAAGCCATGCCAATCTGATC

Table 3. Primers used for Real-Time Polymerase Chain Reaction.

Antibodies (anti-)	Immunogen	Dilutions	Manufacturer's reference
Human			
HIF-1 α (rabbit polyclonal)	Fused protein including residues 530–825 of mouse HIF-1 α , cross-react with human, mouse, rat	1/250*	NB100-479 (Novus)
HIF-2 α (rabbit polyclonal)	C-Term of mouse/human HIF-2 α protein	1/250*	NB 100-132 (Novus)
CHOP (mouse monoclonal)	Full length mouse CHOP, cross-react with human, mouse, rat	1/100*	NB600-1335 (Novus)
Rat			
HIF-1 α (rabbit polyclonal)	Fused protein including residues 530–825 of mouse HIF-1 α	1/400*	NB100-479 (Novus)
CHOP (rabbit polyclonal)	Full length mouse CHOP	1/250*	sc-575 (Santa Cruz Biotechnology)

Table 4. Antibodies used for immunohistochemistry and immunofluorescence experiments.

AECs were transiently transfected with the NEON™ transfection system (Life Technologies) allowing a 25–30% transfection efficiency as previously described⁴¹. The efficiency of transfection was controlled by western blot evaluating the expression of the transfected genes.

Gene silencing in A549 cell line. As transfection efficiency in primary rat AECs is low (less than 30% of cells expressing the transgene), we used A549 for gene silencing experiments. A549 cells were transfected with *CHOP* siRNA sequences 5' AAGAACAGCAGAGGU/CACAA-ttt3', 5'GCCUGGUAUGAGGACCUGC-ttt3' or with *HIF-1 α* siRNA sequence 5' CUGAUGACCAGCAACUUGA-ttt3' using Lipofectamine® 2000 according to the manufacturer's instructions (ThermoFisher). Transfection efficiency reached 80%.

Western blot analyses. Total proteins from rat primary AECs and A549 cells exposed to normoxia or hypoxia were extracted as previously described³⁸ and probed with the appropriate antibodies (Table 2). Protein ratios or expression levels were normalized to the corresponding expression level of anti- β actin, used as a loading control.

RNA extraction and reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Total RNA was extracted from rat AECs and A549 cells exposed to normoxia or hypoxia. Primers were designed to have a 25–30 cycle threshold values (Table 3).

Apoptotic pathways activation assay. Caspase-Glo 3/7® assay (Promega) was used in lung homogenates, rat primary AECs exposed to hypoxia and in A549 cells transfected with plasmid coding for GFP or CHOP-GFP protein (#21898 Addgene) to evaluate apoptosis. Briefly, 50 μ l of reagent containing a proluminescent

caspace substrate was added to 5 µg of cell lysates. The cleavage of the substrate by the caspase 3 present within the samples liberates free aminoluciferin, which is consumed by the luciferase, generating a "glow-type" luminescent signal that is proportional to caspase 3 activity.

Lung immunohistochemistry and cell immunofluorescence. Sections of paraffin-embedded bleomycin-treated mice and rat lung samples as lung biopsies from IPF and controls were incubated overnight at 4 °C with anti-CHOP, anti-HIF-1 α , or anti-HIF-2 α antibodies or with corresponding isotypes (Table 4). AECs cultured 6 h in hypoxic condition (1.5% O₂) were immunostained for HIF-1 α and CHOP. After fixation with 4% paraformaldehyde and cell membrane permeabilization with Triton X100, cells were incubated overnight with anti-CHOP and anti-HIF-1 α antibodies (see Table 4). Next day, after three washes, AECs were incubated with Alexafluor™ secondary antibodies solution. Nucleus was labelled with DAPI.

Statistical analyses. Results were presented as means \pm SD. To evaluate differences between groups, all raw data were submitted to a Mann-Whitney and Kruskal-Wallis One-way analysis of variance followed by a Dunn's multiple comparison tests in PRISM software (version 6, GraphPad). Graphics were performed by PRISM software. A *P* value < 0.05 was considered significant.

References

- Raghu, G. *et al.* An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: Idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **183**, 788–824 (2011).
- Selman, M. *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann. Intern. Med.* **134**, 136–151 (2001).
- King, T. E., Pardo, A. & Selman, M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* **378**, 1949–1961 (2011).
- Willis, B. C. *et al.* Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* **166**, 1321–1332 (2005).
- Selman, M. Role of Epithelial Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: From Innocent Targets to Serial Killers. *Proceedings of the American Thoracic Society* **3**, 364–372 (2006).
- Nojima, I. M. *et al.* A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. *N. Engl. J. Med.* **344**, 573–579 (2001).
- Korfeil, M. *et al.* Epithelial Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Sporadic Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **178**, 838–846 (2008).
- Saegeli, E., Logue, S. E., Gorman, A. M. & Samali, A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports* **7**, 880–885 (2006).
- Tanjore, H., Blackwell, T. S. & Lawson, W. E. Emerging evidence for endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **302**, L721–729 (2012).
- Zhang, L. *et al.* Endoplasmic reticulum stress, a new wrestler, in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Transl Res* **9**, 722–735 (2017).
- Ma, Y., Brewer, J. W., Diehl, J. A. & Hendershot, L. M. Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J. Mol. Biol.* **318**, 1351–1365 (2002).
- McCullough, K. D., Martindale, J. L., Klott, L. O., Aw, T. Y. & Holbrook, N. J. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol. Cell Biol.* **21**, 1249–1259 (2001).
- Puthalakath, H. *et al.* ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* **129**, 1337–1349 (2007).
- Mungrue, I. N., Pagnon, J., Kohannim, O., Gargalovic, P. S. & Lustig, A. J. CHAC1/MGC4504 is a novel proapoptotic component of the unfolded protein response, downstream of the ATF4-ATF3-CHOP cascade. *J. Immunol.* **182**, 466–476 (2009).
- Mulugeta, S., Nguyen, V., Russo, S. J., Muntswamy, M. & Beers, M. F. A surfactant protein C precursor protein BR1CHOS domain mutation causes endoplasmic reticulum stress, proteasome dysfunction, and caspase 3 activation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **32**, 521–530 (2005).
- Lawson, W. E. *et al.* Endoplasmic reticulum stress in alveolar epithelial cells is prominent in IPF: association with altered surfactant protein processing and herpesvirus infection. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **294**, L1119–L1126 (2008).
- López-Hernández, B., Ceña, V. & Posadas, I. The endoplasmic reticulum stress and the HIF-1 signaling pathways are involved in the neuronal damage caused by chemical hypoxia. *Br. J. Pharmacol.* **172**, 2838–2851 (2015).
- Yang, D. *et al.* Hypoxia triggers endothelial endoplasmic reticulum stress and apoptosis via induction of VLDL receptor. *FEBS Lett.* **588**, 4448–4456 (2014).
- Tsouvelakis, A. *et al.* Comparative expression profiling in pulmonary fibrosis suggests a role of hypoxia-inducible factor-1 α in disease pathogenesis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **176**, 1108–1119 (2007).
- Boyce, M. *et al.* A selective inhibitor of eIF2 α dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* **307**, 935–939 (2005).
- Choi, S.-E. *et al.* A chemical chaperone 4-PBA ameliorates palmitate-induced inhibition of glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). *Arch. Biochem. Biophys.* **475**, 109–114 (2008).
- Koshiji, M. *et al.* HIF-1 α induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO J.* **23**, 1949–1956 (2004).
- Weng, Y. *et al.* Hypoxia-induced deoxycytidine kinase contributes to epithelial proliferation in pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **190**, 1402–1412 (2014).
- Burman, A. *et al.* Localized hypoxia links ER stress to lung fibrosis through induction of C/EBP homologous protein. *KCI Insight* **3** (2018).
- Ruschel, A., Stron, P. & Tug, S. Functional regulation of HIF-1 α under normoxia—is there more than post-translational regulation? *Journal of Cellular Physiology* **227**, 514–524 (2012).
- Jain, K., Suryakumar, G., Ganju, I. & Singh, S. B. Amelioration of ER stress by 4-phenylbutyric acid reduces chronic hypoxia induced cardiac damage and improves hypoxic tolerance through upregulation of HIF-1 α . *Vasc. Pharmacol.* **83**, 36–46 (2016).
- Zhao, H. *et al.* Phenylbutyric acid inhibits epithelial-mesenchymal transition during bleomycin-induced lung fibrosis. *Toxicol. Lett.* **232**, 213–220 (2015).
- Liu, C.-L. *et al.* Salubrinal protects against tunicamycin and hypoxia-induced cardiomyocyte apoptosis via the PERK-eIF2 α signaling pathway. *J. Geriatr. Cardiol.* **9**, 258–268 (2012).
- Oyadomart, S. & Mori, M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* **11**, 381–389 (2004).
- Kim, R., Eml, M., Tanabe, K. & Murakami, S. Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis* **11**, 5–13 (2006).
- Krick, S. *et al.* Role of hypoxia-inducible factor-1 α in hypoxia-induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **32**, 395–403 (2005).
- Bernard, O. *et al.* Mesenchymal stem cells reduce hypoxia-induced apoptosis in alveolar epithelial cells by modulating HIF and ROS hypoxic signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **314**, L360–L371 (2018).

33. Althaus, J. *et al.* Expression of the gene encoding the pro-apoptotic BNIP3 protein and stimulation of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) protein following focal cerebral ischemia in rats. *Neurochem. Int.* **48**, 687–695 (2006).
34. Yoo, W. *et al.* HIF-1 α expression as a protective strategy of HepG2 cells against fatty acid-induced toxicity. *J. Cell. Biochem.* **115**, 1147–1158 (2014).
35. Bensellam, M. *et al.* Hypoxia reduces ER-to-Golgi protein trafficking and increases cell death by inhibiting the adaptive unfolded protein response in mouse beta cells. *Diabetologia* **59**, 1492–1502 (2016).
36. Carrière, A. *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species control the transcription factor CHOP-10/GADD153 and adipocyte differentiation: a mechanism for hypoxia-dependent effect. *J. Biol. Chem.* **279**, 40462–40469 (2004).
37. Gilie, T. *et al.* Intermittent Hypoxia Increases the Severity of Bleomycin-Induced Lung Injury in Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2018**, Article ID 1240192 (2018).
38. Uzunhan, Y. *et al.* Mesenchymal stem cells protect from hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **310**, L439–L451 (2016).
39. Uchida, T. *et al.* Prolonged Hypoxia Differentially Regulates Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 α and HIF-2 α Expression in Lung Epithelial Cells: Implication of natural antisense HIF-1 α . *Journal of Biological Chemistry* **279**, 14871–14878 (2004).
40. Yadav, S., Kalra, N., Ganju, L. & Singh, M. Activator protein-1 (AP-1): a bridge between life and death in lung epithelial (A549) cells under hypoxia. *Molecular and Cellular Biochemistry* **436**, 99–110 (2017).
41. Migneault, E. *et al.* Cycloheximide and lipopolysaccharide downregulate α ENaC mRNA via different mechanisms in alveolar epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **305**, L747–L755 (2013).

Acknowledgements

Supported by the Chancellerie des Universités de Paris - Fondation du Legs Poix, the « Bonus Qualité Recherche » Université Paris 13 and the « Fonds de Recherche en Santé Respiratoire ».

Author Contributions

E.B., E.D. and C.P. conception and design; E.B., E.D., A.S., A.N., R.L., O.B., G.T., D.M. and T.G. performed research; E.B., E.D., A.S., A.N., R.L., G.T., Y.U., J.F.B. and P.C. analysis and interpretation; A.B., P.F. contributed plasmids; J.F.B., M.K., E.M., D.V. and Y.U. contributed to tissue specimen collection and analysis; E.B., E.D., J.F.B. and C.P. wrote the paper.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36063-2>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

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



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

© The Author(s) 2018

2. Résumé des résultats

La technique d'immunohistochimie réalisée sur des biopsies de patients atteints de FPI a mis en évidence une co-localisation apparente dans les PII hyperplasiques du facteur de transcription induit par l'hypoxie, HIF-1, et du marqueur d'un stress du RE, CHOP. Ces résultats sont également observés dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite à la bléomycine. Dans le poumon de rats exposés à 24h d'hypoxie hypobare, l'expression de HIF-1 α et CHOP est spécifique des PII. Dans le modèle *in vivo* de rat soumis à 48h d'hypoxie, l'expression du gène anti-apoptotique *Bcl-2* est réprimée alors que celle du gène pro-apoptotiques *Bim* est activée. A 72h d'hypoxie, on observe l'apparition de lésions à l'ADN révélées par la technique du TUNEL.

Ces résultats *in vivo* ont été retrouvés *in vitro* dans des cultures primaires PII de rat exposés à une hypoxie de 1,5% d'O₂. Le microenvironnement hypoxique auquel ont été exposés les PII conduit à une stabilisation du facteur HIF-1 α et dès 4h d'exposition ainsi qu'à une augmentation de l'expression des facteurs ATF4, ATF6N et CHOP alors que la forme épissée de XBP-1 n'est exprimée qu'après 16h d'hypoxie. La localisation de HIF-1 α et CHOP est nucléaire. Les activités transactivatrices d'ATF4 et d'ATF6N sur leur élément de réponse respectif (AARE et ERSE) sont également augmentées à 6h d'hypoxie, traduisant l'activation des voies de l'UPR consécutives à l'induction d'un stress du RE. L'expression de la forme épissée de XBP1, témoignant de son activité après clivage par l'endonucléase de IRE1, n'est observée qu'après 16h d'hypoxie. Concernant la réponse apoptotique, on observe après 24h d'hypoxie la diminution d'expression de *Bcl-2*, l'augmentation d'expression de *Bim* et l'induction de l'activité catalytique de la caspase 3.

Le rôle crucial des deux facteurs de transcription HIF-1 α et CHOP dans l'apoptose des PII a été mis en évidence par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques, de stratégie siRNA et de surexpression. L'inhibition de HIF-1 α ou CHOP limite significativement l'effet de l'hypoxie sur l'apoptose des PII, alors que dans un contexte normoxique la surexpression de ces facteurs conduit à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de *Bim* ainsi que l'activation de la caspase 3. Par ailleurs, l'utilisation du 4-PBA, prévient l'induction de l'expression de CHOP et l'activation des voies apoptotiques en réponse à l'hypoxie.

HIF-1 α est également capable de réguler l'activation transcriptionnelle des voies de l'UPR impliquant ATF4 et ATF6N. Une inhibition de l'expression de HIF-1 α limite la capacité transactivatrice de ATF4 et ATF6N en réponse à l'hypoxie alors qu'une surexpression de HIF-1 α en condition normoxique conduit à l'activation de ces facteurs de transcription. Dans ces deux expérimentations, la modulation de l'expression de CHOP est également observée.

L'ensemble de ce travail montre que l'hypoxie induit l'activation des voies de l'UPR, l'expression de CHOP et l'apoptose des PII. HIF-1 semble être le régulateur majeur de cette réponse.

3. Discussion

a) Choix des modèles *in vivo* et *in vitro*

i. *In vivo*

Dans notre étude, le modèle *in vivo* d'hypoxie consiste à placer des rats dans un caisson hypobare dont la pression est fixée à 380 mmHg, mimant une altitude de 5475 m. Ce choix de pression paraît compatible avec la valeur de pression partielle en O₂ qui pourrait régner dans les alvéoles (P_AO₂) des patients atteints de FPI. En effet, chez ces patients, une PAO₂ d'environ 50 mmHg a principalement été rapportée (Agustí *et al.*, 1991). Des travaux menés sur des rats placés dans un caisson hypobare à différentes pressions atmosphériques ont corrélé la pression de 380 mmHg à une P_AO₂ proche de celle observée chez les patients (LaManna *et al.*, 1992). Par ailleurs, tout comme dans le poumon de patients, l'expression du facteur de transcription HIF-1 et son activité ont été décrites dans le poumon de rats exposés à une hypoxie chronique de 3 semaines mais également une hypoxie aiguë de 24 h (Shukla *et al.*, 2009; W. H. Li *et al.*, 2011; Dürmüller, 2013).

Il existe un autre modèle animal d'exposition à l'hypoxie, dans lequel le paramètre modulé n'est pas la pression atmosphérique mais la fraction inspirée en O₂ (F_IO₂). Les animaux sont ainsi incubés dans un caisson connecté en continu à un flux de gaz pauvre en O₂ et riche en azote. Une pression atmosphérique de 380 mmHg correspond à une F_IO₂ de 10%. Les modèles d'hypoxie hypobare et normobare présentent une réponse ventilatoire à l'hypoxie différente mais les paramètres respiratoires tels la saturation artérielle en O₂ ou encore les valeurs de pH sont correspondants dans les deux modèles (Savourey *et al.*, 2003; Saugy *et al.*, 2016). De plus, les modifications morphologiques diffèrent peu selon le modèle étudié (Sekhon and Thurlbeck, 1996; Sheedy *et al.*, 1996). Compte tenu des similitudes entre ces deux modèles et le laboratoire ayant à disposition un simulateur de haute altitude, l'hypoxie hypobare a donc été choisie pour mener à bien ces travaux.

ii. *In vitro*

Dans nos travaux, des cellules épithéliales alvéolaires de rat ont été isolées à partir de poumons de rat et exposées à une hypoxie normobare. Le protocole d'isolement (*Feng et al., 1993*) permet d'obtenir une population cellulaire enrichie à 95% de PII. Cette pureté a été mise en évidence par immunomarquage de la protéine pro-SPC dont l'expression est observée à 2 et 3 jours de culture mais également par le marquage de la phosphine 3R présente dans les corps lamellaires (*Uzunhan et al., 2016*). Une exposition des cellules à 1,5% d'O₂ correspond à une PO₂ proche de 45 mmHg, pression pouvant être observée dans les alvéoles des patients atteints de FPI a été sélectionnée. En effet, de nombreux travaux étudiant l'effet de l'hypoxie sur les cellules épithéliales alvéolaires utilisent cette même exposition. Cette tension en O₂ conserve l'intégrité des membranes cellulaires et n'est pas cytotoxique (*Signorelli et al., 2010*). En outre, la modulation des voies hypoxiques a été bien décrite, notamment l'expression du facteur HIF-1 α dès 2h d'hypoxie (*Krick et al., 2005; Zhou et al., 2009; Uzunhan et al., 2016; Bernard et al., 2018*).

Les PII ont été transfectés par électroporation afin d'étudier les capacités transactivatrices des facteurs HIF, ATF4 et ATF6N mais également pour évaluer l'activité du promoteur de *CHOP*. Dans nos expériences, l'électroporation est la technique permettant d'obtenir la meilleure efficacité de transfection, aux alentours de 30%.

Pour nos études sur l'effet de la surexpression de CHOP et HIF-1 α dans l'apoptose, la lignée cellulaire A549 a été utilisée. Ces cellules cancéreuses partagent des propriétés propres aux PII, telles la production de surfactant et la production de corps lamellaires (*Kondo et al., 2015; J. Wu et al., 2017*) et se substituent souvent à la culture des PII (*Krick et al., 2005; Zhou et al., 2009*). L'expression de HIF-1 α , la cinétique d'expression des voies de l'UPR et l'expression de CHOP en réponse à l'hypoxie ont été précédemment confirmées au laboratoire. Cependant, la PO₂ utilisée pour l'exposition des A549 est de 0.5% O₂, telle que décrite dans la littérature (*Uchida et al., 2004; Krick et al., 2005*).

b) La régulation des voies de l'UPR et de CHOP en hypoxie

i. Régulation de l'UPR par l'hypoxie

Dans notre modèle cellulaire, l'expression de XBP1 épissé n'est observée qu'à partir de 16h d'hypoxie. Aucune étude n'a été entreprise au laboratoire pour tenter d'expliquer ce retard d'activation. Classiquement, lors de l'induction d'un stress du RE induit par le DTT conduisant à un défaut de formation des ponts disulfures ou lors d'une dérégulation de l'homéostasie calcique

engendrée par l'utilisation de la thapsigargine, une activation simultanée des 3 facteurs de transcription de l'UPR est observée. Cette activation tardive de XBP1 en réponse à l'hypoxie, consécutive à celle d'ATF4 et ATF6N, a cependant été décrite dans différents types cellulaires exposés à la tunicamycine, antibiotique induisant une perturbation de la glycosylation des protéines une accumulation au sein du RE, et à l'activation des voies de l'UPR (*Yoshida et al., 2001; Tsuru et al., 2016*). Cet effet tardif de l'hypoxie sur XBP1 pourrait donc être la conséquence d'une modification des protéines glycosylées comme observée lors d'un traitement avec la tunicamycine.

En hypoxie, l'utilisation de l'inhibiteur de HIF-1, le YC-1, empêche l'induction de l'activité transactivatrice des facteurs de l'UPR ATF4 et ATF6N. De plus, la surexpression de HIF-1 α en condition normoxique induit l'activité transactivatrice d'ATF4 et d'ATF6N, ce qui n'est pas le cas du mutant dominant négatif de HIF-1 α incapable de transactiver. HIF-1 paraît donc impliqué dans l'induction de l'activité de transactivation de ces facteurs de l'UPR. Les promoteurs des gènes codant les facteurs ATF4 et ATF6 ne contenant pas d'éléments de réponse à l'hypoxie, il serait intéressant de vérifier si le rôle de HIF-1 sur l'expression des facteurs est lié à une régulation d'éléments pouvant conduire à un stress du RE. En effet, la modulation des voies de l'UPR par l'hypoxie a également été montrée dans la régulation du complexe associé au peptide naissant lors de la traduction. Le rôle supposé de ce complexe intervient dans le contrôle du transport du peptide néosynthétisé dans le RE (*Pech et al., 2010*). Une diminution de l'expression de cette entité induit un stress du RE et une apoptose de cellules neuronales (*Hotokezaka et al., 2009, 2015*). Par conséquent, une vérification d'un potentiel lien entre HIF-1 α et la régulation de ce complexe pouvant expliquer la modulation d'activité des facteurs de l'UPR pourrait être réalisée.

Par ailleurs, l'augmentation de l'activité transactivatrice des facteurs ATF4 et ATF6N en hypoxie pourrait s'expliquer par une interaction physique entre ces facteurs et HIF-1 qui jouerait le rôle de co-activateur (*Dames et al., 2002*). Des études *in silico* pourraient ainsi être envisagées afin d'étudier d'éventuelles interactions physiques directes entre HIF-1 α et les facteurs de transcription de l'UPR.

ii. Régulation de CHOP par l'UPR

Suite à l'induction d'un stress du RE, l'expression de CHOP est régulée par l'activité transactivatrice des facteurs de transcription ATF4 et ATF6 *via* la reconnaissance de leur élément de réponse respectif présent dans le promoteur de *CHOP*. Dans notre modèle cellulaire, CHOP, de même qu'ATF4 et ATF6N, apparaissent dès 4h d'hypoxie. Ce résultat est en accord avec des

données bibliographiques qui démontrent une expression de CHOP et de ces facteurs de l'UPR suite à l'induction d'un stress du RE dans les cellules endothéliales ou pancréatiques exposées à l'hypoxie selon des cinétiques similaires (Zheng et al., 2012; Yang et al., 2014a). Nos travaux *in vitro*, révèlent que le traitement des PII au 4-PBA, inhibe l'activité transactivatrice des facteurs ATF4 et ATF6N associée à une diminution d'expression de CHOP. L'utilisation du 4-PBA comme un inhibiteur du stress du RE a été décrite dans de nombreux modèles cellulaires, mais également *in vivo* (Rubenstein et al., 1997). Son mécanisme d'action conduit *in fine* à l'augmentation d'expression de la chaperonne GRP78 mais également de co-chaperonnes permettant ainsi une efficacité optimale dans le contrôle du repliement des protéines au sein du RE et une restriction des voies de l'UPR (Kim et al., 2013; Jiang et al., 2018).

Afin de mieux appréhender le rôle de chacun des acteurs sur l'expression de CHOP en hypoxie, des stratégies siRNA dirigées contre ATF4 ou ATF6 pourraient être utilisées en complément.

iii. Régulation de CHOP par HIF-1

Nos expériences *in vivo*, mettent en évidence l'expression de HIF-1 α et CHOP dans les cellules épithéliales alvéolaires de rats exposées à l'hypoxie hypobare. Nous confirmons ces résultats *in vitro* dans des PII exposés à une hypoxie à 1,5% d'O₂. De façon intrigante, l'expression des acteurs des voies de l'UPR et celle de CHOP sont concomitantes, il n'y a pas de délais d'expression entre CHOP et les facteurs de l'UPR. Ces données ont déjà été observées dans des cellules du pancréas et des vaisseaux (Zheng et al., 2012; Yang et al., 2014a) et suggèrent une régulation indépendante de l'UPR. Dans notre modèle, HIF-1 α est induit précocement par rapport aux acteurs de l'UPR. Ce facteur de transcription peut potentiellement réguler le promoteur de *CHOP* qui contient 3 éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) (Yoo et al., 2014). Nous avons donc étudié dans notre modèle cellulaire la modulation du promoteur de *CHOP* par le facteur HIF-1 α (Figure 44). L'activité du promoteur de *CHOP* est augmentée en hypoxie, et l'utilisation d'un inhibiteur de HIF-1, le YC-1, limite cette activité (Figure 39A). Par ailleurs, la surexpression de HIF-1 α dans des PII en condition normoxique conduit à l'activation du promoteur de *CHOP*. En revanche, le mutant dominant négatif de HIF-1 α ne pouvant se lier à l'ADN n'induit pas d'activation du promoteur de *CHOP* (Figure 39B). Ce résultat démontre que la capacité transactivatrice de HIF-1 est nécessaire à l'induction du promoteur de *CHOP*. Nous avons également étudié l'effet d'une délétion d'une séquence du promoteur de *CHOP* contenant 2 éléments HRE (séquence de -442 à -318 paires de bases avant le site d'initiation de la transcription). En hypoxie, l'activité de ce promoteur muté n'est pas induite. Ce résultat confirme

l'implication de HIF dans la régulation de l'activité du promoteur de *CHOP* via sa fixation à son consensus HRE situé sur le promoteur de *CHOP* (Figure 39C). Cependant, des analyses complémentaires telles des mutagenèses dirigées spécifiquement sur les HRE doivent être réalisées pour confirmer ce résultat. En effet, la délétion du promoteur (de -442 à -318) ne se retreint pas aux éléments de réponse à HIF mais contient sans doute d'autres séquences régulatrices. L'effet observé pourrait donc ne pas être spécifique d'une régulation directe par HIF sur un HRE. De manière intéressante, des travaux contradictoires démontrent que l'induction du promoteur de *CHOP* en réponse à l'hypoxie est indépendante d'une interaction directe entre HIF-1 et le promoteur de *CHOP* (Carrière et al., 2004). De plus, une étude récente réalisée sur des souris invalidées pour HIF-1 et HIF-2 spécifiquement dans les PII et exposées à la bléomycine ne montre aucun effet inhibiteur sur l'expression de CHOP (Burman et al., 2018). Il serait cependant intéressant de reproduire ces expérimentations avec un modèle de souris déficient seulement pour l'expression de HIF-1.

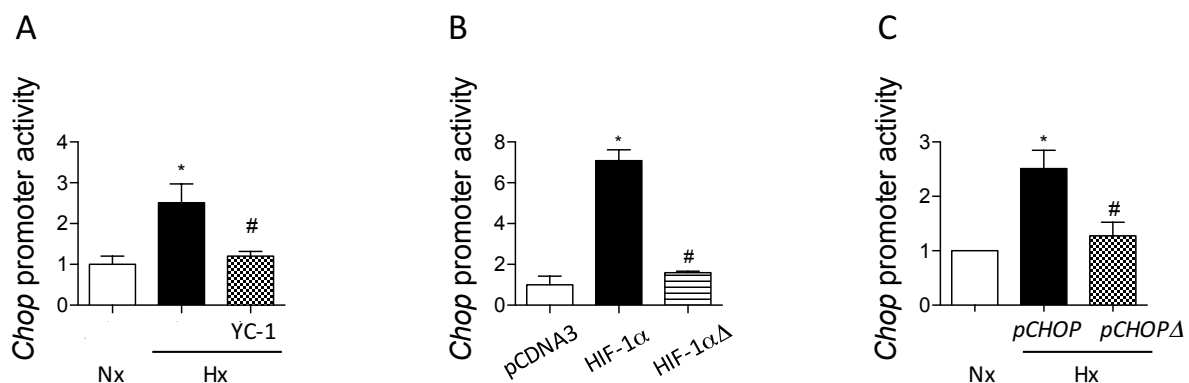


Figure 39. HIF-1 α est impliqué dans l'expression de CHOP dans les pneumocytes de type II exposés à l'hypoxie. Les PII sont transfectés avec un plasmide contenant le promoteur de *CHOP* en amont du gène rapporteur de la luciférase (p*CHOP*) incubés avec le YC1 (10 μ m) et exposés 6h à l'hypoxie (1,5% d'O₂) (Hx) (A). Les PII sont co-transfectés avec un plasmide contenant le promoteur de *CHOP* en amont du gène rapporteur de la luciférase et un plasmide permettant la surexpression de HIF-1 α ou un mutant (HIF-1 α Δ) incapable de transactiver (B). Les PII sont transfectés avec un plasmide codant le promoteur de *CHOP* (p*CHOP*) ou un promoteur délété (p*CHOP* Δ) des régions contenant 2 hypoxia response element (HRE) puis exposés à 6h d'hypoxie (1,5% d'O₂). L'activité des promoteurs de CHOP est évaluée grâce au gène rapporteur de la luciférase (C). Les activités de promoteur sont évaluées par le système Dual-Luciferase® (Promega) et rapportées à la condition normoxie (A, C) ou transfectée avec un plasmide vide pCDNA3 (B). N = 6 extractions de PII, les données sont soumises au test non paramétrique Kruskal-Wallis. *: $P < 0.05$ (différence significative par rapport à la condition contrôle) et #: $P < 0.05$ (différence significative par rapport à la condition hypoxie ou HIF-1 α).

Nos travaux ne permettent pas d'établir avec précision le mécanisme d'activation de *CHOP* en hypoxie. Il serait intéressant de vérifier 1) l'interaction directe des facteurs des voies de l'UPR mais également de HIF-1 sur le promoteur de *CHOP* par la technique de retard sur gel, 2) si HIF-1 et les facteurs de l'UPR peuvent co-activer l'expression de CHOP grâce à des expériences de mutations dirigées sur les différents éléments de réponse. En ce sens, une étude menée sur les

cellules mammaires cancéreuses a mis en évidence la formation d'un complexe HIF-1/XBP1 impliqué dans la régulation de gènes spécifiques de HIF-1 (Chen et al., 2014).

iv. Autres régulateurs de l'expression des voies de l'UPR et de CHOP

Il est important de noter que d'autres voies hypoxiques indépendantes de HIF-1 pourraient induire les voies de l'UPR et ne doivent pas être négligées. L'une de ces voies est la production de ROS (Carrière et al., 2004). L'exposition des PII à l'hypoxie induit la production de ROS (Bernard et al., 2018). Cependant, l'utilisation d'un antioxydant, la N-acétylcystéine, permettant la synthèse de glutathion, n'a pas permis de mettre en évidence un effet limitant sur la modulation de l'activité transactivatrice des facteurs ATF4 et ATF6N (Figure 40A-B), ni de l'activité du promoteur de *CHOP* (Figure 40C) en réponse à l'hypoxie. Il est donc nécessaire de réitérer cette expérience avec d'autres types d'antioxydants dont le mécanisme d'action serait plus rapide, tels le hydroxyanisole butylé, un composé lipophile prenant en charge l'H₂O₂.

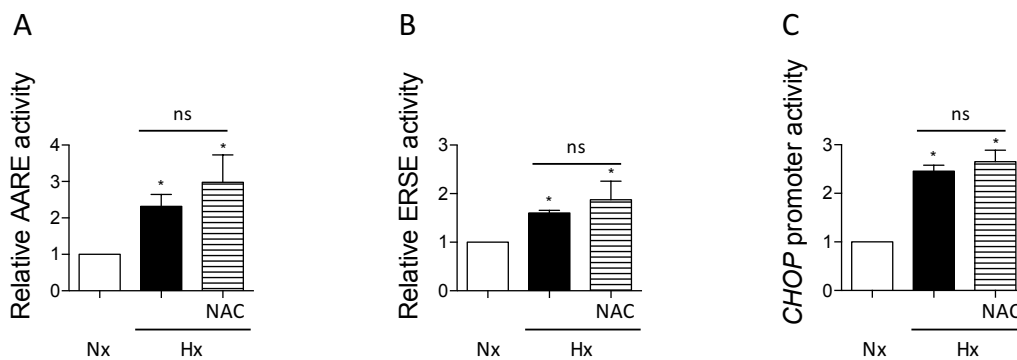


Figure 40. Le traitement à la N-acétylcystéine (NAC) ne module pas les voies de l'UPR en hypoxie. Les PII sont transfectés un plasmide codant pour un gène rapporteur de la luciférase permettant de suivre l'activité transactivatrice d'ATF4 (amino acid response element (AARE)) (A) ou d'ATF6N/XBP1 épissé (endoplasmic reticulum element response (ERSE)) (B) ou codant pour promoteur de *CHOP* (pCHOP) (C). Les cellules sont ensuite traitées à la NAC puis exposées 7h à l'hypoxie (1,5%) (Hx) (A). Les activités des éléments de réponse et du promoteur de *CHOP* sont évalués et rapportés à la condition normoxie. N = 3 extractions de PII, les données sont soumises au test non paramétrique Kruskal-Wallis. *: P<0.05

c) Effet des voies de l'UPR et de CHOP sur l'apoptose des pneumocytes de type

II

Nos résultats montrent que l'exposition de PII au 4-PBA limite l'induction des voies apoptotiques en réponse à l'hypoxie. La culture des cellules en hypoxie en présence de 4-PBA limite la diminution de l'expression du gène anti-apoptotique *Bcl-2* (Figure 41), l'induction de l'expression du gène pro-apoptotique *Bim* et l'activation de la caspase 3. Ces résultats sont également observés lors d'une inhibition d'expression de CHOP par siRNA.

L'utilisation d'un inhibiteur de la voie ATF4, le salubrinal, limite partiellement la régulation de ces différents marqueurs en hypoxie. En effet, cette molécule limite l'activité catalytique de la caspase 3, mais n'a aucun effet sur l'expression du gène *Bcl-2* (Figure 41) suggérant que la voie ATF4 n'est pas le seul mécanisme impliqué dans l'apoptose des PII en réponse à l'hypoxie.

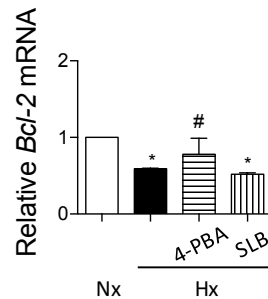


Figure 41. Le salubrinal prévient partiellement l'effet de l'hypoxie sur l'apoptose des pneumocytes de type II. Les PII sont traités au 4-PBA (100µM) ou au salubrinal (100 µM), exposés 24h à l'hypoxie (1,5%) (Hx) et l'expression du marqueur *Bcl-2* est évaluée par RT-qPCR. L'expression du gène est rapportée à la condition normoxique. N = 4 extractions de PII, les données sont soumises au test non paramétrique Kruskal-Wallis. *: $P < 0.05$ et ns : différence non significative.

L'intervention d'ATF6N ou d'autres voies telles que la voie IRE1/JNK pourrait être envisageable. De plus, nous avons démontré que l'exposition à l'hypoxie induit également le clivage et l'activation de la caspase 12, régulant une autre voie apoptotique dépendante d'un stress du RE (Figure 42). L'effet du 4-PBA, qui est un inhibiteur à spectre plus large, doit être testé sur la régulation de ces différents facteurs.

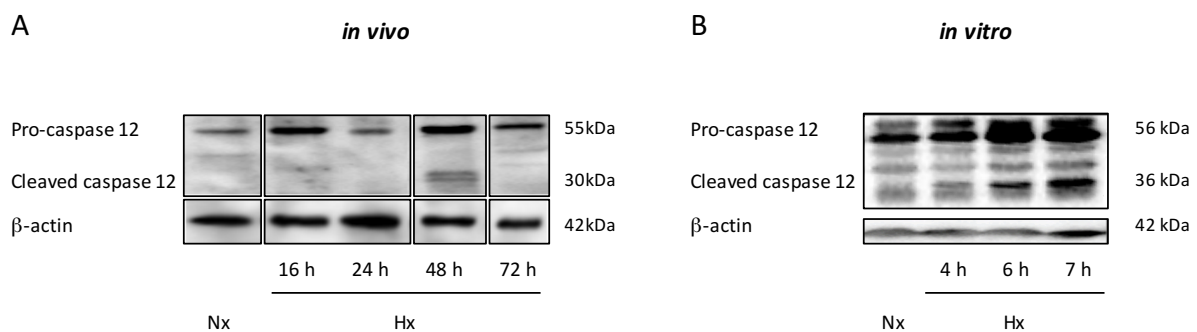


Figure 42. La caspase 12 est activée en hypoxie *in vivo* et *in vitro*. L'expression de la caspase 12 est évaluée par western blot à partir des extraits protéiques des poumons de rats (A) ou de pneumocytes de type II (B) exposés à une hypoxie.

d) Expression de HIF-1α et CHOP dans la fibrose pulmonaire

Notre étude histologique sur des coupes sériées de poumon de patients atteints de FPI montre pour la première fois la co-expression des facteurs HIF-1α et CHOP spécifiquement dans les pneumocytes de type II (PII) hyperplasiques. Cette étude suggère fortement un lien entre l'activation de voies hypoxiques et l'expression de HIF-1α d'une part (Tzouveleakis et al., 2007; Weng et al., 2014; Burman et al., 2018) et l'expression de CHOP d'autre part (Korfei et al., 2008a;

Yao et al., 2016). De façon intéressante, l'expression du facteur HIF-2 chez les patients atteints de FPI est absent des PII hyperplasiques. En revanche, ce facteur est observé dans les foyers fibroblastiques (*Bodempudi et al., 2014; Senavirathna et al., 2018*). Ces données renforcent l'hypothèse d'une expression spécifique de HIF-1 α et HIF-2 α en fonction des types cellulaires au sein d'un même tissu. Une telle hypothèse a par ailleurs été formulée dans les cellules rétinienne (*Mowat et al., 2010*).

Dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite à la bléomycine, nos résultats décrivent une expression de HIF-1 et CHOP dans des PII hyperplasiques, dans des zones de fibrose où la PO₂ est vraisemblablement décrite comme faible (*Weng et al., 2014; Burman et al., 2018*). Ces données sont confirmées par notre étude *in vivo*, qui met en évidence l'expression de HIF-1 α et CHOP dans les cellules épithéliales alvéolaires de rats exposés à une hypoxie hypobare.

Il s'agit désormais de comprendre le rôle de l'expression de ces deux facteurs et de définir s'ils peuvent participer ensemble à la régulation de voies communes. En effet, des interactions entre HIF-1 et des protéines C/EBP ont été décrites dans la régulation de cibles spécifiques (*L. Yang et al., 2008*). Des expériences de co-immunoprécipitation entre HIF-1 et CHOP ont été initiées au laboratoire afin de vérifier l'interaction entre les deux protéines. Par ailleurs, une étude visant à identifier d'éventuels gènes cibles mutuellement régulés par les deux facteurs pourrait être menée *in vitro*. Pour ce faire, des extraits d'ARN de cellules transfectées avec CHOP ou HIF-1 ou co-transfectées avec ces deux facteurs pourraient être étudiés par analyses transcriptomiques. Le profil d'expression génique entre les cellules transfectées avec un seul de deux facteurs ou co-transfectées avec CHOP et HIF-1 serait alors comparé afin de mettre en évidence l'induction de gènes notamment impliqués dans l'apoptose cellulaire.

De façon intéressante, *Burman et al.* ont exposés des souris à une hypoxie de 14% d'O₂ durant 21 jours. Les conditions expérimentales proposées, n'ont pas permis de mettre en évidence d'activation des voies de l'UPR ni de CHOP. Ceci peut s'expliquer par l'absence de réelle hypoxie alvéolaire. En effet, l'utilisation du pimonidazole, la sonde communément utilisée pour la détection d'une pression partielle en oxygène inférieure à 60 mmHg, ne montre pas de zones hypoxiques. Par ailleurs, les auteurs n'ont malheureusement pas réalisé de marquage du facteur HIF-1. Il n'est donc pas possible de conclure quant à l'effet de l'hypoxie et de HIF-1 sur l'activation des voies de l'UPR et sur CHOP dans ce modèle *in vivo*. En revanche, dans ces travaux les auteurs ont mis au point un modèle de double agression chez la souris, qui repose sur une instillation de bléomycine suivie d'une exposition à l'hypoxie. Cette étude démontre le rôle potentialisateur de

l'hypoxie sur le développement de la fibrose. L'implication de HIF d'une part et de CHOP d'autre part dans cet effet de synergie a été mis en évidence par l'utilisation de modèle de souris invalidées pour ces deux facteurs (*Burman et al., 2018*).

En conclusion, notre étude révèle un lien étroit entre hypoxie, voie de l'UPR et apoptose des pneumocytes de type II et décrit le rôle crucial de HIF-1 dans cette régulation. Ces travaux suggèrent l'axe HIF-1/UPR/CHOP comme une nouvelle cible thérapeutique pour limiter l'altération des pneumocytes de type II et ainsi réduire le processus de fibrose pulmonaire.

II. Implication du stress du RE dans la TEM des pneumocytes de type II induite par l'hypoxie

1. Objectifs de l'étude

La perte progressive du phénotype épithélial des pneumocytes de type II (PII) au profit d'un phénotype mésenchymateux est un élément incriminé dans la pathogenèse de la FPI. Au cours de ce processus de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), les cellules acquièrent des propriétés migratoires et leur profil sécrétoire est modifié avec notamment la sécrétion de TGF- β . Ce médiateur soluble stimule la prolifération des fibroblastes et leur différenciation en myofibroblastes participant ainsi à l'environnement pro-fibrosant du parenchyme pulmonaire.

Dans de nombreux tissus, une hypoxie chronique est un contexte propice à l'apparition de TEM (Lu, 2012). L'effet de l'hypoxie sur ce processus cellulaire implique les facteurs de transcription HIF. Dans les PII, l'acquisition d'un profil mésenchymateux est observée *in vitro* dès 6 jours d'hypoxie et fait intervenir le facteur HIF-1 (Zhou et al., 2009; Uzunhan et al., 2016).

L'implication du stress du RE dans le processus de TEM a été mis en évidence dans de nombreux types cellulaires mais également dans les PII *in vitro* (Zhong et al., 2011). Le rôle d'une déplétion calcique du RE, un événement décrit dans l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux, a été observé en réponse à une hypoxie (Gusarova et al., 2011). Les mécanismes reliant le stress du RE et le calcium à l'induction de la TEM en hypoxie ne sont cependant pas décrits dans les PII.

Deux objectifs ont guidé cette étude :

- caractériser le rôle des voies de l'UPR dans l'induction de la TEM observée dans les PII exposés à une hypoxie chronique,
- évaluer le rôle de l'UPR dans le contrôle de l'activation de HIF-1.

ARTICLE 2

ER STRESS IS INVOLVED IN EPITHELIAL-TO-MESENCHYMAL TRANSITION OF ALVEOLAR EPITHELIAL CELLS EXPOSED TO A HYPOXIC MICROENVIRONMENT

Eva Delbrel¹, Uzunhan Yurdagül^{1,2}, Abdoulaye Soumare¹, Thomas Gille^{1,2}, Dominique Marchant¹, Carole Planès^{1,2}, Emilie Boncoeur¹



International Journal of
Molecular Sciences

Accepté le 7 Mars 2019

ER Stress is Involved in Epithelial-To-Mesenchymal Transition of Alveolar Epithelial Cells Exposed to a Hypoxic Microenvironment

Eva Delbrel¹, Yurdagül Uzunhan^{1,2}, Abdoulaye Soumare¹, Thomas Gille^{1,2}, Dominique Marchant¹, Carole Planès^{1,2} and Emilie Boncoeur^{1,*}

¹ Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire 'Hypoxie & Poumon' (Inserm U1272), F-93017 Bobigny, France; eva.delbrel@univ-paris13.fr (E.D.); yurdagul.uzunhan@aphp.fr (Y.U.); abdoulaye.soumare@hotmail.com (A.S.); gille.tom@gmail.com (T.G.); dom.marchant@yahoo.fr (D.M.); carole.planes@aphp.fr (C.P.)

² Assistance Publique Hôpitaux de Paris (APHP), Hôpital Avicenne, F-93017 Bobigny, France

* Correspondence: emilie.boncoeur@univ-paris13.fr; Tel.:+(33)-1-48-38-77-19; Fax: + (33)-1-48-38-89-24

Received: 15 February 2019; Accepted: 7 March 2019; Published: date

Abstract: Background: Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic, progressive and fatal interstitial lung disease of unknown origin. Alveolar epithelial cells (AECs) play an important role in the fibrotic process as they undergo sustained endoplasmic reticulum (ER) stress, and may acquire a mesenchymal phenotype through epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), two phenomena that could be induced by localized alveolar hypoxia. Here we investigated the potential links between hypoxia, ER stress and EMT in AECs. Methods: ER stress and EMT markers were assessed by immunohistochemistry, western blot and qPCR analysis, both in vivo in rat lungs exposed to normoxia or hypoxia (equivalent to 8% O₂) for 48 h, and in vitro in primary rat AECs exposed to normoxia or hypoxia (1.5% O₂) for 2–6 days. Results: Hypoxia induced expression of mesenchymal markers, pro-EMT transcription factors, and the activation of ER stress markers both in vivo in rat lungs, and in vitro in AECs. In vitro, pharmacological inhibition of ER stress by 4-PBA limited hypoxia-induced EMT. Calcium chelation or hypoxia-inducible factor (HIF) inhibition also prevented EMT induction under hypoxic condition. Conclusions: Hypoxia and intracellular calcium are both involved in EMT induction of AECs, mainly through the activation of ER stress and HIF signaling pathways.

Keywords: hypoxia; ER stress; alveolar epithelial cell; loss of phenotype

1. Introduction

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic, progressive and fatal interstitial lung disease of unknown origin. According to the prevailing hypothesis, IPF could be caused due to repetitive micro-injuries of the alveolar epithelium, followed by inefficient and/or aberrant epithelial repair and uncontrolled (myo)fibroblast proliferation, leading to excessive extracellular matrix deposition and destruction of distal lung architecture [1]. Indeed, in IPF lungs, some alveolar epithelial cells (AECs) become hyperplastic with abnormal activation and production of profibrotic factors such as TGF- β 1, while other AECs undergo massive apoptosis. AECs may even acquire a mesenchymal phenotype through a process of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) [2–4]. In the last decade, chronic endoplasmic reticulum (ER) stress of AECs has been recognized as a key pathogenic event in lung fibrosis. ER stress is defined by the activation of the unfolded protein response (UPR) pathways to restore ER homeostasis [5,6].

This implies activation of the following transcription factors: activating transcription factor 4 (ATF4), ATF6N, and spliced X-box binding protein 1 (sXBP1), in order to inhibit protein translation, to increase chaperon synthesis, and to promote the ER activated degradation (ERAD) machinery. Altogether, ER stress and the UPR activation contribute to improve protein folding, and limit the

formation of protein aggregates. First described in familial cases of lung fibrosis due to surfactant protein mutations, ER stress in AECs was also evidenced in sporadic cases of IPF [7,8]. We and others recently proposed that localized alveolar hypoxia could represent an important trigger for ER stress and subsequent UPR activation in AECs from sporadic IPF [9,10].

Localized alveolar hypoxia may likely occur in the course of IPF because of fibrotic lung remodeling and collapse of distal airspaces. Accordingly, the expression of the hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) has been evidenced in AECs from IPF lungs as well as in AECs from mouse lungs treated with bleomycin, a drug known to induce pulmonary fibrosis [11,12]. We and others have reported in vitro, that hypoxic microenvironment induces phenotypic changes of primary AECs characterizing the EMT process. Indeed, HIF-1 α can directly regulate EMT-inducing-genes through fixation on its hypoxia responsive element (HRE), but also promotes the pro-EMT transforming growth factor β (TGF- β) signaling pathways [13,14]. Furthermore, modulation of intracellular calcium has been reported in AECs exposed to hypoxia [15] and could be related to the induction of EMT features [16]. Hypoxic exposure may also lead to calcium depletion from the ER [15], thereby inducing ER stress. Although ER stress may promote EMT in some cell types [17], the potential involvement of chronic ER stress in hypoxia-induced EMT of AECs has never been studied. Here, we hypothesized that ER stress and activation of UPR pathways could contribute to EMT-associated phenotypic changes observed in AECs exposed to hypoxic stress, and that disturbance of intracellular calcium signaling could play a role in this process.

The objectives of the present study were therefore to examine the role of ER stress in the induction of EMT features in AECs exposed to hypoxia in vivo and in vitro, and to decipher the cellular mechanisms involved. We particularly studied the potential role of calcium, an important determinant of ER homeostasis. Our results provide evidence that ER stress and HIF-1 signaling pathways are both involved in the induction of EMT of AECs exposed to hypoxia, and suggest that any disturbance of intracellular calcium homeostasis plays a crucial role in this process.

2. Results

2.1. Acute Hypoxia Upregulates UPR Pathways and Induces Phenotypic Alterations of Alveolar Epithelial Cells in Rat Lungs

To evaluate the effect of hypoxia on UPR pathways in vivo, rats were exposed to a hypoxic atmosphere (equivalent to 8% FiO₂) for 16 to 72 h. Compared to normoxia, exposure to hypoxia induced the three pathways of UPR signaling in lung tissues, as shown by western blot experiments (Figure 1A–C). A significant increase in ATF4 expression was observed after 24 h exposure ($p < 0.05$) as compared to normoxia, with no significant decrease at 48 h exposure (Figure 1A). To study the activation of the ATF6 α pathway, the cleaved form of ATF6N (50 kDa) was quantified and the ATF6N/ATF6 ratio was compared in normoxic and hypoxic conditions. When normalized to β -actin, the exposure of rats to 24 h hypoxia led to a 4.2-fold increase of the ATF6N protein level compared to normoxia (Figure 1B), as well as an increase in the ATF6N/ATF6 ratio (2.8 ± 1.1 , $p < 0.05$). This ATF6N expression was maintained at 48 h of hypoxic exposure, and a more than two-fold increase of the ATF6N/ATF6 ratio was still observed (2.08 ± 0.9). To study the activation of the XBP1 pathway, the spliced form of XBP1 (sXBP1: 55 kDa) was quantified, and sXBP1/XBP1 ratio was compared in normoxic and hypoxic conditions. When normalized to β -actin, exposure of rats to 24 h hypoxia led to a 3.8-fold increase of the sXBP1 protein level compared to normoxia (Figure 1C). This expression was maintained at 48 h of hypoxic exposure. However, no change in the sXBP1/XBP1 ratio was observed.

Expression of epithelial and mesenchymal markers was studied in parallel in lung homogenates of rat exposed to a 72 h-hypoxia. A 3-fold increase in the protein expression of α -SMA and vimentin was observed in hypoxic condition, as compared with normoxic condition ($p < 0.01$ and $p < 0.01$, respectively) (Figure 1D,E). In a previous work, our team demonstrated that hypoxia induces in vitro the expression of *Tgf- β 1*, *Ctgf*, *Zeb1* and *Twist1* mRNA in AECs, four well-known genes involved in the process of EMT [18]. The effect of exposure to 48 h hypoxia on mRNA transcript expression levels of all these markers

was therefore studied in rat lung homogenates (Figure 1F). As compared with normoxic condition, a significant increase in *Tgf-β1* expression, *Ctgf*, and *Twist1* was observed in hypoxic lungs ($p < 0.05$), while no significant modulation of *Zeb1* expression was observed in the hypoxic condition (Figure 1F). Finally, the expression and the localization of α -SMA and TTF1 (used as a marker of alveolar epithelial cells), were studied by immunofluorescence (Figure 1G,H). In hypoxic condition, co-immunostaining studies strongly suggest that α -SMA and TTF1 were co-expressed in some AECs (Figure 1H), consistent with an ongoing process of EMT.

2.2. Activation of UPR Pathways is Involved in the Loss of Alveolar Epithelial Cell Phenotype Induced In Vitro by Hypoxic Exposure

Activation of UPR pathways was confirmed in vitro in primary rat AECs exposed for 6 h to hypoxia. As compared with normoxia, hypoxia led to a significant increase of ATF4 and ATF6N/ATF6 ratio protein expression ($p < 0.01$) (Figure 2A,B). Of note, we recently reported that the XBP1 spliced form was induced only after 16 h of hypoxic exposure [10]. In primary AECs transfected with plasmids coding for luciferase reporter activity of amino acid response element (ATF4-luc) or ER stress response element (ATF6N/sXBP1-luc), a significant induction of the luciferase activity was observed in response to hypoxia ($p < 0.01$) (Figure 2C,D). The ER stress inhibitor 4-phenylbutyrate (4-PBA), known as a chemical chaperone, limits UPR pathway activation. Indeed, treatment of AECs with 4-PBA fully prevented the increase in ATF4 protein expression and the ATF6N/ATF6 ratio ($p < 0.05$) (Figure 2A,B). Furthermore, treatment with 4-PBA also abolished the increase in ATF4 (Figure 2C) and ATF6N (Figure 2D) response element activities induced by hypoxia ($p < 0.05$).

We and others have previously demonstrated that a 6 day-exposure to hypoxia led to a change of AECs morphology, as illustrated by alteration of ZO-1 staining and the loss of TTF1 expression [18]. To investigate the implication of UPR pathways in this phenomenon, AECs were incubated with 4-PBA and cultured for 6 days under the hypoxic condition. As shown in Figure 2E, exposure of AECs to hypoxia led to a decrease in TTF1 expression and to modifications in cell morphology as assessed by ZO-1 staining. Although incubation of AECs with 4-PBA limited TTF1 and ZO-1 decreases, no significant modification in cell morphology was observed by ZO-1 staining. Then, *Tgf-β1*, *Ctgf*, *Zeb1* and *Twist1* mRNA levels were measured in rat primary AECs exposed for 48 h to hypoxia in the presence or absence of 4-PBA (Figure 2F-I). Treatment of AECs with 4-PBA fully prevented the hypoxia-induced increase in *Tgf-β1*, *Ctgf*, *Zeb1* and *Twist1* mRNA levels ($p < 0.05$) (Figure 2F-I).

2.3. Calcium Chelation Limits Cell Alterations and UPR Pathways Activation in AECs Exposed to Hypoxia

A fine tuning of calcium concentration is essential for ER homeostasis [19]. In AECs, hypoxia may induce calcium influx through L-type calcium channels located at the plasma membrane [20], as well as calcium depletion of the ER [15]. However, little is known about the role of intracellular calcium modulation on ER stress regulation. We first evaluated the involvement of calcium in hypoxia-induced loss of AECs phenotype. The cell permeable 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N,N-tetraacetic acid (BAPTA-AM) was used to chelate intracellular calcium. No change in cell morphology or phenotype was observed in normoxic-AECs treated with BAPTA-AM. Pre-treatment of AECs with BAPTA-AM just before a 6-day hypoxic exposure prevented the changes in cell morphology induced by hypoxia as illustrated by ZO-1 staining and the decrease in TTF1 expression (Figure 3A). The key role of calcium in the change of the AECs phenotype under hypoxia was reinforced by the observation that treatment with BAPTA-AM blunted the expression of *Tgf-β1*, *Ctgf*, *Zeb1* and *Twist1* mRNAs in hypoxic AECs ($p < 0.05$) (Figure 3B-E).

Furthermore, any expression and transcriptional activity of ATF4 and ATF6N/sXBP1 were fully prevented when AECs were pre-treated with BAPTA before exposure to hypoxia (Figure 4A,B and Figure 4C,D, respectively, $p < 0.05$).

2.4. Pharmacological Inhibition of UPR Pathways and Chelation of Calcium Modulates HIF-1 Expression and Activity

Numerous studies reported that HIF transcription factor could be involved in loss of AECs phenotype [21]. In our model, we showed by immunohistochemistry that treatment of AECs with the HIF-1 inhibitor YC-1 partially blunted the hypoxic effects on ZO-1 and TTF1 expression (Figure 5A). YC-1 limited TTF1 decrease in response to hypoxia, but no effect on cell morphology as assessed by ZO-1 expression was observed. As ER stress inhibition or calcium chelation also prevented the effect of hypoxia on ZO-1 and TTF1 expression, we next investigated the impact of UPR pathways inhibition or calcium chelation on HIF-1 α stabilization and HIF capacity to transactivate the hypoxia responsive elements (HRE) upstream the luciferase gene in response to hypoxia (Figure 5B,C). In AECs exposed for 7 h to hypoxia, HIF-1 α protein expression (Figure 5B) and the HRE activity (Figure 5C) were significantly increased as compared with normoxia ($p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively). Interestingly, treatment of AECs with either 4-PBA (to limit ER stress), or BAPTA-AM (to chelate calcium) during hypoxic exposure, completely suppressed the accumulation of HIF-1 α protein (Figure 5B) and significantly blunted HIF transcriptional activity (Figure 5C) ($p < 0.01$), suggesting a link between ER stress, intracellular calcium concentration and the HIF pathway.

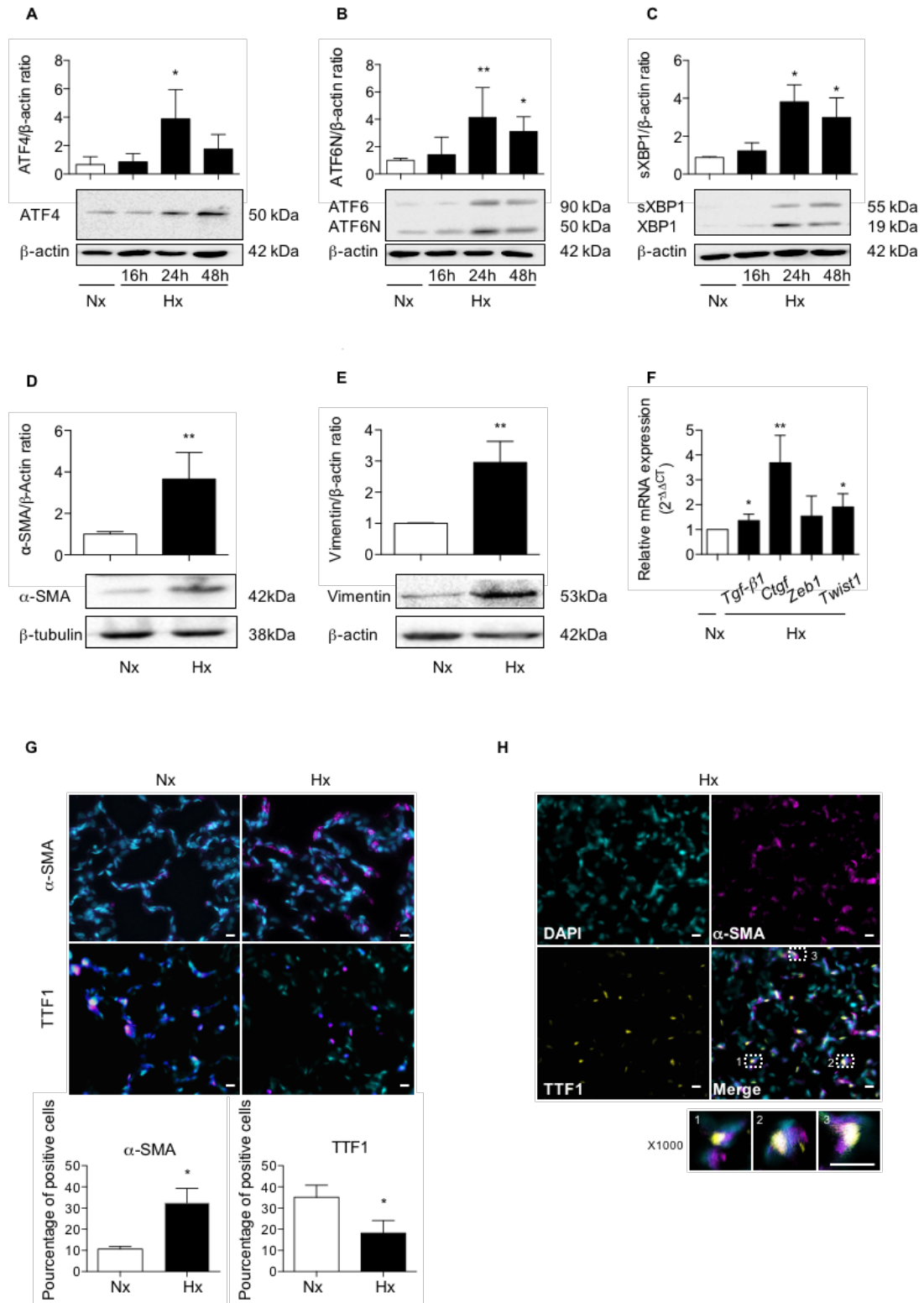


Figure 1. Hypoxia induces UPR pathways and modulates epithelial and mesenchymal markers expression in lungs of rats exposed to hypoxia. (A) Lungs of rats stabulated in normoxia (Nx) (21% O₂) or exposed to hypoxia (Hx) (equivalent to 8% FiO₂) during 16 h, 24 h, 48 h or 72 h were isolated and used for western blotting, immunohistochemistry and RT-qPCR analyses. Western blot of ATF4 protein, (B)

ATF6N/ATF6 and (C) spliced XBP1 (sXBP1)/XBP1 were performed in lung homogenates. Representative blot of $n = 8$ experiments is shown. Quantification has been done and expression levels of ATF4, ATF6N or sXBP1 was reported to the β -actin expression level for each condition. Raw data were submitted to a Kruskal-Wallis one-way analysis of variance. * indicate a significant difference as compared with normoxic condition ($p < 0.05$). (D) Western blot of α -SMA protein and (E) vimentin were performed in lung homogenates from rat exposed to a 72 h-hypoxia. Representative blot of $n = 5$ experiments is shown. Quantification has been done and the expression of α -SMA (D) and vimentin was reported to the β -actin expression for each condition. Raw data ($n = 5$ rats in each group) were submitted to a Mann-Whitney test and relative expression was represented. (F) mRNA transcript expression levels of *Tgf- β 1*, *Ctgf*, *Zeb1* and *Twist1* in lungs homogenates of rats exposed 48 h to hypoxia were quantified by qRT-PCR using $2^{-\Delta\Delta CT}$ method and reported to the normoxic condition. Raw data ($n = 5$ rats in each group) were submitted to a Mann-Whitney test and relative expression was represented. (G) Immunostaining of α -SMA or TTF1 were performed on 5 μ m slices of paraffin-embedded from the left lobe of rat lung exposed to 72 h normoxia or hypoxia. A representative picture of at least $n = 5$ independent experiments for each condition has been presented. Original magnification: $\times 200$ and scale bars represent 20 μ m. Raw data were submitted to a Mann-Whitney test and relative expression was represented. (H) Co-staining for α -SMA (magenta), TTF1 (yellow), and DAPI to localize nuclei (in cyan) is shown (original magnification: $\times 400$ or $\times 1000$). Percentage of α -SMA or TTF1 positive cells in the lung of rats exposed 72 h to hypoxia as compared to normoxia ($n = 5$ rats in each group). Raw data were submitted to a Mann-Whitney test * and ** indicate a significant difference as compared with normoxic condition with a $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

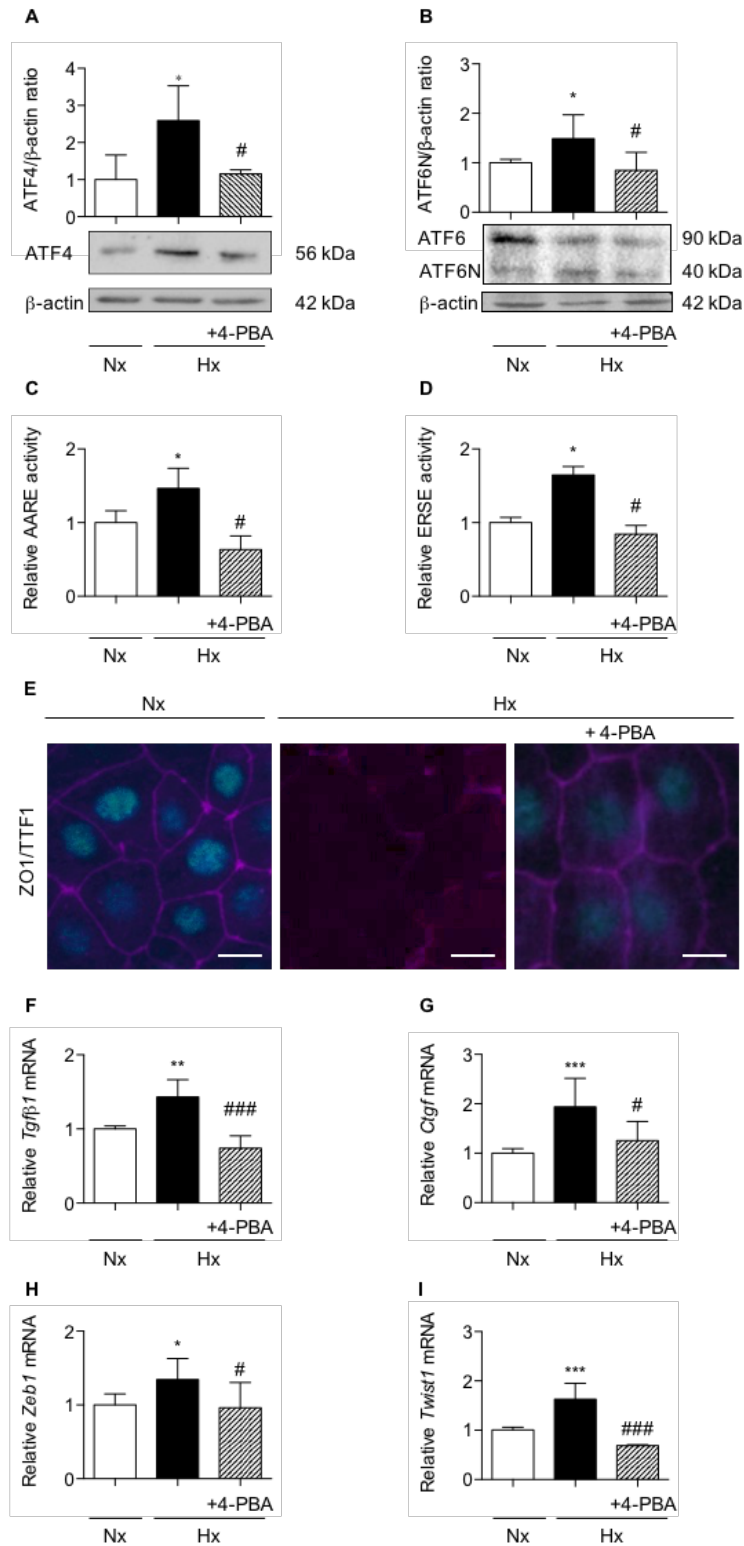


Figure 2. Inhibition of UPR pathways prevents loss of alveolar epithelial cells phenotype in primary rat alveolar epithelial cells exposed to hypoxia. Isolated primary rat AECs were cultured in normoxia (Nx) (21% O₂) or hypoxia (Hx) (1.5% O₂) during various periods in the presence or absence of 100 mM 4-phenylbutyrate (4-PBA). (A) Western blot of ATF4 protein and (B) ATF6N/ATF6 ratio were performed primary AECs exposed 6 h to hypoxia. Representative blot of $n = 5$ experiments is shown. Quantification has been done and the expression levels of ATF4 and ATF6 were reported to the β -actin expression for each condition. (C) Primary rat AECs transfected with plasmid coding for luciferase reporter activity of amino acid response element (AARE: i.e., ATF4-luc) or (D) endoplasmic reticulum

stress element (ERSE: i.e., ATF6N/sXBP1-luc), were treated or not with 100 mM 4-PBA and exposed 6 h in hypoxic condition. (C) Luciferase activity corresponding to the transcriptional capacity of ATF4 or (D) ATF6N was measured. (E) ZO-1 (magenta) and TTF1 (cyan) immunostaining were performed on rat AECs cultured on filter and exposed for 6-days to hypoxia in the presence or absence of 100 mM 4-PBA. A representative picture of at least $n = 5$ independent experiments for each condition has been presented. Scale bar represents 50 μm . (F) mRNA expression levels of *Tgf- β 1*, (G) *Ctgf*, (H) *Zeb1* and (I) *Twist1* were quantified by qRT-PCR using $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method in rat AECs cultured in the presence or absence of 100 mM 4-PBA and exposed 48 h to normoxia or hypoxia. mRNA levels under hypoxic condition were reported to the normoxic condition ($n = 5$ experiments). Raw data were submitted a Kruskal-Wallis test. *, ** and *** indicate a significant difference as compared with normoxic value with $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$ respectively. # and ### indicate a significant difference as compared with value in untreated hypoxic cells with $p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively.

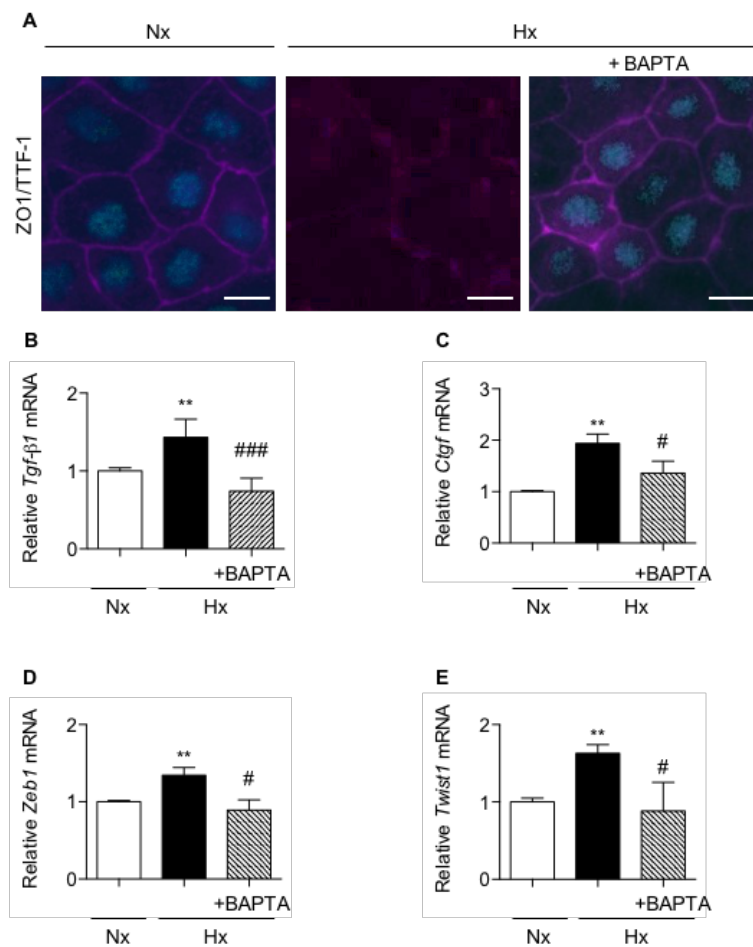


Figure 3. Calcium chelation prevents the loss of epithelial phenotype in primary rat alveolar epithelial cells exposed to hypoxia. Primary rat AECs were treated or not with 1 μM 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N,N-tetraacetic acid (BAPTA-AM) 90 min before exposure to normoxia (Nx) (21% O_2) or hypoxia (Hx) (1.5% O_2) for increasing times. (A) ZO-1 (magenta) and TTF1 (cyan) immunostainings were performed after a 6-day exposure. A representative picture of at least $n = 4$ independent experiments for each condition has been presented and scale bar represents 50 μm . (B) Expression levels of *Tgf- β 1*, (C) *Ctgf*, (D) *Zeb1* and (E) *Twist1* mRNA transcripts were assessed after a 48 h exposure. mRNA levels were quantified by qRT-PCR using $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method and values in hypoxic cells were reported to values obtained in normoxic condition ($n = 4$ experiments). Raw data were submitted a Kruskal-Wallis test. ** indicate a significant difference as compared with normoxic condition with $p < 0.01$, respectively. # and ## indicate a significant difference as compared with value in untreated hypoxic cells with $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

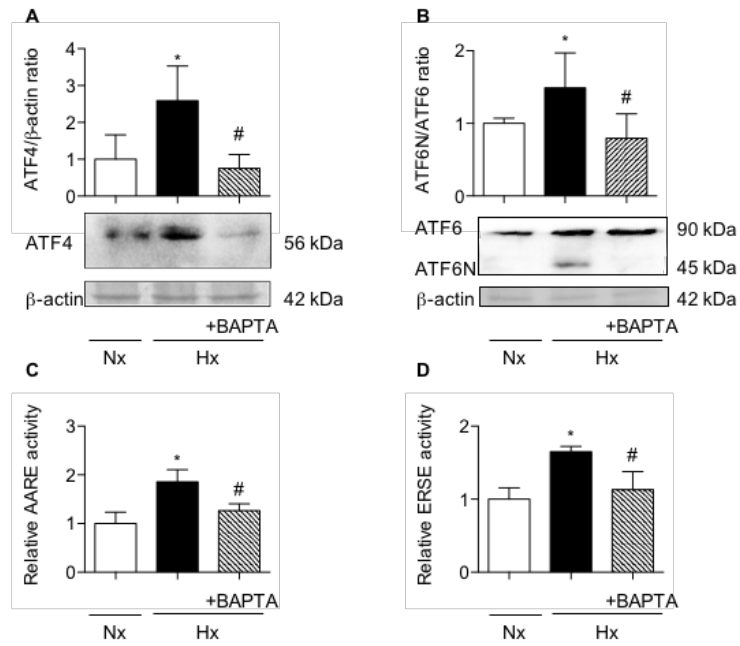


Figure 4. Calcium chelation prevents the induction of UPR pathways in primary rat alveolar epithelial cells exposed to hypoxia. Primary rat AECs were treated or not with 1 μ M 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N,N-tetraacetic acid (BAPTA-AM) 90 min before a 6-h exposition to normoxia (Nx) (21% O₂) or hypoxia (Hx) (1.5% O₂). (A) Western blot of ATF4 and (B) ATF6N/ATF6 ratio were performed. Representative blot of $n = 5$ experiments is shown. Quantification of ATF4 and ATF6N protein expression was performed and was reported to the β -actin expression for each condition. (C) Primary rat AECs were transfected with plasmid coding for luciferase reporter activity of amino acid response element (AARE: i.e., ATF4-luc) or (D) endoplasmic reticulum stress element (ERSE: i.e., ATF6N/sXBP1-luc), and cultured as describe. (C) Luciferase activity corresponding to the transcriptional capacity of ATF4 or (D) ATF6N/sXBP1 was measured ($n = 4$ experiments). Raw data were submitted to a Kruskal-Wallis test. * indicates a significant difference against control or normoxic condition ($p < 0.05$). # indicates a significant difference as compared with value in untreated hypoxic cells ($p < 0.05$).

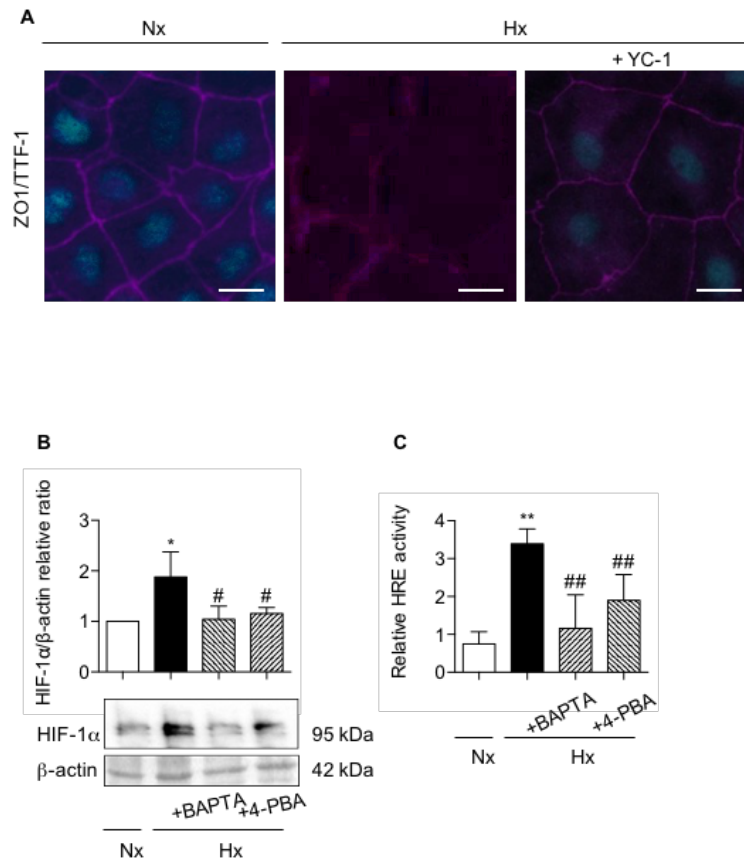


Figure 5. Involvement of HIF-1 α in alveolar epithelial cell phenotypic changes induced by hypoxia. Primary rat AECs were cultured in normoxia (Nx) (21% O₂) or hypoxia (Hx) (1.5% O₂) during 6 days in presence or absence of 10 μ M YC-1. (A) Immunostaining of ZO-1 (magenta) and TTF1 (cyan) were performed. $n = 4$ experiments were performed. Isolated primary rat AECs were cultured in normoxia (Nx) (21% O₂) or hypoxia (Hx) (1.5% O₂) during 6 h in the presence or absence of 100 mM 4-phenylbutyrate (4-PBA) or pre-treated or not with 1 μ M BAPTA-AM 90 min before exposition to hypoxia. A representative picture of at least $n = 4$ independent experiments for each condition has been presented and scale bar represents 50 μ m. (B) Western blot of HIF-1 α protein levels was performed. Representative blot of $n = 5$ experiments is shown. Expression levels of HIF-1 α were quantified and reported to β -actin expression for each condition. Primary rat AECs were transfected with plasmid coding for luciferase reporter activity of hypoxia responsive element (HRE: i.e., HIF-luc), and cultured as described. (C) Luciferase activity corresponding to the transcriptional capacity of HIF was reported ($n = 4$ experiments). Raw data were submitted a Kruskal-Wallis test. * and ** indicate a significant difference as compared with normoxic value with $p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively. # and ## indicate a significant difference as compared with value in untreated hypoxic cells with $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

3. Discussion

Extracellular matrix remodeling and accumulation of fibroblasts and myofibroblasts is a hallmark of IPF. Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) of AECs has been increasingly documented in the fibrogenesis. EMT is mainly initiated by the presence of TGF- β , and we and others proposed that the hypoxic microenvironment of the cells could be an additive trigger for the EMT process in IPF [18,21]. In the present study, we provide evidence that hypoxic exposure and HIF induce EMT-like features in vivo and in vitro in AECs, and that ER stress and UPR-dependent signaling pathways are involved in this process.

Classically, loss of epithelial phenotype and acquisition of mesenchymal characteristics comprise upregulation of α -SMA and vimentin [4,21], modification of tight junction protein ZO-1 [4,17], and

induction of transcription factors driving EMT such as *Zeb1* and *Twist1* [21]. In our study, prolonged exposure to hypoxia induced in vivo in rat lungs an overall increase in the expression of mesenchymal markers α -SMA and vimentin, of transcription factors driving EMT, and of pro-fibrotic mediators known to induce EMT. These in vivo results reinforce our previous in vitro work, demonstrating that prolonged exposure to hypoxia is a trigger for epithelial to mesenchymal modifications of AECs [21]. Furthermore, our results show increased expression of α -SMA in alveolar area in lung tissues from rats exposed to hypoxia. Co-immunostaining experiments suggest that the mesenchymal marker α -SMA and the epithelial marker TTF1 are co-expressed in some AECs, consistent with an ongoing process of EMT. Of note, co-expression of alveolar epithelial and mesenchymal markers has been observed previously in AECs from IPF lungs [17] and in bleomycin-induced lung fibrosis in the mouse [22]. Our observation favors the ambiguous role of AECs in the EMT phenomenon contributing to myofibroblasts accumulation in IPF, as previously described [2].

Our in vivo experiments also show that exposure to hypoxia induces the expression of ER stress signaling pathways, ATF4, ATF6N and sXBP1 with a specific time course in rat lung homogenates. Of note, the activation of XBP1 under hypoxia seems to be more delayed than the activation of ATF4 and ATF6 α pathways. This result is consistent with previous studies suggesting that the ATF4/ATF6 α branches of the UPR play an important role in early events such as apoptosis partly through C/EBP homologous protein (CHOP) induction, while XBP1 is mostly involved in the induction of EMT [10,23,24]. However we cannot exclude that part of the activation of XBP1 could be an implication in the induction of the late apoptosis [25].

Interestingly, in AECs, ER stress induction by thapsigargin or tunicamycin was shown to decrease epithelial markers E-cadherin and ZO-1, to increase the mesenchymal marker α -SMA, and to induce a fibroblast-like morphology consistent with EMT [17]. Furthermore, pharmacological inhibition of ER stress prevents TGF- β 1-induced EMT features [26]. Here, in line with *Mo et al.* [26] work, we observed that the incubation of primary rat AECs with the ER stress pharmacological inhibitor 4-PBA fully prevented the decrease in TTF1 expression induced by hypoxia, and the increase in EMT-like markers *Tgf- β 1*, *Ctgf*, *Twist1* and *Zeb1*. However, no significant modification on cell morphology is observed through ZO-1 immunostaining. Interestingly, intracellular calcium chelation with BAPTA-AM had the same effect and prevented the loss of epithelial phenotype induced by hypoxic microenvironment. An important role of calcium as an intracellular messenger within this process has ever been proposed by others since inhibition of specific calcium channels or calcium chelation [16] in lung cancer cells limits TGF- β -induced EMT [27] though the limitation of N-cadherin and vimentin expression. Modulation of intracellular calcium level and ER homeostasis is largely documented. ER senses and integrates changes in calcium concentrations in and outside of the ER, and maintains cellular homeostasis through specific calcium dependent ER-associated proteins and the activation of the UPR pathways [28]. In our work, calcium chelation is able to limit hypoxia-induced ER stress and as a consequence to limit the EMT-like process. This observation is consistent with previous findings highlighting the impact of hypoxia on calcium homeostasis of AECs. Indeed, hypoxic exposure lead to an induction of calcium influx in cultured AECs, mostly through L-type calcium channels [20].

Next, we demonstrate the critical role of HIF-1 α in the EMT process. Inhibition of HIF-1 α stabilization by YC-1 prevented the loss of TTF1 expression. This observation is in line with studies conducted by *Zhou et al.* showing EMT features after HIF-1 α stabilization in AECs exposed to hypoxia [21]. Interestingly, inhibition of HIF-1 α was observed in hypoxic AECs treated either with the calcium chelator BAPTA, or with the ER stress inhibitor 4-PBA. These intriguing results may suggest that induction of EMT in AECs exposed to hypoxia results in a crosstalk between HIF-1 α and ER stress signaling pathways. Interestingly, the induction of HIF-1 activity by ER stress has been previously reported in cardiomyocytes during myocardial ischemia-reperfusion [29]. Induction of HIF-1 could also be the result of an unbalance between pro-oxidative and anti-oxidative cellular responses. Interestingly, we previously demonstrated in vitro that hypoxic exposure increases reactive oxygen species (ROS) within AECs, and that this could be related to the activation of HIF-1 [30]. Here, we confirmed in vivo that exposure of rats to hypoxia increases ROS in the lungs (see supplemental Figure 1A and 1B). As

oxidizing environment is required for disulfide bonds formation within the ER, we tested the impact of antioxidant treatment of AECs with N-acetylcysteine (NAC) on the expression endoplasmic reticulum oxidoreductase 1 (ERO-1) involved in the disulfide bonds formation (supplemental Figure 1C,D).

We demonstrated ERO-1 induction in response to hypoxia, and showed that treatment of AECs with NAC limited this induction. However, the treatment with NAC did modify neither UPR activation (through the activation of ATF4 or ATF6N/sXBP1 responsive element) nor EMT induction (through the expression of ZO-1 and TTF1) in hypoxic cells (supplemental Figure 1E,F and Figure 1G,H respectively). These findings suggest that the production of ROS does not play a prominent role in hypoxia-induced ER stress and related EMT.

In conclusion, the present study shows that hypoxia and the microenvironment of injured AECs can trigger epithelial cell dysfunction through induction of EMT features. Our study identifies the ER stress and the calcium present in the environment of the ER as critical elements governing the fate of injured cells. We provide evidence that inhibition of HIF-1 α stabilization or pharmacological molecules that relieve ER stress can prevent hypoxia-induced alterations of AECs phenotype, at least in vitro (Figure 6). Taken together, and in accordance with recently published data from *Burman et al.* [9], our study strengthens the hypothesis that the hypoxic milieu of injured AECs could trigger lung fibrosis. Hypoxic-dependent ER stress signaling pathways could represent an attractive therapeutic approach to ameliorate epithelial abnormalities IPF.

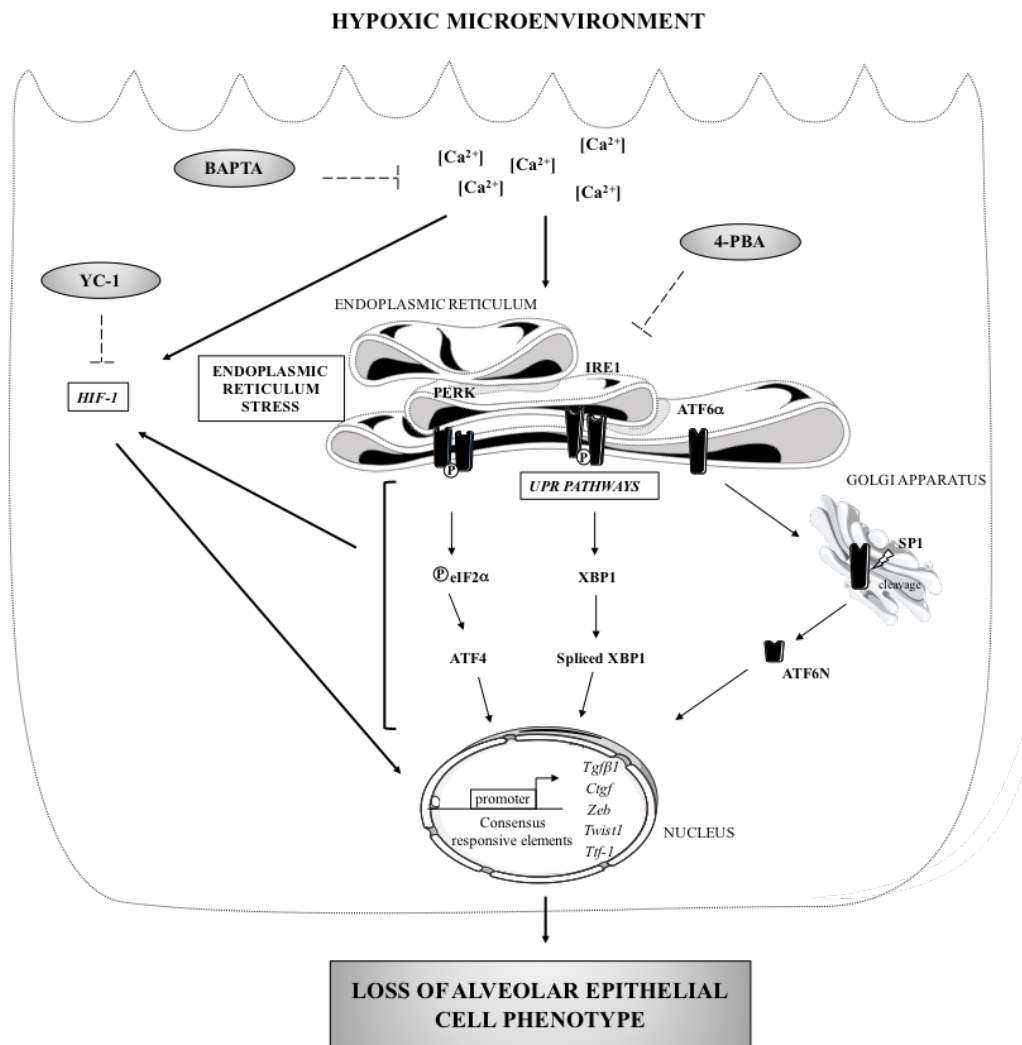


Figure 6. ER stress: a major regulator of the loss of epithelial cell phenotype in hypoxic environment. Loss of alveolar phenotype is a consequence of a long term exposure of the cells to a hypoxic microenvironment. Hypoxia leads to the activation of the PERK/ATF4 and ATF6 α /ATF6N branches of the UPR, to the upregulation of *Tgfb1*, *Ctgf*, *Zeb1* and *Twist1* gene expression, to a decrease in TTF1

expression, and finally to a disruption of ZO-1 expression (black arrows). In vitro, pharmacological inhibitors (dotted arrow) revealed that this effect is partly mediated by the stabilization of HIF-1 α . Calcium chelation induced by BAPTA-AM prevents the loss of epithelial phenotype observed under hypoxia, by blunting the induction of the UPR and HIF-1 transcriptional activity.

4. Materials and Methods

4.1. Rat Model of Acute Hypoxic Exposure

Experiments have been approved by the local ethical committee (Charles Darwin, CE5) in accordance with the European Communities Council for animal care (C2EA-06, authorization APAFIS #7846, approved on September 2017, the 1st). 21-days old male Sprague-Dawley rats (Janvier Labs, St Berthevin, France) were housed four per cage and cared for a 12/12 light/dark cycle in a free food and water environment. Rats were placed for 16 h, 24 h, 48 h or 72 h ($n = 6-8$ rats per group) in a hypobaric chamber maintained at a pressure of 337 mmHg by a vacuum source at flow rates sufficient to prevent CO₂ buildup to simulate an 8% FiO₂. Control rats were kept outside of the hypobaric chamber in the same room. At the end of exposure, animals were anesthetized by intraperitoneal pentobarbital injection (60 mg/kg) and sacrificed by abdominal artery section. The left lobe of the lung was fixed by intratracheal instillation of fresh 4% paraformaldehyde (at 25 cm H₂O transpulmonary pressure). The right lobe of the lung was snap frozen in liquid nitrogen.

4.2. Alveolar Epithelial Cells Isolation

Primary AECs were isolated from four weeks male Sprague-Dawley rats, as describe previously [21] according to a procedure approved by the local ethical committee (Charles Darwin, CE5) (C2EA-06, authorisation C9300801, authorization APAFIS #8150, approved on august 2017, the 8th). Briefly, perfused lungs were digested with 60 U elastase (Worthington, Serlabo, Entraigues-sur-la-Sorgue, France) and AECs were purified by a differential adherence technique on plastic plates (Greiner dishes, Fisher Scientific, Rungis, France). AECs were seeded at 4.5×10^6 cells in 6-well plates or 1×10^6 cells in 24-well plates containing polycarbonate membrane inserts with a pore size of 0.4 μm (Corning™ Transwell™, Fisher Scientific, Rungis, France). Cells were cultured in DMEM containing 25 mM D-glucose, 10 mM Hepes, 23.8 mM NaHCO₃, 2 mM L-glutamine, 10% fetal bovine serum (FBS), 50 U/mL penicillin, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amphotericin B (Thermo Fisher, Illkirch cedex, France) and placed at 37 °C with 5% CO₂ in a humidified incubator.

4.3. Alveolar Epithelial Cells Treatments

On day 1 after isolation, primary rat AECs were placed in a humidified airtight incubator with inflow and outflow valves and exposed to a hypoxic gas mixture containing 1.5% O₂-5% CO₂-94.5% N₂ (oxygen tension in culture media: 45 mmHg), and kept at 37 °C for six days. Control normoxic cells were maintained in a 21% O₂-5% CO₂-74% N₂ humidified incubator during the same time (oxygen tension in culture media: 140 mmHg). For shorter hypoxic exposure experiments, primary rats AECs were used at day 3 after isolation. Calcium chelation was performed by a 90 min pre-treatment with 1 μM of the cell permeable 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N,N-tetraacetic acid (BAPTA-AM) (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Culture medium was removed, cells were washed with PBS and fresh medium was added before hypoxic exposure.

To inhibit UPR pathways activation, AECs were treated with 100 μM of the ER stress inhibitor 4-phenylbutyric acid (4-PBA) (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) and exposed for 6 h or 6-days hypoxia. To inhibit HIF-1 α stabilization, AECs were treated with 10 μM 5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl indazole (YC-1) and exposed for 6 h or 6-days hypoxia.

4.4. In Vivo and In Vitro Immunofluorescence Stainings

In vivo, after exposure for 72 h to hypoxia, fixed rat lungs were dehydrated, paraffin embedded, and sections of 5 μ m were collected on classical Superfrost™ Plus microscope slides (Fisher Scientific, Rungis, France). Tissue sections were submitted to a pH 6 antigen retrieval, kept in a 2% BSA-5% goat serum blocking solution for 1 h at room temperature and incubated overnight at 4 °C with 1:500 anti-mouse alpha-smooth muscle actin (α -SMA) (A2547, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) and 1:500 anti-rabbit thyroid transcription factor-1 (TTF1) solution antibodies (WRAB-1231, Seven hills, Cincinnati, OH, USA). Tissue sections were rinsed with PBS and incubated in 1:200 Alexa 568 Fluor® conjugated secondary antibody solution (Invitrogen, Thermo Fisher, Illkirch cedex, France) and protected from light. In vitro, zonula occludens-1 (ZO-1) and TTF1 immunostaining were realized on AECs cultured 6 days in hypoxic condition as previously described [18]. Briefly, after 4% paraformaldehyde fixation and permeabilization with 0.1% Triton X100, AECs were incubated in 2% BSA blocking solution for 30 min and then 1 h with 1:200 anti-rabbit ZO-1 (AB2272, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) and 1:50 anti-mouse TTF1 (180221, Invitrogen, Thermo Fisher, Illkirch cedex, France) antibodies solution. AECs were then washed with PBS and incubated in 1:200 Alexa 488 and 568 Fluor® conjugated secondary antibodies solution (Invitrogen, Thermo Fisher, Illkirch cedex, France). For in vivo and in vitro immunofluorescence studies, nuclear labeling was performed by a DAPI (300 nM) staining during 8 min and washed with PBS. Slides were mounted with Immun-Mount solution (Thermo Fisher, Illkirch cedex, France) and imaged with a Retiga 2000R CCD camera with Image-proexpress 6.0 (QImaging, Briscous, France) connected to an Axio Observer D1 inverted epifluorescence microscope (Zeiss, Paris, France).

4.5. Transient Transfection of AECs and Luciferase Activity Assay

AECs were transiently transfected with the NEON™ transfection system (Life Technologies, Thermo Fisher, Illkirch cedex, France) allowing a 25–30% transfection efficiency as previously described [31]. ATF4 transcriptional activity was evaluated with the amino acid response element (AARE) cloned upstream of the firefly luciferase reporter gene (6.1 kb pGL3-2xAARE) [32]. ATF6N/sXBP1 transcriptional activity were evaluated with the endoplasmic reticulum response element (ERSE) also cloned upstream of the firefly luciferase reporter gene (pGL4.39 Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Finally, HIF transactivation capacity was evaluated with a plasmid containing hypoxia response element (HRE) cloned upstream the luciferase reporter gene (pGL4.42 Promega, Charbonnières-les-Bains, France). The plasmid pRL-SV40 expressing renilla reniformis luciferase (RL) reporter gene (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) was used for normalization of the luciferase response.

Freshly isolated AECs were plated at 1.5×10^7 cells in 100 mm dishes. On day 1 after isolation, AECs were washed with PBS, dissociated with trypsin, centrifuged at 800 rpm during 8 min and resuspended in the resuspension buffer R (NEON, Invitrogen, Thermo Fisher, Illkirch cedex, France). In each tip, 4×10^5 cells were mixed with 1 μ g of the plasmid of interest (AARE-luc, ERSE-luc, HRE-luc) and with 0.4 μ g of pRL-SV40. After electroporation, cells were seeded in 24-well plates without antibiotics in supplemented DMEM. On day 3, AECs were exposed to several treatments. At the end of exposition, AECs were lysed and Firefly and Renilla Luciferase assays were undertaken with the Dual-Luciferase Reporter Assay System, as specified by the manufacturer (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). AARE, ERSE and HRE activities were assessed by quantifying the relative light units (RLU) ratio of firefly to RL measured with the Clarity™ luminescence microplate reader (BioTek, Colmar, France).

4.6. Western Blot Analyses

For in vivo study, 30 mg of snap-frozen rat lung biopsies exposed several times (16–48 h) to hypobaric hypoxia or normoxia were washed twice in PBS and then subjected to an Ultra-Turrax® homogenizer (IKA, Staufen, Germany) in protein lysis buffer containing 20 mM Tris base, 150 mM NaCl, 1% Triton X100, 1% SDS, 0.5% deoxycholate and 0.01% cocktail protease inhibitors (Fisher Scientific, Rungis, France).

For in vitro study, AECs exposed to normoxia or hypoxia were washed twice in ice-cold PBS and extracted in lysis buffer containing H₂O, 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% Glycerol, 2% SDS and 0.01%

cocktail protease inhibitors. Cells were submitted to three repeated cycles of sonication and speed freezing in azote. Cell lysates were then centrifuged at 13,000 rpm for 30 min at 4 °C to eliminate debris. Total protein content in lung homogenates or in AECs was determined by BCA assay (Thermo Fisher, Illkirch cedex, France). Samples (30 µg protein per sample in Laemmli buffer containing 5% β-mercapto-ethanol) were then resolved through 7.5% or 12% acrylamide gels, electrically transferred to nitrocellulose membrane, and incubated overnight at 4 °C with 1:2000 anti-mouse ATF4 (sc-200, Santa Cruz Biotechnology, Cliniscience, Nanterre, France) anti-mouse α-SMA (A2547, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), anti-mouse vimentin (V6630, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) or with 1:500 anti-rabbit ATF6α (sc-22799, Santa Cruz Biotechnology, Cliniscience, Nanterre, France), anti-mouse XBP1 (sc-7160, Santa Cruz Biotechnology, Nanterre, France), anti-rabbit HIF-1α (NB100-479, Novus, Biotechne, Lille, France) antibody solution. Next day, the membrane was incubated with appropriate anti-rabbit or mouse HRP-conjugated secondary antibody (Dako, P0448 and P0447 respectively, DAKO, Agilent technologies, Les Ulis Cedex, France). The signals revealed after membrane incubation in SuperSignal™ chemiluminescent HRP substrates (Thermo Fisher, Illkirch cedex, France) were quantified by densitometric analysis using Image Lab™ software (BioRad, Marnes-la-Coquette, France), normalized using quantification of the β-actin or β-tubulin in each lane and expressed in arbitrary units.

4.7. RNA Extraction and Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction

AECs freshly isolated were seeded at 3.5×10^6 cells on 12-well plates. After normoxia or hypoxia and treatments exposition, cells were washed twice with PBS, extracted in ice-cold PBS and centrifuged 5 min at 1500 rpm. For in vivo study, 30 mg of snap-frozen rat lung biopsies exposed 48 h to hypobaric hypoxia or normoxia were washed twice in PBS. TRIzol™ Reagent (Qiagen, Courtaboeuf, France) was added and lung tissue was homogenized with an Ultra-Turrax® system. AECs pellet was also incubated with TRIzol™ Reagent. After vigorous mixing cell and lung homogenates, chloroform was added and centrifuged 15 min at 12,000 g. After transferring aqueous phase, nucleic acids were precipitated by isopropanol and then by 75% ethanol. Extracted ARN were resuspended in 20 µL H₂O and quantified using a BioSpec-Nano spectrophotometer (Life Science, Shimadzu, Marne-la-Vallée, France) at 260 nm. Single-strand cDNAs were synthesized from 0.5 µg of total RNA using maxima first strand cDNA synthesis kit composed by a mixture of oligo (dT) and random hexamer primers according to the manufacturer's instructions (Thermo Fisher, Illkirch cedex, France). Resulting cDNA samples were amplified by quantitative polymerase chain reaction (PCR) with Absolute qPCR SybrGreen Rox mix (Thermo Fisher, Illkirch cedex, France) on StepOne Plus Real-Time PCR system (Applied Biosystem, Life technology, Thermo Fisher, Illkirch cedex, France). Loss of epithelial phenotype was evaluated by measurement of *Tgf-β1*, *Ctgf*, *Twist1* and *Zeb1* transcripts levels. Length and sequence of primers used for quantitative real-time PCR are described in Table 1. All samples were performed in duplicate. Cycle threshold values were normalized to the amplification of the endogenous reference gene β-actin for each transcript. The expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method and fold increase expression were reported to normoxia condition.

Table 1. Primers used for Real-Time Polymerase Chain Reaction.

GENE	Forward Primer	Reverse Primer
<i>Twist1</i> (108 bp)	5'-CTACGCCTTCTCCGTCTGGA-3'	5'-CAATGACATCTAGGTCTCCGGC-3'
<i>Ctgf</i> (100 bp)	5'-CCTAGCTGCCTACCGACTGG-3'	5'-CTTAGAACAGGCGCTCCACT-3'
<i>Tgf-β1</i> (146 bp)	5'-TGAGTGGCTGTCTTTTGACG-3'	5'-TGGGACTGATCCCATTGATT-3'
<i>Zeb1</i> (90 bp)	5'-CCGTAAGTTCAAGTGCACCG-3'	5'-GTGGGACTGCCACTGTGGAT-3'
<i>β-actin</i> (74 bp)	5'-ACCGTGAAAAGATGACCCAGA-3'	5'-CACAGCCTGGATGGCTACGT-3'

4.8. Statistical Analyses

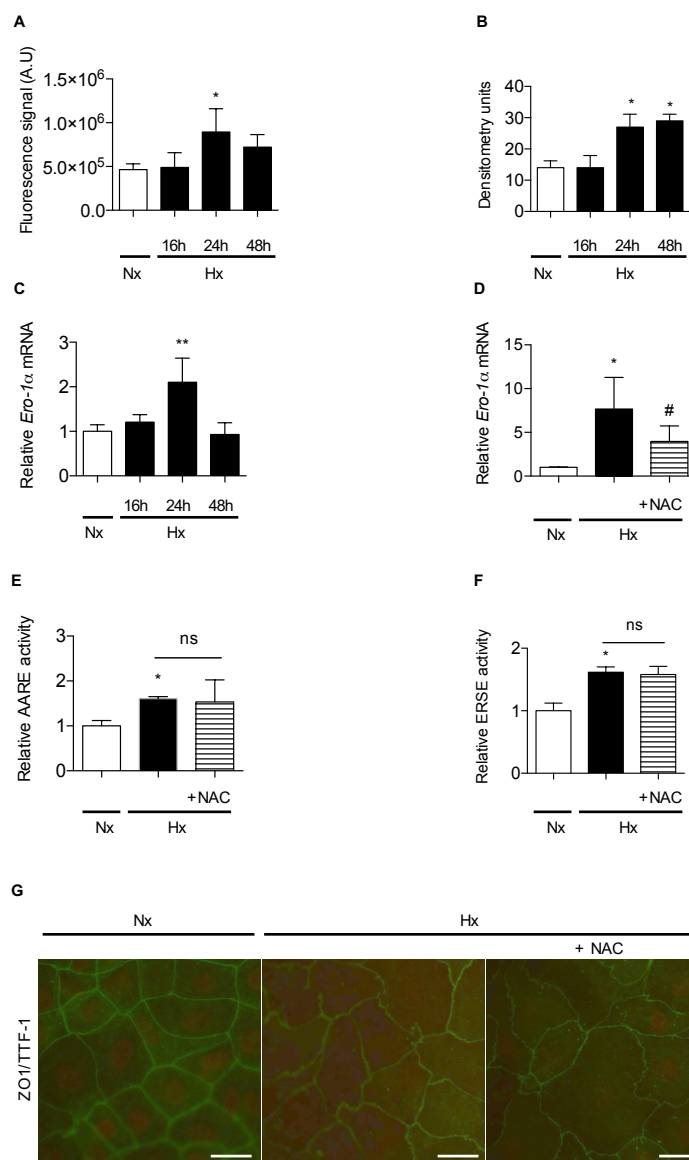
Results were presented as means \pm SD. To evaluate differences between groups, all raw data were submitted to a Mann-Whitney and Kruskal-Wallis one-way analysis of variance followed by a Dunn's multiple comparison tests and graphics were performed by PRISM software (version 6, GraphPad, San Diego, CA, USA). A p value < 0.05 was considered a significant difference between conditions.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at www.mdpi.com/xxx/s1.

SUPPLEMENTAL DATA

ROS production measurement. 30 mg of snap-frozen rat lung biopsies exposed several time (16 h-48 h) to hypobaric hypoxia or normoxia were washed twice in PBS and then subjected to an Ultra-Turrax® homogenizer (IKA) in protein lysis buffer containing 20 mM Tris base, 150 mM NaCl, 1% Triton X100, 1% SDS, 0,5% deoxycholate and 0.01% cocktail protease inhibitors (Thermo Scientific). Samples of 40 μ g proteins were incubated with 10 μ M 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) (Molecular Probes) for 90 min at 37°C in the dark. The presence of oxidative stress was evaluated by the conversion of non-fluorescent 2,7-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCFDA) to fluorescent 2,7-dichlorofluorescein (DCF) by ROS present within the cells. Fluorescence was measured by a TriStar2 LB942 microplate reader (Berthold Technologies). Values of fluorescence intensity were reported.

AOPP level quantification. Lung proteins were extracted from rat exposed several time (16 h-48 h) to hypobaric hypoxia or normoxia. Samples of 10 μ g proteins were incubated in a 96 well plates with the chloramine reaction initiator (CellBiolabs). After 5 min, the reaction was stop and the absorbance was read at 340 nm. The concentration of advanced oxidized protein products was reported (mmol/L).



Supplemental figure 1. Oxidative unbalance in ER is not critical for UPR pathways activation in hypoxic AECs. (A-C) Lungs of rats stabulated in normoxia (Nx) (21 % O₂) or exposed to hypoxia (Hx) (8 % FiO₂-like) during 16 h, 24 h or 48 h were isolated and used for oxidative state measurements and RT-qPCR analyses. ROS level (A) and advanced oxidation protein products and Ros production (B) were evaluated in lung homogenates. (C) mRNA transcript expression levels of *Ero-1α* in lungs homogenates of rats exposed 16 h, 24 h or 48 h to hypoxia were quantified by qRT-PCR using 2^{-ΔΔCT} method and reported to the normoxic condition. n= 5 rats for each group. (D-G) Isolated primary rat AECs were cultured in normoxia (Nx) (21 % O₂) or hypoxia (Hx) (1.5% O₂) during various periods in the presence or absence of 5 mM N-acetyl-L-cystein (NAC). (D) mRNA expression levels of *Ero-1α* were quantified by qRT-PCR using 2^{-ΔΔCT} method in rat AECs cultured in the presence or absence of 5 mM NAC and exposed 6 h to normoxia or hypoxia. mRNA levels under hypoxic condition were reported to the normoxic condition. (E) Primary rat AECs transfected with plasmid coding for luciferase reporter activity of amino acid response element (AARE: *ie* ATF4-luc) or (F) endoplasmic reticulum stress element (ERSE: *ie* ATF6/XBP-1-luc), were treated or not with 5 mM NAC and exposed 6 h in hypoxic condition. Luciferase activity corresponding to the transcriptional capacity of ATF4 (E) or (F) ATF6N was measured. n = 4 experiments were performed. Raw data were submitted to a Mann-Whitney test or a Kruskal-Wallis one-way analysis of variance. * and ** indicate a significant difference as compared with normoxic condition with a P<0.05 and P<0.01, respectively. ns indicate a non-significant difference as compared with hypoxic condition. (G) ZO-1 (green) and TTF1 (red) immunostaining were performed on rat AECs cultured

on filter and exposed for 6-days to hypoxia in the presence or absence of 5 mM NAC. A representative picture of at least n=4 independent experiment for each condition has been presented.

Author Contributions: conceptualization, E.B., E.D., Y.U., and C.P.; methodology and validation: E.B., E.D., A.S., D.M. and T.G.; writing—review and editing, E.B., E.D., Y.U. and C.P.; supervision, E.B. and C.P.; funding acquisition, E.B. and C.P.

Funding: This research was funded by the Chancellerie des Universités de Paris - Fondation du Legs Poix, the « Bonus Qualité Recherche » Université Paris 13 and the « Fonds de Recherche en Santé Respiratoire ».

Acknowledgments: We thank Mme Rabab Label, Mr Geoffrey Tremblais for their excellent technical assistance and Pr. Pierre Fafournoux for generous gift of pGL3-2xAARE plasmid.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

4-PBA	4-phenylbutyrate
AARE	Amino-acid responsive element
AEC	Alveolar epithelial cell
ATF	Activating transcription factor
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N,N-tetraacetic acid
ER	Endoplasmic reticulum
ERSE	ER stress element
HIF	Hypoxia inducible factor
HRE	Hypoxia responsive element
IPF	Idiopathic pulmonary fibrosis
IRE-1	Inositol-requiring endonuclease-1
mRNA	messenger RNA
PERK	PKR-ER like kinase
RL	Renilla reniformis luciferase
TTF1	Thyroid transcription factor 1
UPR	Unfolded protein response
YC-1	5'-hydroxymethyl-2'-furyl-1-benzyl indazole
ZO-1	Zonula occludens 1

References

1. Selman, M.; King, T.E.; Pardo, A.; American Thoracic Society; European Respiratory Society; American College of Chest Physicians. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Prevailing and Evolving Hypotheses about Its Pathogenesis and Implications for Therapy. *Ann. Intern. Med.* 2001, *134*, 136–151.
2. Goldmann, T.; Zissel, G.; Watz, H.; Drömann, D.; Reck, M.; Kugler, C.; Rabe, K.F.; Marwitz, S. Human Alveolar Epithelial Cells Type II Are Capable of TGFβ-Dependent Epithelial-Mesenchymal-Transition and Collagen-Synthesis. *Respir. Res.* 2018, *19*, 138, doi:10.1186/s12931-018-0841-9.
3. Kim; Kugler, M.C.; Wolters, P.J.; Robillard, L.; Galvez, M.G.; Brumwell, A.N.; Sheppard, D.; Chapman, H.A. Alveolar Epithelial Cell Mesenchymal Transition Develops in Vivo during Pulmonary Fibrosis and Is Regulated by the Extracellular Matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, *103*, 13180–13185, doi:10.1073/pnas.0605669103.
4. Willis, B.C.; Liebler, J.M.; Luby-Phelps, K.; Nicholson, A.G.; Crandall, E.D.; du Bois, R.M.; Borok, Z. Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition in Alveolar Epithelial Cells by Transforming Growth Factor-Beta1: Potential Role in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Pathol.* 2005, *166*, 1321–1332.
5. Gora, S.; Maouche, S.; Atout, R.; Wanherdrick, K.; Lambeau, G.; Cambien, F.; Ninio, E.; Karabina, S.-A. Phospholipolyzed LDL Induces an Inflammatory Response in Endothelial Cells through Endoplasmic Reticulum Stress Signaling. *FASEB J.* 2010, *24*, 3284–3297, doi:10.1096/fj.09-146852.

6. Guleria, A.; Singh, V.; Chandna, S. An Attenuated Calcium Signaling and Pre-Emptive Activation of UPR Pathway Together Contribute to ER and Calcium Stress Resilience of Lepidopteran Insect Cells. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Gen. Subj.* 2017, *1861*, 504–521, doi:10.1016/j.bbagen.2016.11.035.
7. Korfei, M.; Ruppert, C.; Mahavadi, P.; Henneke, I.; Markart, P.; Koch, M.; Lang, G.; Fink, L.; Bohle, R.-M.; Seeger, W.; et al. Epithelial Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Sporadic Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2008, *178*, 838–846, doi:10.1164/rccm.200802-313OC.
8. Lawson, W.E.; Crossno, P.F.; Polosukhin, V.V.; Roldan, J.; Cheng, D.-S.; Lane, K.B.; Blackwell, T.R.; Xu, C.; Markin, C.; Ware, L.B.; et al. Endoplasmic Reticulum Stress in Alveolar Epithelial Cells Is Prominent in IPF: Association with Altered Surfactant Protein Processing and Herpesvirus Infection. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2008, *294*, L1119–L1126, doi:10.1152/ajplung.00382.2007.
9. Burman, A.; Kropski, J.A.; Calvi, C.L.; Serezani, A.P.; Pascoalino, B.D.; Han, W.; Sherrill, T.; Gleaves, L.; Lawson, W.E.; Young, L.R.; et al. Localized Hypoxia Links ER Stress to Lung Fibrosis through Induction of C/EBP Homologous Protein. *JCI Insight* 2018, *3*, doi:10.1172/jci.insight.99543.
10. Delbrel, E.; Soumare, A.; Naguez, A.; Label, R.; Bernard, O.; Bruhat, A.; Fafournoux, P.; Tremblais, G.; Marchant, D.; Gille, T.; et al. HIF-1 α Triggers ER Stress and CHOP-Mediated Apoptosis in Alveolar Epithelial Cells, a Key Event in Pulmonary Fibrosis. *Sci. Rep.* 2018, *8*, doi:10.1038/s41598-018-36063-2.
11. Guo, L.; Xu, J.; Liu, L.; Liu, S.; Zhu, R. Hypoxia-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition Is Involved in Bleomycin-Induced Lung Fibrosis. *BioMed Res. Int.* 2015, *2015*, 1–10, doi:10.1155/2015/232791.
12. Tzouveleakis, A.; Harokopos, V.; Paparountas, T.; Oikonomou, N.; Chatziioannou, A.; Vilaras, G.; Tsiambas, E.; Karameris, A.; Bouros, D.; Aidinis, V. Comparative Expression Profiling in Pulmonary Fibrosis Suggests a Role of Hypoxia-Inducible Factor-1 α in Disease Pathogenesis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007, *176*, 1108–1119, doi:10.1164/rccm.200705-683OC.
13. Zhang, W.; Shi, X.; Peng, Y.; Wu, M.; Zhang, P.; Xie, R.; Wu, Y.; Yan, Q.; Liu, S.; Wang, J. HIF-1 α Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis through Direct Regulation of ZEB1 in Colorectal Cancer. *PLoS ONE* 2015, *10*, e0129603, doi:10.1371/journal.pone.0129603.
14. Mingyuan, X.; Qianqian, P.; Shengquan, X.; Chenyi, Y.; Rui, L.; Yichen, S.; Jinghong, X. Hypoxia-Inducible Factor-1 α Activates Transforming Growth Factor-B1/Smad Signaling and Increases Collagen Deposition in Dermal Fibroblasts. *Oncotarget* 2017, *9*, 3188–3197, doi:10.18632/oncotarget.23225.
15. Gusarova, G.A.; Trejo, H.E.; Dada, L.A.; Briva, A.; Welch, L.C.; Hamanaka, R.B.; Mutlu, G.M.; Chandel, N.S.; Prakriya, M.; Sznajder, J.I. Hypoxia Leads to Na,K-ATPase Downregulation via Ca²⁺ Release-Activated Ca²⁺ Channels and AMPK Activation. *Mol. Cell. Biol.* 2011, *31*, 3546–3556, doi:10.1128/MCB.05114-11.
16. Davis, F.M.; Azimi, I.; Faville, R.A.; Peters, A.A.; Jalink, K.; Putney, J.W.; Goodhill, G.J.; Thompson, E.W.; Roberts-Thomson, S.J.; Monteith, G.R. Induction of Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT) in Breast Cancer Cells Is Calcium Signal Dependent. *Oncogene* 2014, *33*, 2307–2316, doi:10.1038/onc.2013.187.
17. Zhong, Q.; Zhou, B.; Ann, D.K.; Minoo, P.; Liu, Y.; Banfalvi, A.; Krishnaveni, M.S.; Dubourd, M.; Demaio, L.; Willis, B.C.; et al. Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Epithelial–Mesenchymal Transition of Alveolar Epithelial Cells: Effects of Misfolded Surfactant Protein. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2011, *45*, 498–509, doi:10.1165/rcmb.2010-0347OC.
18. Uzunhan, Y.; Bernard, O.; Marchant, D.; Dard, N.; Vanneaux, V.; Larghero, J.; Gille, T.; Clerici, C.; Valeyre, D.; Nunes, H.; et al. Mesenchymal Stem Cells Protect from Hypoxia-Induced Alveolar Epithelial-Mesenchymal Transition. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2016, *310*, L439–L451, doi:10.1152/ajplung.00117.2015.
19. Williams, J.A.; Hou, Y.; Ni, H.-M.; Ding, W.-X. Role of Intracellular Calcium in Proteasome Inhibitor-Induced Endoplasmic Reticulum Stress, Autophagy and Cell Death. *Pharm. Res.* 2013, *30*, 2279–2289, doi:10.1007/s11095-013-1139-8.
20. Planes, C.; Friedlander, G.; Loiseau, A.; Amiel, C.; Clerici, C. Inhibition of Na-K-ATPase Activity after Prolonged Hypoxia in an Alveolar Epithelial Cell Line. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 1996, *271*, L70–L78, doi:10.1152/ajplung.1996.271.1.L70.
21. Zhou, G.; Dada, L.A.; Wu, M.; Kelly, A.; Trejo, H.; Zhou, Q.; Varga, J.; Sznajder, J.I. Hypoxia-Induced Alveolar Epithelial-Mesenchymal Transition Requires Mitochondrial ROS and Hypoxia-Inducible Factor 1. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2009, *297*, L1120–L1130, doi:10.1152/ajplung.00007.2009.

22. Tanjore, H.; Xu, X.C.; Polosukhin, V.V.; Degryse, A.L.; Li, B.; Han, W.; Sherrill, T.P.; Plieth, D.; Neilson, E.G.; Blackwell, T.S.; et al. Contribution of Epithelial-Derived Fibroblasts to Bleomycin-Induced Lung Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2009, *180*, 657–665, doi:10.1164/rccm.200903-0322OC.
23. Chen, X.; Iliopoulos, D.; Zhang, Q.; Tang, Q.; Greenblatt, M.B.; Hatzia Apostolou, M.; Lim, E.; Tam, W.L.; Ni, M.; Chen, Y.; et al. XBP1 Promotes Triple-Negative Breast Cancer by Controlling the HIF1 α Pathway. *Nature* 2014, *508*, 103–107, doi:10.1038/nature13119.
24. Li, H.; Chen, X.; Gao, Y.; Wu, J.; Zeng, F.; Song, F. XBP1 Induces Snail Expression to Promote Epithelial- to-Mesenchymal Transition and Invasion of Breast Cancer Cells. *Cell. Signal.* 2015, *27*, 82–89, doi:10.1016/j.cellsig.2014.09.018.
25. Banerjee, A.; Ahmed, H.; Yang, P.; Czinn, S.J.; Blanchard, T.G. Endoplasmic Reticulum Stress and IRE-1 Signaling Cause Apoptosis in Colon Cancer Cells in Response to Andrographolide Treatment. *Oncotarget* 2016, *7*, doi:10.18632/oncotarget.9180.
26. Mo, X.-T.; Zhou, W.-C.; Cui, W.-H.; Li, D.-L.; Li, L.-C.; Xu, L.; Zhao, P.; Gao, J. Inositol-Requiring Protein 1 –X-Box-Binding Protein 1 Pathway Promotes Epithelial–Mesenchymal Transition via Mediating Snail Expression in Pulmonary Fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2015, *65*, 230–238, doi:10.1016/j.biocel.2015.06.006.
27. Bhattacharya, A.; Kumar, J.; Hermanson, K.; Sun, Y.; Qureshi, H.; Perley, D.; Scheidegger, A.; Singh, B.B.; Dhasarathy, A. The Calcium Channel Proteins ORAI3 and STIM1 Mediate TGF- β 2; Induced *Snail* Expression. *Oncotarget* 2018, *9*, doi:10.18632/oncotarget.25672.
28. Krebs, J.; Agellon, L.B.; Michalak, M. Ca²⁺ Homeostasis and Endoplasmic Reticulum (ER) Stress: An Integrated View of Calcium Signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015, *460*, 114–121, doi:10.1016/j.bbrc.2015.02.004.
29. Belaidi, E.; Thomas, A.; Bourdier, G.; Moulin, S.; Lemarié, E.; Levy, P.; Pépin, J.-L.; Korichneva, I.; Godin-Ribuot, D.; Arnaud, C. Endoplasmic Reticulum Stress as a Novel Inducer of Hypoxia Inducible Factor-1 Activity: Its Role in the Susceptibility to Myocardial Ischemia-Reperfusion Induced by Chronic Intermittent Hypoxia. *Int. J. Cardiol.* 2016, *210*, 45–53, doi:10.1016/j.ijcard.2016.02.096.
30. Bernard, O.; Jeny, F.; Uzunhan, Y.; Dondi, E.; Terfous, R.; Label, R.; Sutton, A.; Larghero, J.; Vanneaux, V.; Nunes, H.; et al. Mesenchymal Stem Cells Reduce Hypoxia-Induced Apoptosis in Alveolar Epithelial Cells by Modulating HIF and ROS Hypoxic Signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2018, *314*, L360–L371, doi:10.1152/ajplung.00153.2017.
31. Migneault, F.; Boncoeur, É.; Morneau, F.; Pascariu, M.; Dagenais, A.; Berthiaume, Y. Cycloheximide and Lipopolysaccharide Downregulate AENaC mRNA via Different Mechanisms in Alveolar Epithelial Cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2013, *305*, L747–L755, doi:10.1152/ajplung.00023.2013.
32. Chaveroux, C.; Sarcinelli, C.; Barbet, V.; Belfeki, S.; Barthelaix, A.; Ferraro-Peyret, C.; Lebecque, S.; Renno, T.; Bruhat, A.; Fafournoux, P.; et al. Nutrient Shortage Triggers the Hexosamine Biosynthetic Pathway via the GCN2-ATF4 Signalling Pathway. *Sci. Rep.* 2016, *6*, doi:10.1038/srep27278.



© 2018 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

2. Résumé des résultats

L'exposition de rats à 72h d'hypoxie induit, dans le poumon total, une augmentation de l'expression des marqueurs mésenchymateux : vimentine et α -SMA. Une étude par immunohistochimie révèle que l'expression de ces marqueurs est localisée dans les zones alvéolaires, régions dans lesquelles l'expression du marqueur épithélial TTF1 est diminuée. L'exposition à l'hypoxie induit également l'expression des acteurs de l'UPR, ATF4, ATF6N et XBP1 épissé tel qu'observé par western blot sur le poumon total.

L'implication de l'activation des voies de l'UPR sur le processus de TEM a par la suite été étudiée *in vitro*. L'utilisation de l'inhibiteur du stress du RE, le 4-PBA, prévient l'effet de l'hypoxie sur l'induction de l'expression des gènes pro-TEM *Tgf- β 1*, *Zeb1* et *Twist1*. De plus, cette drogue modère la diminution d'expression de la protéine de ZO1 et du marqueur épithélial TTF1 observé par immunofluorescence à 6 jours d'hypoxie.

L'utilisation d'un chélateur de calcium, le BAPTA, limite l'induction des voies de l'UPR, ainsi que les effets de l'hypoxie sur l'altération d'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux des PII en réponse à l'hypoxie.

Les traitements au 4-PBA et au BAPTA en hypoxie restreignent la stabilisation du facteur HIF-1.

L'ensemble de ces données présente l'implication des voies de l'UPR dans l'induction de la TEM des PII en réponse à l'hypoxie et proposent des mécanismes moléculaires impliqués dans cette régulation.

3. Discussion

a) Limite du modèle utilisé *in vivo*

Notre étude *in vivo* montre une augmentation d'expression de marqueurs mésenchymateux et une diminution du marqueur épithélial TTF1 dans les poumons de rat exposés à une hypoxie de 3 jours. Des résultats similaires ont été observés dans les cellules épithéliales de tubule rénal exposées à 5 jours d'hypoxie (*Higgins et al., 2007*). Compte tenu du faible nombre de cellules en apoptose dans notre modèle *in vivo* (article 1), il est peu discutable que la diminution de l'expression de TTF1 soit imputable à une mort de PII.

L'augmentation d'expression de l' α -SMA est observée par western blot dans les poumons de rats exposés à 3 jours et est localisée par immunohistochimie dans les zones alvéolaires. Malgré la technique de co-marquage TTF1/ α -SMA que nous avons réalisée, il n'a pas été possible, avec le

type de microscopie utilisée, de déterminer avec certitude si une même cellule exprime le marqueur mésenchymateux α -SMA et le marqueur épithélial TTF1. Outre l'éventuelle expression de l' α -SMA par les cellules alvéolaires, il est à noter que cette augmentation d'expression du marqueur mésenchymateux pourrait être liée à la présence accrue de fibroblastes et/ou de myofibroblastes dans les cloisons alvéolaires. En effet, l'hypoxie conduit à la prolifération des fibroblastes (Mizuno *et al.*, 2009) mais également à leur différenciation en myofibroblastes (Gao *et al.*, 2014). Une autre source de cellules mésenchymateuses pourrait être envisagée dans notre modèle, les fibrocytes recrutés depuis le compartiment sanguin, qui peuvent se différencier en fibroblastes. En effet, dans des souris soumises à une hypoxie, ces progéniteurs de cellules mésenchymateuses sont mobilisés depuis la circulation systémique vers la paroi des vaisseaux sanguins et participent à l'augmentation de fibroblastes (Frid *et al.*, 2006; Nikam *et al.*, 2010).

b) Effet d'un stress du RE sur l'induction de la TEM en réponse à l'hypoxie

i. Les voies de l'UPR régulent la TEM des pneumocytes de type II en hypoxie

Dans notre étude *in vitro*, la TEM des PII est observée à 6 jours d'hypoxie par la diminution de l'expression de TTF1 et la modification de morphologie des cellules étudiée par l'expression et la localisation du marqueur des jonctions serrées ZO1. Ces données avaient précédemment été rapportées par le laboratoire (Uzunhan *et al.*, 2016) et un autre groupe (Zhou *et al.*, 2009). Nous avons également observé l'expression des facteurs de transcription pro-TEM *Zeb1*, *Twist1* et *Tgf- β 1* à 48 h d'hypoxie (Uzunhan *et al.*, 2016). Ces résultats sont confortés par l'observation *in vivo* de l'augmentation de l'expression des gènes codant les facteurs de transcription pro-TEM ZEB1, TWIST1 et TGF- β 1.

Dans notre étude, nous démontrons l'implication du stress du RE sur l'induction de l'expression des facteurs de transcription pro-TEM *Zeb1*, *Twist1* et *Tgf- β 1* mais également sur la modulation d'expression de TTF1 et de ZO1. En effet, l'utilisation de l'inhibiteur des voies de l'UPR, le 4-PBA, prévient l'effet de l'hypoxie sur chacun de ses acteurs. Cependant, il est important de noter que l'effet de cette drogue sur la régulation des marqueurs de la TEM, pourrait être indépendant de la modulation des voies de l'UPR. En effet, le 4-PBA est un inhibiteur des histones désacétylase (HDAC). Or, dans de nombreuses études, le rôle de différents inhibiteurs de HDAC ont été décrits comme régulant directement l'expression génique des facteurs pro-TEM par modifications épigénétiques (Peinado *et al.*, 2004; Lei *et al.*, 2010). Afin de vérifier que les voies

de l'UPR peuvent tout de même participer à la régulation d'expression de *Zeb1*, *Twist1* et *Tgf-β1*, les PII ont été traités avec le salubrinal, inhibiteur de la voie d'activation d'ATF4 puis exposés à une hypoxie. *Ad instar* le 4-PBA, le salubrinal prévient l'expression des facteurs pro-TEM en hypoxie confortant notre hypothèse initiale. Le TUDCA pourrait également être utilisé pour confirmer l'implication du stress du RE dans la TEM des PII en réponse à l'hypoxie.

In vivo et *in vitro*, l'expression de XBP1 épissée est tardive. L'implication de ce facteur dans la survie cellulaire a été rapportée dans d'autres conditions que l'hypoxie, de même que sa régulation de la TEM. En effet, dans des cellules cancéreuses, XBP1 induit l'expression de *Snail1* permettant aux cellules d'acquérir des propriétés invasives (*Li et al., 2015*). Par ailleurs, dans un modèle d'accumulation d'une protéine glycosylée dans le RE, l'induction de la voie IRE1/XBP1 est responsable de la TEM d'une lignée de cellules embryonnaires humaines par la régulation des facteurs *Snail1*, *Twist1* et *Zeb1* (*Cuevas et al., 2017*). De manière intéressante, la TEM induite par le TGF-β sur des lignées alvéolaires est limitée par une sous expression de *XBP1* soulignant le rôle majeur de cette voie de l'UPR dans l'induction de la TEM (*Mo et al., 2015*).

Afin de compléter l'étude sur l'acquisition de propriétés de cellules mésenchymateuse, la migration des PII pourrait être étudié dans le contexte d'hypoxie. *In vitro*, des cellules cultivées sur chambre de Boyden permettrait d'évaluer les capacités de motilité des cellules en hypoxie. Par ailleurs, l'expression de métalloprotéase (MMP) par les PII, enzyme nécessaire à la migration des cellules pourrait également être analysée en condition d'hypoxie par western blot mais également par zymographie.

L'implication des voies de l'UPR ayant été désignée dans l'établissement de propriétés contractiles de cellules en condition hypoxique ou non hypoxique (*Gipson et al., 1984; Nakamura et al., 2013; Nagelkerke et al., 2013*), les mécanismes moléculaires reliant le stress du RE et les propriétés migratoires des PII en hypoxie pourraient également être étudiés.

Enfin, notre étude évalue seulement la régulation génique du facteur pro-TEM, le TGF-β1. Il serait intéressant de vérifier si la sécrétion du TGF-β1 par les PII en hypoxie (*Uzunhan et al., 2016*) est modulée lors d'un traitement au 4-PBA.

ii. Le calcium régule l'activation des voies de l'UPR et la TEM des pneumocytes de type II en hypoxie

Dans de nombreux types cellulaires, l'hypoxie conduit à une modulation de la concentration calcique cytosolique. Cet effet repose sur l'activation de canaux calciques localisés au sein de la membrane plasmique, mais également dans le RE. Dans les pneumocytes de type II, l'hypoxie induit l'activation de récepteur à l'IP₃ et des récepteurs à la ryanodine conduisant à la libération de calcium du RE vers le cytosol (*Gusarova et al., 2011*).

Dans notre modèle cellulaire, l'utilisation du chélateur de calcium, le BAPTA, inhibe les voies de l'UPR des PII en hypoxie. Ces résultats ont précédemment été observés par *Gora et al.* dans des cellules endothéliales dans un contexte inflammatoire (*Gora et al., 2010*). L'effet d'une chélation de calcium sur l'inhibition des voies de l'UPR pourrait s'expliquer par une diminution de la traduction des protéines (*Chin et al., 1987; Perkins et al., 1997*) et donc à une restriction de l'accumulation de protéines au sein de RE.

L'utilisation du BAPTA limite la TEM de PII exposés à l'hypoxie. Ce résultat est en accord avec les travaux de *Davis et al.* démontrant, dans les cellules mammaires cancéreuses, l'effet inhibiteur de l'utilisation du BAPTA sur la signalisation calcique en réponse à l'hypoxie ainsi que la TEM (*Davis et al., 2014*). Cependant, il est nécessaire de vérifier par des techniques de mesures calciques, 1) la variation de la concentration calcique intracellulaire par l'hypoxie, 2) l'effet du BAPTA sur l'inhibition de cette signalisation calcique.

c) Rôle du stress du RE sur la stabilisation de HIF-1 α

Dans notre étude sur les PII exposés à l'hypoxie, l'inhibition du stress du RE par le 4-PBA prévient partiellement l'expression du facteur HIF-1 α suggérant un lien entre l'activation des voies de l'UPR et la stabilisation de HIF-1. Ces résultats ont été observés dans un modèle de cellules cardiaques exposées à une hypoxie intermittente préalablement traitées à un autre inhibiteur des voies de l'UPR, le TUDCA (*Belaidi et al., 2016*).

Cependant, dans la littérature, le traitement de différents types cellulaires par les inducteurs des voies de l'UPR, la tunicamycine et la thapsigargine, n'induit pas de stabilisation de la protéine HIF-1 α (*Brockmeier et al., 2011*) mais peuvent induire une augmentation de sa transcription (*Werno et al., 2008*). Lors d'une hypoxie, l'ajout de thapsigargine dans le milieu de culture exacerbe la stabilisation du facteur de transcription (*Brockmeier et al., 2011*). L'ensemble de nos données confrontées à celles de la littérature suggèrent qu'en hypoxie, la régulation

transcriptionnelle du gène codant HIF-1 α par les voies de l'UPR est nécessaire à sa stabilisation. Un élément d'explication de l'effet du stress du RE sur le maintien de l'expression de HIF-1 pourrait être la régulation post-traductionnelle. Il a par exemple été rapporté, dans des cellules endothéliales exposées à une hypoxie, que les voies de l'UPR semblent impliquées dans la stabilisation de HIF-1 en modulant son état de phosphorylation (*Pereira et al., 2014*). Cependant, des études complémentaires sont nécessaires pour établir la ou les kinases impliquées et la voie de l'UPR responsable de l'activation de ces dernières.

Par ailleurs, dans de nombreux types cellulaires, la stabilisation du facteur HIF-1 en hypoxie est régulée par les ROS mitochondriaux (*Chandel et al., 2000*). Les patients atteints de FPI présentent un état oxydatif dérégulé dans les alvéoles pulmonaires (*Kuwano et al., 2003*). Cet état est en lien avec la production de ROS par les cellules inflammatoires (*Cantin et al., 1987*) mais également les fibroblastes et les PII. L'H₂O₂ produit par les cellules environnantes des PII peut diffuser à travers leur membrane et entraîner des modifications phénotypiques de ces cellules (*Waghray et al., 2005*). Paradoxalement, des études cliniques ont révélé que les pneumocytes de patients produisent une quantité importante de molécules antioxydantes suggérant des mécanismes de défense dépassés (*Markart et al., 2009; Schamberger et al., 2016; Lakari et al., 2000*). Sachant qu'un stress du RE peut participer à la production de ROS mitochondriaux, notamment par l'activité réduite de ERO-1, il serait envisageable 1) d'évaluer la production de ROS dans le RE par une sonde permettant de visualiser l'état oxydo-réducteur au sein du RE (*Birk et al., 2013*), 2) de vérifier l'impact des ROS du RE sur l'état oxydo-réducteur de la cellule.

En conclusion, dans cette étude nous avons mis en évidence le rôle des voies de l'UPR dans l'induction de la TEM des pneumocytes de type II en réponse à une hypoxie. Ces résultats confirment le rôle central du stress du RE dans la modulation des voies hypoxiques et plus particulièrement dans la stabilisation de HIF-1.

CONCLUSION GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

Nos travaux ont démontré par différentes approches *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro* que l'hypoxie induit les voies de l'UPR dans des pneumocytes de type II (PII), favorisant ainsi l'apoptose et à la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) de ces cellules.

Nos études ont caractérisé *in vivo* dans les poumons de rat et *in vitro* dans les PII primaires de rat, l'effet de l'hypoxie sur l'induction des voies de l'UPR, activés lors d'un stress du RE. L'activation rapide des voies de l'UPR dans les PII en réponse à l'hypoxie semblent dépendre du facteur HIF-1, facteur dont la présence est largement décrite dans les PII des patients atteints de FPI. Bien que les cinétiques d'apparition de l'apoptose (jusqu'à 24h) et de la TEM (à partir de 48h) des pneumocytes soient différentes en hypoxie, l'inhibition des voies de l'UPR par le 4-PBA *in vitro* prévient ces deux effets. Ces données suggèrent une multiplicité des mécanismes régulés par les voies de l'UPR et subodorent que le stress du RE occupe une position centrale dans la pathogenèse de la FPI.

Par ailleurs, nos travaux soulignent l'importance du facteur CHOP induit par les voies de l'UPR et le facteur HIF-1 dans l'apoptose des PII en hypoxie. Le rôle de CHOP dans le développement de la fibrose induite à la bléomycine chez l'animal a été rapporté, cependant les études portaient sur l'implication de ce facteur dans la régulation des macrophages alvéolaires, cellule exprimant fortement HIF-1 (Ayaub *et al.*, 2016; Yao *et al.*, 2016). Nos travaux *in vitro* suggèrent ainsi que l'expression de CHOP associée à celle de HIF-1 dans les PII de patients atteints de FPI joue un rôle crucial dans le devenir des cellules.

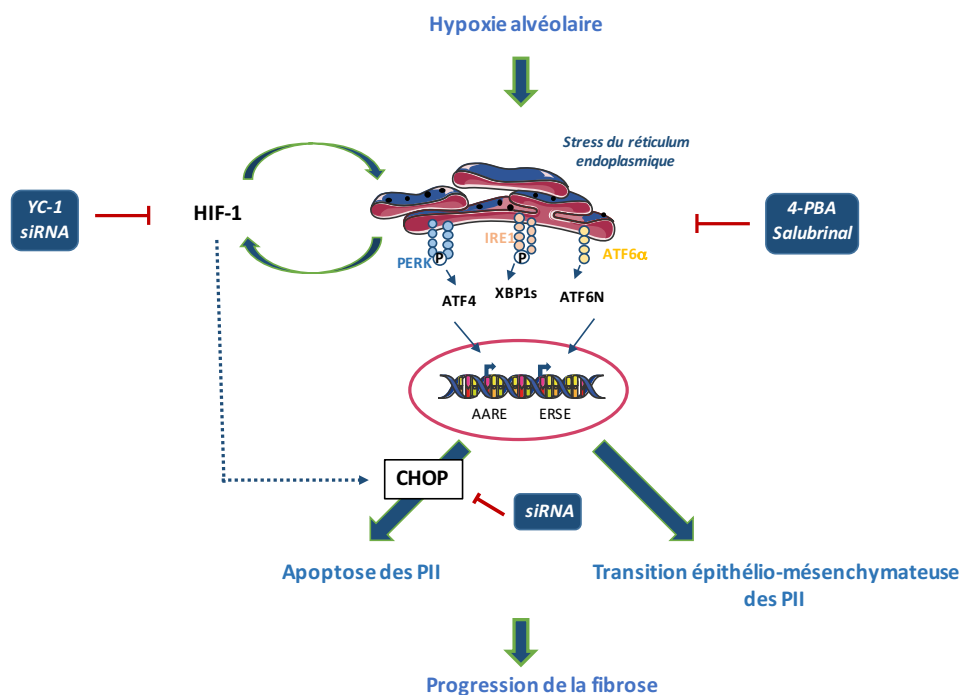


Figure 43. Schéma récapitulatif des travaux de recherche. Des stratégies pharmacologiques et de sous-expressions géniques ont mis en évidence le rôle du stress du RE dans l'apoptose et la transition épithélio-mésenchymateuses des pneumocytes de type II (PII) en hypoxie, le rôle de CHOP dans l'apoptose, ainsi que l'interconnexion des voies de l'UPR et de HIF-1.

L'hyperplasie des pneumocytes de type II (PII), qui se manifeste par une prolifération cellulaire excessive est un autre phénomène de dysfonction observé chez les patients atteints de FPI qui pourrait être la cible de l'hypoxie alvéolaire. Ces PII hyperplasiques, cellules à fort pouvoir de sécrétion de TGF- β , sont apposées sur les foyers fibroblastiques, zone où la PO_2 doit être relativement faible (Khalil et al., 1991; Qunn et al., 2002). Une phase d'hypertrophie précède l'hyperplasie des PII. De façon intéressante, l'hypertrophie et l'hyperplasie de cellules neuro-endocriniennes du poumon de souris déficientes pour les prolyl-hydroxylases sont médiées par le facteur HIF-1 (Pan et al., 2016). Par ailleurs, dans un modèle murin d'asthme, l'hypertrophie et l'hyperplasie des cellules bronchiques induites en réponse au TGF- β impliquent l'induction d'un stress du RE (Park et al., 2015). Un protocole expérimental pourrait donc être proposé afin de vérifier si l'hypoxie entraîne une hyperplasie et une hypertrophie des PII et d'étudier l'éventuelle implication de HIF-1 et des voies de l'UPR dans ce contexte.

Il est important de rappeler que le facteur HIF-1 n'est pas seulement exprimé dans un environnement hypoxique mais peut être régulé par un stress oxydant ou l'activation de kinases favorisant sa stabilisation. Actuellement, la diminution de la pression partielle en oxygène dans les alvéoles des patients n'a jamais été mesurée chez les patients atteints de FPI. Alors que nos

résultats supposent que la stabilisation de HIF-1 est antérieure à l'activation des voies de l'UPR en hypoxie, il n'est pas à exclure que dans un contexte de stress oxydant tel que décrit dans les PII en hypoxie (Bernard et al., 2018), l'induction du stress du RE pourrait prévaloir la stabilisation de HIF-1, notamment par la modulation de la signalisation calcique (Hui et al., 2006).

Le suivi de l'expression d'ATF4, ATF6N ou HIF-1 par la technique d'expression du gène rapporteur de la luciférase pourrait être réalisé dans des souris transgéniques exposées à un protocole de fibrose pulmonaire induite permettrait de définir une cinétique d'activation des différents facteurs. La technique d'imagerie bioluminescente en temps réel permettrait de déterminer quel phénomène, entre l'activation des voies de l'UPR et la stabilisation du facteur HIF-1, prévaut sur l'autre.

Par ailleurs, ce modèle transgénique pourrait être utilisé afin d'identifier le type cellulaire principalement impliqué dans l'induction de ces voies. En effet, alors que les pneumocytes expriment HIF-1, les fibroblastes expriment préférentiellement HIF-2 (Senavirathna et al., 2018). HIF-1 est largement décrit dans le processus d'apoptose, alors que HIF-2 a un rôle plutôt prolifératif et angiogénique. Ces observations suggèrent que la résistance à l'apoptose de fibroblastes pourraient être liée à l'absence d'expression de HIF-1. De façon intéressante, Baek et al. mettent en évidence sur des coupes de poumon de patients de FPI que les fibroblastes sous-jacents aux pneumocytes hyperplasiques, ainsi que les pneumocytes hyperplasiques eux-mêmes, présentent une expression accrue de GRP78 à l'instar des pneumocytes (Baek et al., 2012). De manière intéressante, le 4-PBA et donc le stress du RE permet de limiter l'activation des fibroblastes en réponse au TGF- β .

Le 4-PBA est une drogue autorisée par l'administration des médicaments états-unienne et européenne. En France, le médicament est le Phéburane[®] (Lucane Pharma, France), qui est prescrit dans les désordres du cycle de l'urée. Actuellement, parmi les 52 essais cliniques testant le 4-PBA, la cirrhose du foie est la seule maladie fibrosante ayant fait l'objet d'un essai clinique (Ghabril et al., 2013). Malgré la bonne tolérance au traitement, aucun travail n'a récemment été publié concernant son efficacité. Compte tenu des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* révélant l'effet protecteur du 4-PBA sur les processus pro-fibrosants dans le poumon, un essai clinique dans la FPI pourrait être mené avec cette molécule.

Bien que nos travaux participent à la compréhension des phénomènes mis en jeu dans la pathogenèse de la FPI, deux problématiques majeures restent encore à aborder et orientent les futurs axes de recherche :

- L'inefficacité des traitements
- La prise en charge des patients

Les traitements actuels améliorent la qualité de vie des patients mais n'arrêtent pas la progression de la maladie. Actuellement, aucune étude n'a vérifié l'effet de la pirféridone ni du ninténadib sur les voies de l'UPR ou sur la stabilisation de HIF-1. L'absence de modulation sur ces voies par ces drogues pourrait expliquer leur efficacité perfectible. Par ailleurs, de nombreux essais cliniques évaluent l'effet thérapeutique de cellules souches dont les propriétés anti-inflammatoires et anti-fibrotiques ont été décrites. A ce jour, l'administration de ces cellules chez les patients atteints de FPI conduits à une augmentation du taux de survie (*Ntoliou et al., 2018*). Il serait intéressant d'évaluer l'impact de ces cellules sur les différents marqueurs de notre étude dans des PII ou des fibroblastes exposés à un stimulus pro-fibrosant.

Enfin, la prise en charge du patient et plus particulièrement le diagnostic est un élément préoccupant. En effet, dans certains cas, le profil du scanner ne permet pas de conclure avec certitude sur l'état de pneumopathie interstitielle non spécifique (PINS) ou de FPI. Une biopsie doit donc être réalisée pour confirmer le profil de pneumopathie interstitielle commune (PIC) propre à la FPI, une intervention lourde pour le patient. Actuellement, de nombreux marqueurs biologiques sériques sont dosés chez des patients mais aucun ne permet de différencier la PINS de la FPI (*Drakopanagiotakis et al., 2018*). L'expression d'un marqueur reflétant l'état hypoxique ou du stress du RE dans l'épithélium alvéolaire propre au profil de PIC, permettrait d'orienter le diagnostic de PINS ou de FPI et de palier au recours de la chirurgie.

La compréhension des mécanismes complexes de la pathogenèse de la FPI est un enjeu crucial afin d'améliorer l'efficacité des traitements. L'implication du stress du RE dans la dysfonction des cellules épithéliales alvéolaires dans la FPI a été rapporté, cependant des hypothèses sur l'inducteur de ce phénomène cellulaire dans les formes sporadiques restaient à définir. Notre étude montre que le microenvironnement hypoxique est un inducteur potentiel du stress du RE et propose que l'axe HIF-1/voies de l'UPR pourrait être la cible de nouvelles stratégies thérapeutiques dans la FPI.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abe, J., Berk, B.C., 1999. Fyn and JAK2 mediate Ras activation by reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 274 30 , 21003–21010.
- Aberg, C., Sparr, E., Larsson, M., Wennerstrom, H., 2010. A theoretical study of diffusional transport over the alveolar surfactant layer. *Journal of The Royal Society Interface* 7 51 , 1403–1410. doi:10.1098/rsif.2010.0082
- Abraham, V., Chou, M.L., George, P., Pooler, P., Zaman, A., Savani, R.C., Koval, M., 2001. Heterocellular gap junctional communication between alveolar epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 280 6 , L1085–L1093. doi:10.1152/ajplung.2001.280.6.L1085
- Acloque, H., Adams, M.S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M., Nieto, M.A., 2009. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest* 119 6 , 1438–1449. doi:10.1172/JCI38019
- Adamson, I.Y., 1992. Relationship of mesenchymal changes to alveolar epithelial cell differentiation in fetal rat lung. *Anat. Embryol.* 185 3 , 275–280.
- Adamson, I.Y., Bowden, D.H., 1974. The type 2 cell as progenitor of alveolar epithelial regeneration. A cytodynamic study in mice after exposure to oxygen. *Lab. Invest.* 30 1 , 35–42.
- Adamson, I.Y., Hedgecock, C., Bowden, D.H., 1990. Epithelial cell-fibroblast interactions in lung injury and repair. *Am. J. Pathol.* 137 2 , 385–392.
- Adamson, I.Y., King, G.M., Young, L., 1989. Influence of extracellular matrix and collagen components on alveolar type 2 cell morphology and function. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 25 6 , 494–502.
- Agustí, A.G.N., Roca, J., Gea, J., Wagner, P.D., Xaubet, A., Rodriguez-Roisin, R., 1991. Mechanisms of Gas-exchange Impairment in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Review of Respiratory Disease* 143 2 , 219–225. doi:10.1164/ajrccm/143.2.219
- Akram, K.M., Lomas, N.J., Forsyth, N.R., Spiteri, M.A., 2014. Alveolar epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis display upregulation of TRAIL, DR4 and DR5 expression with simultaneous preferential over-expression of pro-apoptotic marker p53. *Int J Clin Exp Pathol* 7 2 , 552–564.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., Yuan, J., 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87 2 , 171.
- Althaus, J., Bernaudin, M., Petit, E., Toutain, J., Touzani, O., Rami, A., 2006. Expression of the gene encoding the pro-apoptotic BNIP3 protein and stimulation of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) protein following focal cerebral ischemia in rats. *Neurochem. Int.* 48 8 , 687–695. doi:10.1016/j.neuint.2005.12.008
- American Thoracic Society, European Respiratory Society, 2002. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias: This Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS Board of Directors, June 2001 and by The ERS Executive Committee, June 2001. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 165 2 , 277–304. doi:10.1164/ajrccm.165.2.ats01
- Amin-Wetzel, N., Saunders, R.A., Kamphuis, M.J., Rato, C., Preissler, S., Harding, H.P., Ron, D., 2017. A J-Protein Co-chaperone Recruits BiP to Monomerize IRE1 and Repress the Unfolded Protein Response. *Cell* 171 7 , 1625–1637.e13. doi:10.1016/j.cell.2017.10.040
- Amrein, M., von Nahmen, A., Sieber, M., 1997. A scanning force- and fluorescence light microscopy study of the structure and function of a model pulmonary surfactant. *Eur. Biophys. J.* 26 5 , 349–357.
- Angles, G., Dotson, R., Bueche, K., Pias, S.C., 2017. Predicted Decrease in Membrane Oxygen Permeability with Addition of Cholesterol, in: Halpern, H.J., LaManna, J.C., Harrison, D.K., Epel, B. (Eds.), *Oxygen Transport to Tissue XXXIX*. Springer International Publishing, Cham, pp. 9–14. doi:10.1007/978-3-319-55231-6_2
- Antoniou, K.M., Hansell, D.M., Rubens, M.B., Marten, K., Desai, S.R., Siafakas, N.M., Nicholson, A.G., du Bois, R.M., Wells, A.U., 2008. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Outcome in Relation to Smoking Status. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 177 2 , 190–194. doi:10.1164/rccm.200612-1759OC
- Appelhoff, R.J., Tian, Y.-M., Raval, R.R., Turley, H., Harris, A.L., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Gleadle, J.M., 2004. Differential Function of the Prolyl Hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the Regulation of Hypoxia-inducible Factor. *Journal of Biological Chemistry* 279 37 , 38458–38465. doi:10.1074/jbc.M406026200
- Arciniegas, Sutton, A.B., Allen, T.D., Schor, A.M., 1992. Transforming growth factor beta 1 promotes the differentiation of endothelial cells into smooth muscle-like cells in vitro 10.
- Armstrong, L., Medford, A.R.L., Uppington, K.M., Robertson, J., Witherden, I.R., Tetley, T.D., Millar, A.B., 2004. Expression of Functional Toll-Like Receptor-2 and -4 on Alveolar Epithelial Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 31 2 , 241–245. doi:10.1165/rcmb.2004-0078OC
- Arnoux, V., Nassour, M., L'Helgoualc'h, A., Hipskind, R.A., Savagner, P., 2008. Erk5 controls Slug expression and keratinocyte activation during wound healing. *Mol. Biol. Cell* 19 11 , 4738–4749. doi:10.1091/mbc.e07-10-1078
- Ashkenazi, A., Dixit, V.M., 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281 5381 , 1305–1308.
- Ask, K., Bonniaud, P., Maass, K., Eickelberg, O., Margetts, P.J., Warburton, D., Groffen, J., Gaudie, J., Kolb, M., 2008. Progressive pulmonary fibrosis is mediated by TGF- β isoform 1 but not TGF- β 3. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40 3 , 484. doi:10.1016/j.biocel.2007.08.016

- Averous, J., Bruhat, A., Jousse, C., Carraro, V., Thiel, G., Fafournoux, P., 2004. Induction of CHOP Expression by Amino Acid Limitation Requires Both ATF4 Expression and ATF2 Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 279 7 , 5288–5297. doi:10.1074/jbc.M311862200
- Ayaub, E.A., Kolb, P.S., Mohammed-Ali, Z., Tat, V., Murphy, J., Bellaye, P.-S., Shimbori, C., Boivin, F.J., Lai, R., Lynn, E.G., Lhoták, Š., Bridgewater, D., Kolb, M.R., Inman, M.D., Dickhout, J.G., Austin, R.C., Ask, K., 2016. GRP78 and CHOP modulate macrophage apoptosis and the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J. Pathol.* 239 4 , 411–425. doi:10.1002/path.4738

B

- Bae, S.-H., Jeong, J.-W., Park, J.A., Kim, S.-H., Bae, M.-K., Choi, S.-J., Kim, K.-W., 2004. Sumoylation increases HIF-1 α stability and its transcriptional activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 324 1 , 394–400. doi:10.1016/j.bbrc.2004.09.068
- Baek, H.A., Kim, D.S., Park, H.S., Jang, K.Y., Kang, M.J., Lee, D.G., Moon, W.S., Chae, H.J., Chung, M.J., 2012. Involvement of Endoplasmic Reticulum Stress in Myofibroblastic Differentiation of Lung Fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 46 6 , 731–739. doi:10.1165/rcmb.2011-0121OC
- Bakunts, A., Orsi, A., Vitale, M., Cattaneo, A., Lari, F., Tadè, L., Sitia, R., Raimondi, A., Bachi, A., Anken, E. van, 2017. Ratiometric sensing of BiP-client versus BiP levels by the unfolded protein response determines its signaling amplitude [WWW Document]. *eLife*. doi:10.7554/eLife.27518
- Bánsághi, S., Golenár, T., Madesh, M., Csordás, G., RamachandraRao, S., Sharma, K., Yule, D.I., Joseph, S.K., Hajnóczky, G., 2014. Isoform- and Species-specific Control of Inositol 1,4,5-Trisphosphate (IP₃) Receptors by Reactive Oxygen Species. *Journal of Biological Chemistry* 289 12 , 8170–8181. doi:10.1074/jbc.M113.504159
- Bardou, O., Privé, A., Migneault, F., Roy-Camille, K., Dagenais, A., Berthiaume, Y., Brochiero, E., 2012. K⁺ channels regulate ENaC expression via changes in promoter activity and control fluid clearance in alveolar epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1818 7 , 1682–1690. doi:10.1016/j.bbamem.2012.02.025
- Bardou, O., Trinh, N.T.N., Brochiero, E., 2009. Molecular diversity and function of K⁺ channels in airway and alveolar epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 296 2 , L145–L155. doi:10.1152/ajplung.90525.2008
- Barkauskas, C.E., Crouce, M.J., Rackley, C.R., Bowie, E.J., Keene, D.R., Stripp, B.R., Randell, S.H., Noble, P.W., Hogan, B.L.M., 2013. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *Journal of Clinical Investigation* 123 7 , 3025–3036. doi:10.1172/JCI68782
- Barrandon, Y., Green, H., 1987. Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor. *Cell* 50 7 , 1131–1137.
- Bastacky, J., Lee, C.Y., Goerke, J., Koushafar, H., Yager, D., Kenaga, L., Speed, T.P., Chen, Y., Clements, J.A., 1995. Alveolar lining layer is thin and continuous: low-temperature scanning electron microscopy of rat lung. *Journal of Applied Physiology* 79 5 , 1615–1628. doi:10.1152/jappl.1995.79.5.1615
- Baumgartner, K.B., Samet, J.M., Stidley, C.A., Colby, T.V., Waldron, J.A., 1997. Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 155 1 , 242–248. doi:10.1164/ajrccm.155.1.9001319
- Belaidi, E., Thomas, A., Bourdier, G., Moulin, S., Lemarié, E., Levy, P., Pépin, J.-L., Korichneva, I., Godin-Ribuot, D., Arnaud, C., 2016a. Endoplasmic reticulum stress as a novel inducer of hypoxia inducible factor-1 activity: its role in the susceptibility to myocardial ischemia-reperfusion induced by chronic intermittent hypoxia. *Int. J. Cardiol.* 210, 45–53. doi:10.1016/j.ijcard.2016.02.096
- Bennett, D., Fossi, A., Bargagli, E., Refini, R.M., Pieroni, M., Luzzi, L., Ghiribelli, C., Paladini, P., Voltolini, L., Rottoli, P., 2015. Mortality on the Waiting List for Lung Transplantation in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Single-Centre Experience. *Lung* 193 5 , 677–681. doi:10.1007/s00408-015-9767-x
- Bensellam, M., Maxwell, E.L., Chan, J.Y., Luzuriaga, J., West, P.K., Jonas, J.-C., Gunton, J.E., Laybutt, D.R., 2016. Hypoxia reduces ER-to-Golgi protein trafficking and increases cell death by inhibiting the adaptive unfolded protein response in mouse beta cells. *Diabetologia* 59 7 , 1492–1502. doi:10.1007/s00125-016-3947-y
- Bernard, O., Jeny, F., Uzunhan, Y., Dondi, E., Terfous, R., Label, R., Sutton, A., Larghero, J., Vanneaux, V., Nunes, H., Boncoeur, E., Planès, C., Dard, N., 2018a. Mesenchymal stem cells reduce hypoxia-induced apoptosis in alveolar epithelial cells by modulating HIF and ROS hypoxic signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 314 3 , L360–L371. doi:10.1152/ajplung.00153.2017
- Berra, E., 2003. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 in normoxia. *The EMBO Journal* 22 16 , 4082–4090. doi:10.1093/emboj/cdg3392
- Berta, M.A., Mazure, N., Hattab, M., Pouyssegur, J., Brahimi-Horn, M.C., 2007. SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1 α reduces its transcriptional activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 360 3 , 646–652. doi:10.1016/j.bbrc.2007.06.103
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., Ron, D., 2000. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature Cell Biology* 2 6 , 326–332. doi:10.1038/35014014
- Bhaskaran, M., Kolliputi, N., Wang, Y., Gou, D., Chintagari, N.R., Liu, L., 2006. Trans-differentiation of Alveolar Epithelial Type II Cells to Type I Cells Involves Autocrine Signaling by Transforming Growth Factor beta1 through the Smad Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 282 6 , 3968–3976. doi:10.1074/jbc.M609060200

- Bhattacharya, A., Kumar, J., Hermanson, K., Sun, Y., Qureshi, H., Perley, D., Scheidegger, A., Singh, B.B., Dhasarathy, A., 2018. The calcium channel proteins ORAI3 and STIM1 mediate TGF- β induced Snai1 expression. *Oncotarget* 9 50 , 29468–29483. doi:10.18632/oncotarget.25672
- Bhowmick, N.A., Zent, R., Ghiassi, M., McDonnell, M., Moses, H.L., 2001. Integrin β 1 Signaling Is Necessary for Transforming Growth Factor- β Activation of p38MAPK and Epithelial Plasticity. *J. Biol. Chem.* 276 50 , 46707–46713. doi:10.1074/jbc.M106176200
- Bi, M., Naczki, C., Koritzinsky, M., Fels, D., Blais, J., Hu, N., Harding, H., Novoa, I., Varia, M., Raleigh, J., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Bell, J., Ron, D., Wouters, B.G., Koumenis, C., 2005. ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *EMBO J* 24 19 , 3470–3481. doi:10.1038/sj.emboj.7600777
- Bierl, C., Voetsch, B., Jin, R.C., Handy, D.E., Loscalzo, J., 2004. Determinants of Human Plasma Glutathione Peroxidase (GPx-3) Expression. *Journal of Biological Chemistry* 279 26 , 26839–26845. doi:10.1074/jbc.M401907200
- Birk, J., Ramming, T., Odermatt, A., Appenzeller-Herzog, C., 2013. Green fluorescent protein-based monitoring of endoplasmic reticulum redox poise. *Frontiers in Genetics* 4. doi:10.3389/fgene.2013.00108
- Blond-Elguindi, S., Cwirla, S.E., Dower, W.J., Lipshutz, R.J., Sprang, S.R., Sambrook, J.F., Gething, M.J., 1993. Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *Cell* 75 4 , 717–728.
- Bodempudi, V., Hergert, P., Smith, K., Xia, H., Herrera, J., Peterson, M., Khalil, W., Kahm, J., Bitterman, P.B., Henke, C.A., 2014. miR-210 promotes IPF fibroblast proliferation in response to hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 307 4 , L283–L294. doi:10.1152/ajplung.00069.2014
- Bosello-Travain, V., Forman, H.J., Roveri, A., Toppo, S., Ursini, F., Venerando, R., Warnecke, C., Zaccarin, M., Maiorino, M., 2015. Glutathione peroxidase 8 is transcriptionally regulated by HIF α and modulates growth factor signaling in HeLa cells. *Free Radical Biology and Medicine* 81, 58–68. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.12.020
- Boyce, M., Bryant, K.F., Jousse, C., Long, K., Harding, H.P., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Ma, D., Coen, D.M., Ron, D., Yuan, J., 2005. A selective inhibitor of eIF2 α dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 307 5711 , 935–939. doi:10.1126/science.1101902
- Bracken, C.P., Fedele, A.O., Linke, S., Balrak, W., Lisy, K., Whitelaw, M.L., Peet, D.J., 2006. Cell-specific Regulation of Hypoxia-inducible Factor (HIF)-1 α and HIF-2 α Stabilization and Transactivation in a Graded Oxygen Environment. *J. Biol. Chem.* 281 32 , 22575–22585. doi:10.1074/jbc.M600288200
- Bradley, K.H., Kawanami, O., Ferrans, V.J., Crystal, R.G., 1980. Chapter 3 The Fibroblast of Human Lung Alveolar Structures: A Differentiated Cell with a Major Role in Lung Structure and Function, in: *Methods in Cell Biology*. Elsevier, pp. 37–64. doi:10.1016/S0091-679X(08)60757-8
- Brochiero, E., Dagenais, A., Privé, A., Berthiaume, Y., Grygorczyk, R., 2004. Evidence of a functional CFTR Cl⁻ channel in adult alveolar epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 287 2 , L382–L392. doi:10.1152/ajplung.00320.2002
- Brockmeier, U., Platzeck, C., Schneider, K., Patak, P., Bernardini, A., Fandrey, J., Metzén, E., 2011. The Function of Hypoxia-Inducible Factor (HIF) Is Independent of the Endoplasmic Reticulum Protein OS-9. *PLoS ONE* 6 4 , e19151. doi:10.1371/journal.pone.0019151
- Bruhat, A., Averous, J., Carraro, V., Zhong, C., Reimold, A.M., Kilberg, M.S., Fafournoux, P., 2002. Differences in the Molecular Mechanisms Involved in the Transcriptional Activation of the CHOP and Asparagine Synthetase Genes in Response to Amino Acid Deprivation or Activation of the Unfolded Protein Response. *J. Biol. Chem.* 277 50 , 48107–48114. doi:10.1074/jbc.M206149200
- Bruhat, A., Jousse, C., Carraro, V., Reimold, A.M., Ferrara, M., Fafournoux, P., 2000. Amino Acids Control Mammalian Gene Transcription: Activating Transcription Factor 2 Is Essential for the Amino Acid Responsiveness of the CHOP Promoter. *Mol Cell Biol* 20 19 , 7192–7204.
- Brush, M.H., Weiser, D.C., Shenolikar, S., 2003. Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol. Cell. Biol.* 23 4 , 1292–1303.
- Buckingham, S., Avery, M.E., 1962. Time of appearance of lung surfactant in the foetal mouse. *Nature* 193, 688–689.
- Buonato, J.M., Lan, I.S., Lazzara, M.J., 2015. EGF augments TGF β -induced epithelial–mesenchymal transition by promoting SHP2 binding to GAB1. *J Cell Sci* 128 21 , 3898–3909. doi:10.1242/jcs.169599
- Burman, A., Kropski, J.A., Calvi, C.L., Serezani, A.P., Pascoalino, B.D., Han, W., Sherrill, T., Gleaves, L., Lawson, W.E., Young, L.R., Blackwell, T.S., Tanjore, H., 2018a. Localized hypoxia links ER stress to lung fibrosis through induction of C/EBP homologous protein. *JCI Insight* 3 16 . doi:10.1172/jci.insight.99543

C

- Campo, I., Zorzetto, M., Mariani, F., Kadija, Z., Morbini, P., Dore, R., Kaltenborn, E., Frixel, S., Zarbock, R., Liebis, G., Hegermann, J., Wrede, C., Griese, M., Luisetti, M., 2014. A large kindred of pulmonary fibrosis associated with a novel ABCA3 gene variant. *Respir Res* 15 1 , 43. doi:10.1186/1465-9921-15-43
- Cantin, A.M., North, S.L., Fells, G.A., Hubbard, R.C., Crystal, R.G., 1987. Oxidant-mediated epithelial cell injury in idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* 79 6 , 1665–1673. doi:10.1172/JCI113005
- Carbia-Nagashima, A., Gerez, J., Perez-Castro, C., Paez-Pereda, M., Silberstein, S., Stalla, G.K., Holsboer, F., Arzt, E., 2007. RSUME, a Small RWD-Containing Protein, Enhances SUMO Conjugation and Stabilizes HIF-1 α during Hypoxia. *Cell* 131 2 , 309–323. doi:10.1016/j.cell.2007.07.044

- Carrara, M., Prischi, F., Nowak, P.R., Ali, M.M., 2015a. Crystal structures reveal transient PERK luminal domain tetramerization in endoplasmic reticulum stress signaling. *EMBO J* 34 11 , 1589–1600. doi:10.15252/embj.201489183
- Carrara, M., Prischi, F., Nowak, P.R., Kopp, M.C., Ali, M.M., 2015b. Noncanonical binding of BiP ATPase domain to Ire1 and Perk is dissociated by unfolded protein CH1 to initiate ER stress signaling. *eLife* 4. doi:10.7554/eLife.03522
- Carrière, A., Carmona, M.-C., Fernandez, Y., Rigoulet, M., Wenger, R.H., Pénicaud, L., Casteilla, L., 2004. Mitochondrial reactive oxygen species control the transcription factor CHOP-10/GADD153 and adipocyte differentiation: a mechanism for hypoxia-dependent effect. *J. Biol. Chem.* 279 39 , 40462–40469. doi:10.1074/jbc.M407258200
- Chan, J.Y.H., Tsai, C.-Y., Wu, C.H.Y., Li, F.C.H., Dai, K.-Y., Sun, E.Y.H., Chan, S.H.H., Chang, A.Y.W., 2011. Sumoylation of Hypoxia-Inducible Factor-1 α Ameliorates Failure of Brain Stem Cardiovascular Regulation in Experimental Brain Death. *PLoS ONE* 6 3 , e17375. doi:10.1371/journal.pone.0017375
- Chandel, N.S., McClintock, D.S., Feliciano, C.E., Wood, T.M., Melendez, J.A., Rodriguez, A.M., Schumacker, P.T., 2000. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J. Biol. Chem.* 275 33 , 25130–25138. doi:10.1074/jbc.M001914200
- Chang, J., Xia, Y., Wasserloos, K., Deng, M., Blose, K.J., Vorp, D.A., Turnquist, H.R., Billiar, T.R., Pitt, B.A., Zhang, M.-Z., Zhang, L.-M., 2017. Cyclic stretch induced IL-33 production through HMGB1/TLR-4 signaling pathway in murine respiratory epithelial cells. *PLoS One* 12 9 . doi:10.1371/journal.pone.0184770
- Chaveroux, C., Sarcinelli, C., Barbet, V., Belfeki, S., Barthelax, A., Ferraro-Peyret, C., Lebecque, S., Renno, T., Bruhat, A., Fafournoux, P., Manié, S.N., 2016. Nutrient shortage triggers the hexosamine biosynthetic pathway via the GCN2-ATF4 signalling pathway. *Scientific Reports* 6 1 . doi:10.1038/srep27278
- Chen, D., Rauh, M., Buchfelder, M., Eyupoglu, I.Y., Savaskan, N., 2017. The oxido-metabolic driver ATF4 enhances temozolamide chemo-resistance in human gliomas. *Oncotarget* 8 31 . doi:10.18632/oncotarget.17737
- Chen, Li, H., SundarRaj, N., Wang, J.H.-C., 2007. Alpha-smooth muscle actin expression enhances cell traction force. *Cell Motility* 64 4 , 248–257. doi:10.1002/cm.20178
- Chen, X., Iliopoulos, D., Zhang, Q., Tang, Q., Greenblatt, M.B., Hatzia Apostolou, M., Lim, E., Tam, W.L., Ni, M., Chen, Y., Mai, J., Shen, H., Hu, D.Z., Adoro, S., Hu, B., Song, M., Tan, C., Landis, M.D., Ferrari, M., Shin, S.J., Brown, M., Chang, J.C., Liu, X.S., Glimcher, L.H., 2014. XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 α pathway. *Nature* 508 7494 , 103–107. doi:10.1038/nature13119
- Chen, X., Shen, J., Prywes, R., 2002. The Luminal Domain of ATF6 Senses Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Causes Translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *Journal of Biological Chemistry* 277 15 , 13045–13052. doi:10.1074/jbc.M110636200
- Cheng, J., Kang, X., Zhang, S., Yeh, E.T.H., 2007. SUMO-Specific Protease 1 Is Essential for Stabilization of HIF1 α during Hypoxia. *Cell* 131 3 , 584–595. doi:10.1016/j.cell.2007.08.045
- Chicheportiche, Y., Bourdon, P.R., Xu, H., Hsu, Y.M., Scott, H., Hession, C., Garcia, I., Browning, J.L., 1997. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272 51 , 32401–32410.
- Chilosi, M., Poletti, V., Zamò, A., Lestani, M., Montagna, L., Piccoli, P., Pedron, S., Bertaso, M., Scarpa, A., Murer, B., Cancellieri, A., Maestro, R., Semenzato, G., Doglioni, C., 2003. Aberrant Wnt/ β -catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* 162 5 , 1495–1502.
- Chilov, D., Camenisch, G., Kvietikova, I., Ziegler, U., Gassmann, M., Wenger, R.H., 1999. Induction and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): heterodimerization with ARNT is not necessary for nuclear accumulation of HIF-1 α . *J. Cell. Sci.* 112 (Pt 8), 1203–1212.
- Chin, K.V., Cade, C., Brostrom, C.O., Galuska, E.M., Brostrom, M.A., 1987. Calcium-dependent regulation of protein synthesis at translational initiation in eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* 262 34 , 16509–16514.
- Choi, S.-E., Lee, Y.-J., Jang, H.-J., Lee, K.-W., Kim, Y.-S., Jun, H.-S., Kang, S.S., Chun, J., Kang, Y., 2008. A chemical chaperone 4-PBA ameliorates palmitate-induced inhibition of glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). *Arch. Biochem. Biophys.* 475 2 , 109–114. doi:10.1016/j.abb.2008.04.015
- Chourasia, A.H., Tracy, K., Frankenberger, C., Boland, M.L., Sharifi, M.N., Drake, L.E., Sachleben, J.R., Asara, J.M., Locasale, J.W., Karczmar, G.S., Macleod, K.F., 2015. Mitophagy defects arising from BNip3 loss promote mammary tumor progression to metastasis. *EMBO reports* 16 9 , 1145–1163. doi:10.15252/embr.201540759
- Christianson, J.C., Olzmann, J.A., Shaler, T.A., Sowa, M.E., Bennett, E.J., Richter, C.M., Tyler, R.E., Greenblatt, E.J., Wade Harper, J., Kopito, R.R., 2012. Defining human ERAD networks through an integrative mapping strategy. *Nature Cell Biology* 14 1 , 93–105. doi:10.1038/ncb2383
- Chun, Y.-S., Yeo, E.-J., Choi, E., Teng, C.-M., Bae, J.-M., Kim, M.-S., Park, J.-W., 2001. Inhibitory effect of YC-1 on the hypoxic induction of erythropoietin and vascular endothelial growth factor in Hep3B cells. **Abbreviations:** EPO, erythropoietin; VEGF, vascular endothelial growth factor; HIF, hypoxia-inducible factor; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; CO, carbon monoxide; sGC, soluble guanylate cyclase; cGMP, cyclic GMP; YC-1, 3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazole; SNP, sodium nitroprusside; ODQ, 1H-(1,2,4)oxadiazole (4,3a)quinoxatin-1-one; MB, methylene blue; NAME, N(G)-nitro-L-arginine methyl ester; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; and EMSA, electrophoretic mobility gel shift. *Biochemical Pharmacology* 61 8 , 947–954. doi:10.1016/S0006-2952(01)00564-0
- Chuquimia, O.D., Petursdottir, D.H., Periolo, N., Fernández, C., 2013. Alveolar Epithelial Cells Are Critical in Protection of the Respiratory Tract by Secretion of Factors Able To Modulate the Activity of Pulmonary Macrophages and Directly Control Bacterial Growth. *Infection and Immunity* 81 1 , 381–389. doi:10.1128/IAI.00950-12

- Collard, H.R., Moore, B.B., Flaherty, K.R., Brown, K.K., Kaner, R.J., King, T.E., Lasky, J.A., Loyd, J.E., Noth, I., Olman, M.A., Raghu, G., Roman, J., Ryu, J.H., Zisman, D.A., Hunninghake, G.W., Colby, T.V., Egan, J.J., Hansell, D.M., Johkoh, T., Kaminski, N., Kim, D.S., Kondoh, Y., Lynch, D.A., Müller-Quernheim, J., Myers, J.L., Nicholson, A.G., Selman, M., Toews, G.B., Wells, A.U., Martinez, F.J., 2007. Acute Exacerbations of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 176 7 , 636–643. doi:10.1164/rccm.200703-463PP
- Colom, A., Galgoczy, R., Almendros, I., Xaubet, A., Farré, R., Alcaraz, J., 2014. Oxygen diffusion and consumption in extracellular matrix gels: Implications for designing three-dimensional cultures: Implications For Designing Three-Dimensional Cultures. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 102 8 , 2776–2784. doi:10.1002/jbm.a.34946
- Coppenolle, F.V., Abeele, F.V., Slomianny, C., Flourakis, M., Hesketh, J., Dewailly, E., Prevarskaya, N., 2004. Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. *Journal of Cell Science* 117 18 , 4135–4142. doi:10.1242/jcs.01274
- Costa, E.A., Subramanian, K., Nunnari, J., Weissman, J.S., 2018. Defining the physiological role of SRP in protein-targeting efficiency and specificity. *Science* 359 6376 , 689–692. doi:10.1126/science.aar3607
- Cottin, V., Crestani, B., Valeyre, D., Wallaert, B., Cadranet, J., Dalphin, J.-C., Delaval, P., Israel-Biet, D., Kessler, R., Reynaud-Gaubert, M., Aguilaniu, B., Bouquillon, B., Carre, P., Danel, C., Faivre, J.-B., Ferretti, G., Just, N., Kouzan, S., Lebargy, F., Marchand-Adam, S., Philippe, B., Prevot, G., Stach, B., Thivolet-Bejui, F., Cordier, J.-F., the French National Reference Centre and the Network of Competence Centres for Rare Lung Diseases, 2014. Diagnosis and management of idiopathic pulmonary fibrosis: French practical guidelines. *European Respiratory Review* 23 132 , 193–214. doi:10.1183/09059180.00001814
- Crapo, J.D., Barry, B.E., Gehr, P., Bachofen, M., Weibel, E.R., 1982. Cell Number and Cell Characteristics of the Normal Human Lung. *Am Rev Respir Dis* 126 2 , 332–337. doi:10.1164/arrd.1982.126.2.332
- Cronkhite, J.T., Xing, C., Raghu, G., Chin, K.M., Torres, F., Rosenblatt, R.L., Garcia, C.K., 2008. Telomere Shortening in Familial and Sporadic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 178 7 , 729–737. doi:10.1164/rccm.200804-550OC
- Csordás, G., Várnai, P., Golenár, T., Roy, S., Purkins, G., Schneider, T.G., Balla, T., Hajnóczky, G., 2010. Imaging Interorganelle Contacts and Local Calcium Dynamics at the ER-Mitochondrial Interface. *Molecular Cell* 39 1 , 121–132. doi:10.1016/j.molcel.2010.06.029
- Cuevas, E.P., Eraso, P., Mazón, M.J., Santos, V., Moreno-Bueno, G., Cano, A., Portillo, F., 2017. LOXL2 drives epithelial-mesenchymal transition via activation of IRE1-XBP1 signalling pathway. *Scientific Reports* 7 , 44988. doi:10.1038/srep44988
- Cullinan, S.B., Zhang, D., Hannink, M., Arvais, E., Kaufman, R.J., Diehl, J.A., 2003. Nrf2 Is a Direct PERK Substrate and Effector of PERK-Dependent Cell Survival. *Mol Cell Biol* 23 20 , 7198–7209. doi:10.1128/MCB.23.20.7198-7209.2003

D

- Dames, S.A., Martinez-Yamout, M., De Guzman, R.N., Dyson, H.J., Wright, P.E., 2002. Structural basis for Hif-1 α /CBP recognition in the cellular hypoxic response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 8 , 5271–5276. doi:10.1073/pnas.082121399
- Daniels, C.E., Yi, E.S., Ryu, J.H., 2008. Autopsy findings in 42 consecutive patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal* 32 1 , 170–174. doi:10.1183/09031936.00176307
- Davies, M., Robinson, M., Smith, E., Huntley, S., Prime, S., Paterson, I., 2005. Induction of an epithelial to mesenchymal transition in human immortal and malignant keratinocytes by TGF- β 1 involves MAPK, Smad and AP-1 signalling pathways. *J. Cell. Biochem.* 95 5 , 918–931. doi:10.1002/jcb.20458
- Davis, F.M., Azimi, I., Faville, R.A., Peters, A.A., Jalink, K., Putney, J.W., Goodhill, G.J., Thompson, E.W., Roberts-Thomson, S.J., Monteith, G.R., 2014. Induction of epithelial–mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells is calcium signal dependent. *Oncogene* 33 18 , 2307–2316. doi:10.1038/onc.2013.187
- Deng, Y., Li, Z., Liu, J., Wang, Z., Cao, Y., Mou, Y., Fu, B., Mo, B., Wei, J., Cheng, Z., Luo, L., Li, J., Shu, Y., Wang, X., Luo, G., Yang, S., Wang, Y., Zhu, J., Yang, J., Wu, M., Xu, X., Ge, R., Chen, X., Peng, Q., Wei, G., Li, Y., Yang, H., Fang, S., Zhang, X., Xiong, W., 2018. Targeted resequencing reveals genetic risks in patients with sporadic idiopathic pulmonary fibrosis. *Human Mutation*. doi:10.1002/humu.23566
- DePianto, D.J., Chandriani, S., Abbas, A.R., Jia, G., N’Diaye, E.N., Caplazi, P., Kauder, S.E., Biswas, S., Karnik, S.K., Ha, C., Modrusan, Z., Matthay, M.A., Kukreja, J., Collard, H.R., Egen, J.G., Wolters, P.J., Arron, J.R., 2015. Heterogeneous gene expression signatures correspond to distinct lung pathologies and biomarkers of disease severity in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 70 1 , 48–56. doi:10.1136/thoraxjnl-2013-204596
- Depping, R., Steinhoff, A., Schindler, S.G., Friedrich, B., Fagerlund, R., Metzgen, E., Hartmann, E., Köhler, M., 2008. Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): Involvement of the classical importin α/β pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1783 3 , 394–404. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.12.006
- Diebold, I., Petry, A., Hess, J., Görlach, A., 2010. The NADPH Oxidase Subunit NOX4 Is a New Target Gene of the Hypoxia-inducible Factor-1. *Molecular Biology of the Cell* 21 12 , 2087–2096. doi:10.1091/mbc.e09-12-1003
- Dimova, E., Michiels, C., Kietzmann, T., 2009. Kinases as Upstream Regulators of the HIF System: Their Emerging Potential as Anti-Cancer Drug Targets. *Current Pharmaceutical Design* 15 33 , 3867–3877. doi:10.2174/138161209789649358
- Donoso, P., Sanchez, G., Bull, R., Hidalgo, C., 2011. Modulation of cardiac ryanodine receptor activity by ROS and RNS. *Front Biosci (Landmark Ed)* 16 , 553–567.

- Dou, J., He, X., Liu, Y., Wang, Y., Zhao, F., Wang, X., Chen, D., Shi, F., Wang, J., 2014. Effect of downregulation of ZEB1 on vimentin expression, tumour migration and tumourigenicity of melanoma B16F10 cells and CSCs: Effect of downregulation of ZEB1 on vimentin expression. *Cell Biology International* 38 4 , 452–461. doi:10.1002/cbin.10223
- Drakopanagiotakis, F., Wujak, L., Wygrecka, M., Markart, P., 2018. Biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *Matrix Biology, SI : Fibrosis – Mechanisms and Translational Aspects* 68–69, 404–421. doi:10.1016/j.matbio.2018.01.023
- Dremina, E.S., Sharov, V.S., Davies, M.J., Schöneich, C., 2007. Oxidation and Inactivation of SERCA by Selective Reaction of Cysteine Residues with Amino Acid Peroxides. *Chemical Research in Toxicology* 20 10 , 1462–1469. doi:10.1021/tx700108w
- Droemann, D., Goldmann, T., Branscheid, D., Clark, R., Dalhoff, K., Zabel, P., Vollmer, E., 2003. Toll-like receptor 2 is expressed by alveolar epithelial cells type II and macrophages in the human lung. *Histochemistry and Cell Biology* 119 2 , 103–108. doi:10.1007/s00418-003-0497-4
- Du, J., Xu, R., Hu, Z., Tian, Y., Zhu, Y., Gu, L., Zhou, L., 2011. PI3K and ERK-Induced Rac1 Activation Mediates Hypoxia-Induced HIF-1 α Expression in MCF-7 Breast Cancer Cells. *PLoS ONE* 6 9 , e25213. doi:10.1371/journal.pone.0025213
- Duchemann, B., Annesi-Maesano, I., Jacobe de Naurois, C., Sanyal, S., Brillet, P.-Y., Brauner, M., Kambouchner, M., Huynh, S., Naccache, J.M., Borie, R., Piquet, J., Mekinian, A., Virally, J., Uzunhan, Y., Cadranet, J., Crestani, B., Fain, O., Lhote, F., Dhote, R., Saidenberg-Kermanac'h, N., Rosental, P.-A., Valeyre, D., Nunes, H., 2017. Prevalence and incidence of interstitial lung diseases in a multi-ethnic county of Greater Paris. *European Respiratory Journal* 50 2 , 1602419. doi:10.1183/13993003.02419-2016
- Dürmüller, S.L., 2013. Protective effects of HIF-1 in acute, but not chronic, hypoxia: Comparing Madison and Hilltop rats. doi:10.5167/uzh-90827

E

- Epa, A.P., Thatcher, T.H., Pollock, S.J., Wahl, L.A., Lyda, E., Kottmann, R.M., Phipps, R.P., Sime, P.J., 2015. Normal Human Lung Epithelial Cells Inhibit Transforming Growth Factor- β Induced Myofibroblast Differentiation via Prostaglandin E2. *PLOS ONE* 10 8 , e0135266. doi:10.1371/journal.pone.0135266
- Evans, M.J., Cabral, L.J., Stephens, R.J., Freeman, G., 1973. Renewal of alveolar epithelium in the rat following exposure to NO₂. *Am. J. Pathol.* 70 2 , 175–198.

F

- Fagone, P., Jackowski, S., 2009. Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *Journal of Lipid Research* 50 Supplement , S311–S316. doi:10.1194/jlr.R800049-JLR200
- Falanga, V., Qian, S.W., Danielpour, D., Katz, M.H., Roberts, A.B., Sporn, M.B., 1991. Hypoxia upregulates the synthesis of TGF- β 1 by human dermal fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 97 4 , 634–637.
- Fawcett, T.W., Martindale, J.L., Guyton, K.Z., Hai, T., Holbrook, N.J., 1999. Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response. *Biochem J* 339 Pt 1 , 135–141.
- Feldinghabermann, B., Cheresch, D., 1993. Vitronectin and its receptors. *Current Opinion in Cell Biology* 5 5 , 864–868. doi:10.1016/0955-0674(93)90036-P
- Feng, Y., Sokol, E.S., Vecchio, C.A.D., Sanduja, S., Claessen, J.H.L., Proia, T.A., Jin, D.X., Reinhardt, F., Ploegh, H.L., Wang, Q., Gupta, P.B., 2014. Epithelial-to-Mesenchymal Transition Activates PERK-eIF2 α and Sensitizes Cells to Endoplasmic Reticulum Stress. *Cancer Discov* 4 6 , 702–715. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0945
- Feng, Z.-P., Clark, R.B., Berthiaume, Y., 1993. Identification of Nonselective Cation Channels in Cultured Adult Rat Alveolar Type II Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 9 3 , 248–254. doi:10.1165/ajrcmb/9.3.248
- Fernandez, B.A., Fox, G., Bhatia, R., Sala, E., Noble, B., Denic, N., Fernandez, D., Duguid, N., Dohey, A., Kamel, F., Edwards, L., Mahoney, K., Stuckless, S., Parfrey, P.S., Woods, M.O., 2012. A Newfoundland cohort of familial and sporadic idiopathic pulmonary fibrosis patients: clinical and genetic features. *Respiratory Research* 13 1 , 64. doi:10.1186/1465-9921-13-64
- Feske, S., Skolnik, E.Y., Prakriya, M., 2012. Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 12 7 , 532–547. doi:10.1038/nri3233
- Frid, M.G., Brunetti, J.A., Burke, D.L., Carpenter, T.C., Davie, N.J., Reeves, J.T., Roedersheimer, M.T., van Rooijen, N., Stenmark, K.R., 2006. Hypoxia-Induced Pulmonary Vascular Remodeling Requires Recruitment of Circulating Mesenchymal Precursors of a Monocyte/Macrophage Lineage. *Am J Pathol* 168 2 , 659–669. doi:10.2353/ajpath.2006.050599
- Fukuda, R., Zhang, H., Kim, J., Shimoda, L., Dang, C.V., Semenza, G.L., 2007. HIF-1 Regulates Cytochrome Oxidase Subunits to Optimize Efficiency of Respiration in Hypoxic Cells. *Cell* 129 1 , 111–122. doi:10.1016/j.cell.2007.01.047
- Fukuda, Y., Ferrans, V.J., Schoenberger, C.I., Rennard, S.I., Crystal, R.G., 1985. Patterns of pulmonary structural remodeling after experimental paraquat toxicity. The morphogenesis of intraalveolar fibrosis. *Am. J. Pathol.* 118 3 , 452–475.
- Fusakio, M.E., Willy, J.A., Wang, Y., Mirek, E.T., Al Baghdadi, R.J.T., Adams, C.M., Anthony, T.G., Wek, R.C., 2016. Transcription factor ATF4 directs basal and stress-induced gene expression in the unfolded protein response and cholesterol metabolism in the liver. *Mol Biol Cell* 27 9 , 1536–1551. doi:10.1091/mbc.E16-01-0039

G

- Gangwar, I., Sharma, N.K., Panzade, G., Awasthi, S., Agrawal, A., Shankar, R., 2017. Detecting the Molecular System Signatures of Idiopathic Pulmonary Fibrosis through Integrated Genomic Analysis. *Scientific Reports* 7 1 , 1554. doi:10.1038/s41598-017-01765-6
- Gao, Y., Chu, M., Hong, J., Shang, J., Xu, D., 2014. Hypoxia induces cardiac fibroblast proliferation and phenotypic switch: a role for caveolae and caveolin-1/PTEN mediated pathway. *J Thorac Dis* 6 10 , 1458–1468. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2014.08.31
- Garcia, C.K., 2011. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Update on Genetic Discoveries. *Proceedings of the American Thoracic Society* 8 2 , 158–162. doi:10.1513/pats.201008-056MS
- Ghabril, M., Zupanets, I.A., Vierling, J., Mantry, P., Rockey, D., Wolf, D., O’Shea, R., Dickinson, K., Gillaspay, H., Norris, C., Coakley, D.F., Mokhtarani, M., Scharschmidt, B.F., 2013. Glycerol Phenylbutyrate in Patients With Cirrhosis and Episodic Hepatic Encephalopathy: A Pilot Study of Safety and Effect on Venous Ammonia Concentration. *Clin Pharmacol Drug Dev* 2 3 , 278–284. doi:10.1002/cpdd.18
- Ghebremariam, Y.T., Cooke, J.P., Gerhart, W., Griego, C., Brower, J.B., Doyle-Eisele, M., Moeller, B.C., Zhou, Q., Ho, L., de Andrade, J., Raghu, G., Peterson, L., Rivera, A., Rosen, G.D., 2015. Pleiotropic effect of the proton pump inhibitor esomeprazole leading to suppression of lung inflammation and fibrosis. *Journal of Translational Medicine* 13 1 . doi:10.1186/s12967-015-0614-x
- Ghosh, M.C., Makena, P.S., Gorantla, V., Sinclair, S.E., Waters, C.M., 2012. CXCR4 regulates migration of lung alveolar epithelial cells through activation of Rac1 and matrix metalloproteinase-2. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 302 9 , L846–L856. doi:10.1152/ajplung.00321.2011
- Gil-Parrado, S., Fernández-Montalván, A., Assfalg-Machleidt, I., Popp, O., Bestvater, F., Holloschi, A., Knoch, T.A., Auerswald, E.A., Welsh, K., Reed, J.C., Fritz, H., Fuentes-Prior, P., Spiess, E., Salvesen, G.S., Machleidt, W., 2002. Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members. *J. Biol. Chem.* 277 30 , 27217–27226. doi:10.1074/jbc.M202945200
- Gipson, I.K., Kiorpes, T.C., Brennan, S.J., 1984. Epithelial sheet movement: Effects of tunicamycin on migration and glycoprotein synthesis. *Developmental Biology* 101 1 , 212–220. doi:10.1016/0012-1606(84)90131-3
- Glasser, S.W., Witt, T.L., Senft, A.P., Baatz, J.E., Folger, D., Maxfield, M.D., Akinbi, H.T., Newton, D.A., Prows, D.R., Korfhagen, T.R., 2009. Surfactant protein C-deficient mice are susceptible to respiratory syncytial virus infection. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 297 1 , L64–L72. doi:10.1152/ajplung.90640.2008
- Golan-Gerstl, R., Wallach-Dayana, S.B., Amir, G., Breuer, R., 2007. Epithelial Cell Apoptosis by Fas Ligand-Positive Myofibroblasts in Lung Fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 36 3 , 270–275. doi:10.1165/rcmb.2006-0133OC
- Goldmann, T., Zissel, G., Watz, H., Drömann, D., Reck, M., Kugler, C., Rabe, K.F., Marwitz, S., 2018. Human alveolar epithelial cells type II are capable of TGFβ-dependent epithelial-mesenchymal-transition and collagen-synthesis. *Respiratory Research* 19 1 , 138. doi:10.1186/s12931-018-0841-9
- González-González, A., Muñoz-Muela, E., Marchal, J.A., Cara, F.E., Molina, M.P., Cruz-Lozano, M., Jiménez, G., Verma, A., Ramírez, A., Qian, W., Chen, W., Kozielski, A.J., Elemento, O., Martín-Salvago, M.D., Luque, R.J., Rosa-Garrido, C., Landeira, D., Quintana-Romero, M., Rosato, R.R., García, M.A., Ramirez-Tortosa, C.L., Kim, H., Rodriguez-Aguayo, C., Lopez-Berestein, G., Sood, A.K., Lorente, J.A., Sánchez-Rovira, P., Chang, J.C., Granados-Principal, S., 2018. Activating Transcription Factor 4 Modulates TGFβ-Induced Aggressiveness in Triple-Negative Breast Cancer via SMAD2/3/4 and mTORC2 Signaling. *Clinical Cancer Research*. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-3125
- Goodman, B.E., Crandall, E.D., 1982. Dome formation in primary cultured monolayers of alveolar epithelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 243 1 , C96–C100. doi:10.1152/ajpcell.1982.243.1.C96
- Gora, S., Maouche, S., Atout, R., Wanherdrick, K., Lambeau, G., Cambien, F., Ninio, E., Karabina, S.-A., 2010. Phospholipolyzed LDL induces an inflammatory response in endothelial cells through endoplasmic reticulum stress signaling. *The FASEB Journal* 24 9 , 3284–3297. doi:10.1096/fj.09-146852
- Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., Krizanova, O., 2015. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biology* 6 , 260–271. doi:10.1016/j.redox.2015.08.010
- Guleria, A., Singh, V., Chandna, S., 2017. An attenuated calcium signaling and pre-emptive activation of UPR pathway together contribute to ER and calcium stress resilience of Lepidopteran insect cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1861 3 , 504–521. doi:10.1016/j.bbagen.2016.11.035
- Günther, A., Schmidt, R., Nix, F., Yabut-Perez, M., Guth, C., Rosseau, S., Siebert, C., Grimminger, F., Morr, H., Velcovsky, H.G., Seeger, W., 1999. Surfactant abnormalities in idiopathic pulmonary fibrosis, hypersensitivity pneumonitis and sarcoidosis. *Eur. Respir. J.* 14 3 , 565–573.
- Guo, L., Xu, J., Liu, L., Liu, S., Zhu, R., 2015. Hypoxia-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition Is Involved in Bleomycin-Induced Lung Fibrosis. *BioMed Research International* 2015, 1–10. doi:10.1155/2015/232791
- Guo, R., Meng, Q., Guo, H., Xiao, L., Yang, X., Cui, Y., Huang, Y., 2016. TGF-β2 induces epithelial-mesenchymal transition in cultured human lens epithelial cells through activation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Molecular Medicine Reports* 13 2 , 1105–1110. doi:10.3892/mmr.2015.4645

- Guo, X., Zhu, Z., Zhang, W., Meng, X., Zhu, Y., Han, P., Zhou, X., Hu, Y., Wang, R., 2017. Nuclear translocation of HIF-1 α induced by influenza A (H1N1) infection is critical to the production of proinflammatory cytokines. *Emerg Microbes Infect* 6 5 , e39. doi:10.1038/emi.2017.21
- Gusarova, G.A., Trejo, H.E., Dada, L.A., Briva, A., Welch, L.C., Hamanaka, R.B., Mutlu, G.M., Chandel, N.S., Prakriya, M., Sznajder, J.I., 2011. Hypoxia Leads to Na,K-ATPase Downregulation via Ca²⁺ Release-Activated Ca²⁺ Channels and AMPK Activation. *Molecular and Cellular Biology* 31 17 , 3546–3556. doi:10.1128/MCB.05114-11
- Guyton, K.Z., Xu, Q., Holbrook, N.J., 1996. Induction of the mammalian stress response gene GADD153 by oxidative stress: role of AP-1 element. *Biochem. J.* 314 (Pt 2), 547–554.

H

- Hagen, T., 2003. Redistribution of Intracellular Oxygen in Hypoxia by Nitric Oxide: Effect on HIF1. *Science* 302 5652 , 1975–1978. doi:10.1126/science.1088805
- Hagimoto, N., Kuwano, K., Inoshima, I., Yoshimi, M., Nakamura, N., Fujita, M., Maeyama, T., Hara, N., 2002. TGF-beta 1 as an enhancer of Fas-mediated apoptosis of lung epithelial cells. *J. Immunol.* 168 12 , 6470–6478.
- Hagimoto, Naoki, Kuwano, K., Miyazaki, H., Kunitake, R., Fujita, M., Kawasaki, M., Kaneko, Y., Hara, N., 1997. Induction of Apoptosis and Pulmonary Fibrosis in Mice in Response to Ligation of Fas Antigen. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 17 3 , 272–278. doi:10.1165/ajrcmb.17.3.2893
- Hagimoto, N, Kuwano, K., Nomoto, Y., Kunitake, R., Hara, N., 1997. Apoptosis and expression of Fas/Fas ligand mRNA in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 16 1 , 91–101. doi:10.1165/ajrcmb.16.1.8998084
- Hamman, L., Rich, A., 1944. Acute diffuse interstitial fibrosis of the lungs. *Bull Johns Hopkins Hosp* 74, 177–212.
- Hammond, C., Braakman, I., Helenius, A., 1994. Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 3 , 913–917.
- Hara, S., Hamada, J., Kobayashi, C., Kondo, Y., Imura, N., 2001. Expression and Characterization of Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-3 α in Human Kidney: Suppression of HIF-Mediated Gene Expression by HIF-3 α . *Biochemical and Biophysical Research Communications* 287 4 , 808–813. doi:10.1006/bbrc.2001.5659
- Harari, S., Madotto, F., Caminati, A., Conti, S., Cesana, G., 2016. Epidemiology of Idiopathic Pulmonary Fibrosis in Northern Italy. *PLOS ONE* 11 2 , e0147072. doi:10.1371/journal.pone.0147072
- Hartsock, A., Nelson, W.J., 2008. Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778 3 , 660–669. doi:10.1016/j.bbamem.2007.07.012
- Haßdenteufel, S., Johnson, N., Paton, A.W., Paton, J.C., High, S., Zimmermann, R., 2018. Chaperone-Mediated Sec61 Channel Gating during ER Import of Small Precursor Proteins Overcomes Sec61 Inhibitor-Reinforced Energy Barrier. *Cell Reports* 23 5 , 1373–1386. doi:10.1016/j.celrep.2018.03.122
- Hebert, D.N., Foellmer, B., Helenius, A., 1995. Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell* 81 3 , 425–433.
- Helling, B.A., Gerber, A.N., Kadiyala, V., Sasse, S.K., Pedersen, B.S., Sparks, L., Nakano, Y., Okamoto, T., Evans, C.M., Yang, I.V., Schwartz, D.A., 2017. Regulation of *MUC5B* Expression in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 57 1 , 91–99. doi:10.1165/rcmb.2017-00460C
- Hernansanz-Agustín, P., Izquierdo-Álvarez, A., Sánchez-Gómez, F.J., Ramos, E., Villa-Piña, T., Lamas, S., Bogdanova, A., Martínez-Ruiz, A., 2014. Acute hypoxia produces a superoxide burst in cells. *Free Radical Biology and Medicine* 71, 146–156. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.011
- Hernansanz-Agustín, P., Ramos, E., Navarro, E., Parada, E., Sánchez-López, N., Peláez-Aguado, L., Cabrera-García, J.D., Tello, D., Buendía, I., Marina, A., Egea, J., López, M.G., Bogdanova, A., Martínez-Ruiz, A., 2017. Mitochondrial complex I deactivation is related to superoxide production in acute hypoxia. *Redox Biol* 12, 1040–1051. doi:10.1016/j.redox.2017.04.025
- Herrera, I., Cisneros, J., Maldonado, M., Ramírez, R., Ortiz-Quintero, B., Anso, E., Chandel, N.S., Selman, M., Pardo, A., 2013. Matrix Metalloproteinase (MMP)-1 Induces Lung Alveolar Epithelial Cell Migration and Proliferation, Protects from Apoptosis, and Represses Mitochondrial Oxygen Consumption. *Journal of Biological Chemistry* 288 36 , 25964–25975. doi:10.1074/jbc.M113.459784
- Higgins, D.F., Kimura, K., Bernhardt, W.M., Shrimanker, N., Akai, Y., Hohenstein, B., Saito, Y., Johnson, R.S., Kretzler, M., Cohen, C.D., Eckardt, K.-U., Iwano, M., Haase, V.H., 2007. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 117 12 , 3810–3820. doi:10.1172/JCI30487
- Higo, T., Hamada, K., Hisatsune, C., Nukina, N., Hashikawa, T., Hattori, M., Nakamura, T., Mikoshiba, K., 2010. Mechanism of ER Stress-Induced Brain Damage by IP3 Receptor. *Neuron* 68 5 , 865–878. doi:10.1016/j.neuron.2010.11.010
- Hirose, K., Morita, M., Ema, M., Mimura, J., Hamada, H., Fujii, H., Saijo, Y., Gotoh, O., Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y., 1996. cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS factor (Arnt2) with close sequence similarity to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt). *Mol. Cell. Biol.* 16 4 , 1706–1713.
- Hirose, Y., Johnson, Z.I., Schoepflin, Z.R., Markova, D.Z., Chiba, K., Toyama, Y., Shapiro, I.M., Risbud, M.V., 2014. FIH-1-Mint3 Axis Does Not Control HIF-1 α Transcriptional Activity in Nucleus Pulposus Cells. *Journal of Biological Chemistry* 289 30 , 20594–20605. doi:10.1074/jbc.M114.565101

- Hitomi, J., Katayama, T., Eguchi, Y., Kudo, T., Taniguchi, M., Koyama, Y., Manabe, T., Yamagishi, S., Bando, Y., Imaizumi, K., Tsujimoto, Y., Tohyama, M., 2004. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and A β -induced cell death. *The Journal of Cell Biology* 165 3 , 347–356. doi:10.1083/jcb.200310015
- Hodgson, U., 2002. Nationwide prevalence of sporadic and familial idiopathic pulmonary fibrosis: evidence of founder effect among multiplex families in Finland. *Thorax* 57 4 , 338–342. doi:10.1136/thorax.57.4.338
- Hoidal, J.R., Xu, P., Huecksteadt, T., Sanders, K.A., Pfeffer, K., 1997. Transcriptional regulation of human xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase. *Biochemical Society Transactions* 25 3 , 796–799. doi:10.1042/bst0250796
- Hollenhorst, M.I., Richter, K., Fronius, M., 2011. Ion Transport by Pulmonary Epithelia. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011, 1–16. doi:10.1155/2011/174306
- Hollien, J., Weissman, J.S., 2006. Decay of Endoplasmic Reticulum-Localized mRNAs During the Unfolded Protein Response. *Science* 313 5783 , 104–107. doi:10.1126/science.1129631
- Hong, K.M., Belperio, J.A., Keane, M.P., Burdick, M.D., Strieter, R.M., 2007. Differentiation of Human Circulating Fibrocytes as Mediated by Transforming Growth Factor- β and Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ . *Journal of Biological Chemistry* 282 31 , 22910–22920. doi:10.1074/jbc.M703597200
- Hong, M., Luo, S., Baumeister, P., Huang, J.-M., Gogia, R.K., Li, M., Lee, A.S., 2004. Underglycosylation of ATF6 as a Novel Sensing Mechanism for Activation of the Unfolded Protein Response. *Journal of Biological Chemistry* 279 12 , 11354–11363. doi:10.1074/jbc.M309804200
- Horimoto, S., Ninagawa, S., Okada, T., Koba, H., Sugimoto, T., Kamiya, Y., Kato, K., Takeda, S., Mori, K., 2013. The unfolded protein response transducer ATF6 represents a novel transmembrane-type endoplasmic reticulum-associated degradation substrate requiring both mannose trimming and SEL1L protein. *J. Biol. Chem.* 288 44 , 31517–31527. doi:10.1074/jbc.M113.476010
- Hosokawa, N., Wada, I., Nagasawa, K., Moriyama, T., Okawa, K., Nagata, K., 2008. Human XTP3-B Forms an Endoplasmic Reticulum Quality Control Scaffold with the HRD1-SEL1L Ubiquitin Ligase Complex and BiP. *Journal of Biological Chemistry* 283 30 , 20914–20924. doi:10.1074/jbc.M709336200
- Hotokezaka, Y., Katayama, I., van Leyen, K., Nakamura, T., 2015. GSK-3 β -dependent downregulation of γ -taxilin and α NAC merge to regulate ER stress responses. *Cell Death Dis* 6 4 , e1719. doi:10.1038/cddis.2015.90
- Hotokezaka, Y., van Leyen, K., Lo, E.H., Beatrix, B., Katayama, I., Jin, G., Nakamura, T., 2009. α NAC depletion as an initiator of ER stress-induced apoptosis in hypoxia. *Cell Death and Differentiation* 16 11 , 1505–1514. doi:10.1038/cdd.2009.90
- Hsu, Y.T., Wolter, K.G., Youle, R.J., 1997. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 8 , 3668–3672.
- Hu, C.-J., Sataur, A., Wang, L., Chen, H., Simon, M.C., 2007. The N-Terminal Transactivation Domain Confers Target Gene Specificity of Hypoxia-inducible Factors HIF-1 α and HIF-2 α . *Molecular Biology of the Cell* 18 11 , 4528–4542. doi:10.1091/mbc.e06-05-0419
- Hu, C.-J., Wang, L.-Y., Chodosh, L.A., Keith, B., Simon, M.C., 2003. Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in Hypoxic Gene Regulation. *Molecular and Cellular Biology* 23 24 , 9361–9374. doi:10.1128/MCB.23.24.9361-9374.2003
- Huang, L.E., Gu, J., Schau, M., Bunn, H.F., 1998. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 14 , 7987–7992.
- Huang, L.E., Pete, E.A., Schau, M., Milligan, J., Gu, J., 2002. Leu-574 of HIF-1 α Is Essential for the von Hippel-Lindau (VHL)-mediated Degradation Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 277 44 , 41750–41755. doi:10.1074/jbc.M207280200
- Huang, Z.J., Edery, I., Rosbash, M., 1993. PAS is a dimerization domain common to Drosophila Period and several transcription factors. *Nature* 364 6434 , 259–262. doi:10.1038/364259a0
- Hudson, L.G., Newkirk, K.M., Chandler, H.L., Choi, C., Fossey, S.L., Parent, A.E., Kusewitt, D.F., 2009. Cutaneous wound reepithelialization is compromised in mice lacking functional Slug (Snai2). *Journal of Dermatological Science* 56 1 , 19–26. doi:10.1016/j.jdermsci.2009.06.009
- Huggins, C.J., Mayekar, M.K., Martin, N., Saylor, K.L., Gonit, M., Jailwala, P., Kasoji, M., Haines, D.C., Quiñones, O.A., Johnson, P.F., 2016. C/EBP γ Is a Critical Regulator of Cellular Stress Response Networks through Heterodimerization with ATF4. *Mol Cell Biol* 36 5 , 693–713. doi:10.1128/MCB.00911-15
- Hui, A.S., Bauer, A.L., Striet, J.B., Schnell, P.O., Czyzyk-Krzeska, M.F., 2006. Calcium signaling stimulates translation of HIF- α during hypoxia. *The FASEB Journal* 20 3 , 466–475. doi:10.1096/fj.05-5086com
- Humphreys, B.D., Lin, S.-L., Kobayashi, A., Hudson, T.E., Nowlin, B.T., Bonventre, J.V., Valerius, M.T., McMahon, A.P., Duffield, J.S., 2010. Fate Tracing Reveals the Pericyte and Not Epithelial Origin of Myofibroblasts in Kidney Fibrosis. *Am J Pathol* 176 1 , 85–97. doi:10.2353/ajpath.2010.090517
- Hung, S.-P., Yang, M.-H., Tseng, K.-F., Lee, O.K., 2013. Hypoxia-Induced Secretion of TGF- β 1 in Mesenchymal Stem Cell Promotes Breast Cancer Cell Progression. *Cell Transplantation* 22 10 , 1869–1882. doi:10.3727/096368912X657954
- Hutchinson, J., Fogarty, A., Hubbard, R., McKeever, T., 2015. Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review. *European Respiratory Journal* 46 3 , 795–806. doi:10.1183/09031936.00185114
- Hwang, J., Walczak, C.P., Shaler, T.A., Olzmann, J.A., Zhang, L., Elias, J.E., Kopito, R.R., 2017. Characterization of protein complexes of the endoplasmic reticulum-associated degradation E3 ubiquitin ligase Hrd1. *Journal of Biological Chemistry* 292 22 , 9104–9116. doi:10.1074/jbc.M117.785055
- Hyde, D.M., Miller, L.A., McDonald, R.J., Stovall, M.Y., Wong, V., Pinkerton, K.E., Wegner, C.D., Rothlein, R., Plopper, C.G., 1999. Neutrophils enhance clearance of necrotic epithelial cells in ozone-induced lung injury in rhesus monkeys.

- American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 277 6 , L1190–L1198. doi:10.1152/ajplung.1999.277.6.L1190
- Hyseni, A., van der Groep, P., van der Wall, E., van Diest, P.J., 2011. Subcellular FIH-1 expression patterns in invasive breast cancer in relation to HIF-1 α expression. Cellular Oncology 34 6 , 565–570. doi:10.1007/s13402-011-0053-5
- Ichim, G., Tait, S.W.G., 2016. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. Nature Reviews Cancer 16, 539.
- Ikegami, M., Whitsett, J.A., Jobe, A., Ross, G., Fisher, J., Korfhagen, T., 2000. Surfactant metabolism in SP-D gene-targeted mice. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 279 3 , L468–L476. doi:10.1152/ajplung.2000.279.3.L468
- Ikenouchi, J., 2003. Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. Journal of Cell Science 116 10 , 1959–1967. doi:10.1242/jcs.00389
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D., Yamamoto, M., 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. Genes Dev. 13 1 , 76–86.
- Iwano, M., Plieth, D., Danoff, T.M., Xue, C., Okada, H., Neilson, E.G., 2002. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. Journal of Clinical Investigation 110 3 , 341–350. doi:10.1172/JCI200215518
- Iyer, S.N., Wild, J.S., Schiedt, M.J., Hyde, D.M., Margolin, S.B., Giri, S.N., 1995. Dietary intake of pirfenidone ameliorates bleomycin-induced lung fibrosis in hamsters. J. Lab. Clin. Med. 125 6 , 779–785.
- Jaffré, S., Dehoux, M., Paugam, C., Grenier, A., Chollet-Martin, S., Stern, J.-B., Mantz, J., Aubier, M., Crestani, B., 2002. Hepatocyte growth factor is produced by blood and alveolar neutrophils in acute respiratory failure. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 282 2 , L310–L315. doi:10.1152/ajplung.00121.2001
- Jain, K., Suryakumar, G., Ganju, L., Singh, S.B., 2016. Amelioration of ER stress by 4-phenylbutyric acid reduces chronic hypoxia induced cardiac damage and improves hypoxic tolerance through upregulation of HIF-1 α . Vascul. Pharmacol. 83, 36–46. doi:10.1016/j.vph.2016.03.004
- Jain, R., Barkauskas, C.E., Takeda, N., Bowie, E.J., Aghajanian, H., Wang, Q., Padmanabhan, A., Manderfield, L.J., Gupta, M., Li, D., Li, L., Trivedi, C.M., Hogan, B.L.M., Epstein, J.A., 2015. Plasticity of Hopx⁺ type I alveolar cells to regenerate type II cells in the lung. Nature Communications 6 1 . doi:10.1038/ncomms7727
- James, C.C., Zeitz, M.J., Calhoun, P.J., Lamouille, S., Smyth, J.W., 2018. Altered translation initiation of *Gja1* limits gap junction formation during epithelial–mesenchymal transition. Molecular Biology of the Cell 29 7 , 797–808. doi:10.1091/mbc.E17-06-0406
- Jansing, N.L., McClendon, J., Henson, P.M., Tuder, R.M., Hyde, D.M., Zemans, R.L., 2017. Unbiased Quantitation of Alveolar Type II to Alveolar Type I Cell Transdifferentiation during Repair after Lung Injury in Mice. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 57 5 , 519–526. doi:10.1165/rcmb.2017-0037MA
- Jayachandran, A., Königshoff, M., Yu, H., Rupniewska, E., Hecker, M., Klepetko, W., Seeger, W., Eickelberg, O., 2009. SNAIL transcription factors mediate epithelial–mesenchymal transition in lung fibrosis. Thorax 64 12 , 1053–1061. doi:10.1136/thx.2009.121798
- Jiang, B.H., Semenza, G.L., Bauer, C., Marti, H.H., 1996. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. American Journal of Physiology-Cell Physiology 271 4 , C1172–C1180. doi:10.1152/ajpcell.1996.271.4.C1172
- Jiang, X., Fang, G., Dong, L., Jin, P., Ding, L., Zhang, H., Fan, J., Mao, S., Fan, X., Gong, Y., Wang, Y., 2018. Chemical chaperone 4-phenylbutyric acid alleviates the aggregation of human familial pulmonary fibrosis-related mutant SP-A2 protein in part through effects on GRP78. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 1864 10 , 3546–3557. doi:10.1016/j.bbdis.2018.08.014
- Johnson, M.D., Bao, H.-F., Helms, M.N., Chen, X.-J., Tigue, Z., Jain, L., Dobbs, L.G., Eaton, D.C., 2006. Functional ion channels in pulmonary alveolar type I cells support a role for type I cells in lung ion transport. Proceedings of the National Academy of Sciences 103 13 , 4964–4969. doi:10.1073/pnas.0600855103
- Jomaa, A., Fu, Y.-H.H., Boehringer, D., Leibundgut, M., Shan, S., Ban, N., 2017. Structure of the quaternary complex between SRP, SR, and translocon bound to the translating ribosome. Nature Communications 8, 15470. doi:10.1038/ncomms15470
- Jones, J., 2011. Substrate stiffness regulates extracellular matrix deposition by alveolar epithelial cells. Research and Reports in Biology 1. doi:10.2147/RRB.S13178
- Jones, M.G., Fabre, A., Schneider, P., Cinetto, F., Sgalla, G., Mavrogordato, M., Jogai, S., Alzetani, A., Marshall, B.G., O'Reilly, K.M.A., Warner, J.A., Lackie, P.M., Davies, D.E., Hansell, D.M., Nicholson, A.G., Sinclair, I., Brown, K.K., Richeldi, L., 2016. Three-dimensional characterization of fibroblast foci in idiopathic pulmonary fibrosis. JCI Insight 1 5 . doi:10.1172/jci.insight.86375
- Jung, S.-N., Yang, W.K., Kim, J., Kim, H.S., Kim, E.J., Yun, H., Park, H., Kim, S.S., Choe, W., Kang, I., Ha, J., 2008. Reactive oxygen species stabilize hypoxia-inducible factor-1 alpha protein and stimulate transcriptional activity via AMP-activated protein kinase in DU145 human prostate cancer cells. Carcinogenesis 29 4 , 713–721. doi:10.1093/carcin/bgn032

K

- Kaihara, T., Kawamata, H., Imura, J., Fujii, S., Kitajima, K., Omotehara, F., Maeda, N., Nakamura, T., Fujimori, T., 2003. Redifferentiation and ZO-1 reexpression in liver-metastasized colorectal cancer: Possible association with epidermal growth factor receptor-induced tyrosine phosphorylation of ZO-1. *Cancer Science* 94 2 , 166–172. doi:10.1111/j.1349-7006.2003.tb01414.x
- Kaimori, A., Potter, J., Kaimori, J., Wang, C., Mezey, E., Koteish, A., 2007. Transforming Growth Factor- β 1 Induces an Epithelial-to-Mesenchymal Transition State in Mouse Hepatocytes in Vitro. *J. Biol. Chem.* 282 30 , 22089–22101. doi:10.1074/jbc.M700998200
- Kajstura, J., Rota, M., Hall, S.R., Hosoda, T., D’Amario, D., Sanada, F., Zheng, H., Ogórek, B., Rondon-Clavo, C., Ferreira-Martins, J., Matsuda, A., Arranto, C., Goichberg, P., Giordano, G., Haley, K.J., Bardelli, S., Rayatzadeh, H., Liu, X., Quaini, F., Liao, R., Leri, A., Perrella, M.A., Loscalzo, J., Anversa, P., 2011. Evidence for Human Lung Stem Cells. *New England Journal of Medicine* 364 19 , 1795–1806. doi:10.1056/NEJMoa1101324
- Kalluri, R., Weinberg, R.A., 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation* 119 6 , 1420–1428. doi:10.1172/JCI39104
- Kamada, S., Washida, M., Hasegawa, J., Kusano, H., Funahashi, Y., Tsujimoto, Y., 1997. Involvement of caspase-4(-like) protease in Fas-mediated apoptotic pathway. *Oncogene* 15 3 , 285–290. doi:10.1038/sj.onc.1201192
- Kamp, D.W., Liu, G., Cheresch, P., Kim, S.-J., Mueller, A., Lam, A.P., Trejo, H., Williams, D., Tulasiram, S., Baker, M., Ridge, K., Chandel, N.S., Beri, R., 2013. Asbestos-Induced Alveolar Epithelial Cell Apoptosis. The Role of Endoplasmic Reticulum Stress Response. *Am J Respir Cell Mol Biol* 49 6 , 892–901. doi:10.1165/rcmb.2013-0053OC
- Kanter, J.A., Sun, H., Chiu, S., DeCamp, M.M., Sporn, P.H.S., Sznajder, J.I., Bharat, A., 2015. Decreased CXCL12 is associated with impaired alveolar epithelial cell migration and poor lung healing after lung resection. *Surgery* 158 4 , 1073–1082. doi:10.1016/j.surg.2015.04.051
- Kapanci, Y., Weibel, E.R., Kaplan, H.P., Robinson, F.R., 1969. Pathogenesis and reversibility of the pulmonary lesions of oxygen toxicity in monkeys. II. Ultrastructural and morphometric studies. *Lab. Invest.* 20 1 , 101–118.
- Kardia, E., Mohamed, R., Yahaya, B.H., 2017. Stimulatory Secretions of Airway Epithelial Cells Accelerate Early Repair of Tracheal Epithelium. *Scientific Reports* 7 1 . doi:10.1038/s41598-017-11992-6
- Karki, P., Dahal, G.R., Park, I.-S., 2007. Both dimerization and interdomain processing are essential for caspase-4 activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356 4 , 1056–1061. doi:10.1016/j.bbrc.2007.03.102
- Kasai, H., Allen, J.T., Mason, R.M., Kamimura, T., Zhang, Z., 2005. TGF- β 1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respiratory Research* 6 1 . doi:10.1186/1465-9921-6-56
- Kasper, L.H., Boussouar, F., Boyd, K., Xu, W., Biesen, M., Rehg, J., Baudino, T.A., Cleveland, J.L., Brindle, P.K., 2005. Two transactivation mechanisms cooperate for the bulk of HIF-1-responsive gene expression. *The EMBO Journal* 24 22 , 3846–3858. doi:10.1038/sj.emboj.7600846
- Kasuno, K., Takabuchi, S., Fukuda, K., Kizaka-Kondoh, S., Yodoi, J., Adachi, T., Semenza, G.L., Hirota, K., 2004. Nitric Oxide Induces Hypoxia-inducible Factor 1 Activation That Is Dependent on MAPK and Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 279 4 , 2550–2558. doi:10.1074/jbc.M308197200
- Katsamba, P., Carroll, K., Ahlsen, G., Bahna, F., Vendome, J., Posy, S., Rajebhosale, M., Price, S., Jessell, T.M., Ben-Shaul, A., Shapiro, L., Honig, B.H., 2009. Linking molecular affinity and cellular specificity in cadherin-mediated adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 28 , 11594–11599. doi:10.1073/pnas.0905349106
- Katzenstein, A.-L.A., Myers, J.L., 1998. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Clinical Relevance of Pathologic Classification. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 157 4 , 1301–1315. doi:10.1164/ajrccm.157.4.9707039
- Kelley, J., Fabisiak, J.P., Hawes, K., Absher, M., 1991. Cytokine signaling in lung: transforming growth factor-beta secretion by lung fibroblasts. *Am. J. Physiol.* 260 2 Pt 1 , L123-128. doi:10.1152/ajplung.1991.260.2.L123
- Khalil, N., O’Connor, R.N., Unruh, H.W., Warren, P.W., Flanders, K.C., Kemp, A., Berezney, O.H., Greenberg, A.H., 1991. Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 5 2 , 155–162.
- Kietzmann, T., Mennerich, D., Dimova, E.Y., 2016. Hypoxia-Inducible Factors (HIFs) and Phosphorylation: Impact on Stability, Localization, and Transactivity. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 4. doi:10.3389/fcell.2016.00011
- Kim, H.J., Ingbar, D.H., Henke, C.A., 1996. Integrin mediation of type II cell adherence to provisional matrix proteins. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 271 2 , L277–L286. doi:10.1152/ajplung.1996.271.2.L277
- Kim, H.J., Jeong, J.S., Kim, S.R., Park, S.Y., Chae, H.J., Lee, Y.C., 2013. Inhibition of endoplasmic reticulum stress alleviates lipopolysaccharide-induced lung inflammation through modulation of NF- κ B/HIF-1 α signaling pathway. *Scientific Reports* 3 1 . doi:10.1038/srep01142
- Kim, J., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., Dang, C.V., 2006. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metabolism* 3 3 , 177–185. doi:10.1016/j.cmet.2006.02.002
- Kim, K.K., Wei, Y., Szekeres, C., Kugler, M.C., Wolters, P.J., Hill, M.L., Frank, J.A., Brumwell, A.N., Wheeler, S.E., Kreidberg, J.A., Chapman, H.A., 2009. Epithelial cell alpha3beta1 integrin links beta-catenin and Smad signaling to promote myofibroblast formation and pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* 119 1 , 213–224. doi:10.1172/JCI36940
- Kim, Kugler, M.C., Wolters, P.J., Robillard, L., Galvez, M.G., Brumwell, A.N., Sheppard, D., Chapman, H.A., 2006. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the

- extracellular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 35 , 13180–13185. doi:10.1073/pnas.0605669103
- Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., Murakami, S., 2006. Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis* 11 1 , 5–13. doi:10.1007/s10495-005-3088-0
- Kim, S., Ip, H.S., Lu, M.M., Clendenin, C., Parmacek, M.S., 1997. A serum response factor-dependent transcriptional regulatory program identifies distinct smooth muscle cell sublineages. *Molecular and Cellular Biology* 17 4 , 2266–2278. doi:10.1128/MCB.17.4.2266
- King, T.E., Bradford, W.Z., Castro-Bernardini, S., Fagan, E.A., Glaspole, I., Glassberg, M.K., Gorina, E., Hopkins, P.M., Kardatzke, D., Lancaster, L., Lederer, D.J., Nathan, S.D., Pereira, C.A., Sahn, S.A., Sussman, R., Swigris, J.J., Noble, P.W., 2014. A Phase 3 Trial of Pirfenidone in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *New England Journal of Medicine* 370 22 , 2083–2092. doi:10.1056/NEJMoa1402582
- King, T.E., Pardo, A., Selman, M., 2011. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 378 9807 , 1949–1961. doi:10.1016/S0140-6736(11)60052-4
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14 22 , 5579–5588.
- Klien, J.H., Adamson, I.Y., 1989. Fibroblast inhibition and prostaglandin secretion by alveolar epithelial cells exposed to silica. *Lab. Invest.* 60 6 , 808–813.
- Knebel, D., Sieber, M., Reichelt, R., Galla, H.-J., Amrein, M., 2002. Scanning Force Microscopy at the Air-Water Interface of an Air Bubble Coated with Pulmonary Surfactant. *Biophysical Journal* 82 1 , 474–480. doi:10.1016/S0006-3495(02)75412-X
- Kobayashi, K., Jomaa, A., Lee, J.H., Chandrasekar, S., Boehringer, D., Shan, S., Ban, N., 2018. Structure of a prehandover mammalian ribosomal SRP-SRP receptor targeting complex. *Science* 360 6386 , 323–327. doi:10.1126/science.aar7924
- Koh, M.Y., Darnay, B.G., Powis, G., 2008. Hypoxia-Associated Factor, a Novel E3-Ubiquitin Ligase, Binds and Ubiquitinates Hypoxia-Inducible Factor 1, Leading to Its Oxygen-Independent Degradation. *Molecular and Cellular Biology* 28 23 , 7081–7095. doi:10.1128/MCB.00773-08
- Koh, M.Y., Lemos, R., Liu, X., Powis, G., 2011. The Hypoxia-Associated Factor Switches Cells from HIF-1 - to HIF-2 -Dependent Signaling Promoting Stem Cell Characteristics, Aggressive Tumor Growth and Invasion. *Cancer Research* 71 11 , 4015–4027. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-4142
- Koh, M.Y., Nguyen, V., Lemos, R., Darnay, B.G., Kiriakova, G., Abdelmelek, M., Ho, T.H., Karam, J., Monzon, F.A., Jonasch, E., Powis, G., 2015. Hypoxia-Induced SUMOylation of E3 Ligase HAF Determines Specific Activation of HIF2 in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Research* 75 2 , 316–329. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2190
- Kondo, H., Miyoshi, K., Sakiyama, S., Tangoku, A., Noma, T., 2015. Differential Regulation of Gene Expression of Alveolar Epithelial Cell Markers in Human Lung Adenocarcinoma-Derived A549 Clones. *Stem Cells Int* 2015. doi:10.1155/2015/165867
- Königshoff, M., Balsara, N., Pfaff, E.-M., Kramer, M., Chrobak, I., Seeger, W., Eickelberg, O., 2008. Functional Wnt Signaling Is Increased in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLoS ONE* 3 5 , e2142. doi:10.1371/journal.pone.0002142
- Koo, S.-M., Uh, S.-T., Kim, D.S., Kim, Y.W., Chung, M.P., Park, C.S., Jeong, S.H., Park, Y.B., Lee, H.L., Shin, J.W., Lee, E.J., Lee, J.H., Jegal, Y., Lee, H.K., Kim, Y.H., Song, J.W., Park, M.S., Hwangbo, Y., 2016. Relationship between survival and age in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of Thoracic Disease* 8 11 , 3255–3264. doi:10.21037/jtd.2016.11.40
- Koong, A.C., Auger, E.A., Chen, E.Y., Giaccia, A.J., 1994. The regulation of GRP78 and messenger RNA levels by hypoxia is modulated by protein kinase C activators and inhibitors. *Radiat. Res.* 138 1 Suppl , S60-63.
- Korfei, M., Ruppert, C., Mahavadi, P., Henneke, I., Markart, P., Koch, M., Lang, G., Fink, L., Bohle, R.-M., Seeger, W., Weaver, T.E., Guenther, A., 2008a. Epithelial Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Sporadic Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 178 8 , 838–846. doi:10.1164/rccm.200802-313OC
- Koshiji, M., Kageyama, Y., Pete, E.A., Horikawa, I., Barrett, J.C., Huang, L.E., 2004. HIF-1 α induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO J.* 23 9 , 1949–1956. doi:10.1038/sj.emboj.7600196
- Kosmider, B., Messier, E.M., Chu, H.W., Mason, R.J., 2011. Human Alveolar Epithelial Cell Injury Induced by Cigarette Smoke. *PLOS ONE* 6 12 , e26059. doi:10.1371/journal.pone.0026059
- Koval, M., 2013. Claudin Heterogeneity and Control of Lung Tight Junctions. *Annual Review of Physiology* 75 1 , 551–567. doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183809
- Kranz, P., Neumann, F., Wolf, A., Classen, F., Pompsch, M., Ocklenburg, T., Baumann, J., Janke, K., Baumann, M., Goepelt, K., Riffkin, H., Metzen, E., Brockmeier, U., 2017. PDI is an essential redox-sensitive activator of PERK during the unfolded protein response (UPR). *Cell Death Dis* 8 8 , e2986. doi:10.1038/cddis.2017.369
- Krebs, J., Agellon, L.B., Michalak, M., 2015. Ca(2+) homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 460 1 , 114–121. doi:10.1016/j.bbrc.2015.02.004
- Krick, S., Eul, B.G., Hänze, J., Savai, R., Grimminger, F., Seeger, W., Rose, F., 2005. Role of hypoxia-inducible factor-1 α in hypoxia-induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 32 5 , 395–403. doi:10.1165/rcmb.2004-0314OC

- Kumar, A., Kapnadak, S.G., Girgis, R.E., Raghu, G., 2018. Lung transplantation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Expert Review of Respiratory Medicine* 12 5 , 375–385. doi:10.1080/17476348.2018.1462704
- Kumar, A., Tikoo, S., Maity, S., Sengupta, Shantanu, Sengupta, Sagar, Kaur, A., Bachhawat, A.K., 2012. Mammalian proapoptotic factor ChaC1 and its homologues function as γ -glutamyl cyclotransferases acting specifically on glutathione. *EMBO Rep.* 13 12 , 1095–1101. doi:10.1038/embor.2012.156
- Kurita, Y., Araya, J., Minagawa, S., Hara, H., Ichikawa, A., Saito, N., Kadota, T., Tsubouchi, K., Sato, N., Yoshida, M., Kobayashi, K., Ito, S., Fujita, Y., Utsumi, H., Yanagisawa, H., Hashimoto, M., Wakui, H., Yoshii, Y., Ishikawa, T., Numata, T., Kaneko, Y., Asano, H., Yamashita, M., Odaka, M., Morikawa, T., Nakayama, K., Kuwano, K., 2017. Pirfenidone inhibits myofibroblast differentiation and lung fibrosis development during insufficient mitophagy. *Respiratory Research* 18 1 . doi:10.1186/s12931-017-0600-3
- Kuschel, A., Simon, P., Tug, S., 2012. Functional regulation of HIF-1 α under normoxia-is there more than post-translational regulation? *Journal of Cellular Physiology* 227 2 , 514–524. doi:10.1002/jcp.22798
- Kusko, R.L., Brothers, J.F., Tedrow, J., Pandit, K., Huleihel, L., Perdomo, C., Liu, G., Juan-Guardela, B., Kass, D., Zhang, S., Lenburg, M., Martinez, F., Quackenbush, J., Sciruba, F., Limper, A., Geraci, M., Yang, I., Schwartz, D.A., Beane, J., Spira, A., Kaminski, N., 2016. Integrated Genomics Reveals Convergent Transcriptomic Networks Underlying Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 194 8 , 948–960. doi:10.1164/rccm.201510-2026OC
- Kuwahara, M., Hatoko, M., Tada, H., Tanaka, A., 2001. E-cadherin expression in wound healing of mouse skin. *J. Cutan. Pathol.* 28 4 , 191–199.
- Kuwano, K., Kunitake, R., Kawasaki, M., Nomoto, Y., Hagimoto, N., Nakanishi, Y., Hara, N., 1996. P21Waf1/Cip1/Sdi1 and p53 expression in association with DNA strand breaks in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 154 2 , 477–483. doi:10.1164/ajrccm.154.2.8756825
- Kuwano, K., Miyazaki, H., Hagimoto, N., Kawasaki, M., Fujita, M., Kunitake, R., Kaneko, Y., Hara, N., 1999. The involvement of Fas-Fas ligand pathway in fibrosing lung diseases. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20 1 , 53–60.
- Kuwano, K., Nakashima, N., Inoshima, I., Hagimoto, N., Fujita, M., Yoshimi, M., Maeyama, T., Hamada, N., Watanabe, K., Hara, N., 2003. Oxidative stress in lung epithelial cells from patients with idiopathic interstitial pneumonias. *European Respiratory Journal* 21 2 , 232–240. doi:10.1183/09031936.03.00063203

L

- Lakari, E., Pääkkö, P., Pietarinen-Runtti, P., Kinnula, V.L., 2000. Manganese Superoxide Dismutase and Catalase Are Coordinately Expressed in the Alveolar Region in Chronic Interstitial Pneumonias and Granulomatous Diseases of the Lung. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 161 2 , 615–621. doi:10.1164/ajrccm.161.2.9904091
- LaManna, J.C., Vendel, L.M., Farrell, R.M., 1992. Brain adaptation to chronic hypobaric hypoxia in rats. *J. Appl. Physiol.* 72 6 , 2238–2243. doi:10.1152/jappl.1992.72.6.2238
- Lamb, H.K., Mee, C., Xu, W., Liu, L., Blond, S., Cooper, A., Charles, I.G., Hawkins, A.R., 2006. The Affinity of a Major Ca²⁺ Binding Site on GRP78 Is Differentially Enhanced by ADP and ATP. *Journal of Biological Chemistry* 281 13 , 8796–8805. doi:10.1074/jbc.M503964200
- Lamberti, M.J., Pansa, M.F., Vera, R.E., Fernández-Zapico, M.E., Rumie Vittar, N.B., Rivarola, V.A., 2017. Transcriptional activation of HIF-1 by a ROS-ERK axis underlies the resistance to photodynamic therapy. *PLOS ONE* 12 5 , e0177801. doi:10.1371/journal.pone.0177801
- Lamouille, S., Xu, J., Derynck, R., 2014. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15 3 , 178–196. doi:10.1038/nrm3758
- Lando, D., 2002. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes & Development* 16 12 , 1466–1471. doi:10.1101/gad.991402
- Lawson, W.E., Cheng, D.-S., Degryse, A.L., Tanjore, H., Polosukhin, V.V., Xu, X.C., Newcomb, D.C., Jones, B.R., Roldan, J., Lane, K.B., Morrissey, E.E., Beers, M.F., Yull, F.E., Blackwell, T.S., 2011. Endoplasmic reticulum stress enhances fibrotic remodeling in the lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 26 , 10562–10567. doi:10.1073/pnas.1107559108
- Lawson, W.E., Crossno, P.F., Polosukhin, V.V., Roldan, J., Cheng, D.-S., Lane, K.B., Blackwell, T.R., Xu, C., Markin, C., Ware, L.B., Miller, G.G., Loyd, J.E., Blackwell, T.S., 2008a. Endoplasmic reticulum stress in alveolar epithelial cells is prominent in IPF: association with altered surfactant protein processing and herpesvirus infection. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 294 6 , L1119–1126. doi:10.1152/ajplung.00382.2007
- Lawson, W.E., Grant, S.W., Ambrosini, V., Womble, K.E., Dawson, E.P., Lane, K.B., Markin, C., Renzoni, E., Lympny, P., Thomas, A.Q., Roldan, J., Scott, T.A., Blackwell, T.S., Phillips, J.A., Loyd, J.E., du Bois, R.M., 2004. Genetic mutations in surfactant protein C are a rare cause of sporadic cases of IPF. *Thorax* 59 11 , 977–980. doi:10.1136/thx.2004.026336
- Le Parlement Européen, Le Conseil de L'UE, 2000. RÈGLEMENT (CE) No 141/2000 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 16 décembre 1999 concernant les médicaments orphelins.
- Leadsham, J.E., Sanders, G., Giannaki, S., Bastow, E.L., Hutton, R., Naeimi, W.R., Breitenbach, M., Gourlay, C.W., 2013. Loss of cytochrome c oxidase promotes RAS-dependent ROS production from the ER resident NADPH oxidase, Yno1p, in yeast. *Cell Metab.* 18 2 , 279–286. doi:10.1016/j.cmet.2013.07.005

- Lee, A.-H., Iwakoshi, N.N., Glimcher, L.H., 2003. XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response. *Molecular and Cellular Biology* 23 21 , 7448–7459. doi:10.1128/MCB.23.21.7448-7459.2003
- Lee, H.-M., Kang, J.-H., Shin, J.-M., Lee, S.-A., Park, I.-H., 2017. Chemical Chaperone of Endoplasmic Reticulum Stress Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by TGF- β 1 in Airway Epithelium via the c-Src Pathway. *Mediators of Inflammation* 2017, 1–9. doi:10.1155/2017/8123281
- Lei, W., Zhang, K., Pan, X., Hu, Y., Wang, D., Yuan, X., Shu, G., Song, J., 2010. Histone deacetylase 1 is required for transforming growth factor- β 1-induced epithelial–mesenchymal transition. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42 9 , 1489–1497. doi:10.1016/j.biocel.2010.05.006
- Leight, J.L., Wozniak, M.A., Chen, S., Lynch, M.L., Chen, C.S., 2012. Matrix rigidity regulates a switch between TGF- β 1-induced apoptosis and epithelial–mesenchymal transition. *Molecular Biology of the Cell* 23 5 , 781–791. doi:10.1091/mbc.e11-06-0537
- Lesur, O., Arsalane, K., Lane, D., 1996. Lung alveolar epithelial cell migration in vitro: modulators and regulation processes. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 270 3 , L311–L319. doi:10.1152/ajplung.1996.270.3.L311
- Li, G., Mongillo, M., Chin, K.-T., Harding, H., Ron, D., Marks, A.R., Tabas, I., 2009. Role of ERO1- α -mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *The Journal of Cell Biology* 186 6 , 783–792. doi:10.1083/jcb.200904060
- Li, H., Chen, X., Gao, Y., Wu, J., Zeng, F., Song, F., 2015. XBP1 induces snail expression to promote epithelial- to-mesenchymal transition and invasion of breast cancer cells. *Cellular Signalling* 27 1 , 82–89. doi:10.1016/j.cellsig.2014.09.018
- Li, M., Krishnaveni, M.S., Li, C., Zhou, B., Xing, Y., Banfalvi, A., Li, A., Lombardi, V., Akbari, O., Borok, Z., Minoo, P., 2011. Epithelium-specific deletion of TGF- β receptor type II protects mice from bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* 121 1 , 277–287. doi:10.1172/JCI42090
- Li, S.H., Shin, D.H., Chun, Y.-S., Lee, M.K., Kim, M.-S., Park, J.-W., 2008. A novel mode of action of YC-1 in HIF inhibition: stimulation of FIH-dependent p300 dissociation from HIF-1. *Molecular Cancer Therapeutics* 7 12 , 3729–3738. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0074
- Li, W.H., Yuan, D.Y., Sun, F.Y., Zhao, F.C., Zhang, M., Liu, Z., 2011. The Effects of High Altitude Hypoxia Environment on Ultrastructure and the Expression of HIF-1 α in the Rat Lung. *Applied Mechanics and Materials* 140, 68–73. doi:10.4028/www.scientific.net/AMM.140.68
- Li, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E.T., Wang, H., Yang, X., 2013. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of Hematology & Oncology* 6 1 , 19. doi:10.1186/1756-8722-6-19
- Li, Y., Camacho, P., 2004. Ca²⁺-dependent redox modulation of SERCA 2b by ERp57. *J Cell Biol* 164 1 , 35–46. doi:10.1083/jcb.200307010
- Liang, K., Ding, X., Lin, C., Kang, Y.J., 2015. Featured Article: Hypoxia-inducible factor-1 α dependent nuclear entry of factor inhibiting HIF-1. *Experimental Biology and Medicine* 240 11 , 1446–1451. doi:10.1177/1535370215570821
- Liebow, A.A., Carrington, C.B., 1969. The interstitial pneumonias., in: *Frontiers of Pulmonary Radiology*. New York Grune & Stratton, pp. 102–141.
- Lim, M.C.C., Maubach, G., Zhuo, L., 2009. TGF- β 1 down-regulates connexin 43 expression and gap junction intercellular communication in rat hepatic stellate cells. *European Journal of Cell Biology* 88 12 , 719–730. doi:10.1016/j.ejcb.2009.08.003
- Linxweiler, M., Schorr, S., Schäuble, N., Jung, M., Linxweiler, J., Langer, F., Schäfers, H.-J., Cavalíé, A., Zimmermann, R., Greiner, M., 2013. Targeting cell migration and the endoplasmic reticulum stress response with calmodulin antagonists: a clinically tested small molecule phenocopy of SEC62 gene silencing in human tumor cells. *BMC Cancer* 13 1 . doi:10.1186/1471-2407-13-574
- Liou, J., Fivaz, M., Inoue, T., Meyer, T., 2007. Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca²⁺ store depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 22 , 9301–9306. doi:10.1073/pnas.0702866104
- Liou, J., Kim, M.L., Heo, W.D., Jones, J.T., Myers, J.W., Ferrell, J.E., Meyer, T., 2005. STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr. Biol.* 15 13 , 1235–1241. doi:10.1016/j.cub.2005.05.055
- Liu, C.-L., Li, X., Hu, G.-L., Li, R.-J., He, Y.-Y., Zhong, W., Li, S., He, K.-L., Wang, L.-L., 2012. Salubrinal protects against tunicamycin and hypoxia induced cardiomyocyte apoptosis via the PERK-eIF2 α signaling pathway. *J Geriatr Cardiol* 9 3 , 258–268. doi:10.3724/SP.J.1263.2012.02292
- Liu, L., Canon, B., Yee, H.T., Yie, T.A., Hajjou, M., Rom, W.N., 2009. Wnt Pathway in Pulmonary Fibrosis in the Bleomycin Mouse Model. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 28 2 , 99–108.
- López-Hernández, B., Ceña, V., Posadas, I., 2015. The endoplasmic reticulum stress and the HIF-1 signalling pathways are involved in the neuronal damage caused by chemical hypoxia. *Br. J. Pharmacol.* 172 11 , 2838–2851. doi:10.1111/bph.13095
- Lopez-Rodriguez, E., Gay-Jordi, G., Mucci, A., Lachmann, N., Serrano-Mollar, A., 2017. Lung surfactant metabolism: early in life, early in disease and target in cell therapy. *Cell and Tissue Research* 367 3 , 721–735. doi:10.1007/s00441-016-2520-9
- Low, F.N., 1953. The pulmonary alveolar epithelium of laboratory mammals and man. *The Anatomical Record* 117 2 , 241–263. doi:10.1002/ar.1091170208

- Lu, Y., 2012. Inhibition of hypoxia-induced epithelial mesenchymal transition by luteolin in non-small cell lung cancer cells. *Molecular Medicine Reports*. doi:10.3892/mmr.2012.884
- Ludbrook, S.B., Barry, S.T., Delves, C.J., Horgan, C.M.T., 2003. The integrin α v β 3 is a receptor for the latency-associated peptides of transforming growth factors β 1 and β 3. *Biochem. J.* 369 Pt 2 , 311–318. doi:10.1042/BJ20020809
- Luo, D., Wang, J., Li, J., Post, M., 2011. Mouse Snail Is a Target Gene for HIF. *Molecular Cancer Research* 9 2 , 234–245. doi:10.1158/1541-7786.MCR-10-0214
- Luo, S., Baumeister, P., Yang, S., Abcouwer, S.F., Lee, A.S., 2003. Induction of Grp78/BiP by Translational Block ACTIVATION OF THE Grp78 PROMOTER BY ATF4 THROUGH AN UPSTREAM ATF/CRE SITE INDEPENDENT OF THE ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS ELEMENTS. *J. Biol. Chem.* 278 39 , 37375–37385. doi:10.1074/jbc.M303619200
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X., 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94 4 , 481–490.

M

- Ma, Brewer, J.W., Diehl, J.A., Hendershot, L.M., 2002. Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J. Mol. Biol.* 318 5 , 1351–1365.
- Ma, K., Vattem, K.M., Wek, R.C., 2002. Dimerization and Release of Molecular Chaperone Inhibition Facilitate Activation of Eukaryotic Initiation Factor-2 Kinase in Response to Endoplasmic Reticulum Stress. *Journal of Biological Chemistry* 277 21 , 18728–18735. doi:10.1074/jbc.M200903200
- Ma, T., Fukuda, N., Song, Y., Matthay, M.A., Verkman, A.S., 2000. Lung fluid transport in aquaporin-5 knockout mice. *Journal of Clinical Investigation* 105 1 , 93–100. doi:10.1172/JCI8258
- Ma, Y., Hendershot, L.M., 2003. Delineation of a Negative Feedback Regulatory Loop That Controls Protein Translation during Endoplasmic Reticulum Stress. *J. Biol. Chem.* 278 37 , 34864–34873. doi:10.1074/jbc.M301107200
- Maeyama, T., Kuwano, K., Kawasaki, M., Kunitake, R., Hagimoto, N., Matsuba, T., Yoshimi, M., Inoshima, I., Yoshida, K., Hara, N., 2001. Upregulation of Fas-signalling molecules in lung epithelial cells from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* 17 2 , 180–189.
- Maher, T.M., Evans, I.C., Bottoms, S.E., Mercer, P.F., Thorley, A.J., Nicholson, A.G., Laurent, G.J., Tetley, T.D., Chambers, R.C., McAnulty, R.J., 2010. Diminished Prostaglandin E₂ Contributes to the Apoptosis Paradox in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 182 1 , 73–82. doi:10.1164/rccm.200905-0674OC
- Mahon, P.C., 2001. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes & Development* 15 20 , 2675–2686. doi:10.1101/gad.924501
- Maitra, M., Wang, Y., Gerard, R.D., Mendelson, C.R., Garcia, C.K., 2010. Surfactant Protein A2 Mutations Associated with Pulmonary Fibrosis Lead to Protein Instability and Endoplasmic Reticulum Stress. *J Biol Chem* 285 29 , 22103–22113. doi:10.1074/jbc.M110.121467
- Marchi, S., Patergnani, S., Missiroli, S., Morciano, G., Rimessi, A., Wieckowski, M.R., Giorgi, C., Pinton, P., 2018. Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death. *Cell Calcium* 69 , 62–72. doi:10.1016/j.ceca.2017.05.003
- Marciniak, S.J., Garcia-Bonilla, L., Hu, J., Harding, H.P., Ron, D., 2006. Activation-dependent substrate recruitment by the eukaryotic translation initiation factor 2 kinase PERK. *The Journal of Cell Biology* 172 2 , 201–209. doi:10.1083/jcb.200508099
- Marciniak, S.J., Yun, C.Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H.P., Ron, D., 2004. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 18 24 , 3066–3077. doi:10.1101/gad.1250704
- Markart, P., Luboinski, T., Korfei, M., Schmidt, R., Wygrecka, M., Mahavadi, P., Mayer, K., Wilhelm, J., Seeger, W., Guenther, A., Ruppert, C., 2009. Alveolar Oxidative Stress is Associated with Elevated Levels of Nonenzymatic Low-Molecular-Weight Antioxidants in Patients with Different Forms of Chronic Fibrosing Interstitial Lung Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling* 11 2 , 227–240. doi:10.1089/ars.2008.2105
- Marmai, C., Sutherland, R.E., Kim, K.K., Dolganov, G.M., Fang, X., Kim, S.S., Jiang, S., Golden, J.A., Hoopes, C.W., Matthay, M.A., Chapman, H.A., Wolters, P.J., 2011. Alveolar epithelial cells express mesenchymal proteins in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 301 1 , L71–L78. doi:10.1152/ajplung.00212.2010
- Mason, R.J., Leslie, C.C., McCormick-Shannon, K., Deterding, R.R., Nakamura, T., Rubin, J.S., Shannon, J.M., 1994. Hepatocyte growth factor is a growth factor for rat alveolar type II cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 11 5 , 561–567. doi:10.1165/ajrcmb.11.5.7524567
- Matsumoto, M., Minami, M., Takeda, K., Sakao, Y., Akira, S., 1996. Ectopic expression of CHOP (GADD153) induces apoptosis in M1 myeloblastic leukemia cells. *FEBS Lett.* 395 2–3 , 143–147.
- Matthay, M.A., Folkesson, H.G., Clerici, C., 2002. Lung Epithelial Fluid Transport and the Resolution of Pulmonary Edema. *Physiological Reviews* 82 3 , 569–600. doi:10.1152/physrev.00003.2002
- Matyash, M., Matyash, V., Nolte, C., Sorrentino, V., Kettenmann, H., 2002. Requirement of functional ryanodine receptor type 3 for astrocyte migration. *The FASEB Journal* 16 1 , 84–86. doi:10.1096/fj.01-0380fje
- Maynard, R.L., Donaldson, K., Tetley, T.D., 2012. Type 1 pulmonary epithelial cells: a new compartment involved in the slow phase of particle clearance from alveoli. *Nanotoxicology* 7 3 , 350–351. doi:10.3109/17435390.2012.658446

- McCullough, K.D., Martindale, J.L., Klotz, L.O., Aw, T.Y., Holbrook, N.J., 2001. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol. Cell. Biol.* 21 4 , 1249–1259. doi:10.1128/MCB.21.4.1249-1259.2001
- McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M., Hayes, J.D., 2003. Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J. Biol. Chem.* 278 24 , 21592–21600. doi:10.1074/jbc.M300931200
- Mederacke, I., Hsu, C.C., Troeger, J.S., Huebener, P., Mu, X., Dapito, D.H., Pradere, J.-P., Schwabe, R.F., 2013. Fate-tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its etiology. *Nat Commun* 4, 2823. doi:10.1038/ncomms3823
- Mendez, M.G., Kojima, S.-I., Goldman, R.D., 2010. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J* 24 6 , 1838–1851. doi:10.1096/fj.09-151639
- Menezes, M.E., 2014. The Wnt/ β -catenin Signaling Pathway in Epithelial Mesenchymal Transition. *Postdoc Journal.* doi:10.14304/SURYA.JPR.V2N7.1
- Meng, Q., Guo, H., Xiao, L., Cui, Y., Guo, R., Xiao, D., Huang, Y., 2013. mTOR regulates TGF- β ₂-induced epithelial-mesenchymal transition in cultured human lens epithelial cells. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 251 10 , 2363–2370. doi:10.1007/s00417-013-2435-z
- Metzen, E., Stiehl, D.P., Doege, K., Marxsen, J.H., Hellwig-Bürgel, T., Jelkmann, W., 2005. Regulation of the prolyl hydroxylase domain protein 2 (*phd2* / *egln-1*) gene: identification of a functional hypoxia-responsive element. *Biochemical Journal* 387 3 , 711–717. doi:10.1042/BJ20041736
- Miettinen, P.J., Ebner, R., Lopez, A.R., Derynck, R., 1994. TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J. Cell Biol.* 127 6 Pt 2 , 2021–2036.
- Migneault, F., Boncoeur, É., Morneau, F., Pascariu, M., Dagenais, A., Berthiaume, Y., 2013. Cycloheximide and lipopolysaccharide downregulate α ENaC mRNA via different mechanisms in alveolar epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 305 10 , L747–L755. doi:10.1152/ajplung.00023.2013
- Milkiewicz, M., Doyle, J.L., Fudalewski, T., Ispanovic, E., Aghasi, M., Haas, T.L., 2007. HIF-1 α and HIF-2 α play a central role in stretch-induced but not shear-stress-induced angiogenesis in rat skeletal muscle: HIF-1 α and HIF-2 α in stretch-induced angiogenesis. *The Journal of Physiology* 583 2 , 753–766. doi:10.1113/jphysiol.2007.136325
- Mingyuan, X., Qianqian, P., Shengquan, X., Chenyi, Y., Rui, L., Yichen, S., Jinghong, X., 2017. Hypoxia-inducible factor-1 α activates transforming growth factor- β 1/Smad signaling and increases collagen deposition in dermal fibroblasts. *Oncotarget* 9 3 , 3188–3197. doi:10.18632/oncotarget.23225
- Misiewicz, M., Déry, M.-A., Foveau, B., Jodoin, J., Ruths, D., LeBlanc, A.C., 2013. Identification of a Novel Endoplasmic Reticulum Stress Response Element Regulated by XBP1. *J Biol Chem* 288 28 , 20378–20391. doi:10.1074/jbc.M113.457242
- Miyamoto, N., Izumi, H., Miyamoto, R., Bin, H., Kondo, H., Tawara, A., Sasaguri, Y., Kohno, K., 2011. Transcriptional Regulation of Activating Transcription Factor 4 under Oxidative Stress in Retinal Pigment Epithelial ARPE-19/HPV-16 Cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52 3 , 1226–1234. doi:10.1167/iovs.10-5775
- Mizuno, S., Bogaard, H.J., Voelkel, N.F., Umeda, Y., Kadowaki, M., Ameshima, S., Miyamori, I., Ishizaki, T., 2009. Hypoxia regulates human lung fibroblast proliferation via p53-dependent and -independent pathways. *Respir Res* 10 1 , 17. doi:10.1186/1465-9921-10-17
- Mo, X.-T., Zhou, W.-C., Cui, W.-H., Li, D.-L., Li, L.-C., Xu, L., Zhao, P., Gao, J., 2015. Inositol-requiring protein 1 - X-box-binding protein 1 pathway promotes epithelial-mesenchymal transition via mediating snail expression in pulmonary fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 65, 230–238. doi:10.1016/j.biocel.2015.06.006
- Molyneaux, P.L., Cox, M.J., Willis-Owen, S.A.G., Mallia, P., Russell, K.E., Russell, A.-M., Murphy, E., Johnston, S.L., Schwartz, D.A., Wells, A.U., Cookson, W.O.C., Maher, T.M., Moffatt, M.F., 2014. The Role of Bacteria in the Pathogenesis and Progression of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 190 8 , 906–913. doi:10.1164/rccm.201403-0541OC
- Moore, B.B., Moore, T.A., 2015. Viruses in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Etiology and Exacerbation. *Ann Am Thorac Soc* 12 Suppl 2, S186-192. doi:10.1513/AnnalsATS.201502-088AW
- Moore, B.B., Peters-Golden, M., Christensen, P.J., Lama, V., Kuziel, W.A., Paine, R., Toews, G.B., 2003. Alveolar epithelial cell inhibition of fibroblast proliferation is regulated by MCP-1/CCR2 and mediated by PGE₂. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 284 2 , L342–L349. doi:10.1152/ajplung.00168.2002
- Morandi, A., Taddei, M.L., Chiarugi, P., Giannoni, E., 2017. Targeting the Metabolic Reprogramming That Controls Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Aggressive Tumors. *Frontiers in Oncology* 7. doi:10.3389/fonc.2017.00040
- Mowat, F.M., Luhmann, U.F.O., Smith, A.J., Lange, C., Duran, Y., Harten, S., Shukla, D., Maxwell, P.H., Ali, R.R., Bainbridge, J.W.B., 2010. HIF-1 α and HIF-2 α Are Differentially Activated in Distinct Cell Populations in Retinal Ischaemia. *PLoS One* 5 6 . doi:10.1371/journal.pone.0011103
- Mu, D., Cambier, S., Fjellbirkeland, L., Baron, J.L., Munger, J.S., Kawakatsu, H., Sheppard, D., Broaddus, V.C., Nishimura, S.L., 2002. The integrin α β 8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF- β 1. *J Cell Biol* 157 3 , 493–507. doi:10.1083/jcb.200109100
- Mulgeta, S., Maguire, J.A., Newitt, J.L., Russo, S.J., Kotorashvili, A., Beers, M.F., 2007. Misfolded BRICHOS SP-C mutant proteins induce apoptosis via caspase-4- and cytochrome c-related mechanisms. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 293 3 , L720–L729. doi:10.1152/ajplung.00025.2007

- Mulugeta, S., Nguyen, V., Russo, S.J., Muniswamy, M., Beers, M.F., 2005. A surfactant protein C precursor protein BRICHOS domain mutation causes endoplasmic reticulum stress, proteasome dysfunction, and caspase 3 activation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 32 6 , 521–530. doi:10.1165/rcmb.2005-0009OC
- Mungrue, I.N., Pagnon, J., Kohannim, O., Gargalovic, P.S., Lusa, A.J., 2009. CHAC1/MGC4504 is a novel proapoptotic component of the unfolded protein response, downstream of the ATF4-ATF3-CHOP cascade. *J. Immunol.* 182 1 , 466–476.

N

- Nagelkerke, A., Bussink, J., Mujcic, H., Wouters, B.G., Lehmann, S., Sweep, F.C., Span, P.N., 2013. Hypoxia stimulates migration of breast cancer cells via the PERK/ATF4/LAMP3-arm of the unfolded protein response. *Breast Cancer Res* 15 1 , R2. doi:10.1186/bcr3373
- Nakamura, S., Takizawa, H., Shimazawa, M., Hashimoto, Y., Sugitani, S., Tsuruma, K., Hara, H., 2013. Mild Endoplasmic Reticulum Stress Promotes Retinal Neovascularization via Induction of BiP/GRP78. *PLoS ONE* 8 3 , e60517. doi:10.1371/journal.pone.0060517
- Nakashima, N., 2005. The p53-Mdm2 association in epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis and non-specific interstitial pneumonia. *Journal of Clinical Pathology* 58 6 , 583–589. doi:10.1136/jcp.2004.022632
- Nalysnyk, L., Cid-Ruzafa, J., Rotella, P., Esser, D., 2012. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: review of the literature. *European Respiratory Review* 21 126 , 355–361. doi:10.1183/09059180.00002512
- Nathan, S.D., Albera, C., Bradford, W.Z., Costabel, U., du Bois, R.M., Fagan, E.A., Fishman, R.S., Glaspole, I., Glassberg, M.K., Glasscock, K.F., King, T.E., Lancaster, L., Lederer, D.J., Lin, Z., Pereira, C.A., Swigris, J.J., Valeyre, D., Noble, P.W., Wells, A.U., 2016. Effect of continued treatment with pirfenidone following clinically meaningful declines in forced vital capacity: analysis of data from three phase 3 trials in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 71 5 , 429–435. doi:10.1136/thoraxjnl-2015-207011
- Nguyen, H., Uhal, B.D., 2016. The unfolded protein response controls ER stress-induced apoptosis of lung epithelial cells through angiotensin generation. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 311 5 , L846–L854. doi:10.1152/ajplung.00449.2015
- Niecknig, H., Tug, S., Reyes, B.D., Kirsch, M., Fandrey, J., Berchner-Pfannschmidt, U., 2012. Role of reactive oxygen species in the regulation of HIF-1 by prolyl hydroxylase 2 under mild hypoxia. *Free Radical Research* 46 6 , 705–717. doi:10.3109/10715762.2012.669041
- Niesen, M., Muller-Lucks, A., Hedman, R., von Heijne, G., Miller, T.F., 2018. Forces on nascent polypeptides during membrane insertion and translocation via the Sec translocon. doi:10.1101/310698
- Nikam, V.S., Schermuly, R.T., Dumitrescu, R., Weissmann, N., Kwapiszewska, G., Morrell, N., Klepetko, W., Fink, L., Seeger, W., Voswinckel, R., 2010. Treprostinil inhibits the recruitment of bone marrow-derived circulating fibrocytes in chronic hypoxic pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal* 36 6 , 1302–1314. doi:10.1183/09031936.00028009
- Nogee, L.M., Dunbar, A.E., Wert, S.E., Askin, F., Hamvas, A., Whitsett, J.A., 2001. A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. *N. Engl. J. Med.* 344 8 , 573–579. doi:10.1056/NEJM200102223440805
- Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Jungreis, R., Harding, H.P., Ron, D., 2003. Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *EMBO J.* 22 5 , 1180–1187. doi:10.1093/emboj/cdg112
- Ntolios, P., Manoloudi, E., Tzouveleki, A., Bouros, E., Steiropoulos, P., Anevllavis, S., Bouros, D., Froudarakis, M.E., 2018. Longitudinal outcomes of patients enrolled in a phase Ib clinical trial of the adipose-derived stromal cells-stromal vascular fraction in idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin Respir J* 12 6 , 2084–2089. doi:10.1111/crj.12777

O

- O'Dwyer, D.N., Armstrong, M.E., Trujillo, G., Cooke, G., Keane, M.P., Fallon, P.G., Simpson, A.J., Millar, A.B., McGrath, E.E., Whyte, M.K., Hirani, N., Hogaboam, C.M., Donnelly, S.C., 2013. The Toll-like Receptor 3 L412F Polymorphism and Disease Progression in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 188 12 , 1442–1450. doi:10.1164/rccm.201304-0760OC
- Oh, S.-H., Lee, B.-H., Lim, S.-C., 2004. Cadmium induces apoptotic cell death in WI 38 cells via caspase-dependent Bid cleavage and calpain-mediated mitochondrial Bax cleavage by Bcl-2-independent pathway. *Biochem. Pharmacol.* 68 9 , 1845–1855. doi:10.1016/j.bcp.2004.06.021
- Ohoka, N., Hattori, T., Kitagawa, M., Onozaki, K., Hayashi, H., 2007. Critical and Functional Regulation of CHOP (C/EBP Homologous Protein) through the N-terminal Portion. *Journal of Biological Chemistry* 282 49 , 35687–35694. doi:10.1074/jbc.M703735200
- Okeke, E., Parker, T., Dingsdale, H., Concannon, M., Awais, M., Voronina, S., Molgo, J., Begg, M., Metcalf, D., Knight, A.E., Sutton, R., Haynes, L., Tepikin, A.V., 2016. Epithelial-mesenchymal transition, IP3 receptors and ER-PM junctions: translocation of Ca²⁺ signalling complexes and regulation of migration. *Biochemical Journal* 473 6 , 757–767. doi:10.1042/BJ20150364

- Olivera, B.M., Miljanich, G.P., Ramachandran, J., Adams, M.E., 1994. Calcium Channel Diversity and Neurotransmitter Release: The ω -Conotoxins and ω -Agatoxins. *Annual Review of Biochemistry* 63 1 , 823–867. doi:10.1146/annurev.bi.63.070194.004135
- Olmeda, B., Villén, L., Cruz, A., Orellana, G., Perez-Gil, J., 2010. Pulmonary surfactant layers accelerate O₂ diffusion through the air-water interface. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1798 6 , 1281–1284. doi:10.1016/j.bbamem.2010.03.008
- Ong, H.L., Liu, X., Sharma, A., Hegde, R.S., Ambudkar, I.S., 2007. Intracellular Ca²⁺ release via the ER translocon activates store-operated calcium entry. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 453 6 , 797–808. doi:10.1007/s00424-006-0163-5
- Onukwufor, J.O., MacDonald, N., Kibenge, F., Stevens, D., Kamunde, C., 2014. Effects of hypoxia-cadmium interactions on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mitochondrial bioenergetics: attenuation of hypoxia-induced proton leak by low doses of cadmium. *Journal of Experimental Biology* 217 6 , 831–840. doi:10.1242/jeb.093344
- Orgeig, S., Morrison, J.L., Daniels, C.B., 2015. Evolution, Development, and Function of the Pulmonary Surfactant System in Normal and Perturbed Environments, in: Terjung, R. (Ed.), *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 363–422. doi:10.1002/cphy.c150003
- Overgaard, C.E., Mitchell, L.A., Koval, M., 2012. Roles for claudins in alveolar epithelial barrier function: Alveolar epithelial claudins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1257 1 , 167–174. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06545.x
- Oyadomari, S., Mori, M., 2004. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* 11 4 , 381–389. doi:10.1038/sj.cdd.4401373

P

- Palade, G.E., Porter, K.R., 1954. Studies on the endoplasmic reticulum. I. Its identification in cells in situ. *J. Exp. Med.* 100 6 , 641–656.
- Pan, J., Bishop, T., Ratcliffe, P.J., Yeger, H., Cutz, E., 2016. Hyperplasia and hypertrophy of pulmonary neuroepithelial bodies, presumed airway hypoxia sensors, in hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase-deficient mice. *Hypoxia (Auckl)* 4 , 69–80. doi:10.2147/HP.S103957
- Pan, Y., Mansfield, K.D., Bertozzi, C.C., Rudenko, V., Chan, D.A., Giaccia, A.J., Simon, M.C., 2007. Multiple Factors Affecting Cellular Redox Status and Energy Metabolism Modulate Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Activity In Vivo and In Vitro. *Molecular and Cellular Biology* 27 3 , 912–925. doi:10.1128/MCB.01223-06
- Pang, X.-X., Bai, Q., Wu, F., Chen, G.-J., Zhang, A.-H., Tang, C.-S., 2016. Urotensin II Induces ER Stress and EMT and Increase Extracellular Matrix Production in Renal Tubular Epithelial Cell in Early Diabetic Mice. *Kidney and Blood Pressure Research* 41 4 , 434–449. doi:10.1159/000443445
- Panos, R.J., Rubin, J.S., Csaky, K.G., Aaronson, S.A., Mason, R.J., 1993. Keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor/scatter factor are heparin-binding growth factors for alveolar type II cells in fibroblast-conditioned medium. *J Clin Invest* 92 2 , 969–977.
- Paris, A.J., Liu, Y., Mei, J., Dai, N., Guo, L., Spruce, L.A., Hudock, K.M., Brenner, J.S., Zacharias, W.J., Mei, H.D., Slomowitz, A.R., Bhamidipati, K., Beers, M.F., Seeholzer, S.H., Morrissey, E.E., Worthen, G.S., 2016. Neutrophils promote alveolar epithelial regeneration by enhancing type II pneumocyte proliferation in a model of acid-induced acute lung injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 311 6 , L1062–L1075. doi:10.1152/ajplung.00327.2016
- Park, S.-H., Gong, J.-H., Choi, Y.-J., Kang, M.-K., Kim, Y.-H., Kang, Y.-H., 2015. Kaempferol Inhibits Endoplasmic Reticulum Stress-Associated Mucus Hypersecretion in Airway Epithelial Cells And Ovalbumin-Sensitized Mice. *PLoS One* 10 11 . doi:10.1371/journal.pone.0143526
- Parker, M.W., Rossi, D., Peterson, M., Smith, K., Sikström, K., White, E.S., Connert, J.E., Henke, C.A., Larsson, O., Bitterman, P.B., 2014. Fibrotic extracellular matrix activates a profibrotic positive feedback loop. *Journal of Clinical Investigation* 124 4 , 1622–1635. doi:10.1172/JCI71386
- Pawlus, M.R., Wang, L., Hu, C.-J., 2014. STAT3 and HIF1 α cooperatively activate HIF1 target genes in MDA-MB-231 and RCC4 cells. *Oncogene* 33 13 , 1670–1679. doi:10.1038/onc.2013.115
- Pawlus, M.R., Wang, L., Ware, K., Hu, C.-J., 2012. Upstream Stimulatory Factor 2 and Hypoxia-Inducible Factor 2 (HIF2) Cooperatively Activate HIF2 Target Genes during Hypoxia. *Molecular and Cellular Biology* 32 22 , 4595–4610. doi:10.1128/MCB.00724-12
- Pech, M., Spreter, T., Beckmann, R., Beatrix, B., 2010. Dual binding mode of the nascent polypeptide-associated complex reveals a novel universal adapter site on the ribosome. *J. Biol. Chem.* 285 25 , 19679–19687. doi:10.1074/jbc.M109.092536
- Pei, J.-M., Kravtsov, G.M., Wu, S., Das, R., Fung, M.L., Wong, T.M., 2003. Calcium homeostasis in rat cardiomyocytes during chronic hypoxia: a time course study. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 285 6 , C1420–C1428. doi:10.1152/ajpcell.00534.2002
- Peinado, H., Ballestar, E., Esteller, M., Cano, A., 2004. Snail Mediates E-Cadherin Repression by the Recruitment of the Sin3A/Histone Deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 Complex. *Mol Cell Biol* 24 1 , 306–319. doi:10.1128/MCB.24.1.306-319.2004
- Pereira, E.R., Frudd, K., Awad, W., Hendershot, L.M., 2014. Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Hypoxia Response Pathways Interact to Potentiate Hypoxia-inducible Factor 1 (HIF-1) Transcriptional Activity on Targets Like Vascular

- Endothelial Growth Factor (VEGF). *Journal of Biological Chemistry* 289 6 , 3352–3364. doi:10.1074/jbc.M113.507194
- Perez-Perri, J.I., Dengler, V.L., Audetat, K.A., Pandey, A., Bonner, E.A., Urh, M., Mendez, J., Daniels, D.L., Wappner, P., Galbraith, M.D., Espinosa, J.M., 2016. The TIP60 Complex Is a Conserved Coactivator of HIF1A. *Cell Reports* 16 1 , 37–47. doi:10.1016/j.celrep.2016.05.082
- Perkins, P.S., Park, J.H., Pandol, S.J., 1997. The role of calcium in the regulation of protein synthesis in the exocrine pancreas. *Pancreas* 14 2 , 133–141.
- Pescador, N., Cuevas, Y., Naranjo, S., Alcaide, M., Villar, D., Landázuri, M.O., Del Peso, L., 2005. Identification of a functional hypoxia-responsive element that regulates the expression of the egl nine homologue 3 (egl3/phd3) gene. *Biochem. J.* 390 Pt 1 , 189–197. doi:10.1042/BJ20042121
- Peter, M.E., Krammer, P.H., 1998. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr. Opin. Immunol.* 10 5 , 545–551.
- Pierschbacher, M.D., Ruoslahti, E., 1984. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 309 5963 , 30–33.
- Piersma, B., Bank, R.A., Boersema, M., 2015. Signaling in Fibrosis: TGF- β , WNT, and YAP/TAZ Converge. *Front. Med.* 2. doi:10.3389/fmed.2015.00059
- Planes, C., Friedlander, G., Loiseau, A., Amiel, C., Clerici, C., 1996. Inhibition of Na-K-ATPase activity after prolonged hypoxia in an alveolar epithelial cell line. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 271 1 , L70–L78. doi:10.1152/ajplung.1996.271.1.L70
- Plataki, M., Koutsopoulos, A.V., Darivianaki, K., Delides, G., Siafakas, N.M., Bouras, D., 2005. Expression of Apoptotic and Antiapoptotic Markers in Epithelial Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Chest* 127 1 , 266–274. doi:10.1378/chest.127.1.266
- Plumb, R., Zhang, Z.-R., Appathurai, S., Mariappan, M., 2015. A functional link between the co-translational protein translocation pathway and the UPR. *eLife* 4. doi:10.7554/eLife.07426
- Podust, L.M., Krezel, A.M., Kim, Y., 2001. Crystal Structure of the CCAAT Box/Enhancer-binding Protein β Activating Transcription Factor-4 Basic Leucine Zipper Heterodimer in the Absence of DNA. *J. Biol. Chem.* 276 1 , 505–513. doi:10.1074/jbc.M005594200
- Porter, K.R., 1945. A STUDY OF TISSUE CULTURE CELLS BY ELECTRON MICROSCOPY: METHODS AND PRELIMINARY OBSERVATIONS. *Journal of Experimental Medicine* 81 3 , 233–246. doi:10.1084/jem.81.3.233
- Pozharskaya, V., Torres-González, E., Rojas, M., Gal, A., Amin, M., Dollard, S., Roman, J., Stecenko, A.A., Mora, A.L., 2009. Twist: A Regulator of Epithelial-Mesenchymal Transition in Lung Fibrosis. *PLoS ONE* 4 10 , e7559. doi:10.1371/journal.pone.0007559
- Puthalakath, H., O'Reilly, L.A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P.N., Huntington, N.D., Hughes, P.D., Michalak, E.M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., Gotoh, T., Akira, S., Bouillet, P., Strasser, A., 2007. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 129 7 , 1337–1349. doi:10.1016/j.cell.2007.04.027

Q

- Qi, X., Hosoi, T., Okuma, Y., Kaneko, M., Nomura, Y., 2004. Sodium 4-phenylbutyrate protects against cerebral ischemic injury. *Mol. Pharmacol.* 66 4 , 899–908. doi:10.1124/mol.104.001339
- Qiu, P., Feng, X.H., Li, L., 2003. Interaction of Smad3 and SRF-associated complex mediates TGF-beta1 signals to regulate SM22 transcription during myofibroblast differentiation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35 12 , 1407–1420.
- Qunn, L., Takemura, T., Ikushima, S., Ando, T., Yanagawa, T., Akiyama, O., Oritsu, M., Tanaka, N., Kuroki, T., 2002. Hyperplastic epithelial foci in honeycomb lesions in idiopathic pulmonary fibrosis. *Virchows Arch.* 441 3 , 271–278. doi:10.1007/s00428-002-0618-9
- Raghu, G., Chen, S.-Y., Hou, Q., Yeh, W.-S., Collard, H.R., 2016. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis in US adults 18–64 years old. *European Respiratory Journal* 48 1 , 179–186. doi:10.1183/13993003.01653-2015
- Raghu, G., Collard, H.R., Egan, J.J., Martinez, F.J., Behr, J., Brown, K.K., Colby, T.V., Cordier, J.-F., Flaherty, K.R., Lasky, J.A., Lynch, D.A., Ryu, J.H., Swigris, J.J., Wells, A.U., Ancochea, J., Bouras, D., Carvalho, C., Costabel, U., Ebina, M., Hansell, D.M., Johkoh, T., Kim, D.S., King, T.E., Kondoh, Y., Myers, J., Müller, N.L., Nicholson, A.G., Richeldi, L., Selman, M., Dudden, R.F., Griss, B.S., Protzko, S.L., Schünemann, H.J., ATS/ERS/JRS/ALAT Committee on Idiopathic Pulmonary Fibrosis, 2011. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183 6 , 788–824. doi:10.1164/rccm.2009-040GL
- Raghu, G., Yang, S.T.-Y., Spada, C., Hayes, J., Pellegrini, C.A., 2006. Sole Treatment of Acid Gastroesophageal Reflux in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Chest* 129 3 , 794–800. doi:10.1378/chest.129.3.794
- Rajala, K., Lehto, J.T., Saarinen, M., Sutinen, E., Saarto, T., Myllärniemi, M., 2016. End-of-life care of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *BMC Palliat Care* 15. doi:10.1186/s12904-016-0158-8
- Raleigh, J.A., Chou, S.C., Arteel, G.E., Horsman, M.R., 1999. Comparisons among pimonidazole binding, oxygen electrode measurements, and radiation response in C3H mouse tumors. *Radiat. Res.* 151 5 , 580–589.
- Ramesh, S., Wildey, G.M., Howe, P.H., 2009. Transforming growth factor β (TGF β)-induced apoptosis: The rise and fall of Bim. *Cell Cycle* 8 1 , 11–17. doi:10.4161/cc.8.1.7291
- Rannels, S.R., Fisher, C.S., Heuser, L.J., Rannels, D.E., 1987. Culture of type II pneumocytes on a type II cell-derived fibronectin-rich matrix. *Am. J. Physiol.* 253 6 Pt 1 , C759-765. doi:10.1152/ajpcell.1987.253.6.C759

- Rao, R.V., Peel, A., Logvinova, A., del Rio, G., Hermel, E., Yokota, T., Goldsmith, P.C., Ellerby, L.M., Ellerby, H.M., Bredesen, D.E., 2002. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *FEBS Lett* 514 0 , 122–128.
- Rapisarda, A., Melillo, G., 2012. Overcoming disappointing results with antiangiogenic therapy by targeting hypoxia. *Nature Reviews Clinical Oncology* 9 7 , 378–390. doi:10.1038/nrclinonc.2012.64
- Rastaldi, M.P., Ferrario, F., Giardino, L., Dell'Antonio, G., Grillo, C., Grillo, P., Strutz, F., Müller, G.A., Colasanti, G., D'Amico, G., 2002. Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. *Kidney International* 62 1 , 137–146. doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00430.x
- Rauscher, F.J., Sambucetti, L.C., Curran, T., Distel, R.J., Spiegelman, B.M., 1988. Common DNA binding site for Fos protein complexes and transcription factor AP-1. *Cell* 52 3 , 471–480. doi:10.1016/S0092-8674(88)80039-4
- Ray, R., Chen, G., Vande Velde, C., Cizeau, J., Park, J.H., Reed, J.C., Gietz, R.D., Greenberg, A.H., 2000. BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X(L) and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites. *J. Biol. Chem.* 275 2 , 1439–1448.
- Rayego-Mateos, S., Morgado-Pascual, J.L., Rodrigues-Diez, R.R., Rodrigues-Diez, R., Falke, L.L., Mezzano, S., Ortiz, A., Egido, J., Goldschmeding, R., Ruiz-Ortega, M., 2018. Connective tissue growth factor induces renal fibrosis via epidermal growth factor receptor activation: CCN2, fibrosis, EMT, and EGFR pathway. *The Journal of Pathology* 244 2 , 227–241. doi:10.1002/path.5007
- Reid, D.W., Nicchitta, C.V., 2012. Primary Role for Endoplasmic Reticulum-bound Ribosomes in Cellular Translation Identified by Ribosome Profiling. *Journal of Biological Chemistry* 287 8 , 5518–5527. doi:10.1074/jbc.M111.312280
- Richeldi, L., du Bois, R.M., Raghun, 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., Stowasser, S., Schlenker-Herceg, R., Disse, B., Collard, H.R., 2014. Efficacy and Safety of Nintedanib in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *New England Journal of Medicine* 370 22 , 2071–2082. doi:10.1056/NEJMoa1402584
- Rock, J.R., Barkauskas, C.E., Crouse, M.J., Xue, Y., Harris, J.R., Liang, J., Noble, P.W., Hogan, B.L.M., 2011. Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 52 , E1475–E1483. doi:10.1073/pnas.1117988108
- Rojas, D.R., Tegeder, I., Kuner, R., Agarwal, N., 2018. Hypoxia-inducible factor 1a protects peripheral sensory neurons from diabetic peripheral neuropathy by suppressing accumulation of reactive oxygen species. arXiv:1803.03792 [q-bio].
- Romero, Y., Bueno, M., Ramirez, R., Álvarez, D., Sembrat, J.C., Goncharova, E.A., Rojas, M., Selman, M., Mora, A.L., Pardo, A., 2016. mTORC1 activation decreases autophagy in aging and idiopathic pulmonary fibrosis and contributes to apoptosis resistance in IPF fibroblasts. *Aging Cell* 15 6 , 1103–1112. doi:10.1111/acer.12514
- Ron, D., Habener, J.F., 1992. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev.* 6 3 , 439–453.
- Ross, J.M., 1998. Cell-Extracellular Matrix Interactions, in: *Frontiers in Tissue Engineering*. Elsevier, pp. 15–27. doi:10.1016/B978-008042689-1/50004-2
- Rubenstein, R.C., Egan, M.E., Zeitlin, P.L., 1997. In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR. *J Clin Invest* 100 10 , 2457–2465.
- Rubio-Moscardo, F., 2005. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood* 106 9 , 3214–3222. doi:10.1182/blood-2005-05-2013
- Rydell-Törmänen, K., Zhou, X.-H., Hallgren, O., Einarsson, J., Eriksson, L., Andersson-Sjöland, A., Westergren-Thorsson, G., 2016. Aberrant nonfibrotic parenchyma in idiopathic pulmonary fibrosis is correlated with decreased β -catenin inhibition and increased Wnt5a/b interaction. *Physiological Reports* 4 5 , e12727. doi:10.14814/phy2.12727

S

- Sakellariou, G.K., Pearson, T., Lightfoot, A.P., Nye, G.A., Wells, N., Giakoumaki, I.I., Vasilaki, A., Griffiths, R.D., Jackson, M.J., McArdle, A., 2016. Mitochondrial ROS regulate oxidative damage and mitophagy but not age-related muscle fiber atrophy. *Scientific Reports* 6 , 33944. doi:10.1038/srep33944
- Salceda, S., Caro, J., 1997. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J. Biol. Chem.* 272 36 , 22642–22647.
- Sallais, J., Alahari, S., Tagliaferro, A., Bhattacharjee, J., Post, M., Caniggia, I., 2017. Factor inhibiting HIF1 α : A novel target of SUMOylation in the human placenta. *Oncotarget* 8 69 . doi:10.18632/oncotarget.23113
- Samara, K.D., Margaritopoulos, G., Wells, A.U., Siafakas, N.M., Antoniou, K.M., 2011. Smoking and Pulmonary Fibrosis: Novel Insights. *Pulmonary Medicine* 2011, 1–4. doi:10.1155/2011/461439
- Sannes, P.L., 1984. Differences in basement membrane-associated microdomains of type I and type II pneumocytes in the rat and rabbit lung. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 32 8 , 827–833. doi:10.1177/32.8.6747274
- Santiago, B., Galindo, M., Palao, G., Pablos, J.L., 2004. Intracellular Regulation of Fas-Induced Apoptosis in Human Fibroblasts by Extracellular Factors and Cycloheximide. *The Journal of Immunology* 172 1 , 560–566. doi:10.4049/jimmunol.172.1.560

- Saugy, J.J., Schmitt, L., Fallet, S., Faiss, R., Vesin, J.-M., Bertschi, M., Heinzer, R., Millet, G.P., 2016. Sleep Disordered Breathing During Live High-Train Low in Normobaric Versus Hypobaric Hypoxia. *High Altitude Medicine & Biology* 17 3 , 233–238. doi:10.1089/ham.2016.0049
- Saumon, G., 1999. L'épithélium alvéolaire lors des oedèmes pulmonaires. *médecine/sciences* 15 6–7 , 778. doi:10.4267/10608/1434
- Savourey, G., Launay, J.-C., Besnard, Y., Guinet, A., Travers, S., 2003. Normo- and hypobaric hypoxia: are there any physiological differences? *Eur. J. Appl. Physiol.* 89 2 , 122–126. doi:10.1007/s00421-002-0789-8
- Schamberger, A.C., Schiller, H.B., Fernandez, I.E., Sterclova, M., Heinzelmann, K., Hennen, E., Hatz, R., Behr, J., Vašáková, M., Mann, M., Eickelberg, O., Staab-Weijnitz, C.A., 2016. Glutathione peroxidase 3 localizes to the epithelial lining fluid and the extracellular matrix in interstitial lung disease. *Scientific Reports* 6 1 . doi:10.1038/srep29952
- Schenk, S., Hintermann, E., Bilban, M., Koshikawa, N., Hojilla, C., Khokha, R., Quaranta, V., 2003. Binding to EGF receptor of a laminin-5 EGF-like fragment liberated during MMP-dependent mammary gland involution. *J Cell Biol* 161 1 , 197–209. doi:10.1083/jcb.200208145
- Schleich, K., Buchbinder, J.H., Pietkiewicz, S., Kähne, T., Warnken, U., Öztürk, S., Schnölzer, M., Naumann, M., Krammer, P.H., Lavrik, I.N., 2016. Molecular architecture of the DED chains at the DISC: regulation of procaspase-8 activation by short DED proteins c-FLIP and procaspase-8 prodomain. *Cell Death & Differentiation* 23 4 , 681–694. doi:10.1038/cdd.2015.137
- Schneberger, D., Caldwell, S., Kanthan, R., Singh, B., 2013. Expression of Toll-like receptor 9 in mouse and human lungs. *Journal of Anatomy* 222 5 , 495–503. doi:10.1111/joa.12039
- Sekhon, H.S., Thurlbeck, W.M., 1996. Lung morphometric changes after exposure to hypobaric and/or hypoxia and undernutrition. *Respir Physiol* 106 1 , 99–107.
- Selman, M., 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. doi:10.1513/pats.200601-003TK
- Selman, M., King, T.E., Pardo, A., American Thoracic Society, European Respiratory Society, American College of Chest Physicians, 2001. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann. Intern. Med.* 134 2 , 136–151.
- Selman, M., Lin, H.-M., Montaño, M., Jenkins, A.L., Estrada, A., Lin, Z., Wang, G., DiAngelo, S.L., Guo, X., Umstead, T.M., Lang, C.M., Pardo, A., Phelps, D.S., Floros, J., 2003. Surfactant protein A and B genetic variants predispose to idiopathic pulmonary fibrosis. *Human Genetics* 113 6 , 542–550. doi:10.1007/s00439-003-1015-4
- Semenza, G.L., Jiang, B.H., Leung, S.W., Passantino, R., Concordet, J.P., Maire, P., Giallongo, A., 1996. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 271 51 , 32529–32537.
- Semenza, G.L., Wang, G.L., 1992. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* 12 12 , 5447–5454.
- Senavirathna, L.K., Huang, C., Yang, X., Munteanu, M.C., Sathiseelan, R., Xu, D., Henke, C.A., Liu, L., 2018. Hypoxia induces pulmonary fibroblast proliferation through NFAT signaling. *Scientific Reports* 8 1 , 2709. doi:10.1038/s41598-018-21073-x
- Serrano-Mollar, A., Gay-Jordi, G., Guillamat-Prats, R., Closa, D., Hernandez-Gonzalez, F., Marin, P., Burgos, F., Martorell, J., Sánchez, M., Arguis, P., Soy, D., Bayas, J.M., Ramirez, J., Tetley, T.D., Molins, L., de la Bellacasa, J.P., Rodríguez-Villar, C., Rovira, I., Fiolà, J.J., Xaubet, A., 2016. Safety and Tolerability of Alveolar Type II Cell Transplantation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Chest* 150 3 , 533–543. doi:10.1016/j.chest.2016.03.021
- Sesé, L., Nunes, H., Cottin, V., Sanyal, S., Didier, M., Carton, Z., Israel-Biet, D., Crestani, B., Cadranet, J., Wallaert, B., Tazi, A., Maître, B., Prévot, G., Marchand-Adam, S., Guillot-Dudoret, S., Nardi, A., Dury, S., Giraud, V., Gondouin, A., Juvin, K., Borie, R., Wislez, M., Valeyre, D., Annesi-Maesano, I., 2018. Role of atmospheric pollution on the natural history of idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 73 2 , 145–150. doi:10.1136/thoraxjnl-2017-209967
- Sheedy, W., Thompson, J.S., Morice, A.H., 1996. A comparison of pathophysiological changes during hypobaric and normobaric hypoxia in rats. *Respiration* 63 4 , 217–222. doi:10.1159/000196548
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., Prywes, R., 2002. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev. Cell* 3 1 , 99–111.
- Shen, X., Xue, Y., Si, Y., Wang, Q., Wang, Z., Yuan, J., Zhang, X., 2015. The unfolded protein response potentiates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) of gastric cancer cells under severe hypoxic conditions. *Medical Oncology* 32 1 . doi:10.1007/s12032-014-0447-0
- Shih, W., Yamada, S., 2012. N-cadherin-mediated cell-cell adhesion promotes cell migration in a three-dimensional matrix. *Journal of Cell Science* 125 15 , 3661–3670. doi:10.1242/jcs.103861
- Shin, H.-S., Ryu, E.-S., Oh, E.-S., Kang, D.-H., 2015. Endoplasmic reticulum stress as a novel target to ameliorate epithelial-to-mesenchymal transition and apoptosis of human peritoneal mesothelial cells. *Laboratory Investigation* 95 10 , 1157–1173. doi:10.1038/labinvest.2015.91
- Shukla, D., Saxena, S., Jayamurthy, P., Sairam, M., Singh, M., Jain, S.K., Bansal, A., Ilavazaghan, G., 2009. Hypoxic Preconditioning with Cobalt Attenuates Hypobaric Hypoxia-Induced Oxidative Damage in Rat Lungs. *High Altitude Medicine & Biology* 10 1 , 57–69. doi:10.1089/ham.2008.1028
- Signorelli, S., Jennings, P., Leonard, M., Pfaller, W., 2010. Differential Effects of Hypoxic Stress in Alveolar Epithelial Cells and Microvascular Endothelial Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry* 25 001 , 135–144. doi:10.1159/000272066

- Sirianni, F.E., Chu, F.S.F., Walker, D.C., 2003. Human Alveolar Wall Fibroblasts Directly Link Epithelial Type 2 Cells to Capillary Endothelium. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 168 12 , 1532–1537. doi:10.1164/rccm.200303-371OC
- Snetselaar, R., van Batenburg, A.A., van Oosterhout, M.F.M., Kazemier, K.M., Roothaan, S.M., Peeters, T., van der Vis, J.J., Goldschmeding, R., Grutters, J.C., van Moorsel, C.H.M., 2017. Short telomere length in IPF lung associates with fibrotic lesions and predicts survival. *PLoS One* 12 12 . doi:10.1371/journal.pone.0189467
- Song, J.J., Aswad, R., Kanaan, R.A., Rico, M.C., Owen, T.A., Barbe, M.F., Safadi, F.F., Popoff, S.N., 2007. Connective tissue growth factor (CTGF) acts as a downstream mediator of TGF-beta1 to induce mesenchymal cell condensation. *J. Cell. Physiol.* 210 2 , 398–410. doi:10.1002/jcp.20850
- Spiotto, M.T., Banh, A., Papandreou, I., Cao, H., Galvez, M., Gurtner, G., Denko, N.C., Le, Q.T., Koong, A.C., 2010. Visualization of the unfolded protein response in primary tumors reveals unique microenvironments that reflect metabolic variations and predict for tumor growth. *Cancer Res* 70 1 , 78–88. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2747
- Sriburi, R., Jackowski, S., Mori, K., Brewer, J.W., 2004. XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology* 167 1 , 35–41. doi:10.1083/jcb.200406136
- Starck, S.R., Tsai, J.C., Chen, K., Shodiya, M., Wang, L., Yahiro, K., Martins-Green, M., Shastri, N., Walter, P., 2016. Translation from the 5' untranslated region shapes the integrated stress response. *Science* 351 6272 , aad3867. doi:10.1126/science.aad3867
- Stegemann-Koniszewski, S., Jeron, A., Gereke, M., Geffers, R., Kröger, A., Gunzer, M., Bruder, D., 2016. Alveolar Type II Epithelial Cells Contribute to the Anti-Influenza A Virus Response in the Lung by Integrating Pathogen- and Microenvironment-Derived Signals. *mBio* 7 3 . doi:10.1128/mBio.00276-16
- Su, Q., Wang, S., Gao, H.Q., Kazemi, S., Harding, H.P., Ron, D., Koromilas, A.E., 2008. Modulation of the Eukaryotic Initiation Factor 2 α -Subunit Kinase PERK by Tyrosine Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 283 1 , 469–475. doi:10.1074/jbc.M704612200
- Suleiman, M.S., Halestrap, A.P., Griffiths, E.J., 2001. Mitochondria: a target for myocardial protection. *Pharmacol. Ther.* 89 1 , 29–46.
- Sun, Q.-A., Hess, D.T., Nogueira, L., Yong, S., Bowles, D.E., Eu, J., Laurita, K.R., Meissner, G., Stamler, J.S., 2011. Oxygen-coupled redox regulation of the skeletal muscle ryanodine receptor-Ca²⁺ release channel by NADPH oxidase 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 38 , 16098–16103. doi:10.1073/pnas.1109546108
- Suzuki, T., Osumi, N., Wakamatsu, Y., 2010. Stabilization of ATF4 protein is required for the regulation of epithelial–mesenchymal transition of the avian neural crest. *Developmental Biology* 344 2 , 658–668. doi:10.1016/j.ydbio.2010.05.492
- Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M., Samali, A., 2006. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports* 7 9 , 880–885. doi:10.1038/sj.embor.7400779

T

- Takahata, S., Sogawa, K., Kobayashi, A., Ema, M., Mimura, J., Ozaki, N., Fujii-Kuriyama, Y., 1998. Transcriptionally Active Heterodimer Formation of an Arnt-like PAS Protein, Arnt3, with HIF-1 α , HLF, and Clock. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 248 3 , 789–794. doi:10.1006/bbrc.1998.9012
- Tanaka, Y., Ishitsuka, Y., Hayasaka, M., Yamada, Y., Miyata, K., Endo, M., Kondo, Y., Moriuchi, H., Irikura, M., Tanaka, K., Mizushima, T., Oike, Y., Irie, T., 2015. The exacerbating roles of CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) in the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis and the preventive effects of tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) against pulmonary fibrosis in mice. *Pharmacological Research* 99, 52–62. doi:10.1016/j.phrs.2015.05.004
- Tang, X., Liang, X., Li, M., Guo, T., Duan, N., Wang, Y., Rong, G., Yang, L., Zhang, S., Zhang, J., 2015. ATF6 pathway of unfolded protein response mediates advanced oxidation protein product-induced hypertrophy and epithelial-to-mesenchymal transition in HK-2 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 407 1–2 , 197–207. doi:10.1007/s11010-015-2469-0
- Tanjore, H., Blackwell, T.S., Lawson, W.E., 2012. Emerging evidence for endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 302 8 , L721–729. doi:10.1152/ajplung.00410.2011
- Tanjore, H., Cheng, D.-S., Degryse, A.L., Zoz, D.F., Abdolrasulnia, R., Lawson, W.E., Blackwell, T.S., 2011. Alveolar Epithelial Cells Undergo Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Response to Endoplasmic Reticulum Stress. *J Biol Chem* 286 35 , 30972–30980. doi:10.1074/jbc.M110.181164
- Tanjore, H., Xu, X.C., Polosukhin, V.V., Degryse, A.L., Li, B., Han, W., Sherrill, T.P., Plieth, D., Neilson, E.G., Blackwell, T.S., Lawson, W.E., 2009. Contribution of Epithelial-derived Fibroblasts to Bleomycin-induced Lung Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 180 7 , 657–665. doi:10.1164/rccm.200903-0322OC
- Tepede, A., Yogaratnam, D., 2017. Nintedanib for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Journal of Pharmacy Practice* 089719001773524. doi:10.1177/0897190017735242
- Thorley, A.J., Ford, P.A., Giembycz, M.A., Goldstraw, P., Young, A., Tetley, T.D., 2007. Differential Regulation of Cytokine Release and Leukocyte Migration by Lipopolysaccharide-Stimulated Primary Human Lung Alveolar Type II Epithelial Cells and Macrophages. *The Journal of Immunology* 178 1 , 463–473. doi:10.4049/jimmunol.178.1.463

- Tombal, B., Denmeade, S.R., Gillis, J.-M., Isaacs, J.T., 2002. A supramicromolar elevation of intracellular free calcium ($[Ca^{2+}]_i$) is consistently required to induce the execution phase of apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 9 5 , 561–573. doi:10.1038/sj.cdd.4400999
- Torabi, B., Flashner, S., Beishline, K., Sowash, A., Donovan, K., Bassett, G., Azizkhan-Clifford, J., 2018. Caspase cleavage of transcription factor Sp1 enhances apoptosis. *Apoptosis* 23 1 , 65–78. doi:10.1007/s10495-017-1437-4
- Toyofuku, T., Yabuki, M., Otsu, K., Kuzuya, T., Hori, M., Tada, M., 1998. Intercellular Calcium Signaling via Gap Junction in Connexin-43-transfected Cells. *Journal of Biological Chemistry* 273 3 , 1519–1528. doi:10.1074/jbc.273.3.1519
- Tran, T., Suissa, S., 2018. The effect of anti-acid therapy on survival in idiopathic pulmonary fibrosis: a methodological review of observational studies. *European Respiratory Journal* 51 6 , 1800376. doi:10.1183/13993003.00376-2018
- Tsuru, A., Imai, Y., Saito, M., Kohno, K., 2016. Novel mechanism of enhancing IRE1 α -XBP1 signalling via the PERK-ATF4 pathway. *Scientific Reports* 6 , 24217. doi:10.1038/srep24217
- Tsutsumi, S., Gotoh, T., Tomisato, W., Mima, S., Hoshino, T., Hwang, H.-J., Takenaka, H., Tsuchiya, T., Mori, M., Mizushima, T., 2004. Endoplasmic reticulum stress response is involved in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 11 9 , 1009–1016. doi:10.1038/sj.cdd.4401436
- Tuller, E.R., Beavers, C.T., Lou, J.R., Ilnat, M.A., Benbrook, D.M., Ding, W.-Q., 2009. Docosahexaenoic Acid Inhibits Superoxide Dismutase 1 Gene Transcription in Human Cancer Cells: The Involvement of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor and Hypoxia-Inducible Factor-2 Signaling. *Molecular Pharmacology* 76 3 , 588–595. doi:10.1124/mol.109.057430
- Tzouveleakis, A., Harokopos, V., Paparountas, T., Oikonomou, N., Chatziioannou, A., Vilaras, G., Tsiambas, E., Karameris, A., Bours, D., Aidinis, V., 2007. Comparative expression profiling in pulmonary fibrosis suggests a role of hypoxia-inducible factor-1 α in disease pathogenesis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 176 11 , 1108–1119. doi:10.1164/rccm.200705-683OC

U

- Ubeda, M., Wang, X.Z., Zinszner, H., Wu, I., Habener, J.F., Ron, D., 1996. Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element. *Mol Cell Biol* 16 4 , 1479–1489.
- Uchida, T., Rossignol, F., Matthay, M.A., Mounier, R., Couette, S., Clottes, E., Clerici, C., 2004. Prolonged Hypoxia Differentially Regulates Hypoxia-inducible Factor (HIF)-1 α and HIF-2 α Expression in Lung Epithelial Cells: IMPLICATION OF NATURAL ANTISENSE HIF-1 α . *Journal of Biological Chemistry* 279 15 , 14871–14878. doi:10.1074/jbc.M400461200
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., Ron, D., 2000. Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1. *Science* 287 5453 , 664–666. doi:10.1126/science.287.5453.664
- Uzunhan, Y., Bernard, O., Marchant, D., Dard, N., Vanneaux, V., Larghero, J., Gille, T., Clerici, C., Valeyre, D., Nunes, H., Boncoeur, E., Planès, C., 2016. Mesenchymal stem cells protect from hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 310 5 , L439–L451. doi:10.1152/ajplung.00117.2015

V

- Van Hagen, M., Overmeer, R.M., Abolvardi, S.S., Vertegaal, A.C.O., 2010. RNF4 and VHL regulate the proteasomal degradation of SUMO-conjugated Hypoxia-Inducible Factor-2 α . *Nucleic Acids Research* 38 6 , 1922–1931. doi:10.1093/nar/gkp1157
- Van Obberghen-Schilling, E., Roche, N.S., Flanders, K.C., Sporn, M.B., Roberts, A.B., 1988. Transforming growth factor beta 1 positively regulates its own expression in normal and transformed cells. *J. Biol. Chem.* 263 16 , 7741–7746.
- Vancheri, C., Kreuter, M., Richeldi, L., Ryerson, C.J., Valeyre, D., Grutters, J.C., Wiebe, S., Stansen, W., Quaresma, M., Stowasser, S., Wuyts, W.A., INJOURNEY Trial Investigators, 2018. Nintedanib with Add-on Pirfenidone in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Results of the INJOURNEY Trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 197 3 , 356–363. doi:10.1164/rccm.201706-1301OC
- Vandewynckel, Y.-P., Laukens, D., Bogaerts, E., Paridaens, A., Van den Bussche, A., Verhelst, X., Van Steenkiste, C., Descamps, B., Vanhove, C., Libbrecht, L., De Rycke, R., Lambrecht, B.N., Geerts, A., Janssens, S., Van Vlierberghe, H., 2014. Modulation of the unfolded protein response impedes tumor cell adaptation to proteotoxic stress: a PERK for hepatocellular carcinoma therapy. *Hepatology* 59 1 , 93–104. doi:10.1007/s12072-014-9582-0
- Veldhuizen, R., Nag, K., Orgeig, S., Possmayer, F., 1998. The role of lipids in pulmonary surfactant. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1408 2–3 , 90–108. doi:10.1016/S0925-4439(98)00061-1
- Vesuna, F., van Diest, P., Chen, J.H., Raman, V., 2008. Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 367 2 , 235–241. doi:10.1016/j.bbrc.2007.11.151
- Voigt, F., Zhang, H., Cui, X.A., Triebold, D., Liu, A.X., Eglinger, J., Lee, E.S., Chao, J.A., Palazzo, A.F., 2017. Single-Molecule Quantification of Translation-Dependent Association of mRNAs with the Endoplasmic Reticulum. *Cell Reports* 21 13 , 3740–3753. doi:10.1016/j.celrep.2017.12.008

Vukmirovic, M., Herazo-Maya, J.D., Blackmon, J., Skodric-Trifunovic, V., Jovanovic, D., Pavlovic, S., Stojic, J., Zeljkovic, V., Yan, X., Homer, R., Stefanovic, B., Kaminski, N., 2017. Identification and validation of differentially expressed transcripts by RNA-sequencing of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) lung tissue from patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *BMC Pulm Med* 17. doi:10.1186/s12890-016-0356-4

W

- Waghray, M., Cui, Z., Horowitz, J.C., Subramanian, I.M., Martinez, F.J., Toews, G.B., Thannickal, V.J., 2005. Hydrogen peroxide is a diffusible paracrine signal for the induction of epithelial cell death by activated myofibroblasts. *The FASEB Journal* 19 7 , 854–856. doi:10.1096/fj.04-2882fje
- Walter, P., Blobel, G., 1981. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *The Journal of Cell Biology* 91 2 , 545–550. doi:10.1083/jcb.91.2.545
- Walter, P., Ron, D., 2011. The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science* 334 6059 , 1081–1086. doi:10.1126/science.1209038
- Wang, C., Dong, C., Xiong, S., 2017. IL-33 enhances macrophage M2 polarization and protects mice from CVB3-induced viral myocarditis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 103, 22–30. doi:10.1016/j.yjmcc.2016.12.010
- Wang, C., Zhu, H., Sun, Z., Xiang, Z., Ge, Y., Ni, C., Luo, Z., Qian, W., Han, X., 2014. Inhibition of Wnt/ β -catenin signaling promotes epithelial differentiation of mesenchymal stem cells and repairs bleomycin-induced lung injury. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 307 3 , C234–C244. doi:10.1152/ajpcell.00366.2013
- Wang, J., Wang, S., Manzer, R., McConville, G., Mason, R.J., 2006. Ozone induces oxidative stress in rat alveolar type II and type I-like cells. *Free Radical Biology and Medicine* 40 11 , 1914–1928. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.01.017
- Wang, Q., Groenendyk, J., Michalak, M., 2015. Glycoprotein Quality Control and Endoplasmic Reticulum Stress. *Molecules* 20 8 , 13689–13704. doi:10.3390/molecules200813689
- Wang, Q.-C., Zheng, Qiaoxia, Tan, H., Zhang, B., Li, X., Yang, Y., Yu, J., Liu, Y., Chai, H., Wang, X., Sun, Z., Wang, J.-Q., Zhu, S., Wang, F., Yang, M., Guo, C., Wang, H., Zheng, Qingyin, Li, Y., Chen, Q., Zhou, A., Tang, T.-S., 2016. TMCO1 Is an ER Ca²⁺ Load-Activated Ca²⁺ Channel. *Cell* 165 6 , 1454–1466. doi:10.1016/j.cell.2016.04.051
- Wang, Q.-S., Zheng, Y.-M., Dong, L., Ho, Y.-S., Guo, Z., Wang, Y.-X., 2007. Role of mitochondrial reactive oxygen species in hypoxia-dependent increase in intracellular calcium in pulmonary artery myocytes. *Free Radic Biol Med* 42 5 , 642–653. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.12.008
- Wang, Ron, D., 1996. Stress-Induced Phosphorylation and Activation of the Transcription Factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science* 272 5266 , 1347–1349. doi:10.1126/science.272.5266.1347
- Wang, T.N., Chen, X., Li, R., Gao, B., Mohammed-Ali, Z., Lu, C., Yum, V., Dickhout, J.G., Krepinsky, J.C., 2015. SREBP-1 Mediates Angiotensin II-Induced TGF-1 Upregulation and Glomerular Fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology* 26 8 , 1839–1854. doi:10.1681/ASN.2013121332
- Wang, X.Z., Lawson, B., Brewer, J.W., Zinszner, H., Sanjay, A., Mi, L.J., Boorstein, R., Kreibich, G., Hendershot, L.M., Ron, D., 1996. Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Mol. Cell. Biol.* 16 8 , 4273–4280.
- Wang, Y., Shen, J., Arenzana, N., Tirasophon, W., Kaufman, R.J., Prywes, R., 2000. Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J. Biol. Chem.* 275 35 , 27013–27020. doi:10.1074/jbc.M003322200
- Wang, Y., Tang, Z., Huang, H., Li, Jiao, Wang, Z., Yu, Y., Zhang, C., Li, Juan, Dai, H., Wang, F., Cai, T., Tang, N., 2018. Pulmonary alveolar type I cell population consists of two distinct subtypes that differ in cell fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 10 , 2407–2412. doi:10.1073/pnas.1719474115
- Wang, Y., Zhou, W., 2016. Candidate genes of idiopathic pulmonary fibrosis: current evidence and research. *The Application of Clinical Genetics* 5. doi:10.2147/TACG.S61999
- Waters, C.M., Roan, E., Navajas, D., 2012. Mechanobiology in Lung Epithelial Cells: Measurements, Perturbations, and Responses, in: Terjung, R. (Ed.), *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi:10.1002/cphy.c100090
- Weaver, T.E., 1998. Synthesis, processing and secretion of surfactant proteins B and C. *Biochim. Biophys. Acta* 1408 2–3 , 173–179.
- Wei, M.C., Zong, W.-X., Cheng, E.H.-Y., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J., 2001. Proapoptotic BAX and BAK: A Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death. *Science* 292 5517 , 727–730. doi:10.1126/science.1059108
- Weibel, E.R., 2015. On the Tricks Alveolar Epithelial Cells Play to Make a Good Lung. *Am J Respir Crit Care Med* 191 5 , 504–513. doi:10.1164/rccm.201409-1663OE
- Weng, T., Poth, J.M., Karmouty-Quintana, H., Garcia-Morales, L.J., Melicoff, E., Luo, F., Chen, N., Evans, C.M., Bunge, R.R., Bruckner, B.A., Loebe, M., Volcik, K.A., Eltzschig, H.K., Blackburn, M.R., 2014. Hypoxia-induced deoxycytidine kinase contributes to epithelial proliferation in pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 190 12 , 1402–1412. doi:10.1164/rccm.201404-0744OC
- Werno, C., Zhou, J., Brüne, B., 2008. A23187, ionomycin and thapsigargin upregulate mRNA of HIF-1 α via endoplasmic reticulum stress rather than a rise in intracellular calcium. *Journal of Cellular Physiology* 215 3 , 708–714. doi:10.1002/jcp.21351

- Westphalen, K., Gusarova, G.A., Islam, M.N., Subramanian, M., Cohen, T.S., Prince, A.S., Bhattacharya, J., 2014. Sessile alveolar macrophages communicate with alveolar epithelium to modulate immunity. *Nature* 506 7489 , 503–506. doi:10.1038/nature12902
- Wheaton, A.K., Agarwal, M., Jia, S., Kim, K.K., 2017. Lung epithelial cell focal adhesion kinase signaling inhibits lung injury and fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 312 5 , L722–L730. doi:10.1152/ajplung.00478.2016
- Wheaton, A.K., Velikoff, M., Agarwal, M., Loo, T.T., Horowitz, J.C., Sisson, T.H., Kim, K.K., 2016. The vitronectin RGD motif regulates TGF- β -induced alveolar epithelial cell apoptosis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 310 11 , L1206–L1217. doi:10.1152/ajplung.00424.2015
- Whitley, P., Nilsson, I., 1996. A Nascent Secretory Protein May Traverse the Ribosome/Endoplasmic Reticulum Translocase Complex as an Extended Chain 5.
- Wijeyesakere, S.J., Gagnon, J.K., Arora, K., Brooks, C.L., Raghavan, M., 2015. Regulation of calreticulin–major histocompatibility complex (MHC) class I interactions by ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 41 , E5608–E5617. doi:10.1073/pnas.1510132112
- Williams, J.A., Hou, Y., Ni, H.-M., Ding, W.-X., 2013. Role of Intracellular Calcium in Proteasome Inhibitor-induced Endoplasmic Reticulum Stress, Autophagy and Cell Death. *Pharm Res* 30 9 , 2279–2289. doi:10.1007/s11095-013-1139-8
- Willis, Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J.I., Adams, J.M., Huang, D.C.S., 2005a. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev.* 19 11 , 1294–1305. doi:10.1101/gad.1304105
- Willis, Liebler, J.M., Luby-Phelps, K., Nicholson, A.G., Crandall, E.D., du Bois, R.M., Borok, Z., 2005b. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* 166 5 , 1321–1332.
- Wood, D.E., Thomas, A., Devi, L.A., Berman, Y., Beavis, R.C., Reed, J.C., Newcomb, E.W., 1998. Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis. *Oncogene* 17 9 , 1069–1078. doi:10.1038/sj.onc.1202034
- Wooden, S.K., Li, L.J., Navarro, D., Qadri, I., Pereira, L., Lee, A.S., 1991. Transactivation of the grp78 promoter by malformed proteins, glycosylation block, and calcium ionophore is mediated through a proximal region containing a CCAAT motif which interacts with CTF/NF- κ B. *Mol Cell Biol* 11 11 , 5612–5623.
- Woodward, T.L., Sia, M.A., Blaschuk, O.W., Turner, J.D., Laird, D.W., 1998. Deficient epithelial-fibroblast heterocellular gap junction communication can be overcome by co-culture with an intermediate cell type but not by E-cadherin transgene expression. *J. Cell. Sci.* 111 (Pt 23), 3529–3539.
- Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., Massagué, J., 1994. Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* 370 6488 , 341–347. doi:10.1038/370341a0
- Wright, J.R., 2003. Pulmonary surfactant: a front line of lung host defense. *Journal of Clinical Investigation* 111 10 , 1453–1455. doi:10.1172/JCI200318650
- Wu, J., Wang, Y., Liu, G., Jia, Y., Yang, J., Shi, J., Dong, J., Wei, J., Liu, X., 2017. Characterization of air-liquid interface culture of A549 alveolar epithelial cells. *Braz J Med Biol Res* 51 2 . doi:10.1590/1414-431X20176950
- Wu, M.M., Buchanan, J., Luik, R.M., Lewis, R.S., 2006. Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 174 6 , 803–813. doi:10.1083/jcb.200604014
- Wu, Y., Xu, X., Ma, L., Yi, Q., Sun, W., Tang, L., 2017. Calreticulin regulates TGF- β 1-induced epithelial mesenchymal transition through modulating Smad signaling and calcium signaling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 90 , 103–113. doi:10.1016/j.biocel.2017.07.023

X

- Xiong, X.X., Qiu, X.Y., Hu, D.X., Chen, X.Q., 2017. Advances in Hypoxia-Mediated Mechanisms in Hepatocellular Carcinoma. *Mol Pharmacol* 92 3 , 246–255. doi:10.1124/mol.116.107706
- Xu, Cui, W.-H., Zhou, W.-C., Li, D.-L., Li, L.-C., Zhao, P., Mo, X.-T., Zhang, Z., Gao, J., 2017. Activation of Wnt/ β -catenin signalling is required for TGF- β /Smad2/3 signalling during myofibroblast proliferation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 21 8 , 1545–1554. doi:10.1111/jcmm.13085
- Xu, Y., Mizuno, T., Sridharan, A., Du, Y., Guo, M., Tang, J., Wikenheiser-Brokamp, K.A., Perl, A.-K.T., Funari, V.A., Gokey, J.J., Stripp, B.R., Whitsett, J.A., 2016. Single-cell RNA sequencing identifies diverse roles of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *JCI Insight* 1 20 . doi:10.1172/jci.insight.90558

Y

- Yadav, S., Kalra, N., Ganju, L., Singh, M., 2017. Activator protein-1 (AP-1): a bridge between life and death in lung epithelial (A549) cells under hypoxia. *Molecular and Cellular Biochemistry* 436 1–2 , 99–110. doi:10.1007/s11010-017-3082-1
- Yamada, M., Kuwano, K., Maeyama, T., Hamada, N., Yoshimi, M., Nakanishi, Y., Kasper, M., 2008. Dual-immunohistochemistry provides little evidence for epithelial–mesenchymal transition in pulmonary fibrosis. *Histochemistry and Cell Biology* 129 4 , 453–462. doi:10.1007/s00418-008-0388-9
- Yamaguchi, H., Wang, H.-G., 2004. CHOP Is Involved in Endoplasmic Reticulum Stress-induced Apoptosis by Enhancing DR5 Expression in Human Carcinoma Cells. *J. Biol. Chem.* 279 44 , 45495–45502. doi:10.1074/jbc.M406933200

- Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., Mori, K., 2007. Transcriptional Induction of Mammalian ER Quality Control Proteins Is Mediated by Single or Combined Action of ATF6 α and XBP1. *Developmental Cell* 13 3 , 365–376. doi:10.1016/j.devcel.2007.07.018
- Yamamoto, K., Suzuki, N., Wada, T., Okada, T., Yoshida, H., Kaufman, R.J., Mori, K., 2008. Human HRD1 promoter carries a functional unfolded protein response element to which XBP1 but not ATF6 directly binds. *J. Biochem.* 144 4 , 477–486. doi:10.1093/jb/mvn091
- Yamamoto, A., Kishino, T., Ohshima, Y., Yoshioka, Y., Kimura, T., Kasai, A., Maeda, S., 2011. Caspase-4 Directly Activates Caspase-9 in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis in SH-SY5Y Cells. *Journal of Pharmacological Sciences* 115 2 , 239–243. doi:10.1254/jphs.10217SC
- Yamashita, C.M., Dolgonos, L., Zemans, R.L., Young, S.K., Robertson, J., Briones, N., Suzuki, T., Campbell, M.N., Gauldie, J., Radisky, D.C., Riches, D.W.H., Yu, G., Kaminski, N., McCulloch, C.A.G., Downey, G.P., 2011. Matrix Metalloproteinase 3 Is a Mediator of Pulmonary Fibrosis. *Am J Pathol* 179 4 , 1733–1745. doi:10.1016/j.ajpath.2011.06.041
- Yan, C., Grimm, W.A., Garner, W.L., Qin, L., Travis, T., Tan, N., Han, Y.-P., 2010. Epithelial to Mesenchymal Transition in Human Skin Wound Healing Is Induced by Tumor Necrosis Factor- α through Bone Morphogenetic Protein-2. *The American Journal of Pathology* 176 5 , 2247–2258. doi:10.2353/ajpath.2010.090048
- Yanai, H., Shteinberg, A., Porat, Z., Budovsky, A., Braiman, A., Zeische, R., Fraifeld, V.E., 2015. Cellular senescence-like features of lung fibroblasts derived from idiopathic pulmonary fibrosis patients. *Aging* 7 9 , 664–672. doi:10.18632/aging.100807
- Yang, D., Gao, L., Wang, T., Qiao, Z., Liang, Y., Zhang, P., 2014a. Hypoxia triggers endothelial endoplasmic reticulum stress and apoptosis via induction of VLDL receptor. *FEBS Letters* 588 23 , 4448–4456. doi:10.1016/j.febslet.2014.09.046
- Yang, J., Hernandez, B.J., Martinez Alanis, D., Narvaez del Pilar, O., Vila-Ellis, L., Akiyama, H., Evans, S.E., Ostrin, E.J., Chen, J., 2016. The development and plasticity of alveolar type 1 cells. *Development* 143 1 , 54–65. doi:10.1242/dev.130005
- Yang, J., Zhang, L., Erbel, P.J.A., Gardner, K.H., Ding, K., Garcia, J.A., Bruick, R.K., 2005. Functions of the Per/ARNT/Sim Domains of the Hypoxia-inducible Factor. *Journal of Biological Chemistry* 280 43 , 36047–36054. doi:10.1074/jbc.M501755200
- Yang, L., Jiang, Y., Wu, S.F., Zhou, M.Y., Wu, Y.L., Chen, G.Q., 2008. CCAAT/enhancer-binding protein α antagonizes transcriptional activity of hypoxia-inducible factor 1 α with direct protein–protein interaction. *Carcinogenesis* 29 2 , 291–298. doi:10.1093/carcin/bgm262
- Yang, L., Johansson, J., Ridsdale, R., Willander, H., Fitzen, M., Akinbi, H.T., Weaver, T.E., 2010. Surfactant Protein B Propeptide Contains a Saposin-Like Protein Domain with Antimicrobial Activity at Low pH. *The Journal of Immunology* 184 2 , 975–983. doi:10.4049/jimmunol.0900650
- Yang, M.-H., Wu, M.-Z., Chiou, S.-H., Chen, P.-M., Chang, S.-Y., Liu, C.-J., Teng, S.-C., Wu, K.-J., 2008. Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis. *Nature Cell Biology* 10 3 , 295–305. doi:10.1038/ncb1691
- Yano, T., Mason, R.J., Pan, T., Deterding, R.R., Nielsen, L.D., Shannon, J.M., 2000. KGF regulates pulmonary epithelial proliferation and surfactant protein gene expression in adult rat lung. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 279 6 , L1146–L1158. doi:10.1152/ajplung.2000.279.6.L1146
- Yao, L., Conforti, F., Hill, C., Bell, J., Drawater, L., Li, J., Liu, D., Xiong, H., Alzetani, A., Chee, S.J., Marshall, B.G., Fletcher, S.V., Hancock, D., Coldwell, M., Yuan, X., Ottensmeier, C.H., Downward, J., Collins, J.E., Ewing, R.M., Richeldi, L., Skipp, P., Jones, M.G., Davies, D.E., Wang, Y., 2018. Paracrine signalling during ZEB1-mediated epithelial–mesenchymal transition augments local myofibroblast differentiation in lung fibrosis. *Cell Death & Differentiation* 1. doi:10.1038/s41418-018-0175-7
- Yao, Y., Wang, Y., Zhang, Z., He, L., Zhu, J., Zhang, M., He, X., Cheng, Z., Ao, Q., Cao, Y., Yang, P., Su, Y., Zhao, J., Zhang, S., Yu, Q., Ning, Q., Xiang, X., Xiong, W., Wang, C.-Y., Xu, Y., 2016. Chop Deficiency Protects Mice Against Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis by Attenuating M2 Macrophage Production. *Molecular Therapy* 24 5 , 915–925. doi:10.1038/mt.2016.36
- Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., Goldstein, J.L., 2000. ER Stress Induces Cleavage of Membrane-Bound ATF6 by the Same Proteases that Process SREBPs. *Molecular Cell* 6 6 , 1355–1364. doi:10.1016/S1097-2765(00)00133-7
- Yoo, W., Noh, K.H., Ahn, J.H., Yu, J.H., Seo, J.A., Kim, S.G., Choi, K.M., Baik, S.H., Choi, D.S., Kim, T.W., Kim, H.J., Kim, N.H., 2014. HIF-1 α expression as a protective strategy of HepG2 cells against fatty acid-induced toxicity. *J. Cell. Biochem.* 115 6 , 1147–1158. doi:10.1002/jcb.24757
- Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K., 1998. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J. Biol. Chem.* 273 50 , 33741–33749.
- Yoshida, H., Matsui, T., Hosokawa, N., Kaufman, R.J., Nagata, K., Mori, K., 2003. A Time-Dependent Phase Shift in the Mammalian Unfolded Protein Response. *Developmental Cell* 4 2 , 265–271. doi:10.1016/S1534-5807(03)00022-4
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., Mori, K., 2001. XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor. *Cell* 107 7 , 881–891. doi:10.1016/S0092-8674(01)00611-0
- Yoshida, K., Kuwano, K., Hagimoto, N., Watanabe, K., Matsuba, T., Fujita, M., Inoshima, I., Hara, N., 2002. MAP kinase activation and apoptosis in lung tissues from patients with idiopathic pulmonary fibrosis [WWW Document]. doi:info:doi/10.1002/path.1208

- Young, L.R., Noguee, L.M., Barnett, B., Panos, R.J., Colby, T.V., Deutsch, G.H., 2008. Usual interstitial pneumonia in an adolescent with ABCA3 mutations. *Chest* 134 1 , 192–195. doi:10.1378/chest.07-2652
- Young, S.K., Baird, T.D., Wek, R.C., 2016a. Translation Regulation of the Glutamyl-prolyl-tRNA Synthetase Gene EPRS through Bypass of Upstream Open Reading Frames with Noncanonical Initiation Codons. *J Biol Chem* 291 20 , 10824–10835. doi:10.1074/jbc.M116.722256
- Young, S.K., Palam, L.R., Wu, C., Sachs, M.S., Wek, R.C., 2016b. Ribosome Elongation Stall Directs Gene-specific Translation in the Integrated Stress Response. *J Biol Chem* 291 12 , 6546–6558. doi:10.1074/jbc.M115.705640
- Yu, M., Zhang, C., Li, L., Dong, S., Zhang, N., Tong, X., 2014. Cx43 reverses the resistance of A549 lung adenocarcinoma cells to cisplatin by inhibiting EMT. *Oncology Reports* 31 6 , 2751–2758. doi:10.3892/or.2014.3163
- Yu, Q., Stamenkovic, I., 2000. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 14 2 , 163–176.

Z

- Zeeshan, H., Lee, G., Kim, H.-R., Chae, H.-J., Zeeshan, H.M.A., Lee, G.H., Kim, H.-R., Chae, H.-J., 2016. Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS. *International Journal of Molecular Sciences* 17 3 , 327. doi:10.3390/ijms17030327
- Zeindl-Eberhart, E., Brandl, L., Liebmann, S., Ormanns, S., Scheel, S.K., Brabletz, T., Kirchner, T., Jung, A., 2014. Epithelial-Mesenchymal Transition Induces Endoplasmic-Reticulum-Stress Response in Human Colorectal Tumor Cells. *PLoS ONE* 9 1 , e87386. doi:10.1371/journal.pone.0087386
- Zeisberg, M., Neilson, E.G., 2009. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *Journal of Clinical Investigation* 119 6 , 1429–1437. doi:10.1172/JCI36183
- Zeisberg, M., Yang, C., Martino, M., Duncan, M.B., Rieder, F., Tanjore, H., Kalluri, R., 2007. Fibroblasts Derive from Hepatocytes in Liver Fibrosis via Epithelial to Mesenchymal Transition. *Journal of Biological Chemistry* 282 32 , 23337–23347. doi:10.1074/jbc.M700194200
- Zemans, R.L., Briones, N., Campbell, M., McClendon, J., Young, S.K., Suzuki, T., Yang, I.V., De Langhe, S., Reynolds, S.D., Mason, R.J., Kahn, M., Henson, P.M., Colgan, S.P., Downey, G.P., 2011. Neutrophil transmigration triggers repair of the lung epithelium via β -catenin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 38 , 15990–15995. doi:10.1073/pnas.1110144108
- Zemans, R.L., McClendon, J., Aschner, Y., Briones, N., Young, S.K., Lau, L.F., Kahn, M., Downey, G.P., 2013. Role of β -catenin-regulated CCN matricellular proteins in epithelial repair after inflammatory lung injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 304 6 , L415–L427. doi:10.1152/ajplung.00180.2012
- Zeng, L., Lu, M., Mori, K., Luo, S., Lee, A.S., Zhu, Y., Shyy, J.Y.-J., 2004. ATF6 modulates SREBP2-mediated lipogenesis. *EMBO J* 23 4 , 950–958. doi:10.1038/sj.emboj.7600106
- Zeng, L., Yang, X., Li, H., Li, Y., Yang, C., Gu, W., Zhou, Y., Du, J., Wang, H., Sun, J., Wen, D., Jiang, J., 2016. The cellular kinetics of lung alveolar epithelial cells and its relationship with lung tissue repair after acute lung injury. *Respiratory Research* 17 1 . doi:10.1186/s12931-016-0480-y
- Zhang, D., Lu, C., Whiteman, M., Chance, B., Armstrong, J.S., 2008. The Mitochondrial Permeability Transition Regulates Cytochrome c Release for Apoptosis during Endoplasmic Reticulum Stress by Remodeling the Cristae Junction. *J. Biol. Chem.* 283 6 , 3476–3486. doi:10.1074/jbc.M707528200
- Zhang, H., Bosch-Marce, M., Shimoda, L.A., Tan, Y.S., Baek, J.H., Wesley, J.B., Gonzalez, F.J., Semenza, G.L., 2008. Mitochondrial Autophagy Is an HIF-1-dependent Adaptive Metabolic Response to Hypoxia. *Journal of Biological Chemistry* 283 16 , 10892–10903. doi:10.1074/jbc.M800102200
- Zhang, L., Wang, Y., Pandupuspitasari, N.S., Wu, G., Xiang, X., Gong, Q., Xiong, W., Wang, C.-Y., Yang, P., Ren, B., 2017. Endoplasmic reticulum stress, a new wrestler, in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Transl Res* 9 2 , 722–735.
- Zhang, P., Yao, Q., Lu, L., Li, Y., Chen, P.-J., Duan, C., 2014. Hypoxia-Inducible Factor 3 Is an Oxygen-Dependent Transcription Activator and Regulates a Distinct Transcriptional Response to Hypoxia. *Cell Reports* 6 6 , 1110–1121. doi:10.1016/j.celrep.2014.02.011
- Zhang, W., Shi, X., Peng, Y., Wu, M., Zhang, P., Xie, R., Wu, Y., Yan, Q., Liu, S., Wang, J., 2015. HIF-1 α Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis through Direct Regulation of ZEB1 in Colorectal Cancer. *PLOS ONE* 10 6 , e0129603. doi:10.1371/journal.pone.0129603
- Zhao, H., Qin, H.-Y., Cao, L.-F., Chen, Y.-H., Tan, Z.-X., Zhang, C., Xu, D.-X., 2015. Phenylbutyric acid inhibits epithelial-mesenchymal transition during bleomycin-induced lung fibrosis. *Toxicol. Lett.* 232 1 , 213–220. doi:10.1016/j.toxlet.2014.10.013
- Zhao, L., Yee, M., O'Reilly, M.A., 2013. Transdifferentiation of alveolar epithelial type II to type I cells is controlled by opposing TGF- β and BMP signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 305 6 , L409–L418. doi:10.1152/ajplung.00032.2013
- Zheng, X., Zheng, X., Wang, X., Ma, Z., Gupta Sunkari, V., Botusan, I., Takeda, T., Björklund, A., Inoue, M., Catrina, S.-B., Brismar, K., Poellinger, L., Pereira, T.S., 2012. Acute hypoxia induces apoptosis of pancreatic β -cell by activation of the unfolded protein response and upregulation of CHOP. *Cell Death Dis* 3 6 , e322. doi:10.1038/cddis.2012.66
- Zhong, Q., Zhou, B., Ann, D.K., Minoo, P., Liu, Y., Banfalvi, A., Krishnaveni, M.S., Dubourd, M., Demaio, L., Willis, B.C., Kim, K.-J., duBois, R.M., Crandall, E.D., Beers, M.F., Borok, Z., 2011. Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Epithelial-

- Mesenchymal Transition of Alveolar Epithelial Cells: Effects of Misfolded Surfactant Protein. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 45 3 , 498–509. doi:10.1165/rcmb.2010-0347OC
- Zhou, G., Dada, L.A., Wu, M., Kelly, A., Trejo, H., Zhou, Q., Varga, J., Sznajder, J.I., 2009. Hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition requires mitochondrial ROS and hypoxia-inducible factor 1. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 297 6 , L1120–L1130. doi:10.1152/ajplung.00007.2009
- Zhou, L., Lim, L., Costa, R.H., Whitsett, J.A., 1996. Thyroid transcription factor-1, hepatocyte nuclear factor-3beta, surfactant protein B, C, and Clara cell secretory protein in developing mouse lung. *J. Histochem. Cytochem.* 44 10 , 1183–1193.
- Zhou, X.-L., Xu, P., Chen, H.-H., Zhao, Y., Shen, J., Jiang, C., Jiang, S., Ni, S.-Z., Xu, B., Li, L., 2017. Thalidomide Inhibits TGF- β 1-induced Epithelial to Mesenchymal Transition in Alveolar Epithelial Cells via Smad-Dependent and Smad-Independent Signaling Pathways. *Scientific Reports* 7 1 , 14727. doi:10.1038/s41598-017-15239-2
- Zhu, M., Guo, M., Fei, L., Pan, X.-Q., Liu, Q.-Q., 2014. 4-phenylbutyric acid attenuates endoplasmic reticulum stress-mediated pancreatic β -cell apoptosis in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Endocrine* 47 1 , 129–137. doi:10.1007/s12020-013-0132-7
- Zimna, A., Kurpisz, M., 2015. Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. *Biomed Res Int* 2015, 549412. doi:10.1155/2015/549412
- Zuo, F., Kaminski, N., Eugui, E., Allard, J., Yakhini, Z., Ben-Dor, A., Lollini, L., Morris, D., Kim, Y., DeLustro, B., Sheppard, D., Pardo, A., Selman, M., Heller, R.A., 2002. Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 9 , 6292–6297. doi:10.1073/pnas.092134099

CURRICULUM VITAE

Communication sur affiche

- ◆ Congrès J2R, Marseille 2018 : « Le stress du RE est impliqué dans la dysfonction des cellules épithéliales alvéolaires dans un microenvironnement hypoxique »
- ◆ Congrès ERS, Paris 2018 : « Le stress du RE est impliqué dans la dysfonction des cellules épithéliales alvéolaires dans un microenvironnement hypoxique »
- ◆ Congrès biennale de l'espace francophone de pneumologie, Québec 2017 :
« Rôle de CHOP et du stress du RE dans l'induction du stress oxydant dans les cellules épithéliales alvéolaires placées en hypoxie » **Prix du meilleur poster**
- ◆ Congrès J2R, Nice 2016 :
« Hypoxie et stress du RE dans la FPI : Interconnexion des voies HIF et CHOP dans les cellules épithéliales alvéolaires » **Prix du meilleur poster**
Co-auteur : « Recrutement précoces des fibrocytes dans les poumons de souris durant le développement d'une BPCO » DUPIN *et.al*
- ◆ Congrès Hypoxie, Nantes 2016 :
« Induction du stress du RE dans les cellules épithéliales alvéolaires en réponse à l'hypoxie : implication dans la FPI » **Prix du meilleur poster**
- ◆ Congrès FEPS, Paris 2016 :
« Implication majeure des cellules épithéliales alvéolaires dans l'induction du stress du RE en réponse à l'hypoxie dans les poumons de rat » **Prix du meilleur poster**

Formations principales

2016 : **Bio-statistiques**

2015 : **Expérimentation animale** niveau concepteur de projets

Enseignement

2018-2016: Travaux dirigés et travaux pratiques à l'IUT de Bobigny-Université Paris 13 (biologie moléculaire, culture cellulaire, anatomie animale)

2017: Encadrement d'un stagiaire en 2^{ème} année d'IUT

2016: Encadrement d'«**Apprentis Chercheurs**» (*Arbre des Connaissances*)

Financements

Obtention d'une bourse de mobilité **MITACS GLOBALINK** : **Collaboration scientifique** au laboratoire du Pr Emmanuelle BROCHIERO au CRCHUM (Canada)

Projet de financement participatif **THELLIE** : « Identification d'une protéine comme outil pronostique pour améliorer la prise en charge ciblée des patients atteints de Fibrose Pulmonaire Idiopathique » <https://thellie.org/fpi>

Autre information

Représentante des doctorant(e)s 2016-2018