



UNIVERSITÉ SORBONNE PARIS NORD
UFR SANTE MEDECINE BIOLOGIE HUMAINE
ÉCOLE DOCTORALE GALILÉE

THÈSE DE DOCTORAT DE BIOLOGIE
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Menée au sein du laboratoire INSERM UMR U1272 « Hypoxie et Poumon »

Soutenue publiquement le 17 Décembre 2020 par

Liasmine HAINE

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR

**Effet aggravant de l'hypoxie intermittente chronique sur la
fibrose pulmonaire induite par la bléomycine et les mécanismes
moléculaires impliqués**

Directrice du laboratoire : Pr Carole PLANÈS

Co-directeurs de thèse : Dr Emilie BONCOEUR & Pr Nicolas VOITURON

Membres du jury :

Pr Anne PELLE

Examineur & Président

Pr Jean-louis PEPIN

Rapporteur

Dr Bernard MARI

Rapporteur

Dr Sophie LANONE

Examineur

Pr Nicolas VOITURON

Co-directeur de thèse

Dr Emilie BONCOEUR

Co-directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer et d'expertiser ce travail de thèse : le professeur Jean-Louis Pépin, le docteur Bernard Mari, le docteur Sophie Lanone et le professeur Anne Pelle.

Je tiens également à remercier l'école doctorale Galilée de m'avoir accordé une bourse de thèse de 3ans qui m'a permis de réaliser mon travail de recherche dans de bonnes conditions.

Je souhaite adresser mes sincères remerciements à la directrice de l'unité de recherche U1272, le professeur **Carole PLANÈS** de m'avoir accueilli dans son laboratoire depuis janvier 2017. Merci pour la confiance que vous m'avez accordé et votre bienveillance.

Je remercie vivement mes co-directeurs de thèse **Emilie Boncoeur & Nicolas Voituren** d'avoir accepté de me superviser depuis janvier 2017. J'apprécie énormément vos qualités à la fois humaines et scientifiques. Merci pour votre disponibilité, votre écoute, votre patience. Tout au long de ces années, vous avez su m'apporter un soutien constant et sans failles à toutes les étapes : dans l'encadrement technique et scientifique, dans la rédaction et les corrections de ce manuscrit et dans plusieurs autres étapes. J'apprécie beaucoup le travail avec vous souvent dans la bonne humeur avec des discussions scientifiques toujours enrichissantes. J'apprécie également votre soutien à chaque période difficile que j'ai passé. Vous étiez toujours là pour me rassurer et m'encourager. Ces quelques lignes ne suffisent pas pour vous exprimer ma reconnaissance. Grâce à vous j'ai passé ma thèse dans de très bonnes conditions. Je n'aurai pas pu être mieux encadrée.

Je tiens également à remercier tous les étudiants avec qui j'ai partagé de très agréables moments. **Hivda**, ma sœur jumelle, merci pour tous les moments de complicité que nous avons eu, ton soutien et ton aide au quotidien. J'ai adoré le travail avec toi toujours dans une bonne ambiance même dans les périodes difficiles. C'est toujours un grand plaisir de discuter avec toi quel que soit le sujet et de partager avec toi un petit café chaque matin. **Abdellah**, merci pour ton aide et pour toutes les discussions sur nos vies d'étrangers et nos galères à la préfecture. Tu n'as jamais hésité à partager ton expérience avec nous. **Eva**, merci pour tes conseils, ton aide et ton sens de l'humour. Tu m'as beaucoup fait rigoler grâce à tes blagues au quotidien. **Florence**, j'ai beaucoup apprécié les petits messages d'encouragement que tu m'envoyais avant chaque présentation orale que j'ai faite. Merci pour tous les conseils de santé que tu as pu m'apporter en tant que médecin ainsi que les ordonnances que tu m'as prescrit pour mes migraines. **Florine**, merci pour ta gentillesse et tes explications notamment quand je suis arrivée en stage de M2. **Juliette**, merci pour toutes les discussions et les moments partagés ensemble durant ton stage et d'avoir partagé avec moi les hauts et les bas de la recherche scientifique.

Je tiens aussi à remercier tous les étudiants avec qui j'ai partagé la vie du laboratoire: Adil, Christian, Hatice, Inès, Issia, Mariam, Nadjib, Nathan, Nedjma, Raphael, Samia, Simon, Stacy, Sevda, Tenin, Tinhinane.

Dominique, merci pour votre aide au quotidien, votre patience et vos conseils précieux. J'apprécie énormément le travail avec vous ainsi que votre rigueur.

M. Bernaudin, merci votre générosité au quotidien. J'ai apprécié énormément les moments de « culture générale » que vous avez souvent partagé avec nous. Merci d'avoir consacré votre temps à nous aider dans la lecture des lames d'histologie.

Valérie, merci pour vos conseils, vos explications et votre aide notamment lorsqu'il s'agit de protocoles et de manipulations d'histologie.

Je tiens également à remercier tous les membres de l'unité U1272. Thomas Gille, Patricia Quidu, Nicolas Dard, Monsieur Richalet, Alexandre Guimard, Eric Hermand, Hilaria Onorati, Dana Radu, Maria-Luisa Pérez Lozano, Annie Sadoun. Merci à vous tous pour l'ambiance chaleureuse que vous avez instauré au laboratoire, pour votre bonne humeur et votre gentillesse.

Je remercie également chacun des membres du comité de suivi de ma thèse d'avoir accepté de suivre l'évolution de mes travaux de doctorat : le docteur François Lhuissier, le docteur Angela Sutton, le docteur Elise Belaidi.

Je tiens aussi à remercier tous mes collègues moniteurs à l'UFR SMBH : Majda-lyna Mebarek, Koceila Ait Belkacem, Meriem Naim, Kevin Bassand, Mégane Lacaud. Merci votre bonne humeur. Je remercie également Hania Hlawaty pour l'organisation de ces missions d'enseignement.

Je tiens à remercier aussi Roxane pour toutes les formations en microscopie et toutes ses explications. Merci également à Betty pour sa formation en cytométrie en flux.

Je tiens également à remercier les techniciennes de la plateforme d'histologie Naima & Odile pour leur aide et leur disponibilité. Merci également aux techniciens animaliers : Sonia, Samira et Mor.

Merci à Magali, Rofia, pour toutes les discussions partagées et leur gentillesse.

Je tiens aussi à remercier mes chères amies **Dyhia Melbouci & Nesrine Mouhoubi** pour votre soutien constant depuis maintenant plus de 6ans. Pour toutes les discussions partagées avec vous qui me réconfortaient dans mon quotidien ainsi que le courage que vous me transmettiez pendant les périodes difficiles.

Un grand merci à mes cousins et cousines qui m'ont beaucoup aidé depuis mon arrivée en France. Merci pour votre bienveillance, votre générosité et votre aide.

Je tiens à remercier mon père & ma mère pour leur sacrifice et leur soutien au quotidien aussi moral que financier. Merci à mes frères et sœurs pour leur soutien et leur encouragement.

Je tiens à remercier également mon mari pour son soutien au quotidien, sa confiance et sa présence dans les moments de joies et dans les situations difficiles.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	2
SOMMAIRE	4
LISTE DES ABBREVIATIONS	7
LISTES DES FIGURES	10
RESUME	11
ABSTRACT	12
INTRODUCTION	13
I Poumon et pathologies du poumon distal	13
I.1 Le poumon et les voies aériennes	13
I.2 Alvéole et épithélium alvéolaire.....	14
I.2.1 Définition et structure.....	14
I.2.2 Fonction de l'épithélium alvéolaire.....	15
I.2.2.1 Echanges gazeux.....	15
I.2.2.2 Homéostasie liquidienne: la clairance alvéolaire.....	16
I.2.2.3 Production de surfactant.....	18
I.3 Pathologies du poumon distal	18
I.3.1 Pneumopathies interstitielles diffuses.....	18
I.3.2 Le syndrome de détresse respiratoire aigüe.....	19
I.3.2.1 Définition et Epidémiologie	19
I.3.2.2 Diagnostic du SDRA.....	19
I.3.2.3 Physiopathologie du SDRA et facteurs de risque.....	20
I.3.2.4 Traitement du SDRA	23
I.3.3 La fibrose pulmonaire idiopathique.....	23
I.3.3.1 Définition et Epidémiologie	23
I.3.3.2 Diagnostic de la FPI.....	25
I.3.3.3 Mécanismes physiopathologiques de la FPI et facteurs de risque	26
I.3.3.4 Traitement de la FPI.....	30
II Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS)	32
II.1 Définition et Epidémiologie	32
II.2 Diagnostic du SAOS.....	33
II.3 Mécanismes physiopathologiques du SAOS	35
II.4 Traitement du SAOS.....	36
II.5 Utilisation des traitements du SAOS dans la FPI.....	37
III Hypoxie intermittente chronique	38

III.1	Hypoxie intermittente composante majeure du SAOS	38
III.2	Les effets moléculaires et cellulaires de l'hypoxie intermittente.....	39
III.2.1	Hypoxie intermittente et le facteur de transcription HIF	39
III.2.2	Hypoxie intermittente et le stress oxydant.....	41
III.2.2.1	Le stress oxydant : définition et rôle	41
III.2.2.2	Induction du stress oxydant par l'hypoxie intermittente	43
III.2.3	Hypoxie intermittente et le stress du réticulum endoplasmique	44
III.2.3.1	Le réticulum endoplasmique : définition et rôle.....	44
III.2.3.2	Le stress du réticulum endoplasmique : la réponse UPR	44
III.2.3.3	Induction du stress du RE par l'hypoxie intermittente.....	48
III.2.4	Conséquences cellulaires de l'HI– lien avec la fibrogénèse.	49
	HYPOTHESE ET OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE.....	51
	RESULTATS	52
I	Impact de l'exposition à l'HI sur la sévérité de la fibrose pulmonaire	53
I.1	Résumé de l'article 1	53
I.2	Conclusion de l'article 1	68
II	Mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet aggravant de l'HI sur la sévérité de la fibrose pulmonaire	69
II.1	Effets de l'HI et/ou de la BLM sur l'expression de marqueurs du stress du RE à J4, J8 et J21	69
II.2	Impact de l'exposition à l'HI pendant 14 jours sur la sévérité de la fibrose pulmonaire et l'expression des marqueurs de stress du RE.....	72
II.2.1	Effet de l'HI et/ou de la BLM sur la survie des animaux	72
II.2.2	Effet de l'HI et/ou de la BLM sur les dépôts de collagène et l'expression de marqueurs pro-fibrosants.....	73
II.2.3	Effet de l'HI et/ou de la BLM sur l'expression de marqueurs de stress du RE :.....	74
II.3	Impact de l'exposition à l'HI sur les mécanismes moléculaires de la fibrogénèse induite par la BLM	77
II.3.1	Résumé de l'article 2.....	77
II.3.2	Conclusion de l'article 2.....	108
II.4	Impact d'un pré-conditionnement à l'HI sur l'induction du stress oxydant, de l'apoptose et de l'inflammation dans le modèle de souris instillées à la BLM	109
II.4.1	Impact sur l'expression des marqueurs de stress oxydant	109
II.4.2	Impact sur l'expression des marqueurs d'inflammation.....	111
II.4.3	Impact sur l'expression des marqueurs d'apoptose	112
II.4.4	Impact sur l'expression d'autres marqueurs de stress du RE.....	114
II.5	Etude de l'implication de la sénescence cellulaire dans l'effet aggravant de l'HI sur la fibrose pulmonaire	116
	DISCUSSION GENERALE	118
I	Considération méthodologique.....	118
I.1	Intérêts et limites du modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine	118

I.2	Intérêts et limites du modèle d'hypoxie intermittente	119
I.3	Impact du protocole : biais expérimental ?.....	119
II	Impact de l'Hypoxie intermittente sur les lésions pulmonaires induites par la BLM	120
III	Marqueurs moléculaires impliqués	122
III.1	Inflammation, apoptose, stress oxydant, Stress du RE	122
III.2	Importance du protocole d'HI et/ou de la dose de BLM	124
IV	Autres évènements cellulaires dans la FPI: rôle de la sénescence et de l'autophagie	125
	CONCLUSION GENERALE.....	127
	PERSPECTIVES	128
I	Confirmation de l'implication du stress du RE et recherche d'autres mécanismes	128
II	Documenter au niveau cellulaire les effets de l'HI.....	129
III	Validation des résultats sur des prélèvements de patients FPI et/ou SAOS	131
	ANNEXES.....	132
I	Utilisation potentielle de l'Epo en thérapie dans le traitement du SAOS	134
I.1	Résumé de la revue 1.....	134
II	Caractérisation de l'Effet protecteur de l'Epo au niveau pulmonaire dans un modèle murin d'agression pulmonaire aiguë.....	143
II.1	Résumé de la revue 2.....	143
III	Utilisation potentielle de l'Epo en thérapie dans le traitement des pathologies pulmonaires.....	148
III.1	Résumé de la revue 3.....	148
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	180

LISTE DES ABBREVIATIONS

8-OH-dG: 8-hydroxydeoxyguanosine
AARE: amino acid responsive element
ABCA3: ATP-binding cassette-type 3
AOPP: advanced oxidation protein products
AQP: aquaporine
ARE: antioxidant responsive element
ATF: activating transcription factor
Atg: autophagy related gene
BAX: Bcl-2-associated X protein
Bcl-2: B-cell lymphoma 2
Bim: Bcl2-interacting mediator of cell death
BNIP3L: BCL2 interacting protein 3 like
Ca²⁺: ion calcium
CBP: CREB binding protein.
CCL12: C-C motif ligand 12
CEA : cellules épithéliales alvéolaires
CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
Chac-1: cation transport regulator-like protein 1
CHOP: C/EBP homologous protein
Cl⁻ : ion chlorure
CO₂: dioxyde de carbone
Ctgf: connective tissue growth factor
CVF : capacité vitale forcée
CXCL12 : C-X-C motif chemokine ligand 12
eIF2 α : eukaryotic initiation factor 2 α
ENaC: epithelial sodium channels
Epo: Erythropoïétine
ERAD: endoplasmic-reticulum-associated protein degradation
ERSE: endoplasmic reticulum stress elements
FGF: fibroblast growth factor
FIH: facteur inhibiting HIF
FPI: fibrose pulmonaire idiopathique
GADD34: Growth arrest and DNA damage-inducible protein
GPx: glutathione peroxidase
GR: glutathione reductase

GRP: glucose-regulated protein
GSH: glutathione
GSSG: glutathione disulfide
H₂O: molécule d'eau
HI: hypoxie intermittente
HIF: hypoxia inducible factor
HO-1: hème oxygénase 1
HRCT: high-resolution computed tomography
HRE: hypoxia response element
IAH: index d'apnées hypopnées
IRE-1: inositol-requiring enzyme 1
JNK: c-Jun N-terminal kinase
K⁺: ion potassium
Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1
LPS: lipopolysaccharide
MEC : la matrice extracellulaire
MMP-7 : métalloprotéinase-7 matricielle
MUC5B: mucine 5B
Na⁺: ion sodium
NAPDH: nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate
NFκB: nuclear factor-kappa B
NF-Υ: nuclear transcription factor-Υ
NOX: NADPH oxidase
Nrf2: nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
O₂: dioxygène
p300: E1A binding protein P300
Pa: pression partielle
PARP: poly (ADP-ribose) polymerase
PDGF: platelet-derived growth factor
PEP: La pression expiratoire positive
PERK: pancreatic ER kinase (PKR)-like ER kinase
PHD : prolyl-hydroxylases
PIC : pneumopathie interstitielle commune
PID : pneumopathies interstitielles diffuses
PPC: pression positive continue
PSG : polysomnographie

PVHL : la protéine de Von Hippel Lindau
RE : réticulum endoplasmique
REG : réticulum endoplasmique granuleux
REL : réticulum endoplasmique lisse
RER : réticulum endoplasmique rugueux
RGO : les reflux gastro-œsophagiens
ROS : espèces réactives de l'oxygène
SAOS : syndrome d'apnées obstructives du sommeil
SDRA : le syndrome de détresse respiratoire aigüe
SMA: smooth muscle actin
SOD: superoxide dismutase
SP : surfactant protein
TEM : transition épithélio-mésenchymateuse
TGF- β : transforming growth factor- β
TUDCA: tauroursodeoxycholic acid
UPR: unfolded protein response
USI : unités de soins intensifs
VAI : voies aériennes inférieures
VAS : voies aériennes supérieures
VEGF: vascular endothelial growth factor
XBP1: X-box binding protein 1
Zeb1: zinc finger E-box-binding homeobox 1
 γ H2AX: Gamma H2A histone family member X

LISTES DES FIGURES

Figure 1: Structure du système respiratoire.....	13
Figure 2: Structure de l'alvéole pulmonaire et son rôle dans les échanges gazeux au niveau de la membrane alvéolo-capillaire.....	14
Figure 3: Représentation du mécanisme de la clairance alvéolaire et le maintien de l'homéostasie liquidienne.....	17
Figure 4: Exemples d'analyses histologiques chez les patients atteints de SDRA.....	20
Figure 5: Mécanismes physiopathologiques du SDRA.....	22
Figure 6: Exemples d'analyses radiologiques et histologiques chez les patients démontrant un aspect de pneumopathie interstitielle commune.....	26
Figure 7: Hypothèse physiopathologique du développement de la FPI.....	28
Figure 8 : Un exemple de tracé polysomnographique de 5 minutes des événements du SAOS.....	34
Figure 9: Représentation schématique de la physiopathologie du SAOS.....	36
Figure 10: La régulation de HIF-1 α par l'oxygène.....	40
Figure 11: Schéma représentatif des principales voies de génération et d'élimination des ROS.....	41
Figure 12: Schéma représentatif du rôle physiologique et physiopathologique des ROS et du stress oxydant.....	42
Figure 13: Représentation schématique de l'activation des voies UPR.....	45
Figure 14: Résumé schématique des effets délétères de l'HI au niveau moléculaire et cellulaire et leur potentielle implication dans le processus de fibrogénèse.....	49
Figure 15: Analyse de l'expression protéique des marqueurs de stress du RE (CHOP, ATF6 et XBP1 épissé) par WB à J4, J8 et J21.....	70
Figure 16: Courbe de survie estimée selon la méthode de Kaplan Meier.....	72
Figure 17: Analyse de l'expression de l'ARNm des marqueurs pro-fibrosants par RT-qPCR à J14.....	73
Figure 18: Cartographies de coupes de poumons gauches entiers de souris avec une coloration de fibres de collagène au rouge Sirius à J14.....	74
Figure 19: Analyse de l'expression protéique des marqueurs de stress du RE (CHOP, ATF6 et XBP1 épissé) par WB à J14.....	75
Figure 20: Analyse de l'expression des marqueurs de stress oxydant.....	110
Figure 21: Analyse de l'expression des marqueurs d'inflammation.....	111
Figure 22: Analyse de l'expression des marqueurs d'apoptose dans le lysat de poumon total.....	113
Figure 23: Analyse de l'expression d'autres marqueurs du stress du RE.....	114
Figure 24: Analyse de l'expression d'autres marqueurs de sénescence par WB.....	117

RESUME

La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une pneumopathie fibrosante, caractérisée par l'accumulation de tissu conjonctif dans les poumons conduisant à une insuffisance respiratoire restrictive d'évolution fatale. Elle semble être la conséquence d'un dysfonctionnement de cellules épithéliales alvéolaires (CEA) et d'une activation aberrante des fibroblastes suite à des micro-agressions répétées de l'épithélium. Dans ce processus, un ensemble d'événements moléculaires et cellulaires sont mis en jeu et participent activement à la perte du phénotype épithélial. Parmi ces événements, le stress réticulum endoplasmique (RE) semble jouer un rôle majeur et central. Par ailleurs, une forte prévalence du syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) a été rapportée chez les patients FPI. Le SAOS se caractérise par une hypoxie intermittente (HI) nocturne due aux événements obstructifs répétés des voies aériennes supérieures. L'impact du SAOS sur la pathogenèse de la FPI reste encore mal connu.

Dans une première étude, nous avons montré dans un modèle murin de fibrose induite par la bléomycine et exposé à l'HI, une aggravation de la sévérité de la fibrose pulmonaire mise en évidence par une exacerbation de l'inflammation et des lésions tissulaires. Dans une seconde étude, nous avons montré que le stress du RE, élément pathogénique communs à la fibrose pulmonaire et à l'HI, pouvait être au moins en partie responsable de cet effet aggravant. Nous avons également mis en évidence que d'autres événements cellulaires tels que la senescence pourraient être impliqués.

Au cours de ce doctorat nous avons mis en évidence que l'HI avait des effets aggravants sur la fibrogénèse pulmonaire au niveau tissulaire et moléculaire et que le stress du RE et l'induction des voies de l'UPR pourrait constituer un élément central critique. Ce travail contribue ainsi à la meilleure compréhension de l'impact du SAOS chez les patients FPI.

ABSTRACT

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a fibrotic lung disease characterized by an accumulation of connective tissue in the lungs leading to fatal restrictive respiratory failure. It appears to be the consequence of alveolar epithelial cells (AEC) dysfunction and fibroblast aberrant activation in response to repeated micro-injuries of the alveolar epithelium. In this pathophysiological mechanism, several molecular and cellular events are involved and actively participate in the loss of the epithelial phenotype. Among these events, endoplasmic reticulum (ER) stress seems to play a major role. In addition, a high prevalence of obstructive sleep apnea syndrome (OSA) has been reported in IPF patients. OSA is characterized by nocturnal intermittent hypoxia (IH) due to repeated upper airway obstructive events. The impact of OSA on the pathogenesis of IPF remains poorly understood.

In the first study, we showed in a murine model of bleomycin-induced lung fibrosis exposed to IH an increase of pulmonary fibrosis severity through an exacerbation of lung inflammation and tissue damage. In the second study, we showed that ER stress, a pathogenetic element common to pulmonary fibrosis and IH, could be at least in part responsible for this aggravating effect of IH. We have also shown that other cellular events such as cellular senescence could be involved.

During this PhD, we have demonstrated that IH induce an aggravating effects on pulmonary fibrogenesis at histological and molecular level and that ER stress and an induction of UPR pathways could be a crucial element. This work thus contributes to a better understanding of the impact of OSA in IPF patients.

INTRODUCTION

I Poumon et pathologies du poumon distal

I.1 Le poumon et les voies aériennes

Le poumon est un organe important qui assure les échanges gazeux entre le corps et l'atmosphère extérieure. En effet, l'oxygène (O_2) se déplace de l'air extérieur vers le sang et le dioxyde de carbone (CO_2) se déplace du sang vers l'air extérieur. Le système respiratoire se divise en voies aériennes supérieures (VAS) et inférieures (VAI). Les VAS sont composées de la cavité nasale, le pharynx (nasopharynx, oropharynx, laryngopharynx) et le larynx. Les VAI commencent de la trachée vers les bronches qui se divisent en bronchioles. Ces dernières s'ouvrent sur des canaux alvéolaires et alvéoles (Figure 1). Les alvéoles pulmonaires sont en contact avec les capillaires sanguins et assurent les échanges gazeux (Figure 1 & 2) ; (Patton, Thibodeau, et Msc 2020; Losa et Chanson 2015; Chaudhry et Bordoni 2020)

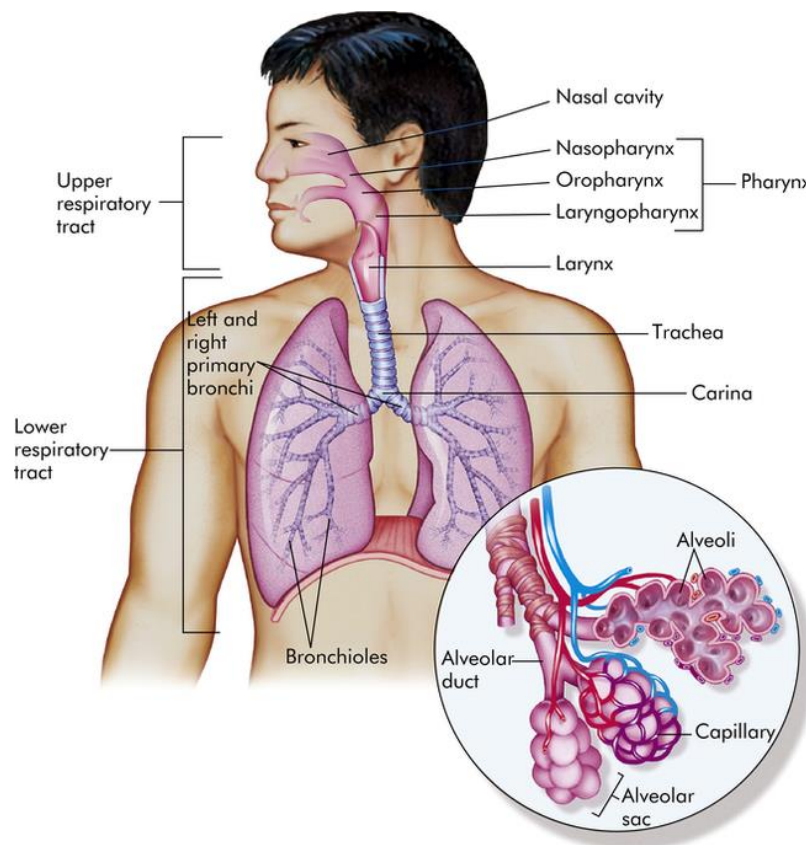


Figure 1: Structure du système respiratoire.

(Patton, Thibodeau, et Msc 2020)

I.2 Alvéole et épithélium alvéolaire

I.2.1 Définition et structure

Les alvéoles pulmonaires sont des petites structures sous forme de cavités remplies d'air qui prolongent les voies respiratoires. On compte en moyenne 480 millions d'alvéoles dans les poumons chez l'homme, organisés en centaines de clusters ou acini (Ochs et al. 2004). La portion tissulaire de l'alvéole est constituée de trois grandes parties : l'épithélium, l'interstitium et l'endothélium (Figure 2) ; (Gehr, Bachofen, et Weibel 1978).

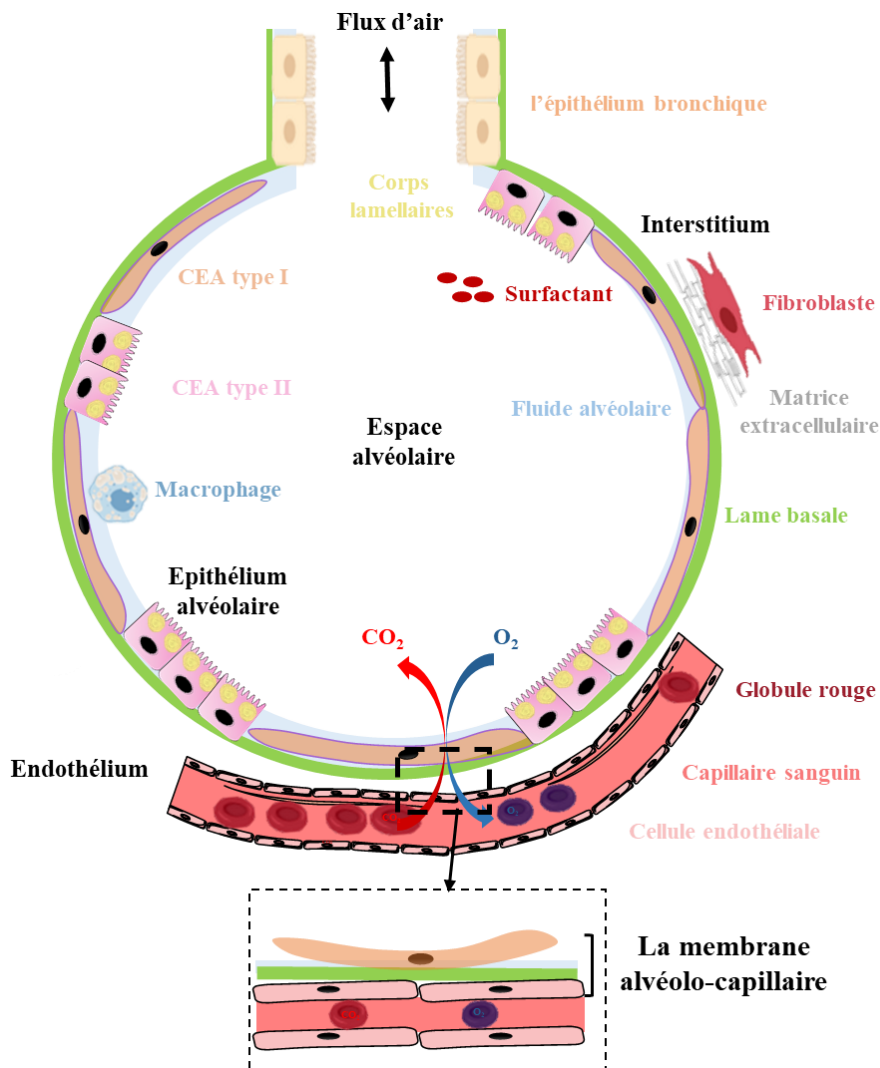


Figure 2: Structure de l'alvéole pulmonaire et son rôle dans les échanges gazeux au niveau de la membrane alvéolo-capillaire.

L'alvéole pulmonaire est une cavité remplie d'air en contact direct avec les capillaires sanguins permettant les échanges gazeux entre l'air et le sang au niveau de la membrane alvéolo-capillaire constituée de l'épithélium, l'interstitium, l'endothélium. Adapté d'après (Hughes 2007; Nova, Skovierova, et Calkovska 2019)

L'épithélium alvéolaire est constitué principalement de deux types de cellules épithéliales alvéolaires (CEA) (appelées également pneumocytes). Les CEA de type I, qui couvrent 95% de la surface alvéolaire en raison de leur grand phénotype aplati et les CEA de type II, qui sont plus épaisses avec une forme cuboïde, qui se caractérisent par la présence de corps lamellaires et des microvillosités à leur surface (Gehr, Bachofen, et Weibel 1978; Crapo et al. 1982). Le nombre de CEA de type II est deux fois plus élevé que le nombre de CEA de type I. Ces cellules sont différentes d'un point de vue fonctionnel avec une différenciation distincte (Crapo et al. 1982; Knudsen et Ochs 2018). La fonction essentielle des CEA de type I est d'assurer les échanges gazeux à travers la membrane alvéolo-capillaire (zone de contact des CEA de type I avec une monocouche de cellules endothéliales des capillaires sanguins) (Figure 2) ; (Herzog et al. 2008; Losa et Chanson 2015). Les CEA de type II quant à elles, assurent différentes fonctions, essentiellement dans la production de surfactant et la défense immunitaire (Herzog et al. 2008). De plus, les CEA de type II sont des cellules multipotentes avec une capacité de se diviser, de s'auto-renouveler et de se trans-différencier en CEA de type I (Evans et al. 1975; Guillot et al. 2013).

En plus des CEA, on retrouve également d'autres types cellulaires. Dans la lumière alvéolaire, se trouve des macrophages alvéolaires (Gehr, Bachofen, et Weibel 1978) qui assurent une fonction primordiale dans l'immunité. Au niveau interstitiel, se trouve des fibroblastes impliqués dans la réparation tissulaire et sécrétant de la matrice extracellulaire (MEC) (Figure 2) ; (Gehr, Bachofen, et Weibel 1978).

1.2.2 Fonction de l'épithélium alvéolaire

L'épithélium alvéolaire joue un rôle très important dans les échanges gazeux et dans le maintien de l'homéostasie pulmonaire. Il constitue une barrière mécanique vis-à-vis des agressions extérieures et participe à la réponse immunitaire. De plus, il maintient l'équilibre liquidien au niveau des alvéoles (Nova, Skovierova, et Calkovska 2019; Guillot et al. 2013).

1.2.2.1 Echanges gazeux

La structure du poumon est bien adaptée pour effectuer sa fonction physiologique principale dans la diffusion des gaz. Ces échanges d'O₂ et de CO₂ s'effectuent par diffusion passive au niveau de la membrane alvéolo-capillaire dans les profondeurs du poumon (Figure 2). La diffusion est entraînée par la différence de pression partielle en gaz entre les deux compartiments (l'espace alvéolaire et le sang). En effet, la pression partielle en O₂ est plus

importante dans l'espace alvéolaire par rapport au sang (le gradient est inversé dans le cas du CO₂) (Hughes 2007).

La membrane alvéolo-capillaire constitue la surface de contact entre l'air et le sang. D'une épaisseur très fine (environ 2µm d'épaisseur chez l'homme), elle est composée des CEA de type I, de la lame basale et de l'endothélium capillaire (Hughes 2007; Gehr, Bachofen, et Weibel 1978). La surface de cette membrane est très importante (équivalente à celle d'une cour de tennis de l'ordre de 100m²) (Hughes 2007; Gehr, Bachofen, et Weibel 1978). Le rapport surface / épaisseur de cette membrane rend le transport d'O₂ et de CO₂ extrêmement efficace (Hughes 2007).

I.2.2.2 Homéostasie liquidienne: la clairance alvéolaire

L'épithélium alvéolaire est recouvert d'une couche de revêtement alvéolaire fluide constituée de deux phases: un film de surface et une hypophase aqueuse (Weibel et Gil 1968; Gil et Weibel 1969; Ochs et al. 2020). Ce revêtement fonctionne comme une couche protectrice de la surface alvéolaire et évite l'assèchement des CEA en contact avec l'air. Ainsi, il constitue une barrière vis-à-vis des particules inhalées ainsi qu'un environnement optimal des macrophages alvéolaires essentiels à la défense immunitaire (Lambrecht 2006). Il joue aussi un rôle de solvant de différentes molécules essentielles aux fonctions pulmonaires telles que les composants du surfactant (Fronius, Clauss, et Althaus 2012; Ochs et al. 2020).

Des mécanismes pathologiques tels que l'insuffisance cardiaque ou une augmentation de la perméabilité de la membrane alvéolo-capillaire peuvent causer un œdème pulmonaire et une perte de l'homéostasie liquidienne (Figure 3A) tels qu'observé dans le cas du syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) (Huppert et Matthay 2017). Le maintien de cette homéostasie est assuré par des mécanismes de transport d'ions transépithéliaux assurés par les CEA (Figure 3B) ; (Fronius, Clauss, et Althaus 2012). En effet, les CEA présentent à leur pôle apical et baso-latéral de nombreux canaux ioniques assurant le transport actif des ions et limitant l'excès de fluide alvéolaire. Le transport actif des ions au travers de l'épithélium alvéolaire génère des gradients osmotiques qui fournissent la force motrice de la diffusion passive de l'eau de l'espace alvéolaire vers le sang, à travers les aquaporines (AQP) exprimées par les CEA de type I (Verkman, Matthay, et Song 2000; Fronius, Clauss, et Althaus 2012). Le transport des ions sodium (Na⁺) à travers le canal sodium (ENaC) sur la surface apicale des CEA de type II (Matalon et O'Brodovich 1999) et de type I (Johnson et al. 2002), est le moteur le plus important de la génération de ce gradient. En outre, il a été montré que le flux des ions Cl⁻ (chlorure) à

travers le canal CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) participe aux mécanismes de la clairance liquidienne (Fang et al. 2002).

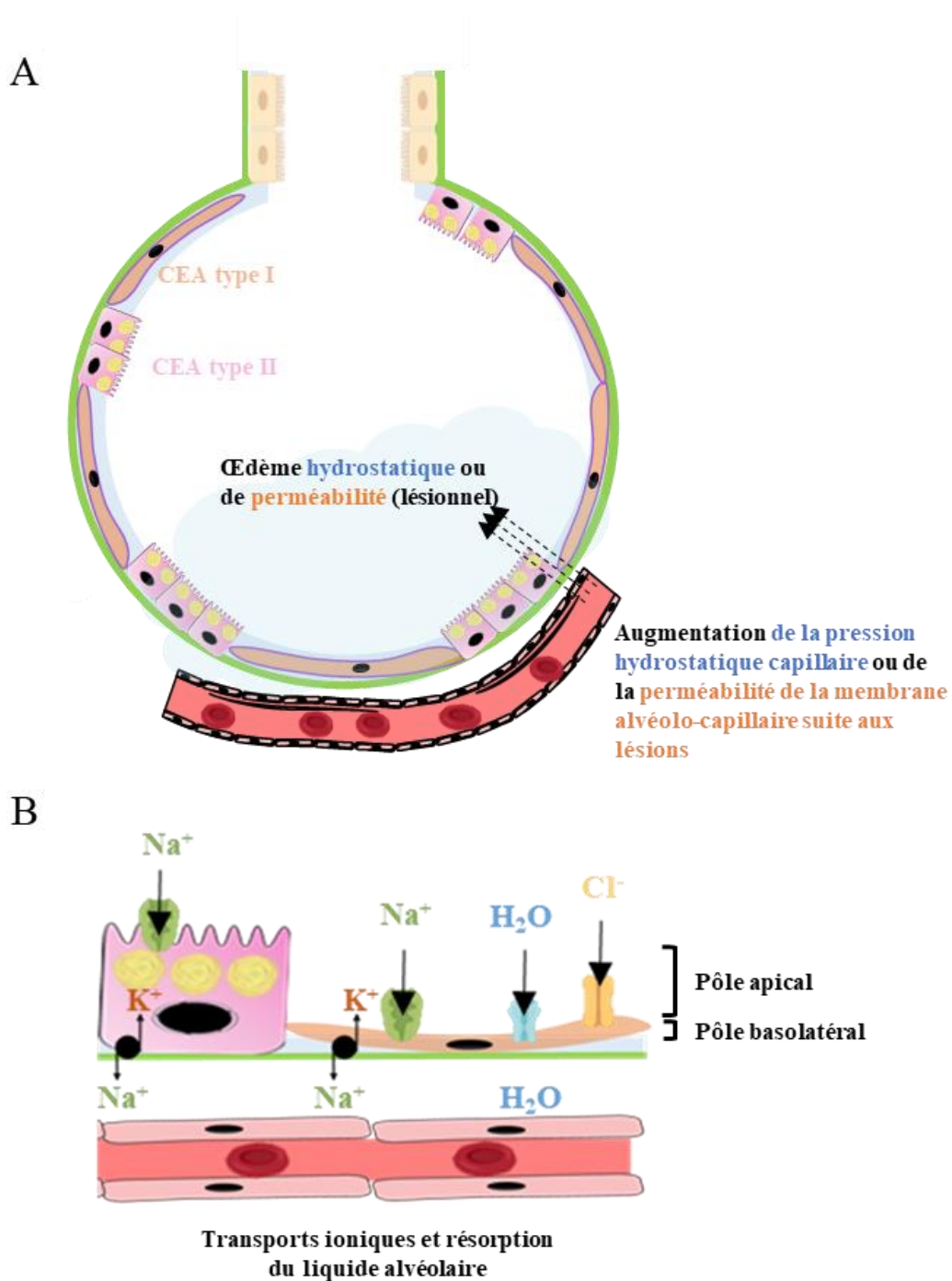


Figure 3: Représentation du mécanisme de la clairance alvéolaire et le maintien de l'homéostasie liquidienne.

A) Un œdème alvéolaire peut être causé par une augmentation de la pression hydrostatique capillaire ou par une augmentation de la perméabilité alvéolo-capillaire. B) La résorption d'un œdème alvéolaire est régulée par des mécanismes de transport d'ions transépithéliaux assurés par les CEA de type I et de type II. Adapté d'après (Huppert et Matthay 2017).

I.2.2.3 Production de surfactant

Une des caractéristiques des CEA de type II est la production de surfactant. Le surfactant est un agent tensioactif constitué essentiellement de lipides (environ 90%) et de protéines (environ 10%). La fraction lipidique est composée majoritairement de phospholipides dont le plus abondant est la dipalmitoylphosphatidylcholine, qui joue un rôle important dans la baisse de la tension superficielle. La fraction protéique quant à elle est composée majoritairement de protéines associées au surfactant (surfactant associated proteins) : SP -A, SP-B, SP-C et SP-D mais également d'autres protéines principalement dérivées de sérum (Griese 1999; Fehrenbach 2001).

Le surfactant a différents rôles au niveau des alvéoles pulmonaires. Il exerce à la fois des fonctions biophysiques et immunologiques. En effet, pendant l'expiration, le surfactant protège les alvéoles de l'affaissement en abaissant la tension superficielle. Il joue également un rôle dans l'équilibre des forces hydrostatiques empêchant ainsi la formation d'un l'œdème pulmonaire (Griese 1999). Il participe aussi à la défense immunitaire en éliminant les pathogènes au niveau pulmonaire. En effet, les protéines SP-A et SP-D (Crouch 2000) du surfactant peuvent se lier à des agents pathogènes facilitant ainsi leur élimination par les macrophages alvéolaires (Fehrenbach 2001; Pison et al. 1994). Par ailleurs, des mutations dans les gènes codant pour les constituants du surfactant notamment les gènes SFTPB et SFTPC codants pour les protéines SP-B et SP-C respectivement ont été décrites (Wert, Whitsett, et Nogee 2009). Bien que rares, ces troubles génétiques entraînent une détresse respiratoire aiguë et une insuffisance respiratoire chez les nouveau-nés à terme avec une mortalité et une morbidité importantes. Chez les nourrissons plus âgés, les enfants et les adultes, ces mutations conduisent à une pneumopathie interstitielle diffuse (Wert, Whitsett, et Nogee 2009).

I.3 Pathologies du poumon distal

I.3.1 Pneumopathies interstitielles diffuses

Les pneumopathies interstitielles diffuses (PID) constituent un groupe hétérogène de pathologies qui touchent la partie profonde du poumon, généralement l'interstitium pulmonaire, mais elles peuvent également affecter les espaces aériens, les voies aériennes périphériques et les vaisseaux ainsi que leurs composantes épithéliales et endothéliales respectives. Les PID sont causées par différentes agressions touchant le parenchyme pulmonaire, et se traduisent par des manifestations inflammatoires (comme le SDRA) et fibrosantes (comme la fibrose pulmonaire idiopathique, FPI) (« American Thoracic Society/European Respiratory Society International

Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias » 2002); (Kalchiem-Dekel et al. 2018).

1.3.2 Le syndrome de détresse respiratoire aigüe

1.3.2.1 Définition et Epidémiologie

Le syndrome de détresse respiratoire aigüe (SDRA) est une réponse inflammatoire pulmonaire aigüe se traduisant par l'apparition d'un œdème pulmonaire non-hydrostatique dû à une augmentation de la perméabilité vasculaire. Il se caractérise également par une diminution de la compliance pulmonaire et une altération des échanges gazeux conduisant à une hypoxémie et une augmentation de la pression partielle en CO₂ (Rezoagli, Fumagalli, et Bellani 2017). La plus récente des définitions du SDRA est celle dite « définition de Berlin » qui a été proposée par un groupe de travail sous l'évaluation de « European Society of Intensive Care Medicine ». Dans cette définition, le SDRA se caractérise par l'association d'une évolution aigüe et rapide, une hypoxémie sévère, la présence des infiltrats radiologiques bilatéraux et un œdème pulmonaire d'origine non cardiogénique (ARDS Definition Task Force et al. 2012).

La majorité de données épidémiologiques récentes concernant le SDRA sont issues de l'étude « LUNG SAFE ». Il s'agit d'une étude de cohorte de patients (plus de 29000 patients) prospective et multicentrique, réalisée au niveau des unités de soins intensifs (USI) de différents pays à travers les différents continents (Bellani et al. 2016). Le SDRA représentait 10,4% de tous les participants en USI. La mortalité hospitalière était plus importante pour ceux avec un SDRA modéré à sévère. La variabilité de l'incidence du SDRA selon la localisation géographique a été également rapportée par cette étude avec l'Océanie en tête du classement suivie par l'Europe (Bellani et al. 2016).

1.3.2.2 Diagnostic du SDRA

Le diagnostic positif du SDRA repose sur la présence des quatre critères nécessaires proposés dans la définition récente de Berlin cités ci-dessus (ARDS Definition Task Force et al. 2012). Selon le degré de l'hypoxémie, le SDRA est classé en trois types selon la sévérité: léger ($200 < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$ mmHg), modéré ($100 < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$ mmHg) et sévère ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100$ mmHg) (ARDS Definition Task Force et al. 2012).

L'identification du facteur de risque sous-jacent à l'apparition de ce syndrome est un aspect très important dans le diagnostic du SDRA. Dans le cas d'une difficulté à identifier l'étiologie, une bronchoscopie avec un lavage bronchoalvéolaire et une numération cellulaire,

ou une biopsie pulmonaire peut-être nécessaire pour le diagnostic (Matthay et al. 2019). Des dommages alvéolaires diffus comprenant un œdème pulmonaire, les membranes hyalines et l'inflammation interstitielle dans la phase aiguë (Figure 4), sont considérés comme la caractéristique histologique du SDRA, bien qu'absents chez environ la moitié des patients atteints de SDRA (Cardinal-Fernández et al. 2017).

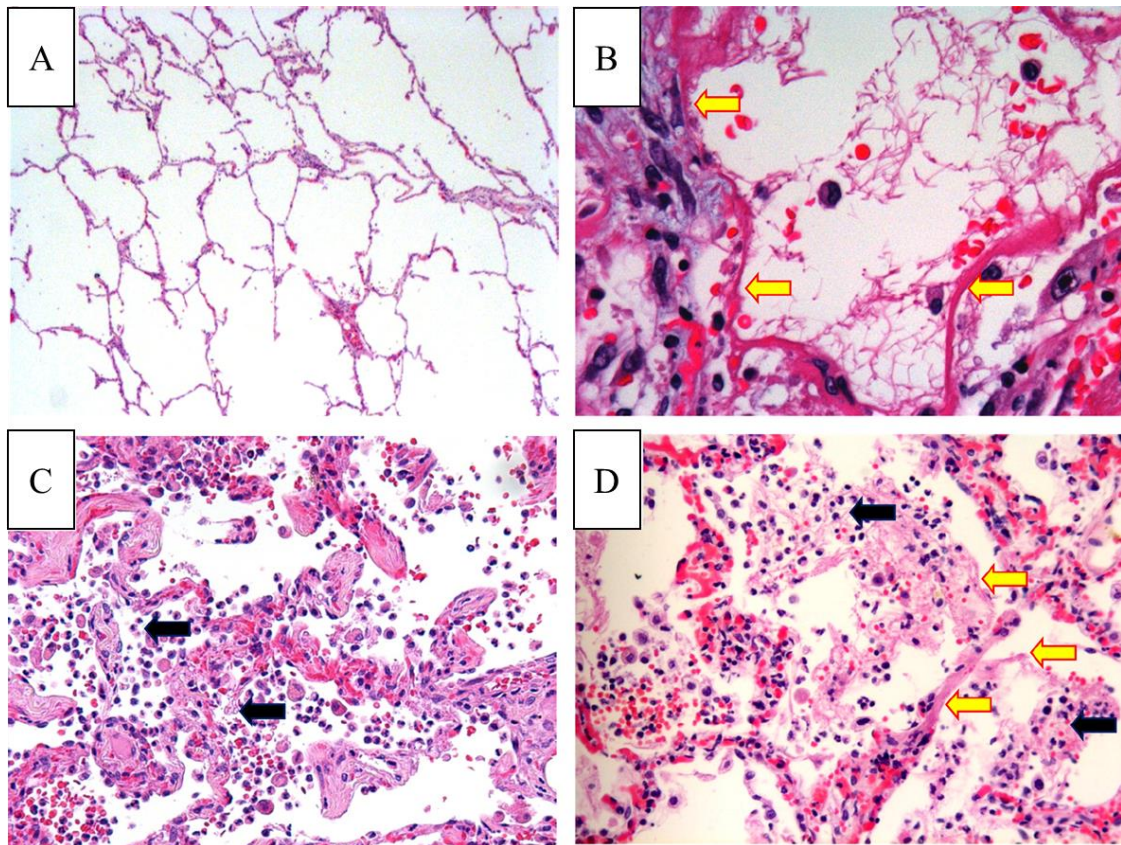


Figure 4: Exemples d'analyses histologiques chez les patients atteints de SDRA

(A) Poumon normal avec distension alvéolaire légère. (B) Dommages alvéolaires diffus (flèches jaunes: membranes hyalines). (C) Pneumonie aiguë (flèches noires: infiltration de neutrophiles). (D) Pneumonie aiguë avec lésions alvéolaires diffuses (flèches noires: infiltration de neutrophiles; flèches jaunes: membranes hyalines). (Cardinal-Fernández et al. 2017)

I.3.2.3 Physiopathologie du SDRA et facteurs de risque

Le développement d'un SDRA peut être causé par différentes affections telles que les infections virales et les traumatismes sévères. La susceptibilité et la sévérité du SDRA peuvent être augmentées par certains facteurs environnementaux (par exemple l'exposition aux polluants de l'air ambiant) (Ware et al. 2016; Reilly et al. 2019) ou certains variants génétiques (Gao et Barnes 2009) (par exemple les gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et la fonction des cellules endothéliales) (Christie et al. 2012; Huppert, Matthay, et Ware 2019). Les

différents stades du développement du SDRA (Figure 5) ont été décrits pour la première fois en 1977 par Bachofen et Weibel en 1977 (Bachofen et Weibel 1977).

La phase initiale se caractérise par la présence d'un œdème interstitiel et alvéolaire, une lésion endothéliale et épithéliale, une accumulation de neutrophiles, de macrophages et de globules rouges dans les alvéoles (Figure 5A). Dans la seconde phase, une réabsorption d'une partie de l'œdème est observée ainsi qu'une prolifération de CEA de type II, témoignant d'une tentative de réparation. À ce stade, des altérations fibreuses de l'interstitium étaient les résultats prédominants avec une infiltration de fibroblastes et des dépôts de collagène (Figure 5B). Dans la phase chronique, on trouve une résolution d'infiltrat neutrophile avec plus de cellules mononuclées et de macrophages dans les alvéoles et une fibrose bien installée (Figure 5C) ; (Bachofen et Weibel 1977; Matthay et Zemans 2011; Thille et al. 2013). Ainsi, les mécanismes physiopathologiques impliqués dans ces différentes phases sont complexes.

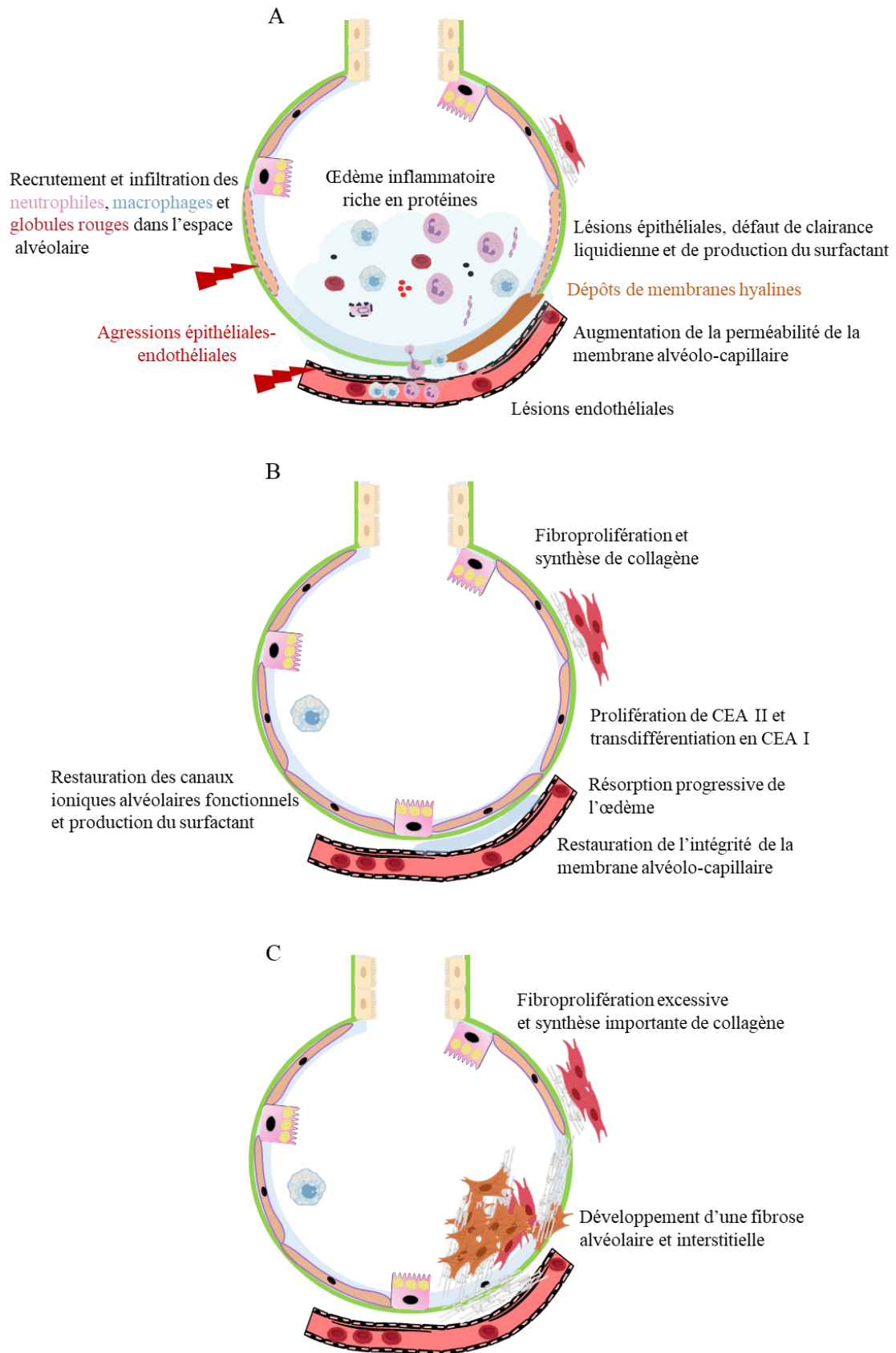


Figure 5: Mécanismes physiopathologiques du SDRA.

A) Phase aiguë du SDRA. B) Phase proliférative du SDRA. C) Evolution fibrosante du SDRA. Adapté d'après (Sweeney et McAuley 2016).

I.3.2.4 Traitement du SDRA

Pendant une longue période, les chercheurs et les cliniciens ont tenté d'utiliser des thérapies préventives dans la phase initiale de la progression de la lésion pulmonaire aiguë, avant son évolution au stade SDRA. Des essais cliniques en utilisant des corticostéroïdes comme approche préventive chez les patients ont été effectués mais sans effets bénéfiques (Luce et al. 1988; Weigelt et al. 1985; Matthay et al. 2019). Actuellement il n'existe aucun médicament efficace permettant de prévenir ou de gérer le SDRA.

La gestion du SDRA repose sur le diagnostic et le traitement des infections responsables avec une assistance respiratoire y compris une supplémentation en oxygène et la ventilation à pression positive. Le patient reçoit également une protection contre la surcharge liquidienne (généralement en utilisant des diurétiques) ainsi qu'un soutien nutritionnel jusqu'à ce que des signes d'amélioration soient observés. La ventilation mécanique est appliquée dans les cas sévères et a pour but de maintenir une oxygénation nécessaire et une élimination du dioxyde de carbone (Matthay et al. 2019). En revanche, des études ont montré que l'utilisation de celle-ci peut exacerber les lésions pulmonaires et le SDRA à cause d'une exposition à un volume courant relativement élevé ou à une pression importante (Matthay, Ware, et Zimmerman 2012; Matthay et al. 2019). La pression expiratoire positive (PEP) est la ventilation protectrice utilisée systématiquement chez les patients atteints de SDRA pour faciliter l'oxygénation, prévenir les collapsus et favoriser le recrutement alvéolaire (Gattinoni et al. 2006; Crotti et al. 2001; Matthay et al. 2019). Il existe également des équipements de ventilation non invasifs recommandés généralement pour les patients avec un SDRA léger comme l'utilisation de l'oxygène à haut débit à travers d'une canule nasale avec un diamètre élevé. Cette méthode est efficace et bien tolérée par les patients atteints de SDRA léger (Frat et al. 2015; Matthay 2015).

Par ailleurs, plusieurs travaux se sont lancés dans la recherche d'autres molécules à but curatif telle que l'Erythropoïétine (Epo), qui a été proposée comme traitement de lésions pulmonaires aiguës (Kakavas et al. 2011). Ces effets potentiels de l'Epo ont fait l'objet d'une revue de littérature située en annexe.

I.3.3 La fibrose pulmonaire idiopathique

I.3.3.1 Définition et Epidémiologie

La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est la pathologie la plus courante des pneumopathies interstitielles diffuses chroniques chez l'adulte (Cottin et al. 2017; Barratt et al. 2018). Il s'agit d'une atteinte fibrosante, progressive d'étiologie inconnue qui touche la partie

interstitielle (parenchyme) du poumon (M. Selman et al. 2001; Moisés Selman et Pardo 2014). C'est une maladie rare, irréversible et incurable malgré l'apparition de traitements anti-fibrosants permettant de ralentir l'évolution clinique de la maladie (Cottin et al. 2017) tels que la pirféridone (King et al. 2014; Knüppel et al. 2017).

L'incidence annuelle de la FPI chez les personnes âgées de 18 à 64 ans est d'environ 6 cas pour 100000 habitants/an (Ganesh Raghu et al. 2016; Glassberg 2019). Cependant, chez les adultes de plus de 65 ans, l'incidence augmente à 94 cas pour 100000 habitants/an (Ganesh Raghu et al. 2014; Glassberg 2019). De même, la prévalence de la FPI est d'environ 18 cas pour 100000 adultes âgés de 18 à 64 ans (Ganesh Raghu et al. 2016; Glassberg 2019), tandis que chez les personnes de 65 ans et plus, la prévalence est de 495 cas pour 100000 personnes (Ganesh Raghu et al. 2014; Glassberg 2019). Ces données peuvent varier selon les pays en raison des différences dans les méthodes de collecte de données (Glassberg 2019). Selon des études menées depuis les années 2000, l'incidence est estimée de 3 à 9 cas pour 100 000 habitants/an en Europe et en Amérique du Nord. Cependant, l'incidence était plus faible en Asie de l'Est et en Amérique du Sud (Hutchinson et al. 2015). La médiane de survie est estimée de 2 à 5 ans à partir du diagnostic (Ganesh Raghu et al. 2016; Ley, Collard, et King 2011). L'incidence augmente notamment avec l'âge avancé et le sexe masculin (le ratio homme : femme équivalent à 1,77 :1) (King et al. 2001; Navaratnam et al. 2011; Ganesh Raghu et al. 2014) avec une durée de survie plus courte après le diagnostic (Ganesh Raghu et al. 2014). Selon plusieurs études, la mortalité et l'incidence de la FPI semblent augmenter au fil du temps (Kaunisto et al. 2013; Hutchinson et al. 2015).

Cliniquement, les patients FPI souffrent principalement d'une dyspnée et de l'aggravation des fonctions pulmonaires qui sont associées au mauvais pronostic (Ganesh Raghu et al. 2014; Strongman, Kausar, et Maher 2018). La sévérité de la dyspnée est généralement associée à la qualité de vie du patient et à la survie (King, Pardo, et Selman 2011, 221; Nakamura et Suda 2015). D'autres symptômes sont également liés à cette pathologie tels que la présence d'une toux sèche, des crépitations bilatéraux à l'auscultation pulmonaire (Thomson et al. 2019) mais également l'hippocratisme digital (déformation des doigts) qui apparaît dans 50% des cas (Cottin et al. 2017; Nakamura et Suda 2015). L'évolution clinique de la FPI est variable et imprévisible, avec un risque d'exacerbation aiguë de la maladie dont l'évolution peut être fatale (Cottin et al. 2017). Parmi les facteurs de risque qui sont liés à la FPI on retrouve le tabagisme (Baumgartner et al. 1997), les reflux gastro-œsophagien (RGO) (G. Raghu et al. 2006), les infections virales (Moore et Moore 2015) et d'autres facteurs

environnementaux comme l'exposition à la poussière de bois, l'amiante, et la pollution atmosphérique (Trethewey et Walters 2018). Il existe également une prédisposition génétique qui est considérée comme facteur clé dans la survenue de la FPI telle que les mutations et des polymorphismes incluant un polymorphisme mononucléotidique commun (rs35705950) dans la région du promoteur MUC5B (mucine 5B) (Seibold et al. 2011; Peljto et al. 2013), des mutations des gènes liés à la télomérase (Thomson et al. 2019), des variants génétiques codants pour les constituants du surfactant : SFTPC (Nogee et al. 2001; Kaur, Mathai, et Schwartz 2017), SFTPA1 (Nathan et al. 2016; Kaur, Mathai, et Schwartz 2017), SFTPA2 (Y. Wang et al. 2009; Kaur, Mathai, et Schwartz 2017) et ABCA3 (Crossno et al. 2010; Kaur, Mathai, et Schwartz 2017). De plus, une mutation dans la région carboxyl-terminale de la protéine C du surfactant (mutation SFTPC-L118Q) a été rapportée dans les formes familiales de fibrose pulmonaire. Ainsi, des souris transgéniques exprimant la forme mutante SFTPC-L118Q, exclusivement dans les CEA de type II, développaient une fibrose pulmonaire plus sévère comparativement au contrôle Wild-type après traitement à la bléomycine (BLM) (Lawson et al. 2011).

I.3.3.2 Diagnostic de la FPI

Le diagnostic de la FPI repose sur plusieurs critères cliniques, radiologiques et histopathologiques (Thomson et al. 2019; Cottin et al. 2017). En effet, le diagnostic de la FPI nécessite avant tout une exclusion de toute autre forme de PID qui sont causées par des facteurs déterminés (toxicité médicamenteuse, connectivites et exposition environnementales) (Thomson et al. 2019; Cottin et al. 2017). L'examen radiologique a pour but de rechercher la présence d'un aspect de pneumopathie interstitielle commune (PIC) (en anglais « usual interstitial pneumonia (UIP) ») certaine ou probable (Figure 6A, 6B) ; (Thomson et al. 2019; Cottin et al. 2017).

Chez un patient remplissant toutes les caractéristiques typiques par la présence des opacités réticulaires et des images en rayon de miel, le diagnostic radiologique peut être retenu et validé. Cependant, si la présence d'un aspect de pneumopathie interstitielle commune n'est pas certaine au niveau radiologique, un examen histopathologique sur des biopsies pulmonaires est nécessaire. Cette analyse, permet de valider la présence ou non d'un aspect de PIC et d'exclure tout autre aspect (Figure 6C, 6D) ; (Cottin et al. 2017). La PIC est caractérisée par une hétérogénéité temporelle et spatiale. L'hétérogénéité temporelle se réfère à des atteintes

hétérogènes à différents stades de développement de fibrose, en allant d'une initiation au remodelage vers une fibrose terminale. L'hétérogénéité spatiale reflète la distribution inégale des diverses altérations pathologiques dans le poumon. En effet, un parenchyme avec une structure d'apparence normale peut se retrouver à proximité des zones fibrotiques sévèrement affectées. Les caractéristiques microscopiques de la PIC sont la présence des foyers de fibroblastes, un épaississement des parois inter-alvéolaires, une hypertrophie et une hyperplasie des CEA de type II (Knudsen, Ruppert, et Ochs 2017).

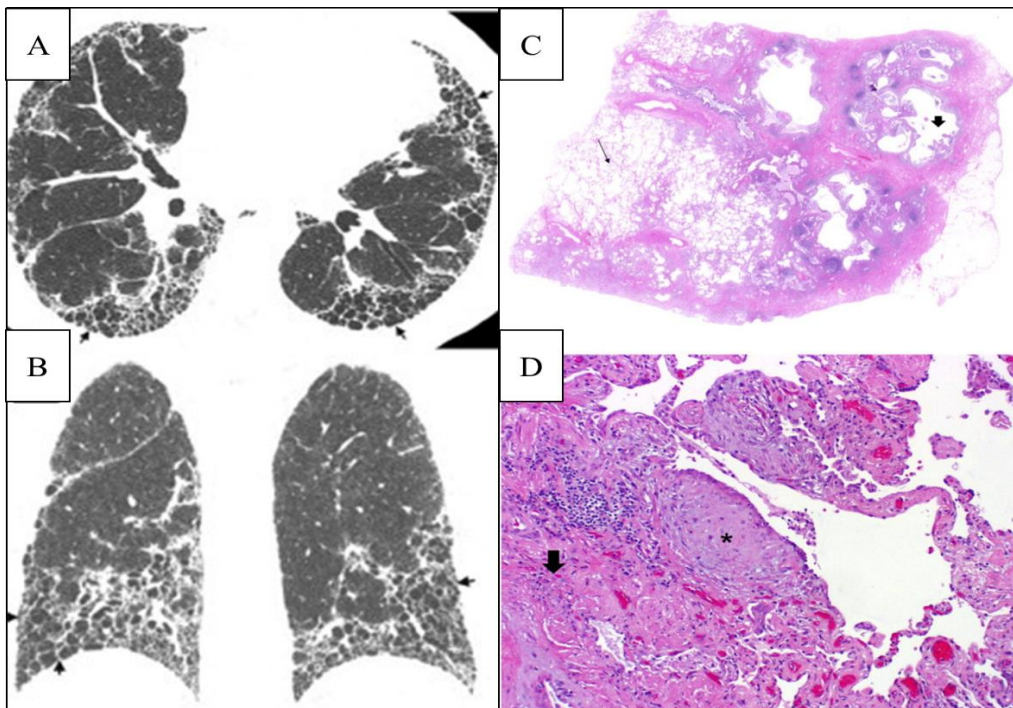


Figure 6: Exemples d'analyses radiologiques et histologiques chez les patients démontrant un aspect de pneumopathie interstitielle commune.

A) et B) Images de tomodensitométrie à haute résolution (HRCT) démontrant un modèle de PIC avec des nids d'abeilles: les images HRCT axiales et coronales montrant une prédominance basale et périphérique d'une anomalie réticulaire avec plusieurs couches de nids d'abeilles (flèches noires). C) et D) Échantillons de biopsie pulmonaire chirurgicale démontrant le modèle de PIC. (C) Microscopie à balayage montrant un processus irrégulier avec des espaces en nids d'abeilles (flèche épaisse), certaines régions de tissu pulmonaire préservées (flèche mince) et une fibrose qui s'étend dans le poumon à partir des régions sous-pleurales. (D) Région de fibrose plus chronique (présentée par une flèche épaisse) et un foyer de fibroblastes (présenté par l'astérisque). D'après (Ganesh Raghu et al. 2011).

I.3.3.3 Mécanismes physiopathologiques de la FPI et facteurs de risque

Plusieurs études ont été effectuées dans le but de comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la FPI. Pendant plusieurs décennies, l'hypothèse d'une

agression inflammatoire chronique (alvéolite), persistante, due à une cause inconnue était considérée comme le facteur clé de la fibrogénèse pulmonaire dans la FPI (HAMMAN 1944; Dempsey 2006; Noble et Homer 2005). Cependant, des études suggèrent que l'inflammation jouerait un rôle mineur dans le développement de la FPI. En effet, l'utilisation des traitements anti-inflammatoires n'a pas montré d'efficacité chez les patients FPI (Davies, Richeldi, et Walters 2003; L. Richeldi et al. 2003; Dempsey 2006). Selon l'hypothèse actuelle, le développement de la FPI serait dû à des micro-agressions répétées de l'épithélium alvéolaire par divers facteurs endogènes et exogènes (virus, fumée de cigarette, RGO, polluants...Etc) menant à une dérégulation du dialogue épithélio-mésenchymateux et conduisant à une réparation aberrante de l'épithélium lésé (M. Selman et al. 2001; Dempsey 2006).

a) Processus de réparation normale chez un sujet sain

Dans un contexte physiologique chez un sujet sain, l'épithélium alvéolaire peut subir des agressions conduisant à la dénudation de la lame basale due à l'apoptose des CEA notamment les plus fragiles (les CEA de type I) (Figure 7A). S'ensuit un processus de réparation avec une étape clé « la réépithélialisation » (M. Selman et al. 2001) essentiellement médiée par les CEA de type II, qui ont la capacité de proliférer et de se différencier en CEA de type I (Evans et al. 1975; Barkauskas et al. 2013). Cette réparation est favorisée par le dialogue entre les CEA et les fibroblastes résidant dans le poumon, *via* la sécrétion de diverses cytokines et facteurs de croissance (M. Selman et al. 2001). Les fibroblastes sont des cellules mésenchymateuses, polyvalentes jouant un rôle très important dans le processus de réparation après lésion dans la plupart des organes (Li et Wang 2011). Dans des conditions de réparation normale, les fibroblastes infiltrent la plaie et se différencient en myofibroblastes en réponse à une lésion. Les myofibroblastes sont des cellules contractiles avec des caractéristiques intermédiaires entre les fibroblastes et des cellules musculaires lisses. Elles sécrètent des protéines de la matrice extracellulaire qui forment une matrice provisoire, qui sert d'échafaudage pour la réparation des tissus. La contraction des myofibroblastes et la matrice provisoire facilitent la réparation en apportant des cellules épithéliales saines au niveau de la plaie. La sécrétion de collagène stabilise la matrice contractée entourant les myofibroblastes. Une fois le processus de réparation fini, les myofibroblastes disparaissent progressivement probablement par un phénomène d'apoptose et la MEC provisoire est dégradée (Figure 7B) ; (M. Selman et al. 2001; Li et Wang 2011).

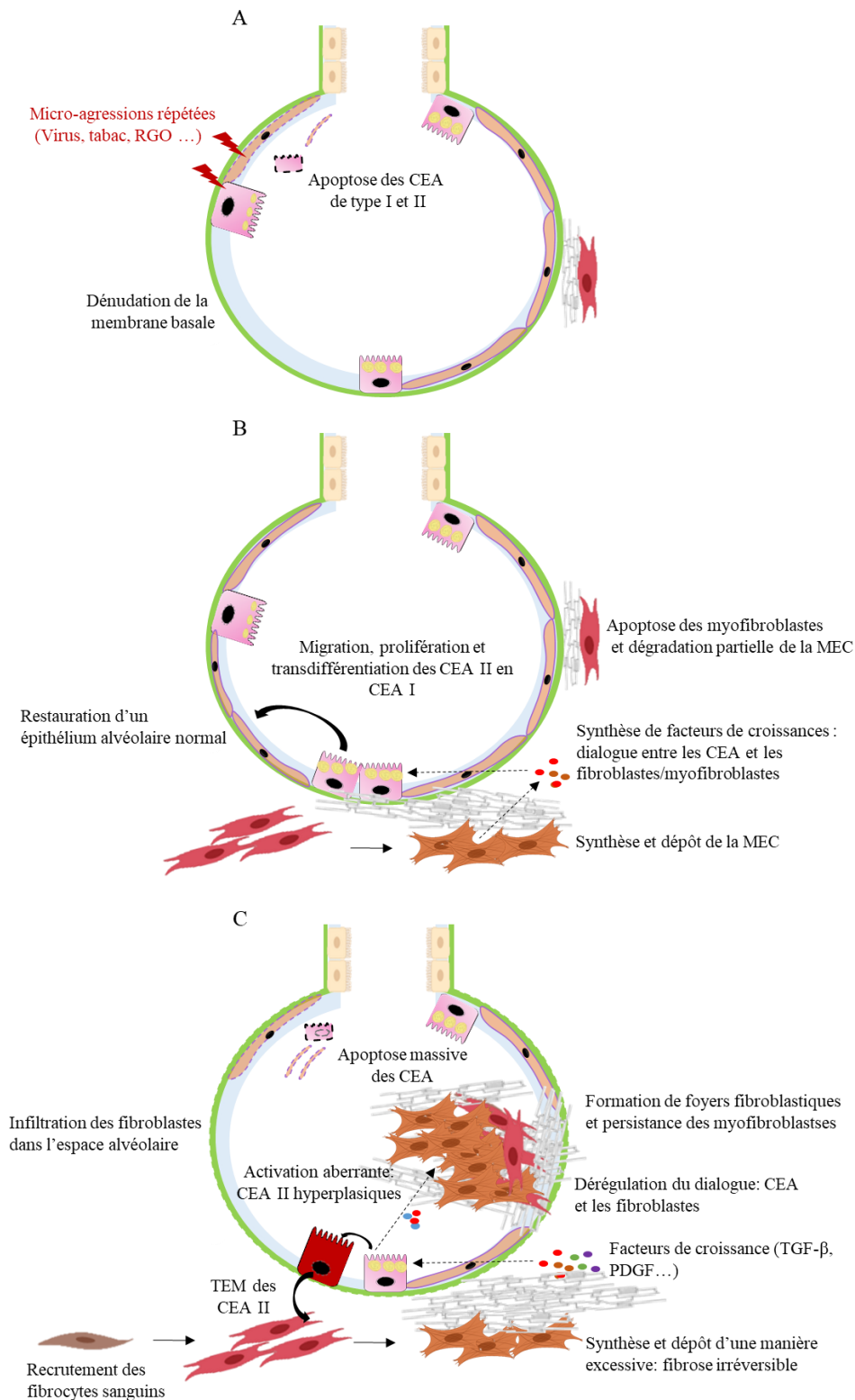


Figure 7: Hypothèse physiopathologique du développement de la FPI.

A) Des micro-agressions répétées induisent des lésions de l'épithélium alvéolaire. B) Processus de réparation physiologique conduisant à la restauration d'un épithélium normal. C) Processus de réparation aberrante conduisant à un tissu cicatriciel et une fibrose. Adapté d'après (M. Selman et al. 2001; Moisés Selman et Pardo 2014).

b) Processus de réparation aberrante dans le cas de la FPI

Dans le cas de la FPI, ce processus de cicatrisation devient chronique. En effet, des agressions répétées de l'épithélium alvéolaire induisent un défaut de réépithélialisation et une mauvaise réparation de l'épithélium alvéolaire (Figure 7C). Ces agressions provoquent d'une part un décrochage de cellules épithéliales et leur apoptose notamment des CEA de type I et une dénudation persistante de la membrane basale (M. Selman et al. 2001; Pardo et Selman 2002). Cette mort excessive des CEA constitue un facteur clé dans la pathogenèse de la FPI. Une sur-activation de la voie de signalisation pro-apoptotique (Fas-FasL) dans les cellules épithéliales de patients FPI a été retrouvée (Maeyama et al. 2001). De plus, une augmentation de l'expression des protéines pro-apoptotiques (p53, p21, caspase 3 et Bax) et une diminution de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 a été retrouvée chez les patients FPI (Plataki et al. 2005). Des études *in vivo* ont montré qu'une induction de l'apoptose spécifique des cellules épithéliales était suffisante pour induire une fibrose pulmonaire (Hagimoto et al. 1997; Sisson et al. 2010). Enfin, une potentielle implication des fibroblastes et des myofibroblastes dans l'induction de l'apoptose des CEA a été également rapportée (Bruce D. Uhal et al. 1998; B. D. Uhal et al. 1995). En effet, les analyses de tissus FPI ont révélé une augmentation de l'apoptose et de la nécrose des CEA proches des foyers de myofibroblastes. Ceci suggère un rôle clé des fibroblastes actifs dans l'induction des dommages des CEA qui provoque des collapsus alvéolaires et un remodelage tissulaire (Bruce D. Uhal et al. 1998; Myers et Katzenstein 1988). De plus, le milieu conditionné de fibroblastes isolés de poumons de patients FPI induisait l'apoptose des CEA *in vitro* (B. D. Uhal et al. 1995).

D'autre part, on retrouve dans les biopsies de patients atteints de FPI une activation anormale des CEA de type II qui deviennent hypertrophiques, hyperplasiques et sécrètent des cytokines et des facteurs de croissance tels que le PDGF (platelet-derived growth factor) (Antoniades et al. 1990; M. Selman et al. 2001) et le TGF- β (transforming growth factor- β) notamment à des stades avancés du développement de la fibrose (Khalil et al. 1996). Ces facteurs induisent la migration, la prolifération et la différenciation de fibroblastes en myofibroblastes (M. Selman et al. 2001; Moisés Selman et Pardo 2014). Ces myofibroblastes s'alignent parallèlement et constituent la majorité de cellules qui forment les foyers fibroblastiques (Kuhn et McDonald 1991; Myers et Katzenstein 1988). En effet, au-dessus des foyers fibroblastiques se trouvent des zones de membrane basale endommagées et un épithélium dénudé ce qui va favoriser le passage des fibroblastes de l'interstitium vers l'épithélium alvéolaire (M. Selman et al. 2001). Ces foyers peuvent être enrichis par le

recrutement de fibrocytes sanguins (Maharaj, Shimbori, et Kolb 2013). Des études réalisées sur des modèles animaux ont montré que ces fibrocytes sont recrutés dans les sites de lésions *via* des chimiokines telles que CXCL12 (Phillips et al. 2004) et CCL12 (Moore et al. 2006). De plus, certaines CEA pourraient elles-mêmes subir une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) en myofibroblastes induite par le TGF- β 1 (Willis et al. 2005). D'une manière intéressante, l'analyse des tissus des patients FPI a révélé la présence d'une population cellulaire co-exprimant des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux, suggérant ainsi une TEM des CEA chez ces patients (Willis et al. 2005). Par ailleurs, les myofibroblastes développeraient un phénotype résistant aux signaux apoptotiques (B. D. Uhal 2008). Ils produisent et sécrètent de la MEC d'une manière excessive, ce qui provoque un épaissement du parenchyme pulmonaire qui devient rigide, conduisant au développement d'une fibrose pulmonaire irréversible et à un déclin de la fonction respiratoire (Figure 7) ; (M. Selman et al. 2001; Pardo et Selman 2002).

I.3.3.4 Traitement de la FPI

Actuellement il existe des traitements médicamenteux permettant de ralentir la progression de cette pathologie mais qui ne sont pas des traitements curatifs. La pirféridone et le nintédanib ont été les premiers agents à réduire le déclin de la capacité vitale forcée (CVF) chez les patients atteints de FPI (Sgalla et al. 2020; Luca Richeldi et al. 2014; King et al. 2014).

Le nintédanib est un inhibiteur de la tyrosine kinase, développé à l'origine comme médicament anticancéreux qui a des propriétés anti-angiogéniques par le blocage de la voie du VEGF (vascular endothelial growth factor) (Hilberg et al. 2008). Il a été par la suite reconnu que le nintédanib possédait une activité antifibrotique (Wollin et al. 2014). On pense que le mécanisme d'action du nintédanib dans la FPI consiste en l'inhibition des médiateurs profibrosants, notamment le PDGF, le FGF (fibroblast growth factor), le TGF- β ainsi que le VEGF, réduisant l'activité des fibroblastes (Wollin et al. 2015).

La pirféridone est un traitement anti-fibrosant avec des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes (King et al. 2014; Knüppel et al. 2017). Malgré le fait que son mécanisme d'action soit mal connu, ces effets anti-fibrosants ont été montrés dans un modèle de fibrose pulmonaire induite par instillation intratrachéale de BLM chez le hamster. Des études *in vitro* sur les fibroblastes pulmonaires humains adultes dérivés de patients atteints de FPI, montrent

que ce traitement inhibe les effets du TGF- β sur la synthèse du collagène et de la MEC (Ganesh Raghu et al. 1999).

Ces deux molécules ont montré une efficacité dans l'inhibition de la formation des fibrilles de collagène I et ont provoqué une réduction et une altération de l'apparence des faisceaux de fibrilles de collagène (Knüppel et al. 2017).

Malgré la présence de ces traitements qui soulagent les patients, la FPI continue d'être une maladie évolutive avec un mauvais pronostic. À ce jour, la transplantation pulmonaire reste la seule option efficace qui confère une meilleure survie et une bonne qualité de vie à certains patients. Cependant, différentes complications post-transplantation sont à envisager telles que l'infection, les tumeurs ou un rejet chronique du greffon qui constitue la principale mortalité à long terme (Laporta Hernandez et al. 2018).

Comme dans le SDRA, une thérapie potentielle à l'Epo pourrait être envisagée dans le cas de la FPI. En effet, des études ont montré que l'Epo exerce des effets protecteurs anti-fibrosants dans divers organes tels que le cœur et le rein (Lu et al. 2012; Geng, Hu, et Lian 2015). Ces effets potentiels de l'Epo ont fait l'objet d'une revue de littérature située en annexe.

II Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS)

Différentes études ont rapporté la fréquence des perturbations du sommeil et la présence du SAOS chez les patients atteints de pneumopathies interstitielles (Pihtili et al. 2013; Lancaster et al. 2009; Troy et Corte 2014). Actuellement, le SAOS est reconnu comme une comorbidité importante associée à la FPI qui peut affecter la survie des patients (Ganesh Raghu et al. 2011; Schiza et al. 2015). En effet, plusieurs études cliniques, dont une de notre laboratoire, ont montré une forte prévalence du SAOS chez les patients FPI, par rapport à la population générale (Lancaster et al. 2009; Gille et al. 2017). Lancaster et ses collaborateurs ont montré que 88% des sujets déjà suivis pour une FPI présentent un SAOS dont 20% avec un SAOS léger et 68% avec un SAOS modéré à sévère. Cette étude a suggéré qu'un test de diagnostic du SAOS doit être envisagé chez les patients souffrant d'une FPI compte tenu de cette forte incidence (Lancaster et al. 2009). Dans l'étude réalisée dans notre laboratoire par Gille et al, une prévalence d'un SAOS modéré à sévère et d'un SAOS sévère chez 62% et 40% respectivement a été retrouvée chez les patients avec une FPI nouvellement diagnostiquée (incidente) (Gille et al. 2017).

II.1 Définition et Epidémiologie

Les apnées du sommeil sont la forme la plus répandue de troubles du sommeil et sont caractérisées par des pauses respiratoires récurrentes dues à un rétrécissement /collapsus des VAS et/ou à un arrêt périodique du réseau respiratoire ponto-bulbaire au cours du sommeil (Fung 2014). Les apnées obstructives sont les plus communes des apnées du sommeil (Franklin et Lindberg 2015). Le SAOS est défini par l'obstruction itérative des VAS pendant le sommeil, due au moins en partie au relâchement des muscles dilatateurs du pharynx (Terry Young, Peppard, et Gottlieb 2002), responsable d'une obstruction fréquemment associée à la fragmentation du sommeil et à des micro-réveils (Guilleminault et al. 1993; T. Young et al. 1993), conduisant à leur tour à la contraction de ces muscles dilatateurs des VAS. Cette succession d'événements au cours de la nuit conduit à de brefs épisodes d'hypoxie-réoxygénation de façon répétée et cyclique (Eckert et Malhotra 2008).

Des études sur la prévalence du SAOS ont montré que ce syndrome touche généralement des personnes adultes avec une prévalence qui peut varier de 6% à 17% de la population générale, atteignant 49% dans les âges avancés (Senaratna et al. 2017).

Il est également plus fréquent chez les hommes (24% des hommes d'âge moyen versus 9% des femmes dans la même fourchette d'âge) (T. Young et al. 1993; Block et al. 1979). Chez les hommes, une corrélation positive entre l'âge avancé et l'obésité avec l'incidence de la désaturation nocturne en oxygène et de la respiration anormale a été rapportée (Block et al. 1979, 19).

Parmi les symptômes les plus fréquents chez les patients SAOS pendant leur sommeil, on trouve les ronflements, étouffement nocturne, dyspnée, bouche sèche, RGO. En dehors de la période de sommeil ces patients souffrent généralement d'une hypersomnolence diurne et d'une fatigue, maux de tête, baisse de la concentration, agressivité et anxiété ...etc (Guilleminault, Tilkian, et Dement 1976; Guilleminault et al. 1993; Qureshi, Ballard, et Nelson 2003). En outre, le SAOS est un facteur de risque indépendant de nombreuses pathologies telles que les pathologies cardiovasculaires (Bradley et Floras 2009) Bradley & Floras, 2009 et métaboliques (FUSETTI et al. 2012).

II.2 Diagnostic du SAOS

La présence et le degré de sévérité du SAOS sont évalués par le calcul de l'index d'apnées hypopnées (IAH), qui se définit par le nombre d'apnées et/ou d'hypopnées qui se produisent par heure pendant le sommeil. Le SAOS est défini avec un IAH ≥ 5 événements/heure et peut-être classé en trois types : léger ($5 \leq \text{IAH} < 15$ événements/heure), modéré ($15 \leq \text{IAH} \leq 30$) ou sévère ($\text{IAH} > 30$) (« Sleep-Related Breathing Disorders in Adults: Recommendations for Syndrome Definition and Measurement Techniques in Clinical Research » 1999) (Gottlieb et Punjabi 2020).

Le SAOS est détecté généralement en utilisant des tests d'apnées du sommeil à domicile ou en laboratoire. En laboratoire, la polysomnographie (PSG) est majoritairement utilisée pour le diagnostic standard du SAOS chez les patients au moment du sommeil (Gjevre et al. 2011; Gottlieb et Punjabi 2020). Au cours de ce test, différents paramètres sont évalués : une exploration cérébrale avec une électroencéphalographie ; une mesure de la saturation de l'hémoglobine en oxygène par oxymétrie de pouls ; l'effort respiratoire en mesurant les mouvements thoraciques et abdominaux à l'aide de bandes d'inductance, le flux d'air à travers le nez ou à travers le nez et la bouche (Figure 8). D'autres paramètres peuvent également être évalués tels que les ronflements, les mouvements de jambes et la position du corps (Gottlieb et Punjabi 2020). L'accès à la PSG nocturne est limité en raison du coût élevé et de la disponibilité tardive. Les tests de diagnostic du SAOS à domicile sont de plus en plus utilisés permettant de

réduire le coût (5 fois moins cher) et également d’avoir un accès plus précoce au diagnostic. Ce test est efficace et utile pour détecter des troubles respiratoires du sommeil à condition de son utilisation correcte (Gjevre et al. 2011; Gottlieb et Punjabi 2020). Ces tests permettent de mesurer l’effort respiratoire, le flux d’air et la saturation de l’hémoglobine en oxygène. Cependant, ils ne permettent pas d’évaluer le stade du sommeil et les mouvements de jambes. Les résultats des tests à domicile nécessitent parfois une vérification avec la PSG en laboratoire en raison de la possibilité de résultats faux négatifs (Gottlieb et Punjabi 2020).

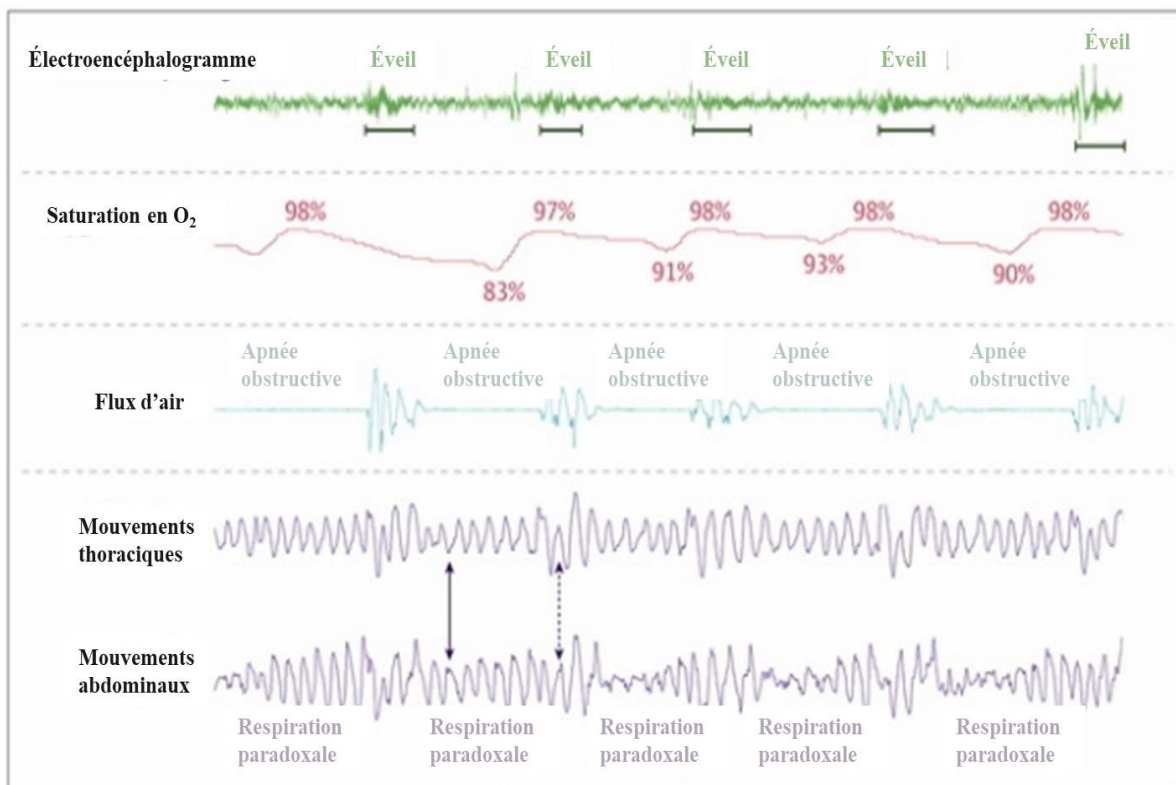


Figure 8 : Un exemple de tracé polysomnographique de 5 minutes des événements du SAOS.

À chaque apnée obstructive, l'absence de flux d'air s'accompagne de mouvement déphasé du thorax et de l'abdomen (flèche pleine), connu sous le nom de respiration paradoxale, et par une diminution de la saturation en oxygène. Comme la saturation en oxygène est mesurée par oxymétrie de pouls au doigt, la saturation en oxygène du nadir est retardée par rapport à l'apnée en raison de temps de circulation du poumon aux doigts. L'Électroencéphalogramme permet d'enregistrer les périodes d'éveil qui permet de mettre fin aux événements obstructifs, avec une reprise de la respiration normale (flèche en pointillé) et une restauration de saturation en oxygène à des niveaux normaux. Le retour au sommeil après chaque excitation est associé à l'effondrement de VAS et aux apnées obstructives récurrentes. D'après (Gottlieb et Punjabi 2020).

II.3 Mécanismes physiopathologiques du SAOS

La structure du pharynx est caractérisée par une susceptibilité à la déformation et à un affaissement notamment lors du sommeil à cause de l'absence d'un support rigide ou osseux (Eckert et Malhotra 2008). La contraction de muscles dilatateurs liés au pharynx est très importante pour le maintien de la perméabilité des VAS. Chez les patients SAOS, la disposition des tissus mous est modifiée et les VAS apnéiques semble être plus petites et rétrécies latéralement comparativement aux sujets sains (R. J. Schwab et al. 1995; Richard J Schwab et al. 2003). Ceci augmentet leur risque d'effondrement et d'obstruction chez ces patients pendant le sommeil (R. J. Schwab et al. 1995; Eckert et Malhotra 2008; Gottlieb et Punjabi 2020). Associé à cette vulnérabilité pharyngée, l'activité des muscles dilatateurs est réduite pendant la période du sommeil (Mezzanotte, Tangel, et White 1992). D'autres facteurs de risque du développement du SAOS sont également décrits tels que l'âge, le sexe masculin (Martin et al. 1997), l'obésité (P. E. Peppard et al. 2000), la consommation d'alcool (Taveira et al. 2018) ainsi qu'une prédisposition génétique (Mathur et Douglas 1995; Redline et al. 1995).

Les obstructions des VAS entraînent un arrêt complet (apnée) ou une réduction considérable (hypopnée) du débit d'air pendant au moins 10 secondes (Guilleminault, Tilkian, et Dement 1976), malgré la présence d'un effort respiratoire continu (Dp 1985; Qureshi, Ballard, et Nelson 2003). Ceci est aussi accompagné par des désaturations répétées en oxygène ($\geq 3\%$) (« Sleep-Related Breathing Disorders in Adults: Recommendations for Syndrome Definition and Measurement Techniques in Clinical Research » 1999) ; (Whyte et Gibson 2018). Des travaux de recherche clinique ont montré que les hypopnées sont cliniquement importantes et que le SAOS peut survenir en l'absence d'apnées récurrentes (Gould et al. 1988). La survenue fréquente et répétitive d'apnées et/ou hypopnées entraine des épisodes récurrents d'hypoxie-réoxygénation ou « Hypoxie Intermittente ; HI ». Ceci induit des troubles intermittents des gaz sanguins chez ces patients avec une hypoxémie (diminution de la pression partielle en oxygène, PaO_2) et une hypercapnie (augmentation de la $PaCO_2$) pendant la période du sommeil (Gould et al. 1988; Whyte et Gibson 2018; « Sleep-Related Breathing Disorders in Adults: Recommendations for Syndrome Definition and Measurement Techniques in Clinical Research » 1999). L'augmentation de l'effort respiratoire ainsi que l'hypoxémie et l'hypercapnie provoquent le réveil. Cette réponse permet la restauration de l'activité des muscles dilatateurs et la perméabilité pharyngée. Une hyperventilation donc se met en place afin de corriger le taux des gaz sanguins (O_2 , CO_2) à la normale (Figure 9).

Cette réponse répétée d'une manière chronique et l'HI qui en résulte, constituent une composante majeure du SAOS responsable de l'augmentation de toutes les causes de mortalité des patients SAOS par rapport aux patients non apnéiques (Whyte et Gibson 2018; Marshall Nathaniel S. et al., s. d.; Dewan, Nieto, et Somers 2015b).

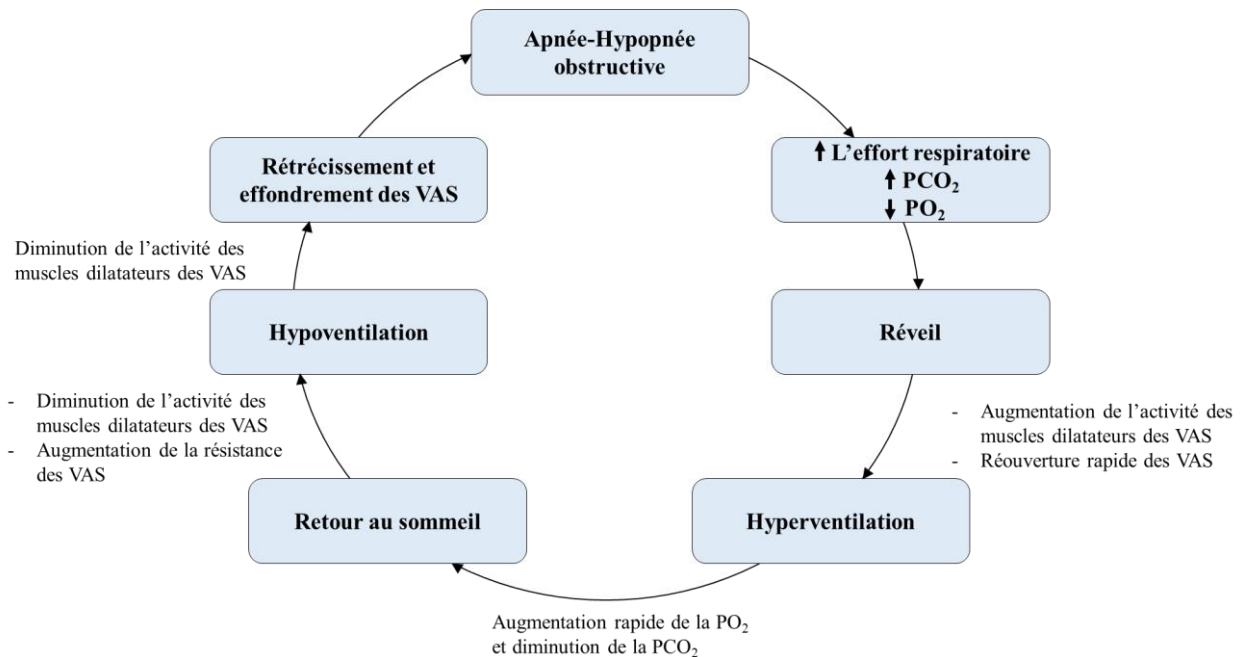


Figure 9: Représentation schématique de la physiopathologie du SAOS.

Les séquences physiopathologiques du SAOS sont représentées en bleu et les processus physiologiques associés qui se produisent tout au long du cycle sont représentés en dehors du cycle. Adapté d'après (Eckert et Malhotra 2008).

II.4 Traitement du SAOS

Le SAOS est une affection courante associée à une mauvaise qualité de vie du patient et consiste un facteur d'aggravation d'autres maladies telles que les pathologies cardiovasculaires (Tietjens Jeremy R. et al. 2019). Son traitement est donc nécessaire. Actuellement, il existe différentes approches thérapeutiques efficaces conçues pour améliorer le sommeil et la qualité de vie du patient. On distingue différents types de traitements : des modifications comportementales, l'utilisation d'appareils médicaux ou encore de la chirurgie. Le choix du traitement du SAOS dépend de l'état de santé général du patient, de la gravité, de la durée et de la cause des symptômes (Jyothi et al. 2019; Gottlieb et Punjabi 2020).

Les mesures comportementales sont des méthodes moins invasives et parfois suffisantes pour traiter le SAOS. Le patient est amené à modifier certaines habitudes quotidiennes telles que la pratique d'exercices physiques (Paul E. Peppard et Young 2004; Iftikhar et al. 2017) , la perte de poids (Hudgel et al. 2018), l'arrêt de la consommation d'alcool (Gottlieb et Punjabi 2020). Ceci inclut également la thérapie positionnelle à l'aide des appareils qui aident les personnes à dormir sur le côté en évitant la position sur le dos (position couchée) (Srijithesh et al. 2019).

Pour les patients avec un SAOS, l'utilisation des dispositifs d'avancement mandibulaire est recommandée notamment pour ceux qui souffrent d'un SAOS modéré à sévère ou ayant des effets indésirables associés au traitement à la pression positive des voies respiratoires (PAP) (Qaseem et al. 2013). La PAP est la principale thérapie utilisée chez les patients souffrant d'un SAOS symptomatique à tous les degrés de sévérité. Le patient à l'aide d'un masque porté sur nez ou sur nez et la bouche, est branché à un appareil qui délivre une pression empêchant ainsi l'effondrement des voies respiratoires lors de l'inspiration pendant le sommeil. L'utilisation de cet appareil permet une amélioration de l'IAH chez 90% des patients (Patil et al. 2019; Gottlieb et Punjabi 2020). Pour certains patients notamment ceux avec des symptômes et une intolérance au traitement à la PAP, des modifications chirurgicales des VAS sont recommandées. Ces interventions consistent à modifier les tissus mous des VAS, tels que le palais, la base de la langue et les parois pharyngées latérales. La trachéotomie a été également appliquée et a montré une efficacité dans le cas du SAOS sévère avant la disponibilité de la PAP. Cependant, cette méthode est invasive et rarement utilisée actuellement (Aurora et al. 2010; Gottlieb et Punjabi 2020).

II.5 Utilisation des traitements du SAOS dans la FPI

La relation entre la FPI et le SAOS est complexe et le lien n'est pas clair. En effet, une association entre le SAOS et la FPI pourrait être expliquée par une instabilité des VAS secondaire à la perte de volume pulmonaire, due au trouble ventilatoire restrictif qui se développe au cours de la FPI (Heinzer et al. 2005; Gille et al. 2017). Néanmoins, à l'inverse, le SAOS pourrait lui-même avoir des effets pro-fibrosants induits par le RGO nocturne (Green, Broughton, et O'Connor 2003; Ganesh Raghu 2003) ou encore par les épisodes répétés d'hypoxie-réoxygénation générant ainsi un stress oxydant au niveau pulmonaire (Pialoux et al. 2009). Ceci suggère que le traitement du SAOS chez les patients FPI pourrait limiter l'impact

délétère de ces événements pathogéniques du SAOS. Des études concernant l'utilisation du traitement du SAOS chez les patients FPI sont rares et son efficacité nécessite plus de preuves. Néanmoins, une étude monocentrique en 2015 a montré que le traitement du SAOS modéré à sévère par ventilation en pression positive continue (PPC ou C-PAP) chez les patients atteints de FPI semble améliorer la qualité de vie des patients et diminuer la mortalité (Mermigkis et al. 2015) sans que les mécanismes impliqués ne soient clairement identifiés.

III Hypoxie intermittente chronique

III.1 Hypoxie intermittente composante majeure du SAOS

Les épisodes récurrents d'hypoxie-réoxygénation nocturnes liés aux apnées obstructives du sommeil constituent un stress d'HI chronique. Elle est considérée comme un événement majeur contribuant à la pathogenèse des comorbidités liées au SAOS. L'HI favorise la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et une inflammation systémique et vasculaire avec un dysfonctionnement endothélial. Ces événements sont principalement les causes de morbidité et de mortalité de plusieurs pathologies cardiovasculaires, des dysfonctionnements métaboliques, des problèmes cognitifs mais également la progression des cancers (Dewan, Nieto, et Somers 2015b).

L'HI est largement utilisée en recherche afin de mimer les effets délétères de l'apnée du sommeil. Différents modèles animaux ont été développés dans le but de comprendre les mécanismes mis en place par l'HI lors du SAOS. Les protocoles expérimentaux d'HI impliquent généralement plusieurs variables : la durée d'exposition qui peut s'étendre sur plusieurs jours voire plusieurs semaines, la fréquence des cycles ainsi que le pourcentage d'O₂ (nadir FiO₂) choisi pour les conditions d'hypoxie (Farré et al. 2018; Almendros, Wang, et Gozal 2014).

Cependant, il faut noter que selon le protocole d'exposition utilisé, les effets de l'HI semblent être controversés d'une étude à l'autre. En effet, l'HI peut avoir des effets bénéfiques et protecteurs ou bien des effets délétères selon la configuration des paramètres cités ci-dessus (Dale, Ben Mabrouk, et Mitchell 2014). Ceci semble également dépendre de la capacité de l'organisme à répondre et à activer les mécanismes adaptatifs à l'HI (Almendros, Wang, et Gozal 2014).

III.2 Les effets moléculaires et cellulaires de l'hypoxie intermittente

Selon son degré et sa sévérité, l'HI peut induire des effets cellulaires et moléculaires qui sont souvent délétères. D'une part, par le biais du stress oxydant (Lavie 2003; Lavie, Vishnevsky, et Lavie 2004; Jordan et al. 2006) et de l'inflammation (Unnikrishnan, Jun, et Polotsky 2015) qu'elle génère. D'autre part, l'HI est une forme d'hypoxie qui stabilise le facteur de transcription HIF-1 α (hypoxia inducible factor), impliqué dans différents mécanismes pathologiques (Moulin et al. 2018; Semenza 2011). D'autres stress semble être induits en réponse à l'HI tels que le stress du réticulum endoplasmique (RE) qui a été rapporté par plusieurs études dans divers organes (Belaidi et al. 2016; L.-H. Xu et al. 2015; Hou et al. 2017; Shi et al. 2020). L'activation de ces différents stress moléculaires conduirait à des événements cellulaires tels que l'apoptose (Redza-Dutordoir et Averill-Bates 2016; Delbrel et al. 2018), la TEM (Delbrel et al. 2019), la sénescence cellulaire (J. He et al. 2019; Davalli et al. 2016; H. S. Kim et al. 2019) et l'autophagie (P. Wang et al. 2017; Akhter et al. 2020; Ornatowski et al. 2020). L'activation de ces facteurs de stress ainsi que les événements cellulaires qu'ils induisent, jouent un rôle important dans divers processus pathologiques tels que la fibrogénèse pulmonaire.

III.2.1 Hypoxie intermittente et le facteur de transcription HIF

L'HI a pour conséquence moléculaire de stabiliser le facteur de transcription HIF-1 (Yuan et al. 2008; Prabhakar, Kumar, et Nanduri 2010; Moulin et al. 2018) impliqué dans la régulation de l'expression de divers gènes cibles en conditions hypoxiques (Semenza 2011). HIF-1 est un hétérodimère composé d'une sous-unité α (HIF-1 α) cytoplasmique, dont l'expression est régulée par l'oxygène, et d'une sous-unité β (HIF-1 β) nucléaire, constitutivement exprimée (Figure 10); (Semenza 2011).

HIF-1 α est constitutivement exprimé par la cellule et immédiatement dégradé dans le protéasome en condition normoxique. Sa dégradation est effectuée après hydroxylation de deux résidus prolines (P402 et P564) par les protéines prolyl-hydroxylases (PHD), qui existe sous trois isoformes PHD1, PHD2 et PHD3 (Watts et Walmsley 2019). Cette hydroxylation permet ainsi l'ubiquitination de HIF-1 α par la protéine de Von Hippel Lindau (pVHL). VHL est une sous-unité d'une ubiquitine ligase E3 qui ajoute une chaîne poly-ubiquitine au facteur HIF-1 α permettant sa dégradation dans le protéasome. En outre, l'hydroxylation dépendante de l'O₂ du résidu asparagine 803 (N803) du HIF-1 α par le facteur inhibiteur de HIF-1 (FIH-1) supprime l'interaction de HIF-1 α avec les coactivateurs p300 et CBP (CREB binding protein).

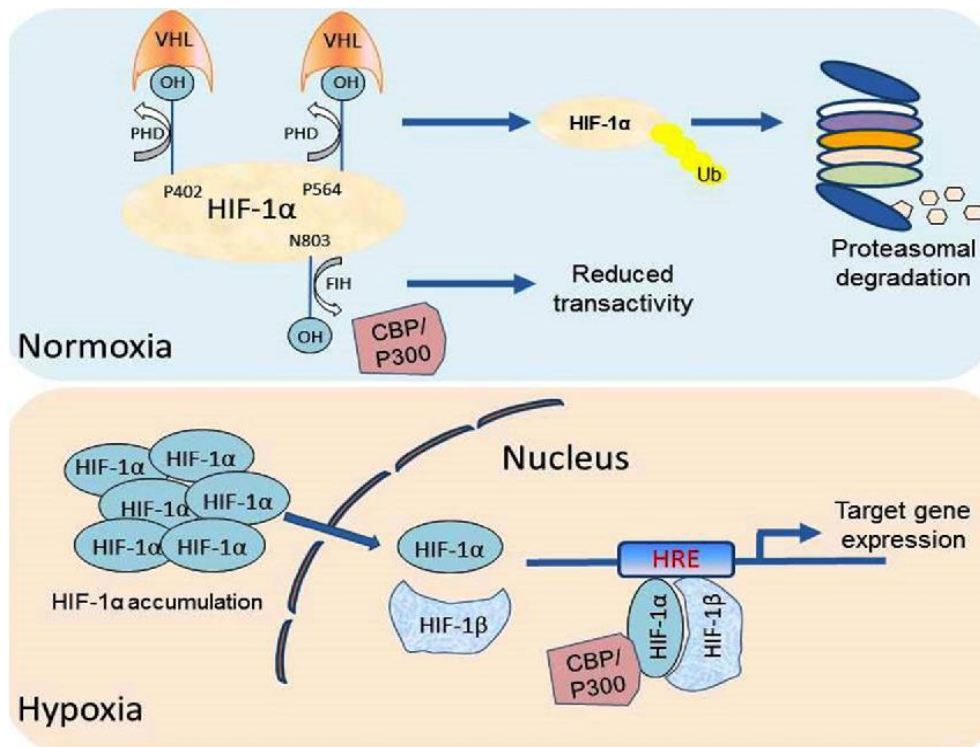


Figure 10: La régulation de HIF-1 α par l'oxygène.

En normoxie, HIF-1 α est hydroxylé par la PHD et FIH et immédiatement dégradé dans le protéasome. En condition d'hypoxie, HIF-1 α est stabilisé, se transloque dans le noyau où il se dimérise avec HIF-1 β et ses coactivateurs pour induire la transcription des gènes cibles. (Z. Liu, Semenza, et Zhang 2015).

En condition hypoxique, la PHD dont le fonctionnement dépend de la concentration en O₂ est inhibée. Le facteur HIF-1 α est donc stabilisé et accumulé, se transloque dans le noyau de la cellule où il se dimérise avec HIF-1 β et ses coactivateurs. Le complexe formé induit l'expression de gènes spécifiques via une séquence consensus située dans leur région promotrice appelée « hypoxia response élément » (HRE). Parmi les gènes cibles on trouve l'Epo, le VEGF (Z. Liu, Semenza, et Zhang 2015; Semenza 2011). La réponse hypoxique peut être également médiée par le facteur de transcription HIF-2 qui est un hétérodimère composé de HIF-1 β et HIF-2 α régulé également par l'oxygène (un paralogue de HIF-1 α). Le complexe HIF-2 α /HIF-1 β peut également activer la transcription génique sur la séquence HRE. Cependant, des études suggèrent que les complexes HIF-1 α /HIF-1 β et HIF-2 α /HIF-1 β peuvent avoir des cibles transcriptionnelles distinctes, lié à leur domaine de transactivation qui est différents (Ratcliffe 2007; Hu et al. 2003).

Il a été montré que l'HI pourrait stabiliser le facteur HIF-1 α (Yuan et al. 2008) contrairement au facteur HIF-2 α qui est diminué (Nanduri et al. 2009; Prabhakar, Kumar, et Nanduri 2009). De plus, HIF-1 α après sa stabilisation et son activation, serait impliqué dans divers mécanismes qui sont souvent délétères. Parmi ces effets, on trouve l'induction de

l'inflammation (Peyssonnaud et al. 2007) et du stress oxydant (Prabhakar, Kumar, et Nanduri 2009). De plus, l'implication de HIF-1 α dans l'induction du stress du RE a été également montrée (Delbrel et al. 2018).

III.2.2 Hypoxie intermittente et le stress oxydant

Le stress oxydant est l'un des facteurs majeurs impliqués dans les effets délétères de l'HI dans différents contextes pathologiques.

III.2.2.1 Le stress oxydant : définition et rôle

Le stress oxydant est défini par un déséquilibre entre la production des ROS et la défense antioxydante (Redza-Dutordoir et Averill-Bates 2016). Dans le métabolisme aérobie cellulaire, plus de 90% de molécules d'O₂ sont consommées et réduites directement en H₂O dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie pendant la respiration cellulaire. Cependant, environ 2% à 3% sont convertis en molécules et radicaux libres dérivés de l'O₂ appelés ROS (Otoupalova et al. 2020). La génération des ROS tels que $\bullet\text{O}_2^-$, HO \bullet , H₂O₂, peut avoir une origine exogène (comme le tabagisme, la pollution de l'air) ou endogène comme les mitochondries, les catécholamines, les NADPH oxydases (NOX) (Figure 11).

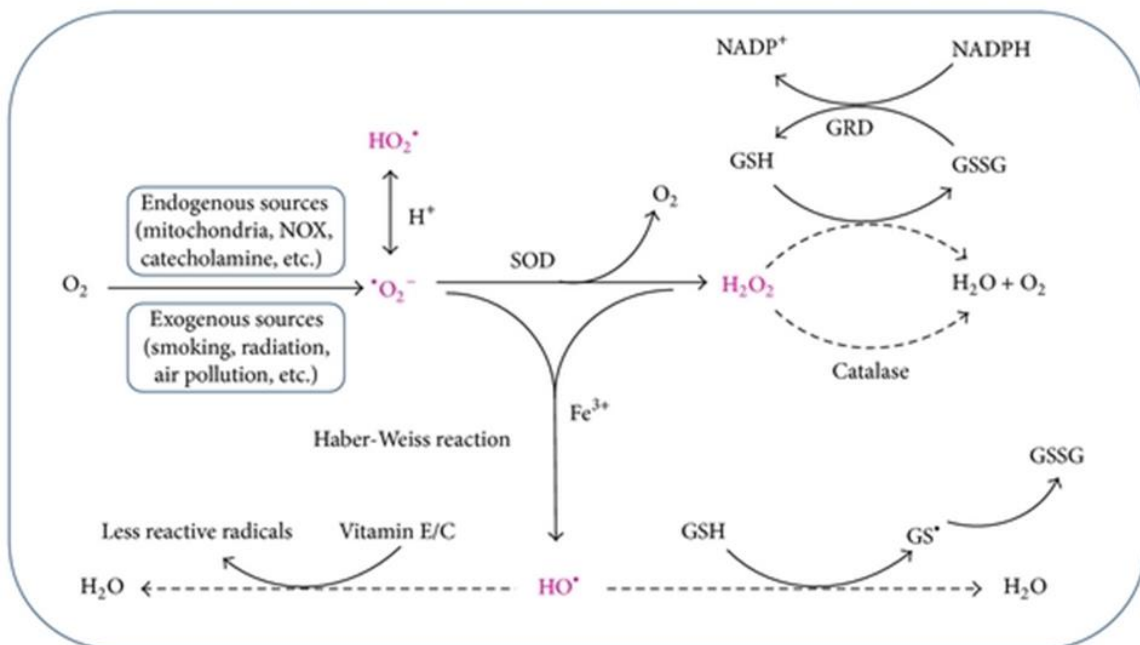


Figure 11: Schéma représentatif des principales voies de génération et d'élimination des ROS.
D'après (Z.-Z. Xie, Liu, et Bian 2016).

La réaction de Haber-Weiss en présence de fers ferriques entre l' $\bullet\text{O}_2^-$ et l' H_2O_2 , génère le radical $\text{HO}\bullet$. L'excès du radical $\bullet\text{O}_2$ est éliminé par la SOD (superoxyde dismutase) en catalysant sa dismutation en H_2O_2 et O_2 . L' H_2O_2 peut être éliminé et transformé en H_2O par les enzymes antioxydantes catalase et GPx (glutathione peroxidase). Cette dernière nécessite la GSH (glutathione) comme co-substrat qui est oxydé en GSSG (glutathione disulfide). Celui-ci peut à nouveau être réduit en GSH par la GR (glutathione reductase) utilisant la NADPH (nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate). La GSH peut aussi interagir avec le radical libre d'oxygène pour former le GS \bullet (radical thiyle) et puis GSSG tardivement. Les vitamines E et C agissent comme anti-oxydants, peuvent réagir avec les radicaux libres d'oxygène et former des radicaux moins réactifs (Figure 11) ; (Z.-Z. Xie, Liu, et Bian 2016).

Les ROS, en faibles quantités, exercent des rôles essentiels pour le fonctionnement de l'organisme. En effet, ils participent à la défense immunitaire, à la signalisation cellulaire et au maintien de la balance oxydant/anti-oxydant (Figure 12); (Covarrubias et al. 2008; Otoupalova et al. 2020; Redza-Dutordoir et Averill-Bates 2016).

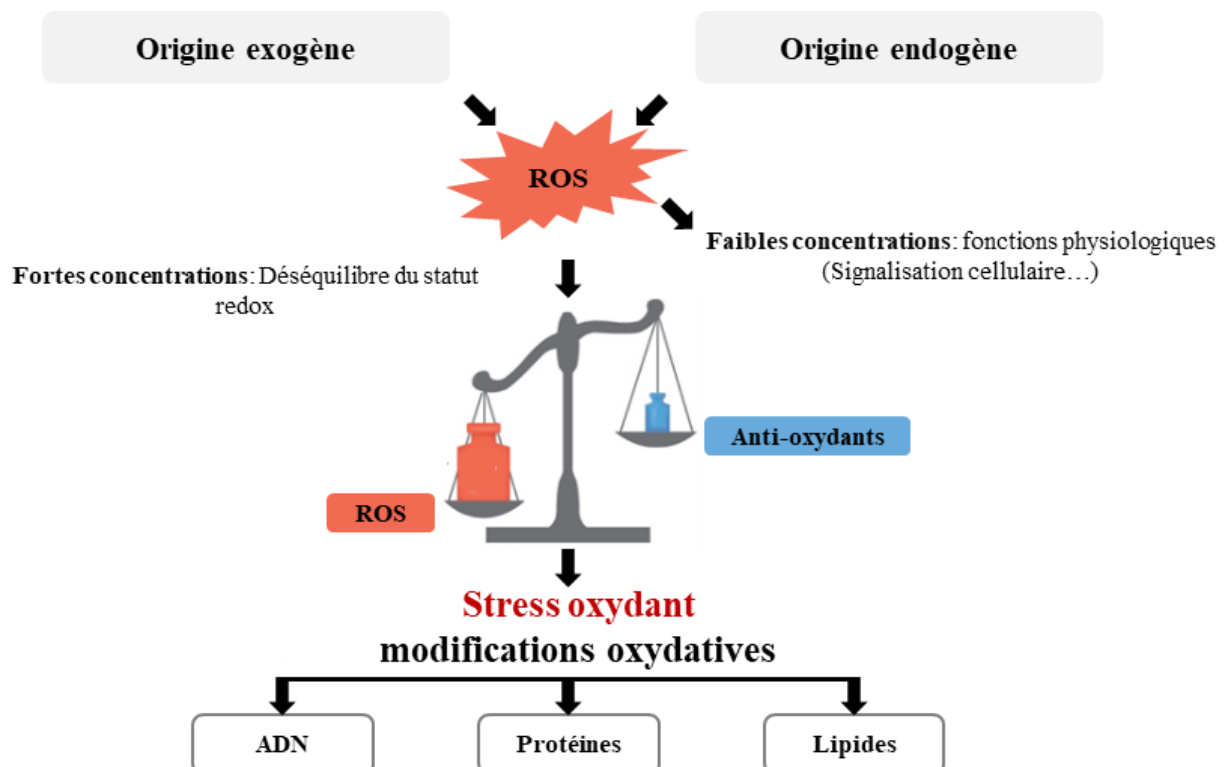


Figure 12: Schéma représentatif du rôle physiologique et physiopathologique des ROS et du stress oxydant.

Adapté d'après (Münzel et al. 2017; Redza-Dutordoir et Averill-Bates 2016)

Cependant, une production excessive des ROS ainsi qu'une défaillance de la capacité protectrice antioxydante conduisent à un déséquilibre du statut « redox » et à un stress oxydatif induisant des dommages aux constituants cellulaires (protéines, lipides, ADN) (Figure 12) (Münzel et al. 2017; Redza-Dutordoir et Averill-Bates 2016). Le stress oxydant, conséquence directe de l'HI associée au SAOS (Lavie 2015) est par ailleurs considéré comme l'un des événements moléculaires importants de la pathogenèse du SAOS (Lavie 2003).

III.2.2.2 Induction du stress oxydant par l'hypoxie intermittente

Le stress oxydant est considéré comme l'un des mécanismes les plus délétères associés à la comorbidité du SAOS (Lavie 2003). En effet, l'HI associée aux cycles récurrents d'hypoxie-réoxygénation serait le principal facteur conduisant à l'induction du stress oxydant chez les patients présentant un SAOS en favorisant la production de ROS (Lavie 2015).

Par ailleurs, en condition d'exposition à l'HI, les ROS induisent la stabilisation de HIF-1 α (Jung et al. 2008; Yuan et al. 2008), qui à son tour pourrait favoriser une augmentation persistante des ROS (Prabhakar, Kumar, et Nanduri 2009), générant une boucle d'auto-régulation.

Chez les patients présentant un SAOS, des analyses au niveau sérique ont montré que les neutrophiles et les monocytes circulants présentaient une libération *in vitro* de ROS de manière importante (Schulz et al. 2000; Dyugovskaya, Lavie, et Lavie 2002). De plus, des études ont également montré une augmentation de la peroxydation lipidique (Barceló et al. 2000; Hopps et al. 2014) et l'oxydation de protéines (AOPP; advanced oxidation protein products) au niveau plasmatique chez les patients SAOS (Ozben et al. 2014; Hopps et al. 2014). Des dommages au niveau de l'ADN ont été également observés dans les lymphocytes de ces patients (J. Xie et al. 2014) avec une augmentation de l'excrétion urinaire du 8-OHdG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) dans le cas d'un SAOS sévère (Yamauchi et al. 2005). Ceci a été aussi associé une diminution de la défense antioxydante chez ces patients par rapport aux individus ne présentant pas de SAOS (Barceló et al. 2006; Wysocka et al. 2008).

Les effets de l'HI dans l'induction du stress oxydant et son implication dans différents mécanismes pathologiques ont été rapportés en utilisant des modèles animaux. Au niveau pulmonaire, une exposition à l'HI (4 semaines) induisait des lésions pulmonaires suite à une augmentation du stress oxydant et de l'inflammation chez la souris (Tuleta et al. 2016). De la même manière, une augmentation de l'apoptose des cellules pulmonaires, un stress du RE et une génération de ROS ont été rapportés chez des rats exposés pendant 12 semaines à des cycles d'HI (Ding et al. 2020). Des effets similaires de l'HI ont été observés dans d'autres tissus tels

que le cœur (L. Chen et al. 2005) et le cerveau (Row et al. 2003). Les ROS générés semblent être la cause principale de leur dysfonctionnement.

III.2.3 Hypoxie intermittente et le stress du réticulum endoplasmique

Parmi les événements moléculaires induits en réponse à l'HI, on trouve également le stress du RE. En effet, plusieurs études ont montré qu'une exposition à l'HI est capable d'induire les marqueurs de stress du RE dans différents tissus et que ce stress était lié à différents processus pathologiques en fonction des tissus (Belaidi et al. 2016; Shi et al. 2020; L.-H. Xu et al. 2015; Hou et al. 2017).

III.2.3.1 Le réticulum endoplasmique : définition et rôle

Le RE est un organite cellulaire visualisé pour la première fois grâce à la microscopie électronique sur des fibroblastes de poulet (Chicken Fibroblast-Like Cells) (Porter, Claude, et Fullam 1945; G. E. Palade et Porter 1954). Le RE occupe une grande partie du cytoplasme cellulaire et constitue un réseau très large de tubules allongés et de disques aplatis (G. E. Palade et Porter 1954). On distingue 2 types de RE selon leur structure et leur fonction: le RE rugueux (RER) ou granuleux (REG) qui est recouvert de ribosomes et qui joue un rôle dans la synthèse de protéines et le RE lisse (REL) qui n'est pas associé aux ribosomes et est impliqué plutôt dans le métabolisme lipidique (Cooper 2000).

La structure du RE est dynamique et assure plusieurs rôles importants au fonctionnement de la cellule. En effet, il intervient dans le maintien de l'homéostasie du calcium (Ca^{2+}) (Berridge 2002), dans la synthèse et le stockage des lipides (Cooper 2000) mais joue également un rôle très important dans la synthèse, le repliement, la maturation et les modifications post-traductionnelles des protéines sécrétées et transmembranaires (Caro et Palade 1964; G. Palade 1975; Cooper 2000; Schwarz et Blower 2016). La perte de l'homéostasie du RE à cause de divers facteurs conduit à un stress du RE.

III.2.3.2 Le stress du réticulum endoplasmique : la réponse UPR

Plusieurs facteurs extrinsèques et intrinsèques peuvent induire une perturbation des fonctions du RE et une perte de son homéostasie. Ce déséquilibre dans ces fonctions va conduire à une accumulation des protéines mal-repliées au niveau de la lumière du RE ; cette condition est appelée « stress du RE ». Les protéines mal repliées accumulées sont toxiques pour la

cellule. Une réponse adaptative appelée la réponse UPR (Unfolded Protein Response) est donc mise en place par la cellule pour se protéger des effets délétères du stress du RE (Schröder et Kaufman 2005; Szegezdi et al. 2006). La réponse UPR est initiée par l'activation de trois effecteurs transmembranaires au niveau de la lumière du RE: PERK (pancreatic ER kinase (PKR)-like ER kinase), ATF6 (activating transcription factor 6) et IRE-1 (inositol-requiring enzyme 1) (Figure 13).

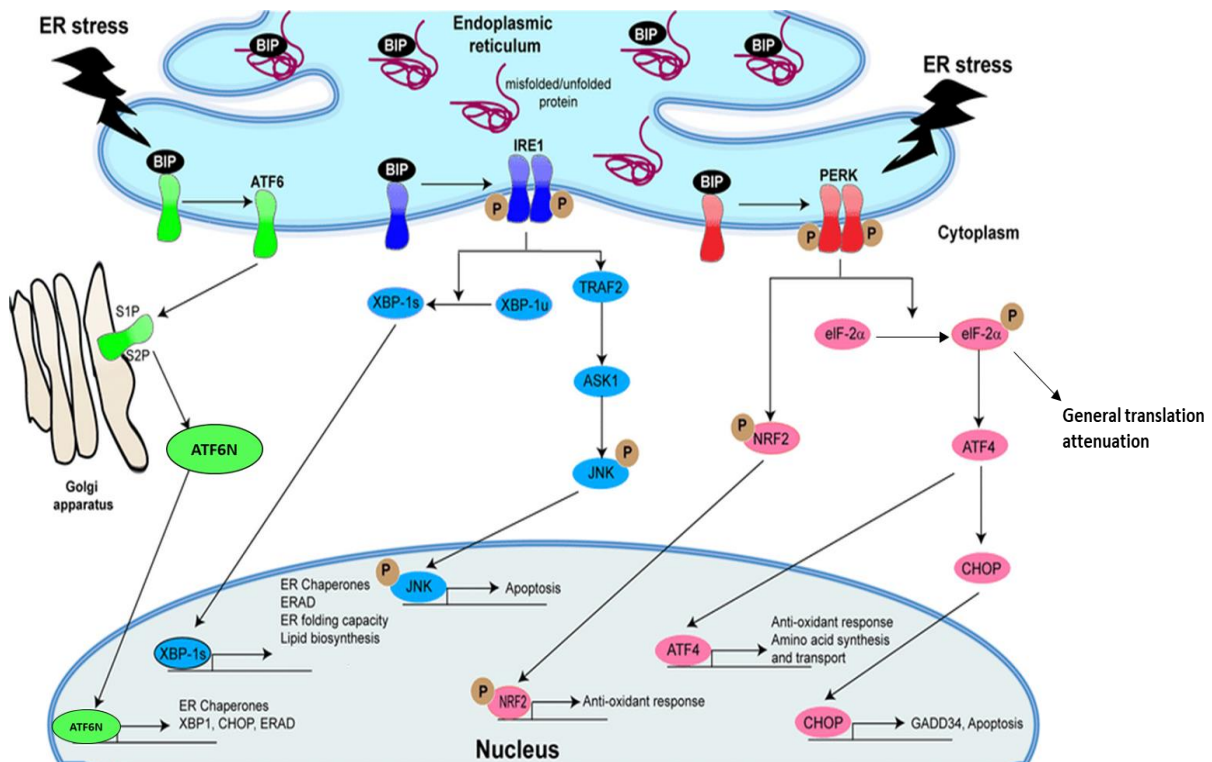


Figure 13: Représentation schématique de l'activation des voies UPR.

Adaptée d'après (Ribeiro et Lubamba 2017)

En condition physiologique, ces récepteurs sont maintenus dans un état inactif, liés à la protéine chaperonne GRP78/Bip (Glucose-regulated protein 78). Lors d'un stress du RE, la protéine GRP78 se dissocie de ces trois effecteurs et se lie ainsi aux protéines mal repliées. Ceci induit l'activation de ces trois effecteurs conduisant à l'induction de différentes voies de signalisation qui ont pour but de soulager le RE d'une part par l'arrêt de la traduction de nouvelles protéines et d'autre part par la dégradation des protéines mal-repliées. Ceci permet la restauration du fonctionnement physiologique du RE (Figure13). Bien que cette réponse soit activée pour favoriser la survie cellulaire, si le stress du RE reste persistant et prolongé, elle peut se transformer en une réponse délétère pour la cellule, conduisant à l'apoptose des cellules (Schröder et Kaufman 2005; Szegezdi et al. 2006).

a) La voie de signalisation PERK

Après sa dissociation de GRP78/Bip, la protéine kinase PERK se dimérise et s'auto-phosphoryle conduisant à son activation (Figure13). L'activation de cette voie de signalisation a pour fonction d'inhiber la synthèse de nouvelles protéines par la cellule. En effet, PERK activé va phosphoryler le facteur eIF2 α (eukaryotic initiation) qui, d'une part va bloquer la traduction de nouvelles protéines (Prostko, Brostrom, et Brostrom 1993; Brostrom et Brostrom 1997; Heather P. Harding, Zhang, et Ron 1999), et d'autre part activer le facteur de transcription ATF4 (Activating transcription factor 4) (H. P. Harding et al. 2000). ATF4 va être transloqué dans le noyau et induire la transcription des gènes cibles *via* son élément de réponse AARE (Amino Acid Responsive Element). ATF4 stimule la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés, et la réponse antioxydante favorisant la survie cellulaire, mais peut également favoriser l'apoptose cellulaire notamment *via* l'induction du facteur de transcription pro-apoptotique CHOP (C/EBP Homologous Protein) si l'homéostasie du RE n'est pas retrouvée (H. P. Harding et al. 2000; Schröder et Kaufman 2005; Szegezdi et al. 2006; Hasnain, Prins, et McGuckin 2016).

PERK activé peut également induire la phosphorylation du facteur de transcription Nrf2 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2). Dans les conditions normales, Nrf2 se trouve à l'état inactif dans le cytoplasme lié à l'ancre cytosquelettique Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1). Dans le cas de stress du RE, Nrf2 est phosphorylé par PERK entraînant sa dissociation de Keap1 et son activation. Nrf2 activé se transloque dans le noyau et induit la transcription de gènes à travers l'élément de réponse ARE (Antioxidant Responsive Element) (Nguyen, Sherratt, et Pickett 2003). Les gènes cibles de ce facteur codent notamment les gènes impliqués dans la réponse antioxydante tels que l'hème oxygénase 1 (HO-1), les sous-unités A1 et A2 de la glutathion S-transférase (Nguyen, Sherratt, et Pickett 2003; Schröder et Kaufman 2005) ou encore ATF4 (Miyamoto et al. 2011).

b) La voie de signalisation ATF6

ATF6 inactif est une glycoprotéine transmembranaire de type II (90 kDa) constituée d'un motif bZIP (basic leucine zipper) du côté N-terminal cytosolique (Haze et al. 1999). Dans les conditions de stress du RE, ATF6 se déplace vers l'appareil de Golgi (X. Chen, Shen, et Prywes 2002) ou il subit une protéolyse par une sérine protéase (S1P ; Site-1 protease) (Figure

13). Celle-ci clive ATF6 dans le domaine luminal et puis par la métalloprotéase (S2P) dans la bicouche phospholipidique. Ce clivage permet la libération d'ATF6 clivé (ATF6N) qui correspond au domaine cytoplasmique d'ATF6 (le domaine bZIP, 50kDa). La forme clivée (ATF6N) correspond à la forme active d'ATF6 jouant un rôle de facteur de transcription (Haze et al. 1999; Ye et al. 2000; Schröder et Kaufman 2005). ATF6N se transloque dans le noyau et agit sur les éléments de réponse au stress du RE (ERSE-I et -II) en collaboration avec le facteur NF-Y (Schröder et Kaufman 2005). Les cibles d'ATF6N comprennent les protéines chaperonnes (GRP78, GRP94), CHOP (Okada et al. 2002; Szegezdi et al. 2006; Hasnain, Prins, et McGuckin 2016), les protéines contribuant à la dégradation associée au RE appelées aussi le complexe de dégradation ERAD (endoplasmic-reticulum-associated protein degradation) (Hasnain, Prins, et McGuckin 2016; T. Zhang et al. 2020), et XBP1 (X-box binding protein 1) qui joue un rôle essentiel dans la signalisation IRE-1 (H. Yoshida et al. 2001). L'activation de cette voie permet le contrôle du repliement et la qualité des protéines ainsi que la clairance des protéines mal repliées *via* leur dégradation. ATF6N stimule également les gènes impliqués dans la biosynthèse des lipides (Ribeiro et Lubamba 2017). Les effets d'ATF6 sont plutôt « pro-survie », il peut cependant également induire les ARNm du facteur pro-apoptotique CHOP (Okada et al. 2002; Szegezdi et al. 2006).

c) La voie de signalisation IRE-1

IRE-1 est une sérine-thréonine kinase et endo-ribonucléase située sur la membrane du RE. Dans les conditions de stress du RE, après détachement de GRP78, IRE-1 est activé par dimérisation et autophosphorylation (Figure 13). IRE-1 activé induit un épissage non conventionnel de l'ARNm du facteur de transcription XBP1 par clivage au niveau d'un intron (de 26 nucléotides) de la région codante pour ce facteur (Calfon et al. 2002). Ceci conduit à un décalage du cadre de lecture codant de l'ARNm résultant de l'expression d'un facteur de transcription actif et plus stable (sXBP1; spliced XBP1) (Calfon et al. 2002; H. Yoshida et al. 2001; Ni et al. 2018) ; Le facteur sXBP1 se transloque dans le noyau et induit la transcription de gènes cibles en se fixant sur l'élément de réponse ERSE en présence du facteur NF-Y (Ni et al. 2018; Schröder et Kaufman 2005). Comme la voie ATF6, les cibles transcriptionnelles de ce facteur sont les protéines chaperonnes (A.-H. Lee, Iwakoshi, et Glimcher 2003) ainsi que le complexe de dégradation (ERAD) dans le but de désengorger le RE (Hiderou Yoshida et al. 2003). Dans le cas où le stress ne serait pas résolu, IRE1 peut induire l'apoptose en activant la voie de signalisation de la kinase JNK (c-Jun N-terminal kinase) (T. Zhang et al. 2020).

III.2.3.3 Induction du stress du RE par l'hypoxie intermittente

Parmi les effets moléculaires de l'exposition à l'HI, l'induction des marqueurs de stress du RE décrits dans les voies UPR (tels que GRP78, sXBP1, ATF6...etc) a été rapportée dans plusieurs études sur divers organes en utilisant des modèles animaux exposés à l'HI. Ces effets sont souvent associés à des conséquences délétères au niveau des tissus et sont observables à des temps d'exposition plus au moins longs selon le type du tissu et le protocole d'hypoxie utilisé (Belaidi et al. 2016; L.-H. Xu et al. 2015; Hou et al. 2017; Shi et al. 2020). Au niveau cardiaque, dans un modèle murin de lésion d'ischémie-reperfusion, l'exposition à l'HI (pendant 14 jours, 60 cycles/h, nadir 5% O₂) a induit l'expression des marqueurs de stress du RE (GRP78, eIF2 α phosphorylé et sXBP1) dans les cardiomyocytes accompagnée par une augmentation importante de la taille de l'infarctus induit après ischémie-reperfusion (Belaidi et al. 2016). Des résultats similaires ont été retrouvés au niveau cérébral avec une augmentation de GRP78, CHOP et de la caspase 12 dans les neurones CA1 de l'hippocampe après 14 jours d'exposition à l'HI (40 cycles/h, nadir 10% O₂). Cette étude a montré une implication du stress du RE dans les mécanismes sous-jacents des déficits de la mémoire (L.-H. Xu et al. 2015). Au niveau hépatique, 8 semaines d'exposition à l'HI (30 cycles/h, nadir 7% O₂) ont induit une augmentation de l'expression des protéines GRP78, PERK, ATF6 clivé, IRE-1 phosphorylé, CHOP, eIF2 α et caspase 12. Cet effet était accompagné de lésions hépatiques avec des hépatocytes gonflés et la présence d'infiltrats de cellules inflammatoires (Hou et al. 2017). De plus, l'utilisation d'un inhibiteur de stress du RE (TUDCA; Tauroursodeoxycholic acid) permettait de limiter les lésions tissulaires (Belaidi et al. 2016; Hou et al. 2017; L.-H. Xu et al. 2015).

De manière intéressante, une étude récemment publiée chez le rat exposé à l'HI (30 cycles/h, nadir 4-5% O₂) pendant 12 semaines a montré au niveau pulmonaire une augmentation des marqueurs de stress du RE (CHOP, GRP78, caspase12 clivée...etc) accompagnée par une induction de ROS et de l'apoptose des cellules pulmonaires (Ding et al. 2020). De la même manière l'induction de stress du RE a été également rapportée dans les poumons de souris exposées à une HI chronique (40 cycles/h, nadir 5% O₂) (Shi et al. 2020). Après quatre semaines d'exposition à l'HI, les auteurs rapportent une augmentation des dépôts de collagène et une apoptose cellulaire qui sembleraient être la résultante de l'activation du stress du RE et plus particulièrement de l'induction de GRP78, CHOP et PERK. De manière intéressante, cette étude a montré que le traitement des animaux par un inhibiteur du stress du RE (TUDCA)

limitait les effets de l'HI sur l'apoptose et la fibrose dans le poumon (Shi et al. 2020). L'ensemble de ces différentes études laisse suggérer que le stress du RE pourrait être un élément central des évènements cellulaires induits en réponse à l'HI.

III.2.4 Conséquences cellulaires de l'HI– lien avec la fibrogénèse.

Au niveau moléculaire, les conséquences délétères de l'exposition à l'HI pourraient être impliquées dans le processus de fibrogénèse. En effet, l'induction du facteur HIF par l'HI entraînerait entre autres l'induction d'un stress oxydant, d'un stress du RE et de l'inflammation, trois évènements communs à l'induction d'une TEM ou d'une apoptose, décrits comme éléments pathogéniques majeurs dans la fibrogénèse (Figure 14).

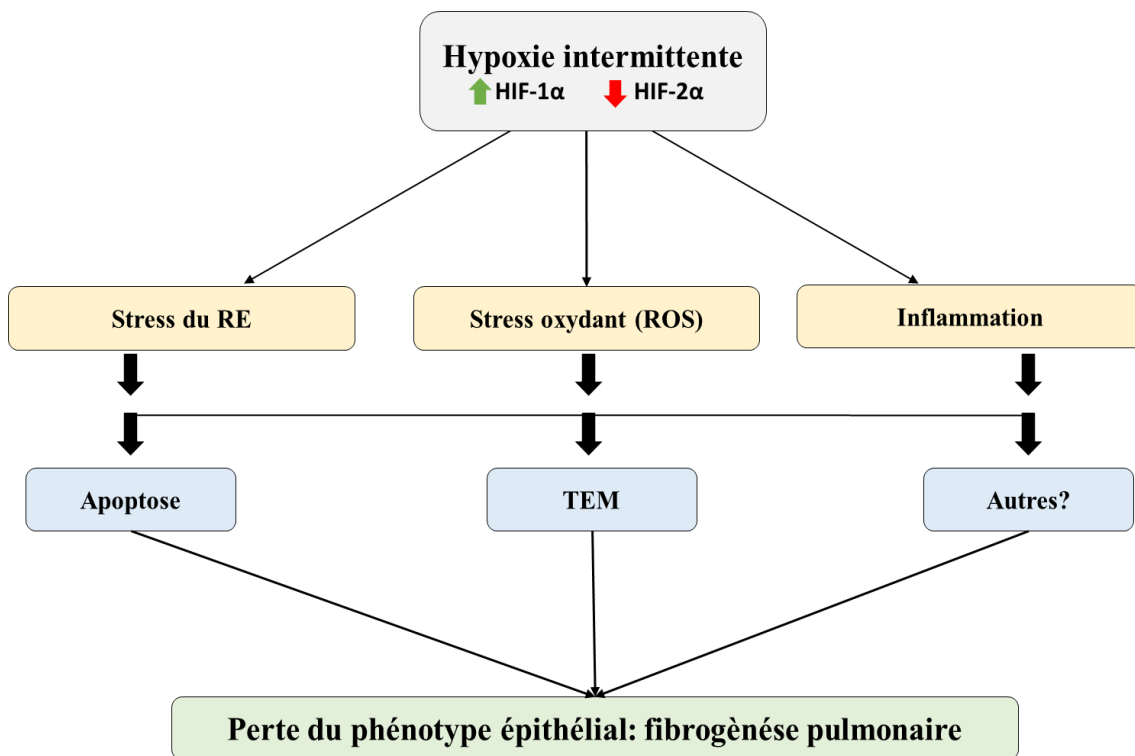


Figure 14: Résumé schématique des effets délétères de l'HI au niveau moléculaire et cellulaire et leur potentielle implication dans le processus de fibrogénèse.

Un rôle important de l'hypoxie dans la pathogénèse de la FPI est actuellement bien admis. En effet, l'expression de HIF-1α a été rapportée dans les CEA de patients FPI (Tzouveleakis et al. 2007), et son implication dans l'induction de la TEM et de l'apoptose a été mise en évidence au laboratoire (Uzunhan et al. 2015; Bernard et al. 2018). De manière intéressante, l'induction d'un stress du RE semble être commune aux deux évènements cellulaires (Delbrel et al. 2018; 2019).

De plus, l'exposition à l'HI peut induire l'apoptose des neurones via l'induction d'un stress oxydant majeur (W. Xu et al. 2004), et l'apoptose des cellules pulmonaires *via* l'induction d'un stress du RE (Shi et al. 2020).

Enfin, l'HI peut contribuer à la TEM en induisant une augmentation des marqueurs mésenchymateux et une diminution des marqueurs épithéliaux dans les cellules du médulloblastome (Gupta et al. 2011). Au laboratoire nous avons montré que l'hypoxie chronique *via* l'induction d'un stress du RE et des ROS induisait également la TEM (Uzunhan et al. 2015; Delbrel et al. 2019).

HYPOTHESE ET OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE

Le SAOS est un facteur de risque indépendant de nombreuses pathologies cardiovasculaires et métaboliques et des études, dont une du laboratoire (Gille et al. 2017), ont montré une forte prévalence du SAOS chez les patients atteints de FPI (Lancaster et al. 2009; Gille et al. 2017). Cependant, au début de mon doctorat, le lien entre SAOS et la FPI était peu décrit. Le SAOS est caractérisé par des épisodes d'hypoxie-réoxygénation nocturnes. Ces épisodes répétés et cycliques sont délétères du fait du stress cellulaire qu'ils engendrent suite à l'induction d'une réponse inflammatoire, un déséquilibre de la réponse au stress oxydant et/ou à un déséquilibre de l'homéostasie du RE.

Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse que l'hypoxie intermittente liée aux épisodes d'hypoxie-réoxygénation du SAOS pourrait être un facteur aggravant de la fibrose pulmonaire.

Nous avons proposé de tester expérimentalement cette hypothèse physiopathologique dans un modèle murin de fibrose pulmonaire exposé à l'HI chronique. Dans ce contexte, les objectifs étaient :

- I) D'étudier l'effet d'une telle exposition sur la sévérité de la fibrose pulmonaire expérimentale;**
- II) De déterminer les mécanismes moléculaires impliqués.**

RESULTATS

Comme indiqué en amont dans l'introduction, un SAOS modéré à sévère a été observé avec une forte prévalence chez les patients présentant une FPI incidente (Lancaster et al. 2009; Gille et al. 2017). Néanmoins, des études ayant pour but de comprendre la relation entre ces deux pathologies sont rares et ce lien reste ainsi mal connu. Dans le but de comprendre cette association, nous avons réalisé une première étude *in vivo* (chapitre 1) démontrant que l'exposition à l'HI entraînait une augmentation de la mortalité, associée à une fibrose pulmonaire plus sévère. Une augmentation du stress oxydant, de l'inflammation et de l'apoptose a également été observée. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans cette exacerbation de la fibrose par l'HI n'ont pas été caractérisés.

Plusieurs travaux de recherche ont montré l'induction d'un stress du RE par l'HI dans le cœur (Belaidi et al. 2016), le cerveau (L.-H. Xu et al. 2015), le foie (Hou et al. 2017), mais également dans le poumon (Shi et al. 2020). D'autre part, les marqueurs de stress du RE ont été retrouvés dans les CEA de patients atteints de FPI (Korfei et al. 2008). De plus, plusieurs études suggèrent un rôle clé de ce stress dans les processus de fibrogénèse (Delbrel et al. 2018; 2019; Kropski et Blackwell 2018; Burman, Tanjore, et Blackwell 2018). Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse que l'aggravation observée dans la première étude pourrait être due au moins en partie à l'induction d'un stress du RE. Dans cette seconde étude (chapitre 2) nous avons montré que l'exposition à l'HI augmentait l'expression des marqueurs du stress du RE et des facteurs pro-fibrosants.

Les résultats de ces études seront présentés en deux grands chapitres:

Chapitre I: Impact de l'exposition à l'HI sur la sévérité de la fibrose pulmonaire

Chapitre II: Mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet aggravant de l'HI sur la sévérité de la fibrose pulmonaire

Chapitre I

I Impact de l'exposition à l'HI sur la sévérité de la fibrose pulmonaire

Intermittent Hypoxia Increases the Severity of Bleomycin-Induced Lung Injury in Mice.

Thomas Gille, Morgane Didier, Cécile Rotenberg, Eva Delbrel, Dominique Marchant, Angela Sutton, Nicolas Dard, Liasmine Haine, Nicolas Voituron, Jean-François Bernaudin, Dominique Valeyre, Hilario Nunes, Valérie Besnard, Emilie Boncoeur and Carole Planès. *Oxid Med Cell Longev*. 2018; 2018: 1240192. Published online 2018 Mar 14. doi:10.1155/2018/1240192

I.1 Résumé de l'article 1

Contexte : Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) caractérisé par une hypoxie intermittente, est fréquemment observé chez les patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique (FPI). L'objectif de cette étude était d'évaluer l'impact de l'HI sur la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (BLM) chez la souris.

Méthodes : Des souris C57BL/6J ont reçu une instillation intra-trachéale de BLM ou de solution physiologique (saline) puis ont été exposées à l'HI (40 cycles / heure; nadir: 6% O₂; 8 heures / jour) ou à de l'air intermittent (AI). Quatre groupes expérimentaux ont été formés :

Saline-AI: groupe instillé à la solution physiologique et exposé à l'AI ;

Saline-HI: groupe instillé à la solution physiologique et exposé à l'HI ;

BLM-AI: groupe instillé à la BLM et exposé à l'AI ;

BLM-HI: groupe instillé à la BLM et exposé à l'HI.

Dans ces groupes nous avons évalué (i) la survie; (ii) l'inflammation alvéolaire, l'œdème pulmonaire, le stress oxydatif pulmonaire et les enzymes antioxydantes; (iii) l'apoptose des cellules pulmonaires; et (iv) la fibrose pulmonaire.

Résultats : La survie à 21 jours était plus faible dans le groupe BLM-HI. La fibrose pulmonaire était plus sévère à 21 jours chez les souris BLM-HI, comme indiqué par la teneur en collagène pulmonaire et l'histologie. Au jour 4, les souris BLM-HI ont développé une alvéolite à polynucléaires neutrophiles plus sévère. Un stress oxydatif pulmonaire a été observé et l'expression de la superoxyde dismutase et de la glutathion peroxydase a été diminuée chez les

souris BLM-HI par rapport au groupe BLM-AI. Au jour 8, un œdème pulmonaire a été observé et l'apoptose des cellules pulmonaires a été augmentée dans le groupe BLM-HI.

Conclusion : Ces résultats montrent que l'exposition à l'HI chronique augmente la mortalité, l'inflammation pulmonaire et la fibrose pulmonaire chez les souris traitées par la BLM. Cette étude pose la question de l'impact du SAOS sévère sur l'aggravation de la fibrose pulmonaire.

Research Article

Intermittent Hypoxia Increases the Severity of Bleomycin-Induced Lung Injury in Mice

Thomas Gille,^{1,2} Morgane Didier,^{1,2} Cécile Rotenberg,^{1,2} Eva Delbrel,¹
Dominique Marchant,¹ Angela Sutton,³ Nicolas Dard,¹ Liasmine Haine,¹ Nicolas Voituron,¹
Jean-François Bernaudin,^{1,2,4} Dominique Valeyre,^{1,2} Hilario Nunes,^{1,2} Valérie Besnard,¹
Emilie Boncoeur,¹ and Carole Planès^{1,2}

¹Laboratoire Hypoxie & Poumon (EA 2363), Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, 93017 Bobigny, France

²Hôpital Avicenne (AP-HP), 93009 Bobigny, France

³AP-HP, Hôpital Jean Verdier, 93140 Bondy, France

⁴UPMC, Sorbonne Université, 75013 Paris, France

Correspondence should be addressed to Carole Planès; carole.planes@aphp.fr

Received 26 July 2017; Revised 3 January 2018; Accepted 10 January 2018; Published 14 March 2018

Academic Editor: Jean-Louis Pepin

Copyright © 2018 Thomas Gille et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. Severe obstructive sleep apnea (OSA) with chronic intermittent hypoxia (IH) is common in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). Here, we evaluated the impact of IH on bleomycin- (BLM-) induced pulmonary fibrosis in mice. **Methods.** C57BL/6J mice received intratracheal BLM or saline and were exposed to IH (40 cycles/hour; FiO₂ nadir: 6%; 8 hours/day) or intermittent air (IA). In the four experimental groups, we evaluated (i) survival; (ii) alveolar inflammation, pulmonary edema, lung oxidative stress, and antioxidant enzymes; (iii) lung cell apoptosis; and (iv) pulmonary fibrosis. **Results.** Survival at day 21 was lower in the BLM-IH group ($p < 0.05$). Pulmonary fibrosis was more severe at day 21 in BLM-IH mice, as assessed by lung collagen content ($p = 0.02$) and histology. At day 4, BLM-IH mice developed a more severe neutrophilic alveolitis, ($p < 0.001$). Lung oxidative stress was observed, and superoxide dismutase and glutathione peroxidase expression was decreased in BLM-IH mice ($p < 0.05$ versus BLM-IA group). At day 8, pulmonary edema was observed and lung cell apoptosis was increased in the BLM-IH group. **Conclusion.** These results show that exposure to chronic IH increases mortality, lung inflammation, and lung fibrosis in BLM-treated mice. This study raises the question of the worsening impact of severe OSA in IPF patients.

1. Introduction

Several studies recently showed that obstructive sleep apnea syndrome (OSA) was highly established in incident and prevalent cases of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) [1–4]. We reported in a prospective study that the prevalence of moderate-to-severe and of severe OSA was 62% and 40%, respectively, in patients with newly diagnosed IPF, suggesting that OSA precedes (or occurs at the same time as) the onset of IPF [1]. Indeed in the IPF population, severe OSA was strongly associated with the presence of cardiovascular diseases (particularly ischemic heart disease) and with increased systemic oxidative stress and IPF biomarkers. IPF, the most common form of idiopathic interstitial pneumonias, is a

devastating lung disease with a median survival of ~3 years from the time of diagnosis, for which medical treatments show little efficacy [5, 6]. IPF generally affects subjects over 60 and is characterized by the accumulation of extracellular matrix in the distal regions of the lungs, leading to impairment of alveolar gas exchange and progressive loss of pulmonary function. The pathophysiology of IPF is not fully understood, but it could be due to aberrant repair following repetitive microinjuries of the alveolar epithelium, including chronic silent microaspiration, cigarette smoke, and chronic viral infections for example [5, 7]. Oxidative stress is observed in the lung of IPF patients and most likely plays an important role in the pathophysiology of the disease [8, 9].

Although the prognosis of IPF is generally bad, there is a great heterogeneity in the natural course of the disease, which could be explained by the presence of associated comorbidities [6]. In patients with IPF, the potential influence of OSA on the natural course of lung fibrosis has never been evaluated using robust methodology. Here, we hypothesized that moderate-to-severe OSA, by increasing lung oxidative stress and inflammation through chronic nocturnal intermittent hypoxia (IH) [10–12], could lead to repetitive alveolar micro-injuries promoting the development/progression of pulmonary fibrosis [13]. To test this hypothesis, we set up a double-hit experimental model in which mice were first treated with bleomycin (BLM) to induce lung fibrosis and then exposed to chronic IH or intermittent air for 3 weeks. The objectives of the present study were to evaluate in this model the effects of chronic IH on animal survival and the severity of lung inflammation and of lung fibrosis and to investigate the mechanism(s) involved. Our results show that exposure to chronic IH mimicking severe OSA increased animal mortality and worsened lung inflammation and lung fibrosis in BLM-treated mice.

2. Methods

2.1. Animals. Male C57BL/6J mice were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). All experiments were approved by the institutional reviewing board on animal experimentation and accorded with animal welfare guidelines (Ministère Français de la Pêche et de l'Agriculture, APAFIS number 1258-2015072312175063). Animals were housed in standard cages and light conditions and fed standard diet with ad libitum access to drinking water in our University Animal Facility (Agreement number A 9300801). Experiments were performed on 2-3-month-old mice, with investigators blinded to experimental condition for all comparative measurements. The total number of mice used in this study was 100.

2.2. Model of Pulmonary Fibrosis and Chronic Intermittent Hypoxia. Pulmonary fibrosis was induced by a single intratracheal instillation of bleomycin (BLM) (Bellon, Paris, France) (3.5 unit/g body weight in 100 μ l saline) [14, 15]. In preliminary experiments, such a dose of BLM induced significant pulmonary fibrosis on day 21 as assessed by lung histology and collagen content determination with an acceptable mortality rate (~25% on day 21). Exposure to chronic intermittent hypoxia (IH) was achieved in customized Plexiglas chambers using an automated nitrogen/air delivery profile system (O₂ Sense Gas Driver Vivo, Adelbio, Aubière, France) modulating flow rates and adjusting the balance of inspired nitrogen and room air enriched with oxygen (O₂). The fraction of inspired oxygen (FIO₂) within the chamber declined from 21% to 6%, resulting in arterial oxyhemoglobin saturation nadir of 60% to 65% for <5 seconds in mice. The nadir in FIO₂ within the chamber during each cycle was followed by restoration of oxygen tension to 21% by flushing the chamber with room air enriched with O₂. Control animals exposed to chronic intermittent air (IA) were placed in a similar Plexiglas chamber in the same room and exposed

to alternating periods of room air using an identical protocol of gas flows as the IH protocol. Exposures were conducted for 40 cycles/h (duration of each cycle: 90 s), 8 h/day (09:00–17:00, during the rodent nocturnal cycle), and 7 days/week for up to 3 weeks.

2.3. Experimental Design. The experimental design is shown in Figure 1. On day 0, anesthetized mice were given intratracheal BLM or saline and allowed to recover for 24 h. On day 1, mice were exposed to either IH or IA as described above for 4, 8, or 21 days. Therefore, 4 experimental groups were studied: group *saline + chronic intermittent air* (Saline-IA), group *saline + chronic intermittent hypoxia* (Saline-IH), group *bleomycin + chronic intermittent air* (BLM-IA), and group *bleomycin + chronic intermittent hypoxia* (BLM-IH). Animal viability was checked twice a day, and mice were weighed on alternate days. Mice were sacrificed on day 4, day 8, or day 21. Briefly, mice were euthanized with intraperitoneal injection of pentobarbital (250 mg/kg) followed by exsanguination. The trachea was cannulated before a thoracotomy was performed, and a catheter was inserted in the pulmonary artery to perform lung vascular lavage. Lungs were processed for further experiments as described below.

2.4. Lung Histology. Lung histology was performed as previously described [16]. Lungs were inflated with 4% paraformaldehyde at a pressure of 20 cm H₂O before the trachea was tied. Heart and lungs were removed *en bloc* and placed in 20 ml 4% paraformaldehyde overnight. The lungs were embedded in paraffin. Sections were cut at 4 μ m thickness and stained with haematoxylin and eosin.

2.5. Bronchoalveolar Lavage. One ml of cold saline was injected into the lungs through the tracheal cannula and flushed back and forth three times. The bronchoalveolar lavage (BAL) fluid was centrifuged, and the supernatant was immediately frozen at –80°C. The cell pellet was further processed to obtain total cell count and cytological formula.

2.6. Determination of Lung Wet/Dry Weight Ratio. Lung water content (including intravascular water, interstitial, and alveolar water) was determined by the lung wet/dry weight ratio as previously described [17]. Briefly, mice were killed as described above except that lung vascular lavage was not performed. The right lower lobe was removed, weighed, then placed in an incubator at 80°C for 24 h for desiccation and weighed again to calculate the wet/dry lung weight ratio.

2.7. Immunohistochemistry. Immunolocalization of 3-nitrotyrosine was performed on 4 μ m paraffin-embedded lung sections from the 4 experimental groups (4–5 per group). Sections were deparaffinized and rehydrated, and epitopes were recovered using 0.01 M sodium citrate buffer at pH 6. Then, tissue sections were incubated overnight at 4°C with primary antibody (1:250 for anti 3-nitrotyrosine (Abcam number ab61392, France). The LSAB2/DAB kit (Dako/Agilent Technologies, France) was used to detect bound antibodies, according to the manufacturer's instructions, and tissue sections were counterstained with haematoxylin.

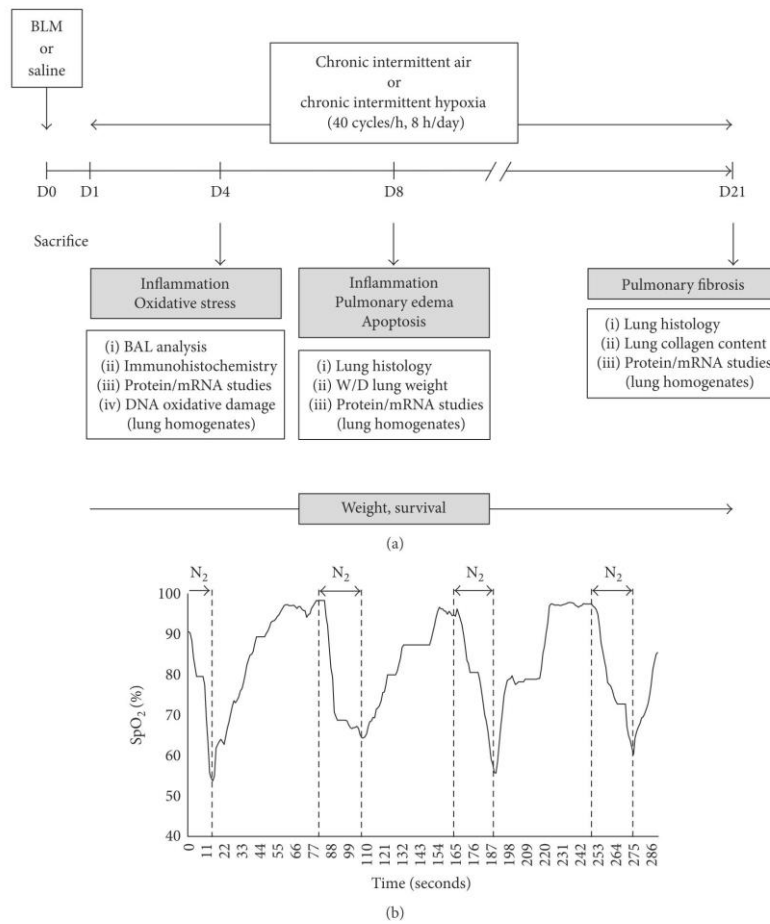


FIGURE 1: Exposure to intermittent hypoxia in a murine model of lung fibrosis. (a) Experimental design. (b) Representative trace of oxygen saturation measured by pulse oximetry (SpO₂) in a mouse exposed to intermittent hypoxia.

2.8. TUNEL Experiments. The detection and quantification of apoptosis by TUNEL staining were performed on paraffin-embedded lung sections from the 4 experimental groups, using an In Situ Cell Death Detection kit from the ROCHE company (number 11684795910). Briefly, tissue sections were dewaxed, rehydrated, and permeabilized using proteinase K. A positive control was performed using DNase I. The labelling protocol was performed following the manufacturer's instructions. Slides were mounted using Vectashield Antifade Mounting Medium with DAPI (Vector number H-1200, United Kingdom).

2.9. Morphometry. Counting of nitrotyrosine-positive cells was performed on lung sections of four to five mice for each experimental group, and results were normalized per lung

area. The overall proportion of TUNEL-positive cells was determined by dividing the number of TUNEL-positive cells (fluorescein-positive cells) by the total number of cells contained within the field (DAPI stained cells) and then multiplying by 100. For both counting, five fields per section were analyzed to gather the data. The *x*- and *y*-coordinates for each field measured were selected by a random number generator. Double-blind counting was performed for both nitrotyrosine immunohistostaining and TUNEL assay.

2.10. ELISA. Myeloperoxidase (MPO) concentration was assessed in 40 μ g lung homogenates by ELISA according to the manufacturer's instructions (DuoSet DY3667, Bio-Techne). DNA oxidative damage was assessed in 40 μ g lung homogenates and BAL fluid by determination of 8-

TABLE 1: QPCR primers list.

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	PCR product size (bp)
<i>B2m</i>	GTGACCTGGTCTTTCTGGT	GTATGTTCCGGCTTCCCATTTC	115
<i>Col1a1</i>	GTGGTGACAAGGGTGAGACA	GAGAACCAAGGAGAACCAGGA	99
<i>Col3a1</i>	TACACCTGCTCCTGTGCTTC	CATTCTCCCACTCCAGACT	226
<i>Fn1</i>	TGGTGGCCACTAAATACGAA	GGAGGGCTAACATTCTCCAG	103
<i>Tgfb1</i>	ACTGATACGCCTGAGTGGCT	CCCTGTATTCCGTCTCCTTG	80
<i>Ctgf</i>	GAGTGTGCACTGCCAAAGAT	GGCAAGTGCATTGGTATTTC	102

hydroxy-deoxyguanosine (8-OH-DG) levels using an ELISA kit (Oxiselect™, Cell Biolabs Inc., San Diego, CA).

2.11. Western Blot Analysis. Lungs were removed and immediately homogenized for 3 min in ice-cold lysis RIPA buffer (pH 8) containing 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholate, and protease inhibitors. The lysate was centrifuged (15,000 rpm, 10 min, 4°C), and supernatants were aliquoted and immediately frozen before use. For Western blotting, samples of protein extracts (40 or 100 µg/lane) were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membrane (GE Healthcare). Membranes were blocked in TBST (150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.4, 0.1% Tween 20) containing 5% (w/v) dry milk powder and then incubated with primary antibodies (diluted in blocking solution) overnight at 4°C. Following washes with TBST, blots were incubated for 1 hr at room temperature with secondary antibodies. Immunoreactive bands were revealed with the ECL Luminata kit (Millipore) or West kit (Thermo Scientific), visualized on an image capture system (ChemiDoc MP, Bio-Rad), and quantified with Image Lab software (Bio-Rad). Protein levels were normalized to respective β -actin control. Primary antibodies used in the study were rabbit polyclonal anti superoxide dismutase 1 (SOD1) (Enzo Life Sciences, ADI-SOD 100; dilution: 1/5000), polyclonal rabbit anti superoxide dismutase 2 (SOD2) (Enzo Life Sciences, ADI-SOD 100; dilution: 1/5000), rabbit polyclonal anti-catalase (Calbiochem, 219010; dilution: 1/5000), rabbit polyclonal anti glutathione peroxidase (GPX) (Abcam, ab59546; dilution 1/5000), rabbit polyclonal anti-cleaved PARP (Poly-ADP-ribose polymerase) (Cell Signalling; dilution:1/1000), and mouse monoclonal anti β -actin (Santa Cruz, SC 47778; dilution: 1/1000).

2.12. Reverse Transcription and Real-Time (RT) PCR Analysis. Total cellular RNAs from lung homogenates were extracted using the RNeasy kit (QIAGEN S.A., Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions. RNAs were quantified using a BioSpec-nano (Shimadzu, Noisiel, 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 (Fisher Scientific, Illkirch, France). Resulting cDNA samples were amplified by quantitative polymerase chain reaction (PCR) with Absolute qPCR SYBR Green ROX mix (Fisher Scientific, Illkirch, France) on StepOne

system qPCR (Applied Biosystems, Life Technologies, France). Cycle threshold values were normalized to amplification of *Beta 2 microglobulin (B2m)*. For each transcript, the expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, as detailed by the manufacturer. Primer sequences used for quantitative real-time PCR are listed in Table 1.

2.13. Lung Collagen Content. Soluble lung collagen content was measured in the frozen unlavaged right lung with the Sircol assay (Biocolor Ltd., Belfast, UK) according to the manufacturer's instructions. Results were expressed in µg/lobe.

2.14. Statistical Analysis. Results are presented as means \pm SE. Differences between groups were evaluated with one-way variance analyses (ANOVA), and, when allowed by the *F* value, results were compared by the modified least significant difference (Fisher's PLSD). Survival was estimated by the method of Kaplan-Meier and compared by the log-rank test. $p < 0.05$ was considered significant. Analyses were carried out using StatView® software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) and Prism® software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

3. Results

3.1. Exposure to Intermittent Hypoxia Reduces Survival in Bleomycin-Treated Mice. Global comparisons revealed significant differences in survival between groups of mice treated with saline or BLM at day 0 and exposed to IA or IH from day 1 to day 21, as shown in Figure 2. In mice treated with saline and exposed to either AI or IH, the survival rate at day 21 was 100%. Treatment with BLM induced mortality after day 8 in mice exposed to either IA or IH. Indeed, the survival over 21 days was significantly lower in mice treated with BLM exposed to IH than in mice treated with BLM exposed to IA (52% versus 76%, $p = 0.04$). Gross examination of lungs from all deceased mice revealed the presence of large congestive hemorrhagic areas.

3.2. Exposure to Intermittent Hypoxia Increases Lung Inflammation and Pulmonary Edema in Bleomycin-Treated Mice. Total cell counts in BAL at day 4 were significantly increased in mice treated with BLM (whether exposed to IA or IH), as compared with mice treated with saline (Figure 3(a)). This was associated with an increase in the number of polymorphonuclear cells (PMN). The increase in BAL total cell count and the increase in PMN number were significantly more important in the BLM IH group

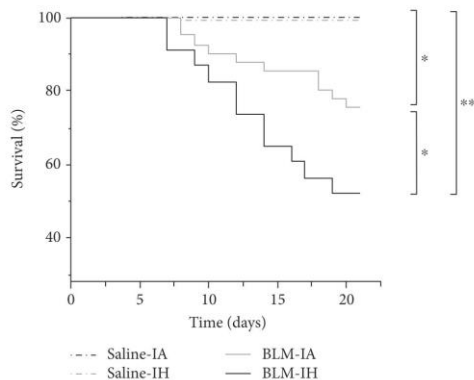


FIGURE 2: Survival is reduced in response to intermittent hypoxia in a murine model of lung fibrosis. Kaplan-Meier plot of mice survival after bleomycin exposure in normoxia and intermittent hypoxia (IH). Eight-week-old mice received an intratracheal instillation of bleomycin or saline (NaCl) at day 0. Survival of mice ($n = 23\text{--}41$) after bleomycin was significantly decreased compared with controls ($n = 14\text{--}16$). Exposure to IH worsened mice survival. $p < 0.0001$ by Log-rank test. * $p < 0.05$ versus Saline-IA; ** $p < 0.01$ versus Saline-IA.

than in the BLM IA group ($p < 0.001$), indicating that exposure to IH exacerbated the neutrophilic alveolitis induced by BLM treatment. As shown in Figure 3(b), concentration of myeloperoxidase (MPO) in lung homogenates at day 4 was significantly induced in groups of mice treated with BLM, with no difference between mice exposed to IA or IH. On day 8, MPO concentration had returned to normal in mice treated with BLM and IA, but was still significantly increased in mice treated with BLM and IH ($p < 0.05$). Histological analysis of lung tissue at day 8 clearly showed alveolar and interstitial cellular infiltrates in the lungs of BLM-treated mice that appeared with a larger extent in the BLM-IH group than in the BLM-IA group (Figure 3(c)). Also, the wet-to-dry lung weight ratio at day 8 was significantly increased in the BLM-IH group, indicating the presence of pulmonary edema.

3.3. Lung Oxidative Stress and Lung Antioxidant Enzymes. Lung oxidative stress was evaluated at day 4 by 3-nitrotyrosine immunostaining of lung sections (reflecting protein nitrosylation) [18] and by assessment of 8-OH-DG levels [1] in lung homogenates and BAL fluid. Immunostaining of 3-nitrotyrosine was very weak in lung sections from mice treated with saline and either exposed to IA or to IH ($n = 4\text{--}5$ per group) (Figure 4(a)). By contrast, staining was observed in all lung sections from mice treated with BLM, with no obvious difference between the BLM-IA group and the BLM-IH group ($n = 4\text{--}5$ per group). 3-nitrotyrosine-positive cells were both immune cells and alveolar epithelial cells (Figure 4(a)). As shown in Figure 4(b), there was a trend to an increase in 8-OH-DG levels in lung homogenates from mice treated with BLM (the BLM-IA and BLM-IH groups) as

compared with mice treated with saline. However, this increase was not significant, most likely because of the small number of samples and the variability of values in BLM-treated mice. Measurements of 8-OH-DG in BAL fluid samples showed that 8-OH-DG levels were under the detection threshold of the ELISA kit in all mice treated with saline (data not shown). Concerning BLM-treated mice, 8-OH-DG was detected (i.e., values above the detection threshold) in 3 upon 9 BAL fluid samples in the BLM-IA, and in 5 upon 7 samples in the BLM-IH group ($p = 0.07$ by *Chi2*). Next, we assessed protein expression levels of antioxidant enzymes (SOD1, SOD2, catalase, and GPX) by Western blotting in lung homogenates at day 4 (Figure 5). Expression levels of SOD1 were not significantly modified by any experimental condition (data not shown). Expression of catalase in lung homogenates was markedly decreased by 76% in the Saline-IH group as compared with the Saline-IA group ($p < 0.5$), but was not significantly modified in the BLM-IA and BLM-IH groups (Figure 5(a)). Expression levels of SOD2 protein were significantly decreased by 30–35% in the Saline-IH and the BLM-IA groups as compared with the Saline-IA group and were further decreased (–61%) in the BLM-IH group (Figure 5(b)). Expression levels of SOD2 were significantly lower in the BLM-IH group than in the BLM-IA group ($p < 0.05$). Finally, expression levels of GPX were reduced by 50% in the BLM-IA group as compared with the Saline-IA group ($p < 0.01$) and were further reduced by more than 85% in the Saline-IH and the BLM-IH groups ($p < 0.001$ as compared with the Saline-IA group and $p < 0.05$ as compared with the BLM-IA group) (Figure 5(c)).

3.4. Exposure to Intermittent Hypoxia Increases Lung Cell Apoptosis in Bleomycin-Treated Mice. Lung cell apoptosis was evaluated at day 8 by TUNEL staining on paraffin-embedded lung sections and by quantification of cleaved-PARP protein expression levels reflecting early apoptosis [19] by Western blot in lung homogenates (Figure 6). The number of TUNEL-positive cells was very low in Saline-IA- and Saline-IH-treated lungs, tended to increase in BLM-IA lungs (not significant), and was significantly augmented in BLM-IH lungs (Figures 6(a) and 6(b)). TUNEL-positive cells were mostly alveolar epithelial type II cells, and to a lesser degree intra-alveolar inflammatory cells. Consistent with this result, the protein expression level of cleaved-PARP was significantly increased in lung homogenates from BLM-IH-treated mice as compared with other groups (Figures 6(c) and 6(d)).

3.5. Exposure to Intermittent Hypoxia Worsens Lung Fibrosis in Bleomycin-Treated Mice. First, levels of mRNA transcripts coding for extracellular matrix proteins (*Col1a1*, *Col3a1*, and *Fn1*) and profibrotic factors (*Tgfb1* and *Ctgf*) were evaluated in lung homogenates by qRT-PCR at day 4, day 8, and day 21 (Figures 7(a)–7(c)). Exposure to IH per se did not modify mRNA expression levels, as compared with IA. Treatment with BLM + IA induced a significant increase in *Fn1* mRNA levels at day 4, day 8, and day 21 (as compared with saline) (Figure 7(c)), and in *Col1a1* mRNA levels at day 8 (Figure 7(a)). Treatment with BLM + IH further

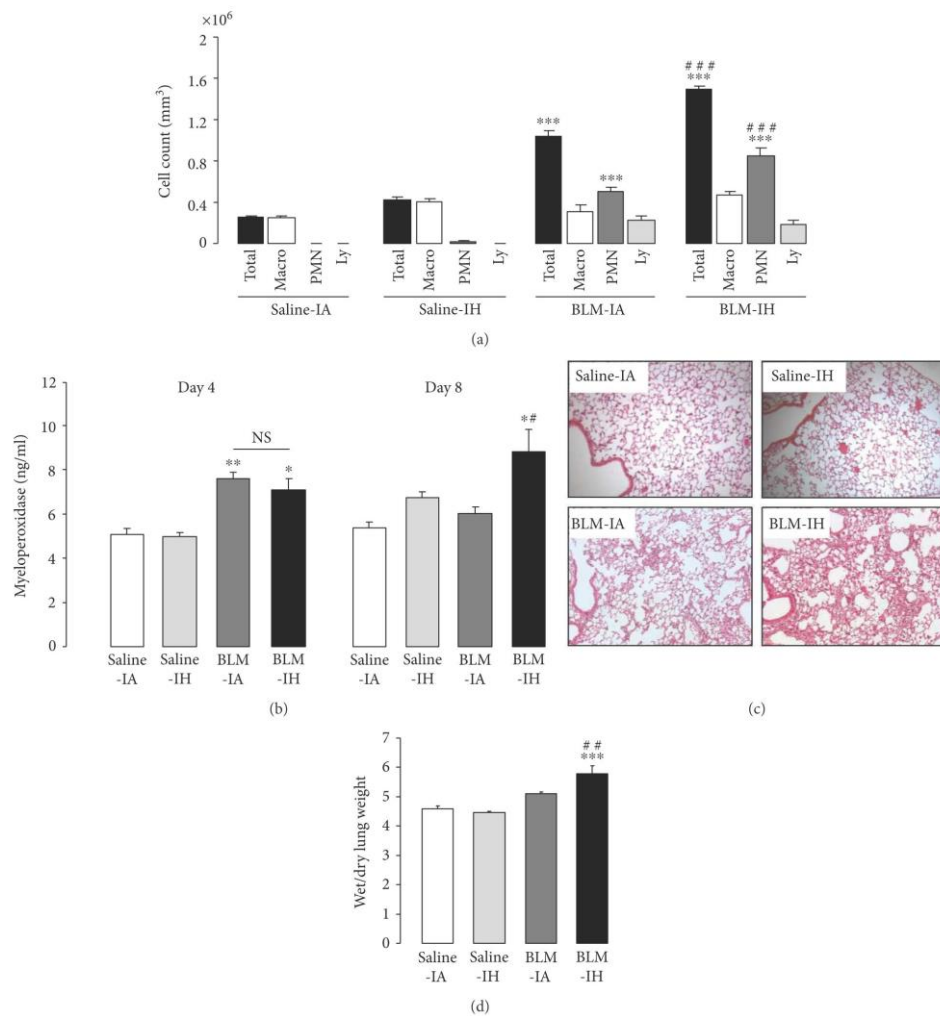


FIGURE 3: Intermittent hypoxia increases lung inflammation and pulmonary edema in bleomycin-treated mice. (a) Total cell count was determined in BAL from mice at day 4 in the 4 experimental groups. Changes in BAL cell population (Macro: macrophages; PMN: polymorphonuclear cells; Ly: lymphocytes) were determined in the 4 experimental groups. Data represent means \pm SE, $n = 6$ mice per group. (b) Myeloperoxidase (MPO) concentration was assessed by ELISA in lung homogenate of mice at day 4 and day 8 in the 4 experimental groups. Data represent means \pm SE, $n = 4$ mice per group. (c) Lung histology of mice at day 8. Lung sections were prepared at day 8 in the 4 experimental groups and stained with haematoxylin and eosin to assess lung morphology. (d) Lung wet/dry weight ratios for all experimental groups at day 8. Data represent means \pm SE, $n = 5$ mice per group. * $p < 0.01$ versus Saline-IA; ** $p < 0.01$ versus Saline-IA; *** $p < 0.001$ versus Saline-IA; # $p < 0.05$ versus BLM-IA; ## $p < 0.01$ versus BLM-IA; ### $p < 0.001$ versus BLM-IA.

increased *Coll1a1* and *Fn1* mRNA transcript levels at day 8 (Figures 7(a) and 7(b)), and also increased *Col3a1* mRNA transcript levels at day 8 ($p = 0.05$) (Figure 7(b)). Levels of *Tgfb1* mRNA transcripts were not modified in any experimental condition (data not shown). Expression levels

of *Ctgf* mRNAs were significantly increased at day 8 in mouse lungs treated with BLM, with no significant difference between the BLM-IA and the BLM-IH group, and returned to normal at day 21 (Figure 7(d)). In addition, histological examination at day 21 revealed a patchy distribution of

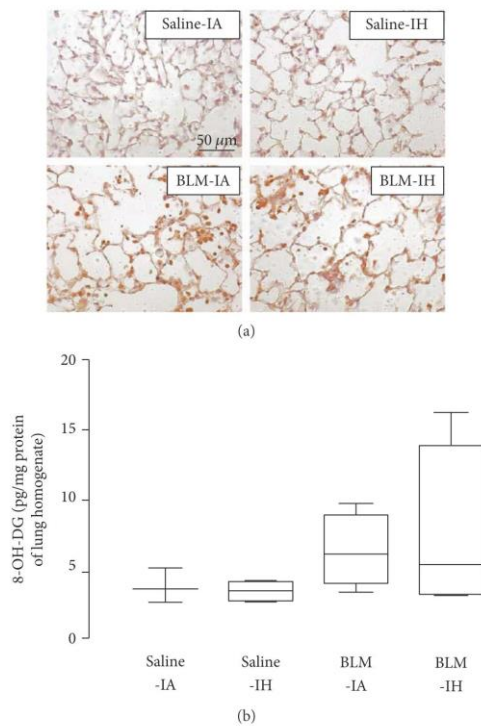


FIGURE 4: Intermittent hypoxia and bleomycin enhanced lung nitrosative/oxidative stress in mouse lungs. (a) 3-nitrotyrosine presence was assessed by immunostaining on lung sections of mice prepared at day 4 in the 4 experimental groups. The figure is representative of at least 5 individual mice for each group. Magnification $\times 200$. (b) 8-OH-DG concentration was assessed by ELISA in lung homogenate of mice at day 4 in the 4 experimental groups. Data represent means \pm SE, $n = 4-5$ mice per group.

fibrotic areas in the lungs from mice treated with BLM (Figure 7(d)). Lung fibrosis appeared more severe with a larger extent of fibrotic areas in the BLM IH group than in the BLM IA group (Figure 7(e), lower panels). Finally, quantification of collagen content in lung homogenates by Sircol assay at day 21 (Figure 7(e)) showed that collagen content was increased by 35% and by 63% in the BLM IA group and in the BLM IH group, respectively, as compared with Saline IA group ($p < 0.001$). Lung collagen content was significantly higher in the BLM IH group than in the BLM IA group (1772 ± 124 versus $1470 \pm 82 \mu\text{g/ml}$, $p < 0.05$). Taken together, these data indicate that exposure to IH worsened lung fibrosis in BLM-treated mice.

4. Discussion

The high prevalence of moderate-to-severe OSA in prevalent and incident cases of IPF raises the question whether OSA

could modulate the course of pulmonary fibrosis [1–3]. In the present study, we evaluated the effect of chronic IH, a typical feature of severe OSA [10, 11, 20], on the severity of lung fibrosis induced by BLM in mice. Our main findings provide evidence that exposure to chronic IH worsened BLM-induced lung injury inasmuch as IH: (i) doubled mortality after 21 days in BLM-treated mice; (ii) increased pulmonary inflammation as assessed by neutrophilic alveolitis and pulmonary edema during the first week following BLM treatment; (iii) induced lung cell apoptosis; and (iv) increased the severity of BLM-induced pulmonary fibrosis estimated by histological analysis, *collagen* and *fibronectin* mRNA transcript levels, and collagen content in lung homogenates. Indeed, exposure of BLM-treated mice to chronic IH was associated with an imbalance between antioxidant and prooxidant enzymes compromising cellular defense against oxidative stress.

IPF is thought to be the consequence of repetitive microinjuries on the ageing lung, followed by inefficient repair of the injured alveolar epithelium, and uncontrolled activation and proliferation of (myo)fibroblasts [5]. ATII cells, the progenitor cells of alveolar epithelium, instead of proliferating and transdifferentiating to recover the denuded alveolar basal membrane, undergo massive apoptosis or may even transform themselves into fibroblasts through epithelial-mesenchymal transition (EMT) [21, 22]. Some ATII cells also become hyperplastic with abnormal activation and production of profibrotic factors such as TGF β 1 and CTGF. IPF lungs display increased oxidative stress probably caused by an increase in oxidants associated with extracellular glutathione deficiency [8, 9]. In the present study, experimental lung fibrosis was induced in mice by a single intratracheal instillation of BLM. The BLM model is the best-characterized murine model of pulmonary fibrosis [14, 15]. BLM, a drug with antibiotic/antineoplastic properties originally isolated from *Streptomyces verticillatus*, has a dose-dependent pulmonary toxicity resulting in lung fibrosis in humans. Intratracheal administration of BLM in murine lung induces a direct damage of alveolar epithelial cells (mostly alveolar type I cells), an inflammatory response, and increased epithelial apoptosis, with signs resembling acute lung injury within the first week. In response to this initial injury, lung fibrosis progressively develops to be maximal around days 21–28 and can eventually resolve afterwards. Although the BLM model does not recapitulate all features of the IPF lung, it is the most extensively used murine model to study the pathogenesis of pulmonary fibrosis. In our model, mice were exposed one day after BLM administration to chronic and severe IH (40 cycles/h, 8 h/day, nadir FIO $_2$ 6%, for 21 days) to mimic nocturnal hypoxia-reoxygenation episodes encountered during severe OSA, inasmuch as severe OSA may affect as much as 40% of patients with incident IPF [1]. Indeed, previous animal studies have shown that such regimens of chronic and severe IH were able to induce in mice deleterious cardiovascular, metabolic, or neurological effects, whereas less severe regimens (shorter duration, lower cycle frequency, higher FIO $_2$ nadir) were not or could even exert some protective effects [10, 11].

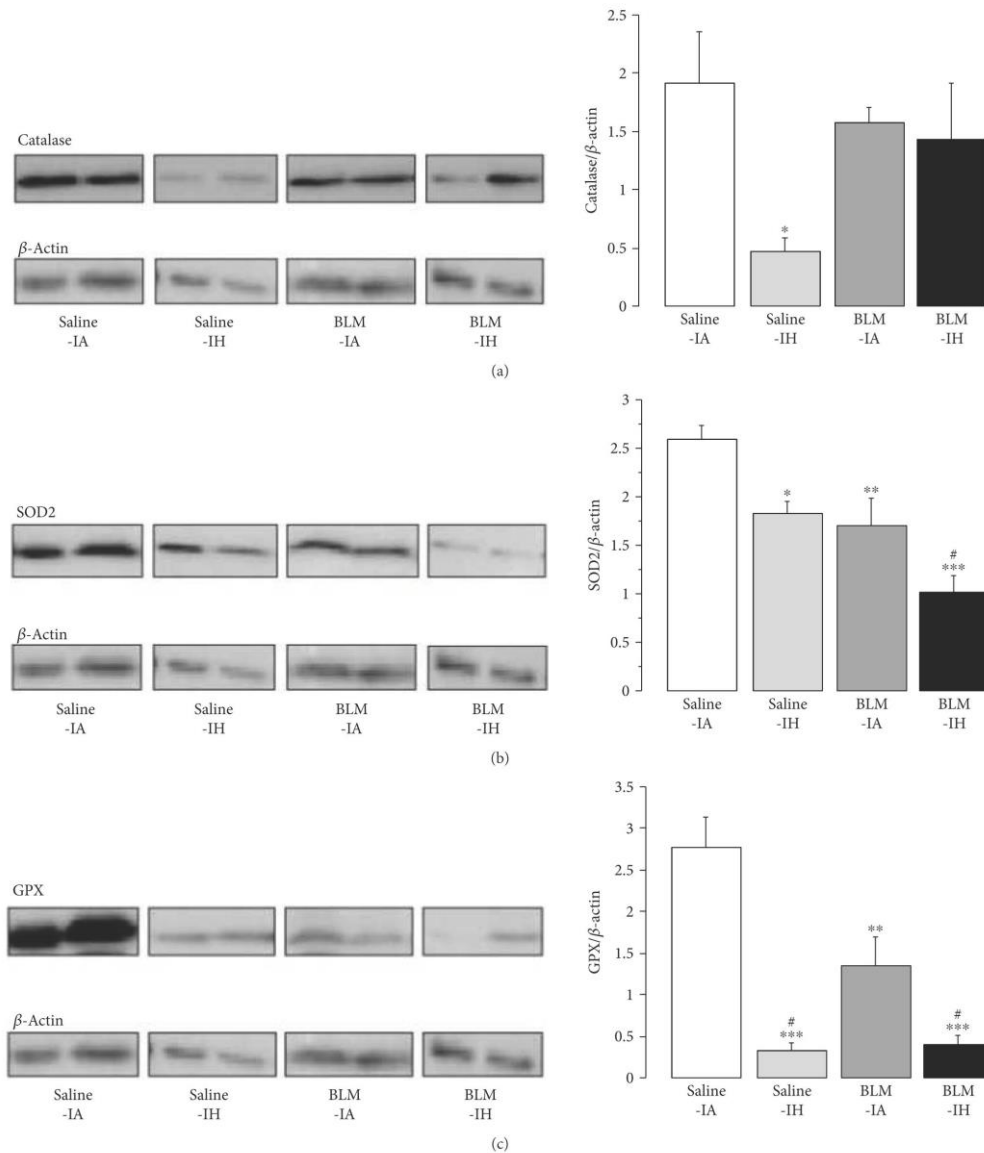


FIGURE 5: Intermittent hypoxia reduced antioxidant enzymes in mouse lungs. Immunoblotting for catalase (a), SOD2 (b), and GPX (c) was performed on lungs on D4 in the 4 experimental groups. Histograms show quantitative representation of protein levels of $n = 4-5$ mice/group. * $p < 0.01$ versus Saline-IA; ** $p < 0.01$ versus Saline-IA; *** $p < 0.001$ versus Saline-IA; # $p < 0.05$ versus BLM-IA.

In our model, lung inflammation was evidenced within the first week in mice treated with BLM, but not in mice treated with saline and exposed to either IA or IH. Interestingly, lung inflammation was more intense in mice treated

with BLM and IH than in those treated with BLM and IA, as indicated by histological analysis, a more severe neutrophilic alveolitis at day 4 and a greater increase in MPO expression in lung homogenates at day 8. Also, pulmonary

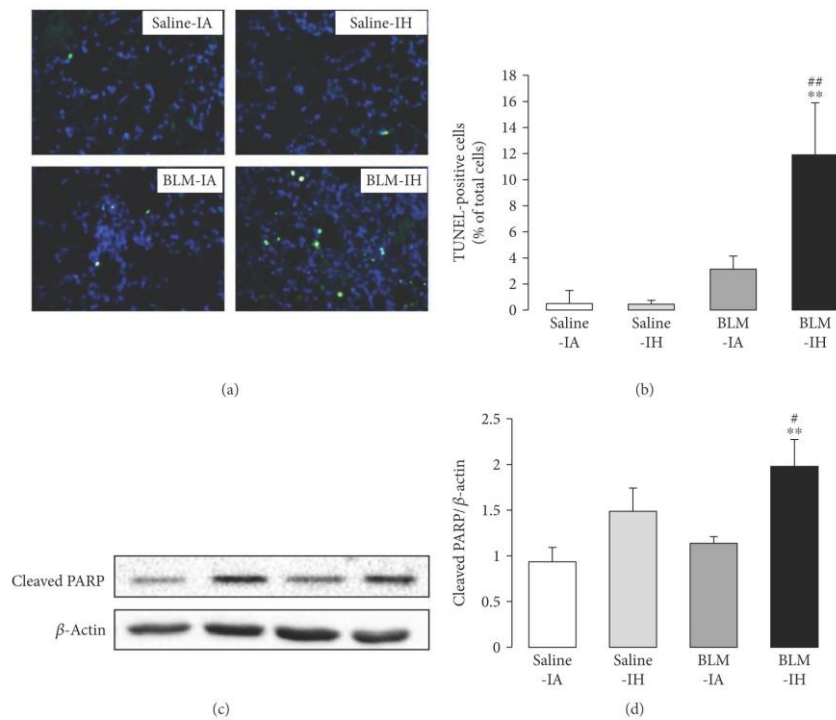


FIGURE 6: Intermittent hypoxia increased apoptosis in mouse lungs. (a) Apoptosis was determined by TUNEL assay on lung sections of mice prepared at day 8 in the 4 experimental groups. Magnification $\times 200$. (b) Fraction of TUNEL-positive cells (green) on lung sections was determined relative to DAPI-positive cells (blue). The figure is representative of at least 5 individual mice for each group. (c) Immunoblotting for cleaved PARP was performed on lungs on day 8 in the 4 experimental groups. (d) Histograms show quantitative representation of protein levels of $n = 4$ -5 mice/group. ** $p < 0.01$ versus Saline-IA; # $p < 0.05$ versus BLM-IA; ## $p < 0.01$ versus BLM-IA.

edema as assessed by wet-to-dry lung weight ratio at day 8 was more severe in the BLM-IH group than in the BLM-IA group. The severity of lung edema in mice treated with BLM and IH could be due to increased air-blood barrier permeability to fluid and proteins leading to alveolar flooding, secondary to the afflux and activation of PMN as described in acute lung injury [23]. In addition, accumulation of pulmonary edema fluid can be the consequence of decreased ability of the lung to clear edema fluid from the alveolar space. Transepithelial vectorial sodium transport from alveoli to interstitium is achieved by alveolar epithelial cells and normally provides the driving force for edema fluid clearance, one condition that it is preserved [24, 25]. To our knowledge, the effect of IH on active alveolar sodium transport has not been studied. Of note, alveolar sodium transport by alveolar epithelial cells was previously shown to be inhibited by acute and chronic hypoxia and by oxidative stress [26–28], two elements associated with IH challenge.

Oxidative stress is considered as a major pathogenic feature in IH [10], but it is also induced by BLM [29]. Here, we observed at day 4 a marked increase in 3-nitrotyrosine

immunostaining as well as a trend (not significant) to an increase in 8-OH-DG levels in lung tissues from mice treated with BLM and exposed to either IA or IH. By using these techniques, we were not able to detect any significant effect of exposure to IH per se, inasmuch the Saline-IH group was not different from the Saline-IA group. These results strongly suggest that oxidative stress is induced in BLM-treated mouse lungs, with no obvious difference between mice exposed to IA and mice exposed to IH. However, quantification of antioxidant enzyme protein expression in lung homogenates revealed some differences between BLM-IA and BLM-IH groups. Namely, expression levels of SOD2 and GPX were significantly more decreased in the BLM-IH group than in the BLM-IA group (–61% versus –35%, respectively, for SOD2 and –80% versus –50%, respectively, for GPX). Although we did not measure SOD2 and GPX activities, the important decrease in protein expression levels of these enzymes suggested that antioxidant defense mechanisms might be particularly reduced in the BLM-IH group. Indeed, it was previously reported that IH decreased SOD2 activity and increased oxidative stress in lung

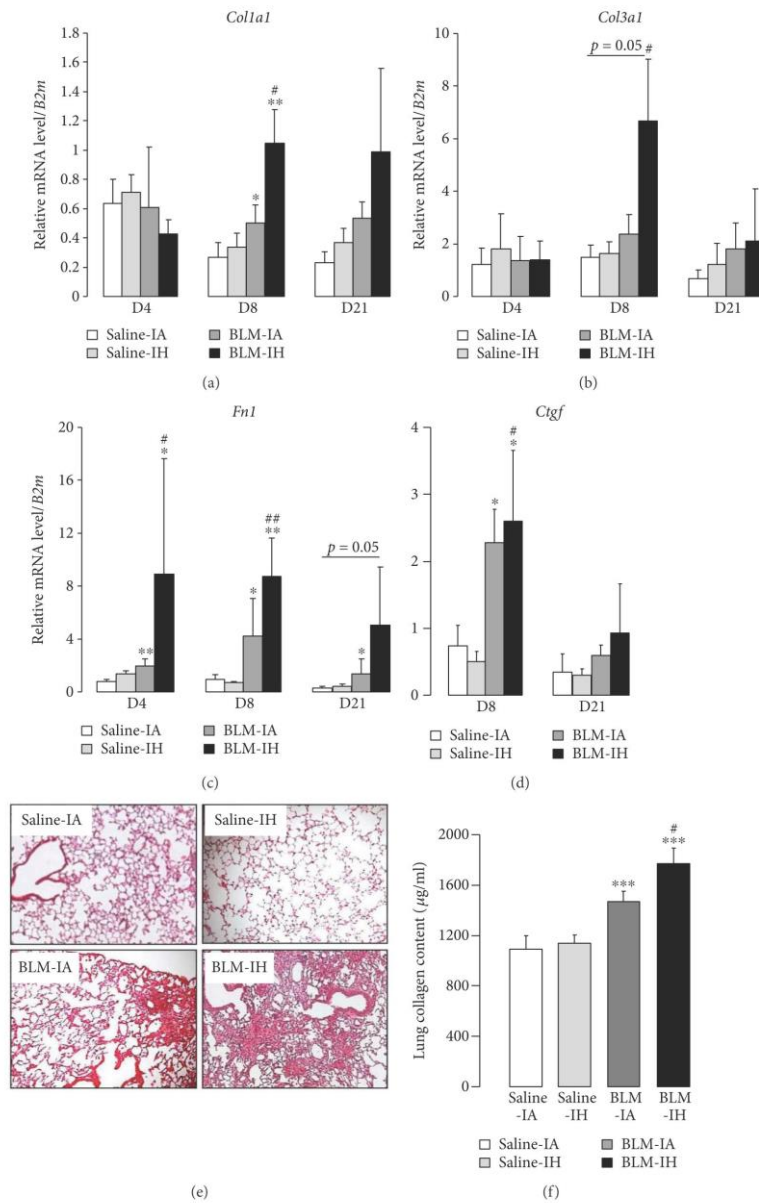


FIGURE 7: Lung fibrosis is increased in response to intermittent hypoxia. Quantitative RT-PCR was performed to estimate (a) *Colla1*, (b) *Col3a1*, (c) *Fn1*, and (d) *Ctgf* mRNA levels in whole lung homogenate from mice in the 4 experimental groups and normalized to *B2m* mRNA. Results are expressed as means \pm SE of 5 animals per group. (e) Lung histology of mice at day 21. Lung sections were prepared at day 21 in the 4 experimental groups and stained with haematoxylin and eosin to assess lung morphology. (f) Soluble collagen content was assessed by Sircol assay in lung homogenates in saline-treated mice ($n = 5-10$ mice per group) compared with BLM-treated mice ($n = 14-18$ mice per group). * $p < 0.01$ versus Saline-IA; ** $p < 0.01$ versus Saline-IA; *** $p < 0.001$ versus Saline-IA; # $p < 0.05$ versus BLM-IA; ## $p < 0.01$ versus BLM-IA.

epithelial cell line H441 cells [30]. Concerning prooxidant enzymes, our data show that lung MPO concentration was increased at day 4 in both groups treated with BLM (BLM-IA and BLM-IH), consistent with PMN infiltration of lung tissues [23]. However, whereas MPO concentration went back to normal at day 8 (corresponding to the end of the inflammatory phase of lung BLM injury) in the BLM-IA group, it remained significantly elevated in the BLM-IH group, suggesting an imbalance between lung antioxidant and prooxidant enzymes in this condition. Of note, we also evaluated mRNA and protein levels of NADPH-oxidases (NOX2 and NOX4) since these prooxidant enzymes are induced by IH in some cell types [11], but we found no significant modification under our experimental conditions (data not shown). This does not exclude however that NOX2 or NOX4 expression might vary under IH condition in some specific cell types (for instance fibroblasts or alveolar epithelial cells), but analyses performed on whole lung homogenates did not allow us to detect such cell-type specific events.

Increased apoptosis of ATII cells is a deleterious feature in IPF that compromises normal alveolar epithelium repair after injury and may therefore promote lung fibrosis [5]. Here, TUNEL staining revealed that the rate of apoptotic lung cells was markedly and specifically increased in the BLM-IH group. Apoptosis was detected both in ATII cells and immune cells. Consistent with this finding, lung expression levels of cleaved PARP protein, a marker of early apoptosis, were also significantly and specifically increased in this condition. These results are in line with previous works showing that IH can induce apoptosis in various cell types such as neurons [31] or pancreatic β cells [32]. Our *in vivo* model did not allow us to analyze the pro- and antiapoptotic pathways potentially involved in ATII cell apoptosis, and additional experiments *in vitro* in cultured primary ATII cells are clearly needed to study the cellular mechanisms of IH-induced apoptosis. Based on previous studies, it can be hypothesized that both activation of the hypoxia-inducible factor 1 α pathway (and its proapoptotic targets) and accumulation of reactive oxygen species could be involved in ATII cell apoptosis [33–35].

One important question is whether exposure to IH would worsen lung fibrosis and animal mortality in our experimental model. Our results based on lung histological examination, the time-course of extracellular matrix protein mRNA transcripts, and quantification of lung collagen provide evidence that pulmonary fibrosis at day 21 was more severe in mice treated with BLM and IH as compared with those treated by BLM and IA. Indeed, animal mortality observed during the fibrotic phase (from day 8 to day 21) was almost doubled in the BLM-IH group as compared with the BLM-IA group, and postmortem analysis of the lungs suggests that the cause of death was mostly respiratory deficiency. Our data concerning lung fibrosis are in line with those from Braun et al. [36], recently obtained in rats treated with BLM or saline on day 0 and exposed to chronic IH (nadir FIO_2 10%, 30 cycles/h, 10 h/day) or to normoxia from day 5 to day 35. The latter study showed that a 30-day exposure to IH increased lung NF- κ B activity, worsened pulmonary fibrosis (as assessed by lung hydroxyproline content), and

impaired lung compliance in rats treated with BLM. The authors observed a significant increase in mRNA expression of the profibrotic factor CTGF in rat lungs treated by BLM and IH (as compared with mice treated with BLM and IA) which could contribute to worsen fibrosis, but this was not the case in our experiments in mice, maybe because of species differences. In their study, Braun et al. did not specifically evaluate the severity of pulmonary inflammation during the first week following BLM administration. Indeed, contrary to our findings, the authors did not mention any increase in the mortality rate of rats exposed to BLM and IH. This discrepancy may be due to the fact that the IH regimen they used was less severe than that in our experiments (e.g., FIO_2 nadir 10% versus 6% in the present study). However, whatever the species and IH regimen differences between the two studies, they both strongly support the deleterious role of chronic IH in the development of BLM-induced lung fibrosis. Further *in vitro* experiments using specific lung cell types (ATII cells, fibroblasts) should be undertaken to decipher the mechanism(s) leading to the worsening of pulmonary fibrosis by chronic IH.

5. Conclusion

This animal study provides strong evidence that chronic IH worsens lung inflammation, lung fibrosis, and mortality in BLM-induced lung injury in mice. Our findings raise the question of the worsening impact of severe OSA in IPF patients. This represents an important issue in the clinical management of IPF for which medical therapies show little efficacy, since OSA can be efficiently treated with continuous positive airway pressure (CPAP) therapy. Prospective controlled trials evaluating the influence of OSA on the course of IPF and the potential beneficial effect of CPAP therapy in IPF patients are urgently needed to address these issues.

Disclosure

The present work was previously presented as a poster presentation at the 2016 meeting of the Federation of European Physiological Societies and the French Physiological Society in Paris (France).

Conflicts of Interest

The authors have no conflict of interest to disclose.

Authors' Contributions

Thomas Gille and Morgane Didier contributed equally to this work. Valérie Besnard and Emilie Boncoeur contributed equally to this work.

Acknowledgments

The authors would like to thank Professor Nathalie Charnaux for helpful discussions and to Ms. Patricia Quidu (EA2363) and Ms. Chantal Simon (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Jean Verdier Hospital, Biochemistry Laboratory, Bondy, France) for technical assistance. Chancellerie des

Universités de Paris-Fondation du Legs Poix, University Paris 13, and COMUE Université Sorbonne Paris Cité (Grant "FPI-SPC").

References

- [1] T. Gille, M. Didier, M. Boubaya et al., "Obstructive sleep apnoea and related comorbidities in incident idiopathic pulmonary fibrosis," *The European Respiratory Journal*, vol. 49, no. 6, article 1601934, 2017.
- [2] L. H. Lancaster, W. R. Mason, J. A. Parnell et al., "Obstructive sleep apnea is common in idiopathic pulmonary fibrosis," *Chest*, vol. 136, no. 3, pp. 772–778, 2009.
- [3] C. Mermigkis, J. Chapman, J. Golish et al., "Sleep-related breathing disorders in patients with idiopathic pulmonary fibrosis," *Lung*, vol. 185, no. 3, pp. 173–178, 2007.
- [4] G. Milioli, M. Bosi, V. Poletti et al., "Sleep and respiratory sleep disorders in idiopathic pulmonary fibrosis," *Sleep Medicine Reviews*, vol. 26, pp. 57–63, 2016.
- [5] T. E. King Jr, A. Pardo, and M. Selman, "Idiopathic pulmonary fibrosis," *Lancet*, vol. 378, no. 9807, pp. 1949–1961, 2011.
- [6] B. Ley, H. R. Collard, and T. E. King Jr., "Clinical course and prediction of survival in idiopathic pulmonary fibrosis," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 183, no. 4, pp. 431–440, 2011.
- [7] G. Raghu, "The role of gastroesophageal reflux in idiopathic pulmonary fibrosis," *The American Journal of Medicine*, vol. 115, no. 3, Supplement 1, pp. 60–64, 2003.
- [8] V. L. Kinnula, C. L. Fattman, R. J. Tan, and T. D. Oury, "Oxidative stress in pulmonary fibrosis: a possible role for redox modulatory therapy," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 172, no. 4, pp. 417–422, 2005.
- [9] D. M. Walters, H. Y. Cho, and S. R. Kleeberger, "Oxidative stress and antioxidants in the pathogenesis of pulmonary fibrosis: a potential role for Nrf2," *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 10, no. 2, pp. 321–332, 2008.
- [10] I. Almdendros, Y. Wang, and D. Gozal, "The polymorphic and contradictory aspects of intermittent hypoxia," *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 307, no. 2, pp. L129–L140, 2014.
- [11] L. Lavie, "Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia – revisited – the bad ugly and good: implications to the heart and brain," *Sleep Medicine Reviews*, vol. 20, pp. 27–45, 2015.
- [12] P. Levy, M. Kohler, M. N. WT et al., "Obstructive sleep apnoea syndrome," *Nature Reviews Disease Primers*, vol. 1, article 15015, 2015.
- [13] V. Pialoux, P. J. Hanly, G. E. Foster et al., "Effects of exposure to intermittent hypoxia on oxidative stress and acute hypoxic ventilatory response in humans," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 180, no. 10, pp. 1002–1009, 2009.
- [14] B. B. Moore and C. M. Hogaboam, "Murine models of pulmonary fibrosis," *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 294, no. 2, pp. L152–L160, 2008.
- [15] M. A. Mouratis and V. Aidinis, "Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin," *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, vol. 17, no. 5, pp. 355–361, 2011.
- [16] N. Randrianarison, C. Clerici, C. Ferreira et al., "Low expression of the β -ENaC subunit impairs lung fluid clearance in the mouse," *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 294, no. 3, pp. L409–L416, 2008.
- [17] C. Planes, N. H. Randrianarison, R. P. Charles et al., "ENaC-mediated alveolar fluid clearance and lung fluid balance depend on the channel-activating protease 1," *EMBO Molecular Medicine*, vol. 2, no. 1, pp. 26–37, 2010.
- [18] J. Zhou, L. Ge, C. Jia et al., "ROS-mediated different homeostasis of murine corneal epithelial progenitor cell line under oxidative stress," *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, p. 36481, 2016.
- [19] C. M. Simbulan-Rosenthal, D. S. Rosenthal, S. Iyer, A. H. Boulares, and M. E. Smulson, "Transient poly(ADP-ribose)ylation of nuclear proteins and role of poly(ADP-ribose) polymerase in the early stages of apoptosis," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 22, pp. 13703–13712, 1998.
- [20] P. Levy, J. L. Pepin, C. Arnaud et al., "Intermittent hypoxia and sleep-disordered breathing: current concepts and perspectives," *The European Respiratory Journal*, vol. 32, no. 4, pp. 1082–1095, 2008.
- [21] B. C. Willis, J. M. Liebler, K. Luby-Phelps et al., "Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor- β 1," *The American Journal of Pathology*, vol. 166, no. 5, pp. 1321–1332, 2005.
- [22] Y. Uzunhan, O. Bernard, D. Marchant et al., "Mesenchymal stem cells protect from hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition," *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 310, no. 5, pp. L439–L451, 2016.
- [23] L. B. Ware and M. A. Matthay, "The acute respiratory distress syndrome," *The New England Journal of Medicine*, vol. 342, no. 18, pp. 1334–1349, 2000.
- [24] E. Hummler and C. Planes, "Importance of ENaC-mediated sodium transport in alveolar fluid clearance using genetically-engineered mice," *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 25, no. 001, pp. 063–070, 2010.
- [25] M. A. Matthay, "Resolution of pulmonary edema. Thirty years of progress," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 189, no. 11, pp. 1301–1308, 2014.
- [26] T. Gille, N. Randrianarison-Pellan, A. Goolaerts et al., "Hypoxia-induced inhibition of epithelial Na⁺ channels in the lung. Role of Nedd4-2 and the ubiquitin-proteasome pathway," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 50, no. 3, pp. 526–537, 2014.
- [27] S. Matalon, R. Bartoszewski, and J. F. Collawn, "Role of epithelial sodium channels in the regulation of lung fluid homeostasis," *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 309, no. 11, pp. L1229–L1238, 2015.
- [28] C. Planes, M. Blot-Chabaud, M. A. Matthay, S. Couette, T. Uchida, and C. Clerici, "Hypoxia and β_2 -agonists regulate cell surface expression of the epithelial sodium channel in native alveolar epithelial cells," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 49, pp. 47318–47324, 2002.
- [29] S. I. Hagiwara, Y. Ishii, and S. Kitamura, "Aerosolized administration of N-acetylcysteine attenuates lung fibrosis induced by bleomycin in mice," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 162, no. 1, pp. 225–231, 2000.
- [30] C. Li, M. M. Wright, and R. M. Jackson, "Reactive species mediated injury of human lung epithelial cells after hypoxia-reoxygenation," *Experimental Lung Research*, vol. 28, no. 5, pp. 373–389, 2002.
- [31] W. Xu, L. Chi, B. W. Row et al., "Increased oxidative stress is associated with chronic intermittent hypoxia-mediated brain

- cortical neuronal cell apoptosis in a mouse model of sleep apnea," *Neuroscience*, vol. 126, no. 2, pp. 313–323, 2004.
- [32] J. Xu, Y. S. Long, D. Gozal, and P. N. Epstein, " β -cell death and proliferation after intermittent hypoxia: role of oxidative stress," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 46, no. 6, pp. 783–790, 2009.
- [33] D. Bouvry, C. Planès, L. Malbert-Colas, V. Escabasse, and C. Clerici, "Hypoxia-induced cytoskeleton disruption in alveolar epithelial cells," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 35, no. 5, pp. 519–527, 2006.
- [34] S. Krick, B. G. Eul, J. Hänze et al., "Role of hypoxia-inducible factor-1 α in hypoxia-induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 32, no. 5, pp. 395–403, 2005.
- [35] Y. Tagawa, N. Hiramatsu, A. Kasai et al., "Induction of apoptosis by cigarette smoke via ROS-dependent endoplasmic reticulum stress and CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP)," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 45, no. 1, pp. 50–59, 2008.
- [36] R. K. Braun, O. Broymann, F. M. Braun et al., "Chronic intermittent hypoxia worsens bleomycin-induced lung fibrosis in rats," *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 2017.

I.2 Conclusion de l'article 1

Les résultats obtenus dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la BLM nous ont permis de mieux comprendre l'impact de l'HI dans un contexte de fibrose pulmonaire. Cette étude suggère que l'HI rencontrée dans le SAOS pourrait être un facteur aggravant de la FPI chez les patients en exacerbant l'inflammation pulmonaire et la fibrose pulmonaire mise en évidence par une augmentation du taux de collagène dans le poumon.

Cependant, les mécanismes moléculaires sous-jacents restant encore mal connus, il est primordial d'identifier les médiateurs moléculaires impliqués. En effet, ceci permettrait de mieux comprendre le rôle du SAOS dans la survenue, la progression et/ou le maintien de la FPI et ainsi, à plus ou moins long terme, permettre une meilleure prise en charge de ces patients.

Pour tenter de répondre à cette question, nous avons réalisé une seconde étude qui avait pour but d'identifier les stress moléculaires induits en réponse à l'HI et qui pourraient être responsables de cet effet aggravant. Compte tenu des éléments de la littérature présentés dans l'introduction, nos travaux se sont portés sur des acteurs clés communs tel que le stress du RE.

Chapitre II

II Mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet aggravant de l'HI sur la sévérité de la fibrose pulmonaire

Le but de ce travail était d'étudier et d'identifier les facteurs moléculaires communs à l'HI et la fibrose pulmonaire et pouvant être responsables de cet effet aggravant de l'HI. Pour cela, dans cette seconde partie nous avons réalisé :

- 1) Une analyse de l'expression de marqueurs de stress du RE dans les prélèvements pulmonaires de souris issues de la première étude (J4, J8 et J21) ;
- 2) Une analyse de l'expression de marqueurs de stress du RE et des facteurs pro-fibrosants dans les prélèvements pulmonaires d'une nouvelle série sacrifiée à un temps intermédiaire (J14);
- 3) Une évaluation de l'impact d'un pré-conditionnement à l'HI sur l'expression des marqueurs de stress du RE et les facteurs pro-fibrosants ;
- 4) Une recherche d'autres marqueurs de stress qui pourraient jouer un rôle clé dans les effets aggravants de l'HI.

II.1 Effets de l'HI et/ou de la BLM sur l'expression de marqueurs du stress du RE à J4, J8 et J21

Les échantillons analysés sont issus de la première étude (Gille et al. 2018) qui a montré une aggravation de la fibrose pulmonaire par l'HI. Les souris ont été instillées à la BLM (3.5UI/g) ou au saline à J0, puis exposées à de l'HI (40 cycles/h, 8h/jour, nadir: 6% O₂) ou à de l'AI à J1. Les souris ont été sacrifiées à J4, J8 et J21. L'analyse de l'expression des marqueurs de stress du RE a été effectuée par western blot (WB) sur des lysats de poumon total à différents temps d'exposition (J4, J8, J21).

Nos résultats (figure 15) montrent que l'instillation de BLM induit une augmentation significative de l'expression d'ATF6 et une tendance à l'augmentation de l'expression de CHOP et de XBP1s à J8 comparativement au groupe contrôle (Saline-AI). Cependant, aucun effet de la BLM à J4 et J21 n'a été observé par rapport au groupe contrôle (Saline-AI).

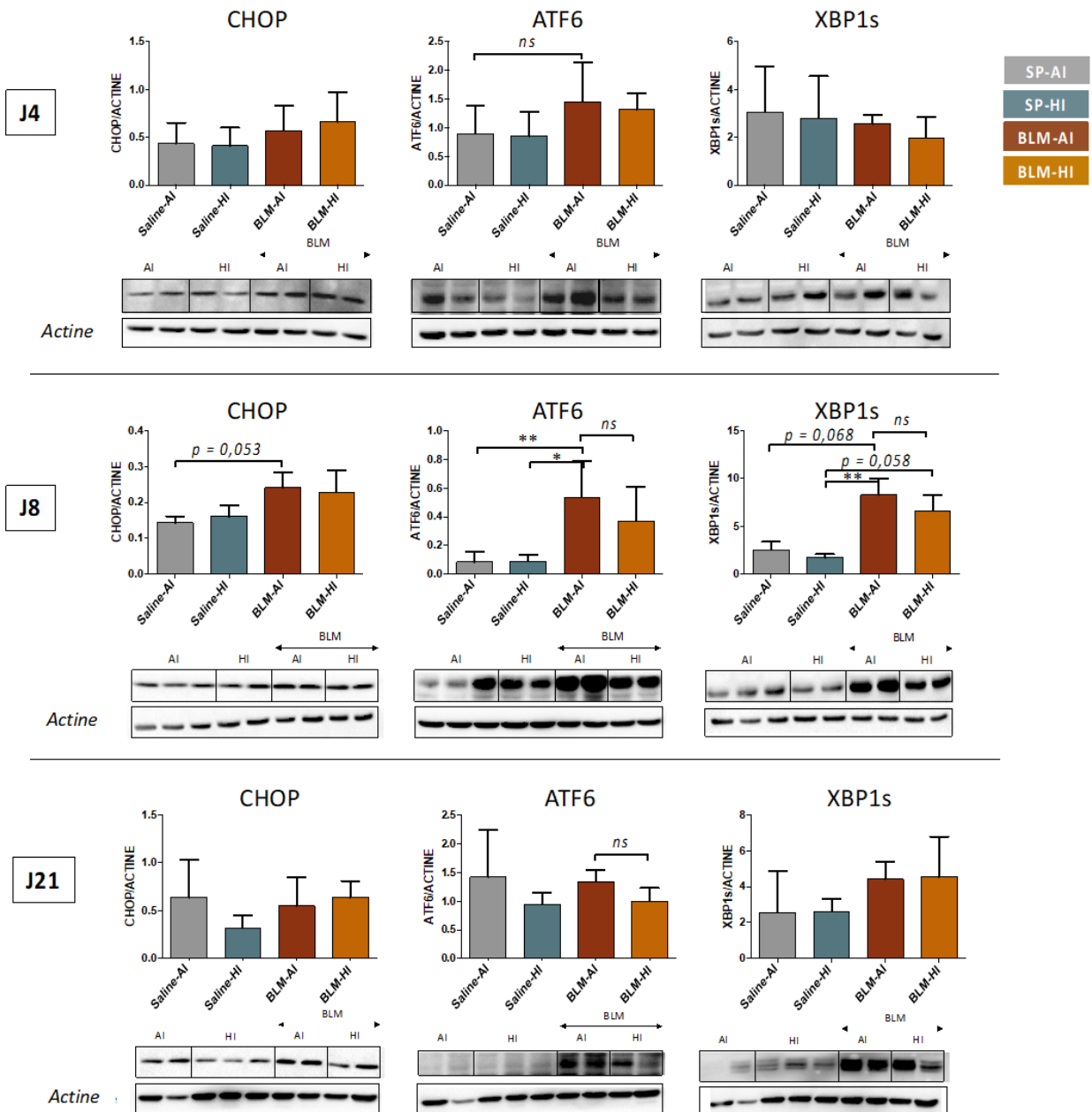


Figure 15: Analyse de l'expression protéique des marqueurs de stress du RE (CHOP, ATF6 et XBP1 épissé) par WB à J4, J8 et J21.

Les souris ont reçu une instillation intra-trachéale de BLM à 3.5UI/g ou de saline à J0 puis exposées à de l'HI (40 cycles/heure; 8h/jour; nadir: 6% O₂) ou à de l'AI à J1. Les prélèvements de poumons ont été ensuite effectués à J4, J8 et J21. Analyse par WB de l'expression des marqueurs de stress du RE (CHOP, ATF6 et XBP1s) à J4, J8 et J21, effectuée sur des lysats de protéines totales du lobe inférieur du poumon droit. Pour chaque marqueur un blot représentatif ainsi qu'une quantification (histogramme) de l'expression des protéines, rapportée à l'actine ont été représentés. Dans chaque groupe, n = 4 à 7 souris. Les données brutes ont été soumises au test non paramétrique « Kruskal-Wallis ». XBP1s = XBP1 épissé; *: p < 0,05; **: p < 0,01; ns: différence non significative. (D'après Juliette BRAVAIS- Master 2)

L'exposition à l'HI n'a pas d'effet sur l'expression des marqueurs de stress du RE (CHOP, ATF6 et XBP1s) comparativement au contrôle exposé à de l'AI (groupe Saline-AI *versus* groupe Saline-HI) à J4, J8 et J21. De plus, chez les souris ayant reçu de la BLM, il n'y a pas d'effet aggravant de l'exposition à l'HI sur l'expression de ces marqueurs (groupe BLM-HI *versus* groupe BLM-AI) à différents temps J4, J8 et J21. D'autres marqueurs de stress du RE (ATF4, GRP78, GRP75) ont été également analysés et leur expression n'est pas été modifiée de façon significative entre les différentes conditions.

Conclusion partie II-1

Dans nos conditions expérimentales, nous avons observé un effet de la BLM sur l'induction de l'expression des marqueurs de stress du RE uniquement à J8 et cet effet n'est plus significatif à J21. Cependant, nous n'avons observé ni d'augmentation du stress du RE dans le groupe BLM-HI par rapport à BLM-AI, ni d'effet de l'HI seule dans ces conditions expérimentales.

Le fait de ne plus observer de variation de l'expression des marqueurs du stress du RE à J21 nous laisse suggérer que le stress du RE est induit en fin de phase inflammatoire et en début de la phase fibrosante. En effet, selon la cinétique du développement de la fibrose pulmonaire dans le modèle de BLM, l'installation de la fibrose débiterait à partir de J8 vers une fibrose bien installée au bout de 14 jours puis vers une phase terminale de la fibrose à 21 jours ; au-delà de cette phase la fibrose serait résorbée. Par conséquent, les acteurs moléculaires impliqués dans le processus pro-fibrosant pourraient être activés dans la période entre J8 et J14. Nous avons donc supposé que J21 pourrait être un temps relativement tardif pour l'analyse de ces marqueurs moléculaires.

De plus, les effets de l'HI sur l'expression des marqueurs de stress du RE ont été observés dans le cœur au bout de 14 jours d'exposition (Belaidi et al. 2016). En se basant sur ces différentes hypothèses et les données de littérature, nous avons décidé d'expertiser ces marqueurs à un temps intermédiaire (J14). Ce temps n'ayant pas été réalisé dans la première étude, une nouvelle série expérimentale a été initiée.

II.2 Impact de l'exposition à l'HI pendant 14 jours sur la sévérité de la fibrose pulmonaire et l'expression des marqueurs de stress du RE

Les souris ont été instillées à la BLM (3.5UI/g) ou de saline à J0, puis exposées à de l'HI (30 cycles/h, 8h/jour, nadir: 7% O₂) ou à de l'AI à J1. Les souris ont été sacrifiées à J14.

II.2.1 Effet de l'HI et/ou de la BLM sur la survie des animaux

La BLM a induit d'une manière significative une mortalité des souris par rapport au groupe contrôle (taux de mortalité est de 43% dans le groupe BLM-AI versus 0% dans le groupe Saline-AI). L'exposition à l'HI n'a pas induit une mortalité des souris dans le groupe Saline-HI. Dans le cas de double agression (groupe BLM-HI) nous n'avons pas un effet aggravant de l'HI sur la mortalité induite par la BLM (groupe BLM-AI). Par ailleurs, le groupe de souris exposées à de l'HI présente une mortalité plus précoce (Figure 16).

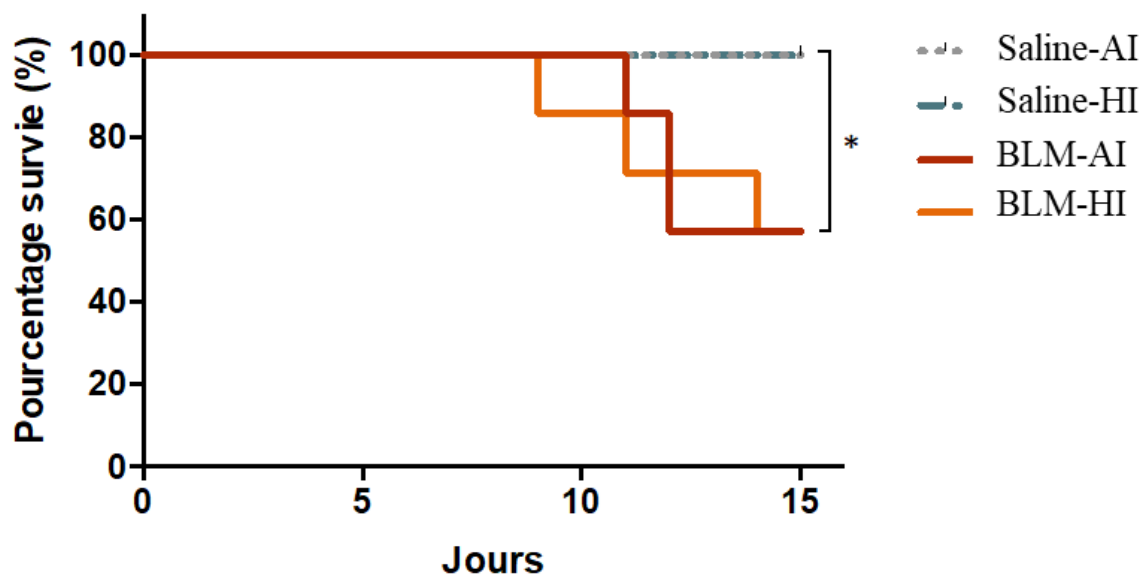


Figure 16: Courbe de survie estimée selon la méthode de Kaplan Meier.

Les souris ont reçu une instillation intra-trachéale de BLM à 3.5UI/g ou de saline à J0 puis exposées à de l'HI (30 cycles/heure; 8h/jour ; nadir : 7% O₂) ou à de l'AI à J1. Le statut vital des animaux a été relevé quotidiennement. Dans chaque groupe, n = 4 à 9 souris. * : p < 0,05 selon le test de Logrank. (D'après le Master 2 de Juliette BRAVAIS)

II.2.2 Effet de l'HI et/ou de la BLM sur les dépôts de collagène et l'expression de marqueurs pro-fibrosants

L'analyse de l'expression des ARNm des marqueurs pro-fibrosants (*Collagène 1a1*, *Collagène 3a1*, *Fibronectine*, *Pdgf-β*, *Cxcl12* et *Serpine 1*) dans le lysat de poumon total, montre une augmentation significative de tous ces marqueurs en réponse à la BLM (groupe BLM-AI *versus* groupe Saline-AI) (Figure 17). Cependant, l'exposition à l'HI seule n'augmente pas l'expression des marqueurs pro-fibrosants dans le groupe Saline-HI et elle n'exacerbe pas l'expression de ces marqueurs dans le groupe BLM-HI comparativement au groupe BLM-AI (Figure 17).

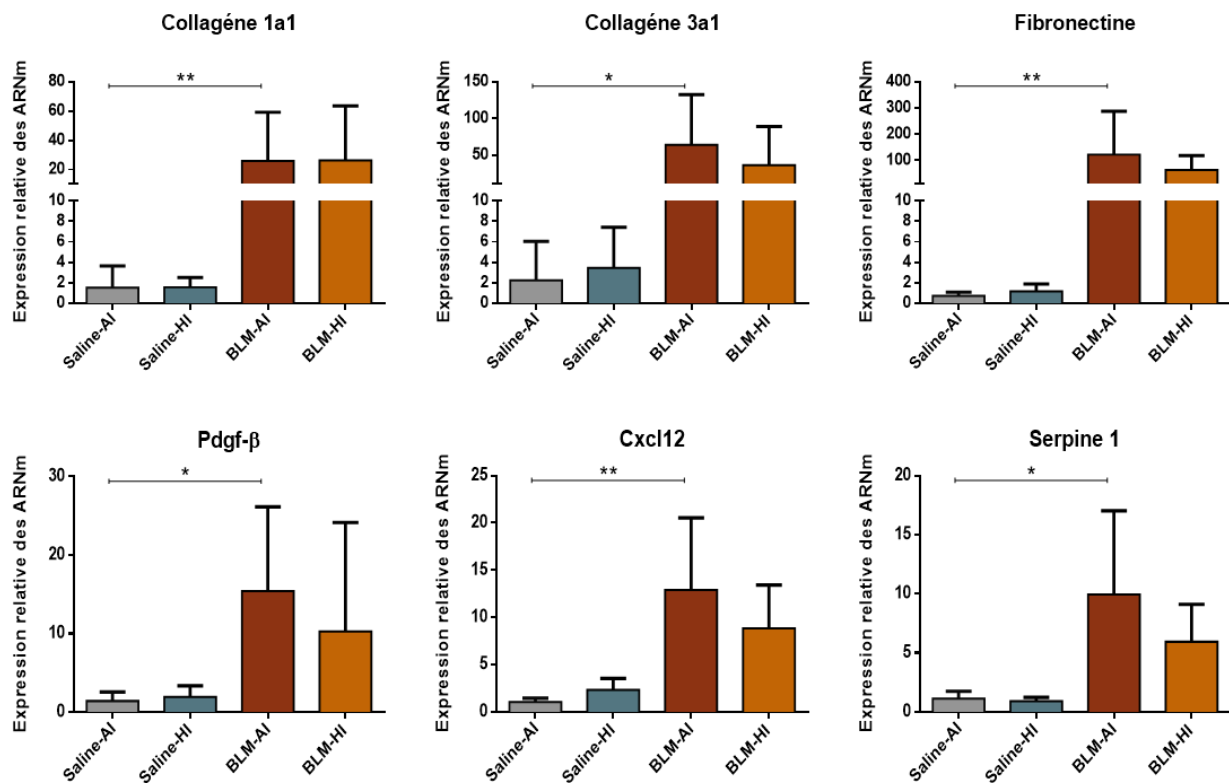


Figure 17: Analyse de l'expression de l'ARNm des marqueurs pro-fibrosants par RT-qPCR à J14.

Les souris ont reçu une instillation intra-trachéale de BLM à 3.5UI/g ou de saline à J0 puis exposées à de l'HI (30cycles/heure; 8h/jour; nadir: 7% O₂) ou à de l'AI à J1. Les prélèvements des poumons ont été effectués à J14 et la quantification de l'expression des ARNm par RT-qPCR a été réalisée sur des extraits d'ARN totaux du lobe supérieur du poumon droit. Les histogrammes correspondent à la quantification de l'expression des ARNm des facteurs pro-fibrosants, avec dans chaque groupe, n = 4 à 7 souris. Les données brutes ont été soumises au test non paramétrique « Kruskal-Wallis »; *: p < 0,05; **: p < 0,01. (D'après Juliette BRAVAIS ANNEE, Master 2)

Au niveau histologique, nous avons observé que l'instillation de BLM a induit une fibrose caractérisée par des dépôts de collagène au niveau pulmonaire, avec une répartition hétérogène au sein de la même coupe ainsi d'une coupe à l'autre. De plus, sur ces petits effectifs (n=4), la fibrose pulmonaire ne semble pas plus sévère dans le groupe ayant été exposé à l'HI (BLM-HI) versus le groupe BLM-AI (Figure 18).

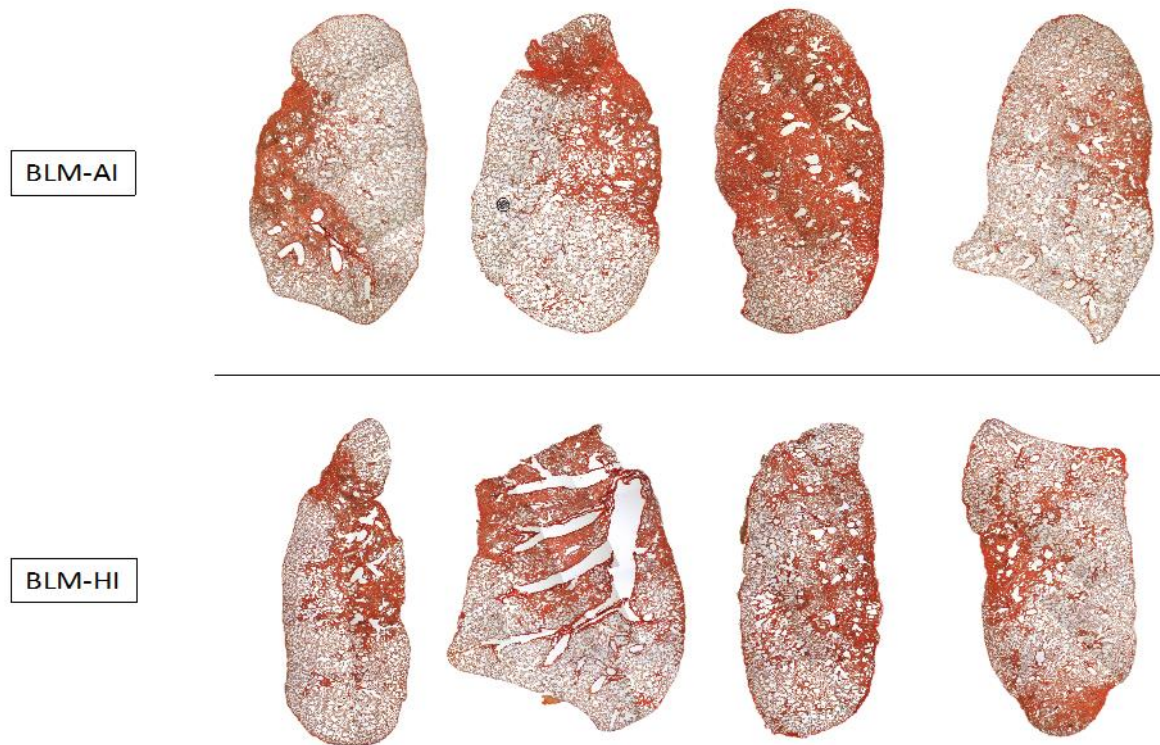


Figure 18: Cartographies de coupes de poumons gauches entiers de souris avec une coloration de fibres de collagène au rouge Sirius à J14.

Les souris ont reçu une instillation intra-trachéale de BLM à 3.5UI/g ou de saline à J0 puis exposées à de l'HI (30 cycles/heure; 8h/jour ; nadir : 7% O₂) ou à de l'AI à J1. Les prélèvements des poumons ont été effectués à J14. Des coupes de 5µm d'épaisseur ont été réalisées au microtome à partir du poumon gauche préalablement fixé au PFA 4% et inclus dans des blocs de paraffine. Après déparaffinage et réhydratation des tissus, une coloration des fibres de collagène au rouge Sirius a été effectuée. Les cartographies du poumon gauche entier ont été réalisées avec le logiciel «HistoLab Image Analysis Software ». La première ligne représente les poumons du groupe BLM-AI (n=4) et la deuxième ligne ceux du groupe BLM-HI (n=4). (D'après Juliette BRAVAIS ANNEE, master 2)

II.2.3 Effet de l'HI et/ou de la BLM sur l'expression de marqueurs de stress du RE :

L'analyse de l'expression de marqueurs de stress du RE dans le lysat de poumon montre une tendance à l'augmentation de l'expression de XBP1s et une augmentation significative de l'expression de CHOP et d'ATF6 chez le groupe de souris BLM-AI comparativement au groupe contrôle Saline-AI (Figure 19).

L'exposition à de l'HI seule ne semble pas modifier l'expression des marqueurs de stress du RE par rapport au groupe contrôle (groupe Saline-HI *versus* Saline-AI). Ainsi, l'HI n'exacerbe pas l'expression des marqueurs de stress du RE induits par la BLM (groupe BLM-HI *versus* groupe BLM-AI) (Figure 19). D'autres marqueurs (ATF4, GRP78, GRP75) ont été également étudiés et ne sont pas modifiés de façon significative entre les différentes conditions

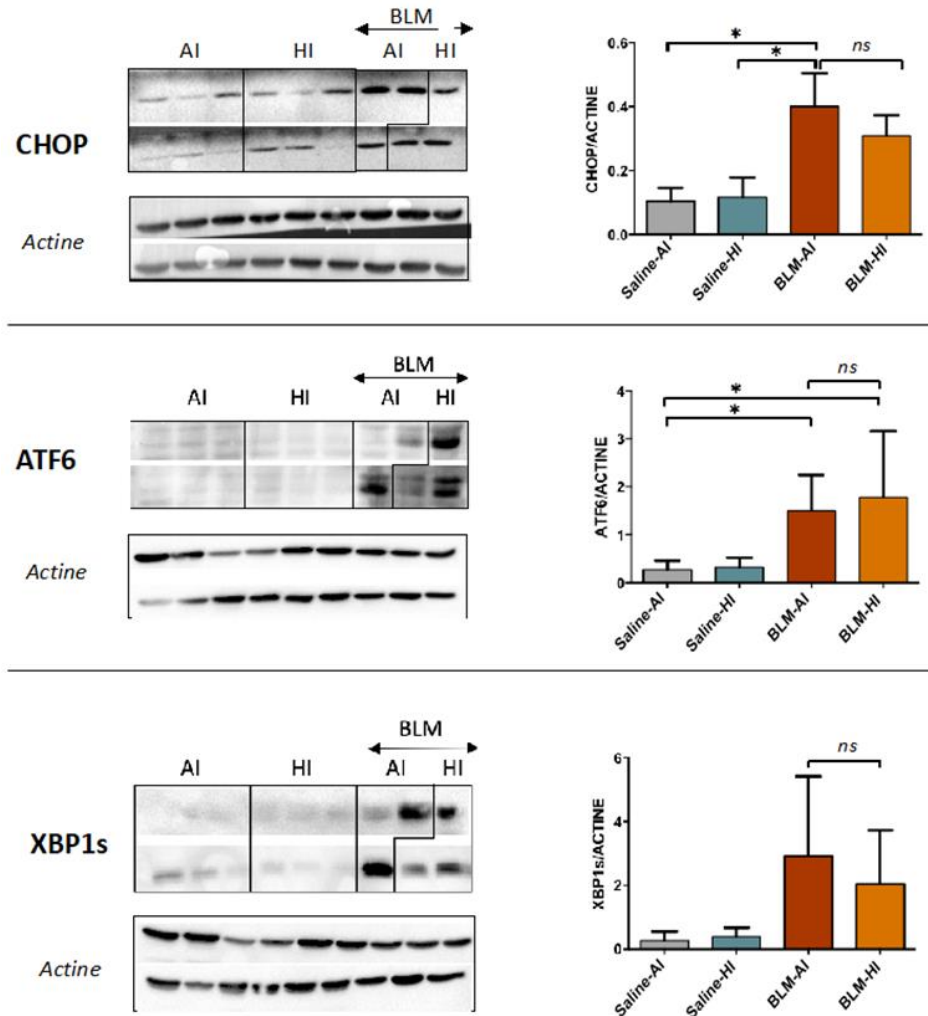


Figure 19: Analyse de l'expression protéique des marqueurs de stress du RE (CHOP, ATF6 et XBP1 épissé) par WB à J14.

Les souris ont reçu une instillation intra-trachéale de BLM à 3.5UI/g ou de saline à J0 puis exposées à de l'HI (30 cycles/heure; 8h/jour ; nadir : 7% O₂) ou à de l'AI à J1. Les prélèvements de poumons ont été ensuite effectués à J14. Analyse par WB de l'expression des marqueurs de stress du RE (CHOP, ATF6 et XBP1s) à J14, effectuée sur des lysats de protéines totales du lobe inférieur du poumon droit. Pour chaque marqueur un blot représentatif (à gauche) ainsi qu'une quantification (à droite) de l'expression des protéines, rapportée à l'actine ont été représentés. Dans chaque groupe, n = 4 à 9 souris. Les données brutes ont été soumises au test non paramétrique « Kruskal-Wallis »; * : p < 0,05; ns : différence non significative. (D'après le Master 2 de Juliette BRAVAIS)

Conclusion Partie II-2

L'analyse histologique et moléculaire des facteurs pro-fibrosants n'a pas révélé de différence en terme de sévérité de la fibrose pulmonaire entre le groupe de souris exposé à l'HI (BLM-HI) et le groupe exposé à l'AI (BLM-AI). L'analyse de l'expression des marqueurs du stress du RE a montré une augmentation par la BLM à J14 (similaire à l'effet observé à J8). Cependant, dans ces conditions expérimentales, l'exposition à l'HI seule n'a pas induit d'effets sur l'expression des marqueurs de stress du RE et ne semble pas induire d'effet supplémentaire dans le groupe ayant subi une double agression (BLM-HI) comparativement au groupe BLM-AI.

L'absence d'effet de l'HI seule ou de son effet aggravant sur l'expression des marqueurs de stress du RE nous a conduit à émettre différentes hypothèses pour tenter de trouver une explication de l'ensemble des résultats obtenus. Ces hypothèses sont les suivantes :

- 1) Les temps d'exposition à l'HI analysés dans notre étude (J4, J8, J14 et J21) ne seraient pas suffisants pour une induction d'un stress du RE au niveau pulmonaire ;
- 2) L'effet potentiellement aggravant de l'HI pourrait être masqué par une instillation simultanée de BLM avec l'exposition à l'HI ;
- 3) Un effet majeur de BLM, dû à la forte dose de BLM utilisée qui pourrait masquer un éventuel effet aggravant de l'HI au niveau moléculaire ;
- 4) Le stress du RE n'est pas majoritairement impliqué et l'effet aggravant de l'HI est la conséquence de l'activation d'autres voies de signalisations..

Afin de vérifier ces hypothèses, nous avons modifié notre protocole expérimental avec :

- 1) Un temps d'exposition à l'HI plus long (28 jours) ;
- 2) Un préconditionnement à l'HI pendant 14 jours avant l'instillation de la BLM ;
- 3) Dans ce protocole de préconditionnement, nous avons testé deux doses différentes de BLM : une dose forte à 3.5UI/g et une dose faible à 2UI/g.

II.3 Impact de l'exposition à l'HI sur les mécanismes moléculaires de la fibrogénèse induite par la BLM

Sleep Apnea in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: a molecular role for intermittent hypoxia.

L. Haine, J. Bravais, C-Y. Yegen, JF. Bernaudin, D. Marchant, C. Planès, N. Voituron and E. Boncoeur

II.3.1 Résumé de l'article 2

Introduction: La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une pathologie sans traitement curatif caractérisée par l'accumulation de tissu conjonctif pulmonaire cicatriciel conduisant à une insuffisance respiratoire. Un stress du réticulum endoplasmique (RE) pourrait contribuer au dysfonctionnement des cellules épithéliales alvéolaires et à la fibrogénèse. En outre, une forte prévalence du syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) a été rapportée chez les patients notamment dans les formes incidentes de FPI. Le SAOS est défini par l'obstruction répétée des voies aériennes supérieures pendant le sommeil induisant des épisodes d'hypoxie-réoxygénation ou « Hypoxie Intermittente » (HI). Nous avons montré dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (BLM) que l'exposition à l'HI conduisait à une surmortalité et une aggravation de la fibrose *via* un mécanisme moléculaire encore inconnu. L'objectif est ici de déterminer si cette aggravation est secondaire à une induction du stress du RE par l'HI.

Méthodes: Des souris mâles C57BL6 ont reçu une instillation intratrachéale de BLM ou de sérum physiologique (saline) et ont été exposées soit à de l'HI (30 cycles/h ; 8h/jour ; nadir : 7% O₂) soit à de l'air intermittent (AI) selon deux protocoles différents :1) Une instillation de 3.5 UI/g de BLM ou de saline a été effectuée à J0 avec une exposition simultanée à l'HI ou à l'AI à J1. Les poumons ont été prélevés à J14. 2) Une instillation de 3.5 UI/g ou de 2UI/g de BLM ou de saline a été effectuée après une préexposition à l'HI ou à l'AI pendant 14 jours. Les animaux ont été ensuite réexposés à l'HI ou à l'AI pendant 14 jours. Le poids des souris ainsi que leur survie ont été relevés quotidiennement. À J28, les animaux ont été sacrifiés et les poumons ont été prélevés. Les marqueurs de stress du RE ont été étudiés par western blot, l'expression des collagènes 1 & 3 par coloration au Trichrome de Masson et RT-qPCR, l'expression des facteurs pro-fibrosants par RT-qPCR.

Résultats: Pour les deux doses utilisées, la BLM induit une fibrose pulmonaire associée à une augmentation des marqueurs de stress du RE et des facteurs pro-fibrosants, mais seule la forte dose conduit à une perte significative du poids des animaux et une augmentation de la mortalité. Seule, l'exposition à l'HI conduit à un dépôt de collagène dans le parenchyme pulmonaire et à une augmentation significative de l'expression des facteurs pro-fibrosants et des marqueurs de stress du RE. Pour les deux doses de BLM utilisées, le pré-conditionnement à l'HI engendre une aggravation de la fibrose pulmonaire. Cependant, alors qu'aucun effet moléculaire expliquant cette aggravation n'est identifiable pour la forte dose de BLM, on observe une exacerbation de l'expression des marqueurs de stress du RE et des facteurs pro-fibrosants lorsqu'une dose faible de BLM a été utilisée.

Conclusion : L'exposition préalable à l'HI augmente la sévérité de la fibrose pulmonaire. Ce phénomène pourrait résulter au moins en partie d'une exacerbation du stress du RE et de l'expression des facteurs pro-fibrosants.

Sleep Apnea in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: a molecular role for intermittent hypoxia

Authors' names and affiliation:

L. Haine¹, J. Bravais¹, C-Y. Yegen¹, JF. Bernaudin^{1,2}, D. Marchant, C¹. Planès^{1,2}, N. Voituren^{1,3} and E. Boncoeur¹.

¹ Laboratoire Hypoxie & Poumon, UMR INSERM U1272, Université Sorbonne Paris Nord. Bobigny, France

² Hôpital Avicenne, Assistance Public, Hôpitaux de Paris, France

³ Département STAPS, Université Sorbonne Paris Nord, Bobigny, France

Short tittle: ER stress in OSA and IPF

Keywords: Obstructive sleep Apnea, Idiopathic Pulmonary Fibrosis, ER stress, Intermittent Hypoxia

Corresponding author: [Dr Emilie Boncoeur \(emilie.boncoeur@sorbonne-paris-nord.fr\)](mailto:emilie.boncoeur@sorbonne-paris-nord.fr), Université Sorbonne Paris Nord, UFR SMBH, Laboratoire "Hypoxie & Poumon", UMR INSERM U1272, 93017 Bobigny, France.

Abstract

Background: High prevalence of obstructive sleep apnea syndrome (OSA) is reported in incident forms of idiopathic pulmonary fibrosis. Chronic intermittent hypoxia (IH), the major pathogenic element of OSA, worsens experimental lung fibrosis. Here we investigate in bleomycin (BLM)-induced lung injury, the molecular mechanisms implicated in the pathogenic impact of IH on pulmonary fibrosis.

Methods: Two experimental protocols were conducted in C57BL/6J mice: 1) Animals received intratracheal BLM or saline and were exposed to IH (30 cycles/hour; FiO₂ nadir: 6%; 8 hours/day) or intermittent air (IA) for 14 days or 2) two distinct doses of BLM were administered on day 14 following IH or IA exposure, and subsequently, the mice were exposed to IH or IA for an additional 2 weeks. Weight loss and survival were monitored daily, and lungs were extracted at the end of the experimental protocol.

Results: 28 days IH exposition alone induced collagen deposition, and increased expression of pro-fibrosis and ER stress markers in whole lung extract. IH worsening effect of BLM-induced fibrosis is observed when low dose of BLM is administered following 14 days IH exposure. In the low dose BLM-treated group, IH induced more collagen deposition in lung tissues than BLM/IA, and significantly increased pro-fibrotic and ER-stress markers. Indeed, col1a, col3a, CXCL12 and Serpin1 mRNA expression were significantly increased following IH with 2UI/kg BLM treatment. Whereas IH induced significantly the expression of ATF6, ATF4, GRP75 and CHOP ER stress markers, only the expression of XBP-1 and ATF6 (induced by BLM treatment) were significantly modulated by the pre-exposition to IH.

Conclusion: These results show that IH worsens mice lung fibrosis induced by bleomycin, through a mechanism implicated at least in part the induction of ER stress markers.

Introduction

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is the most common form of interstitial lung disease in adults' (Barratt et al., 2018; Cottin, 2017; Selman et al., 2001). It is now well accepted that the pathogenesis of the disease would be related to the recurrent micro-aggressions of the alveolar epithelium by various endogenous and exogenous factors (viruses, cigarette smoke, gastroesophageal reflux, pollutants, etc.). These aggressions lead to the deregulation of epithelial-mesenchymal interaction and to an aberrant repair of the injured epithelium (Dempsey, 2006; Selman et al., 2001). Alveolar epithelial cells (AEC) phenotype and function is disrupted and fibroblasts proliferation is enhanced. AEC undergo apoptosis (Mermigkis et al., 2001; Plataki et al., 2005) and/or epithelio-mesenchymal transition (EMT) (Goldmann et al., 2018; Salton et al., 2019; Willis et al., 2005), and fibroblasts are activated into myofibroblasts. A characteristic micro-environment is formed, principally made of pro-fibrotic mediators (TGF β , PDGF, CTGF ...etc) (Allen and Spiteri, 2002). Accumulation of extracellular matrix (ECM) is then observed, which lead to parenchymal rigidity and contribute to alteration of lung function (Selman et al., 2001) .

Recently, several studies reported the prevalence of obstructive sleep apnea syndrome (OSA) in IPF patient (Gille et al., 2017; Lancaster et al., 2009), and the use of OSA therapy by continuous positive airway pressure (CPAP) is effective and improved the daily living activities and quality of sleep in patients with IPF (C et al., 2015; Mermigkis et al., 2013). OSA consists of repeated upper airway obstructions leading transient reduction in inspiratory air flow caused by increased resistance in the upper airways (Guilleminault et al., 1993; Young et al., 1993) These obstructions induce hypercapnia and hypoxemia / haemoglobin desaturation (Badran et al., 2014). The activation of peripheral/central chemoreflex arc during these episodes leads to micro-arousals, sleep fragmentation and increase in ventilation (Andrade et al., 2018). Thus, OSA is characterized by cyclic episodes of hypoxia-reoxygenation named "intermittent hypoxia, (IH)" which is particularly deleterious due to the generation of oxidative stress and inflammation response and considered as a key factor responsible in related-comorbidities (Dewan et al., 2015; Sforza and Roche, 2016). However, little is known about the time sequence of OSA' onset as compared to IPF (Gille et al., 2017).

Interestingly, IH exposure, as the pathogenic element of OSA, negatively impact LPS-induced ALI (Kim et al., 2020) and we and other showed that IH worsens the severity of lung fibrosis on rodent model of Bleomycin (BLM)-induced lung fibrosis (Braun et al., 2018; Gille et al., 2018). However, the impact of OSA in IPF development or evolution is unclear (Lancaster et al., 2009), and the molecular mechanisms involved in these effects are poorly understood.

Among the molecular mechanism that may be involved both in the pathogenesis of IPF and intermittent hypoxia (a major element of OSA), endoplasmic reticulum (ER) stress seems to play a

major role. ER stress markers have been found overexpressed in IPF biopsies (Korfei et al., 2008) as well as in mouse models of Bleomycin-induced lung fibrosis (Delbrel et al., 2018; Hsu et al., 2017), but also in the heart and lung of mice exposed to intermittent hypoxia (Belaidi et al., 2016; Shi et al., 2020). ER is involved in calcium homeostasis and in the synthesis, maturation and folding of proteins. When the homeostasis is disturbed, following an accumulation of Ca^{2+} or improperly folded proteins, a specific signalling pathway called the Unfolded Protein Response (UPR) is activated monitoring the ER stress. Three essential branches of the UPR (IRE1- XBP1), (PERK-eIF- α) and ATF6 are initiated by the release and the shifting of the chaperone proteins GRP78 on unfolded proteins (Tanjore et al., 2013), to moderate the overall proteins synthesis, promote their degradation, or induce apoptosis or change in cells phenotype by EMT (Delbrel et al., 2019, 2018; Szegezdi et al., 2006; Tanjore et al., 2011). Interestingly, ER stress-induced lung apoptosis and fibrosis has recently been pointed out in lung of mice exposed to IH (Shi et al., 2020).

In this study, we investigate the molecular mechanism implicated in the worsening effect of IH on the lung fibrosis. We show that IH increases ECM deposition, increase the expression of pro-fibrotic factors, and we show that IH preconditioning, before the instauration of lung fibrosis, worsens the expression of ER stress markers.

Materials & methods

Ethical approval

Experimental protocol was approved by the Ethics committee Charles Darwin, done in accordance with European community's council directive 2010/63/EU for animal care, and conducted in accordance with French laws for animal care (APAFIS #18309-2019010316127879 v16).

Animals

Experiments were performed in ninety-one C57BL/6J male mice (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France), aged around 8 weeks old. All Animals were housed in standard conditions in a 12h/12h light/dark cycles, at an ambient temperature of 20-22°C, and had ad libitum access water and food.

Lung fibrosis induction

As previously described (Gille et al., 2018), lung fibrosis was induced by a single intra-tracheal instillation of Blemomycin (BLM, bellon – Sanofi laboratory) at 3.5 IU/g or 2 IU/g in 100 µl of saline. Control group was instilled with 100 µl of saline. The same qualified experimenter always performed instillations. Weight and survival were controlled daily. As weight loss was an indicator of intra-tracheal BLM instillation success, mice without weight loss were excluded from the study.

Experimental design

After BLM or saline instillation, mice were exposed to intermittent hypoxia (IH) or intermittent air (IA) depending on two protocols (Figure1).

Protocol I: BLM (3.5 IU/g) or saline instillation was performed at day 0 (d0). Then, mice were exposed to IH or IA at d1 and were sacrificed 2 weeks later (d15). Four experimental groups were formed: Saline/IA; Saline/IH 14d; BLM (3.5 IU/g) /IA and BLM (3.5 IU/g) /IH 14d.

Protocol II: mice were exposed to IH or IA during 14 days, and then instilled with BLM (3.5 IU/g or 2 IU/g) or saline. Mice were sacrificed 2 weeks later (d28). Six experimental groups were formed: Saline/IA, Saline/IH 28d, BLM (3.5 IU/g)/IA and BLM (3.5 IU/g) /IH 28d, BLM (2 IU/g) /IA and BLM (2 IU/g) /IH 28d.

Intermittent hypoxia exposure

As previously described (Gille et al., 2018), mice were placed in a customized plexiglas chamber (Ruskinn) associated with an automated nitrogen/air delivery system (Iconic, Ruskin). Oxygen level was permanently monitored and IH was achieved by adding nitrogen or oxygen in the chamber. The fraction of inspired oxygen (FiO₂) varies from 21 % to 7%. In order to be as close as possible to the kinetics observed in OSA (Pun, 2020), the nadir was reached by adding nitrogen slowly (around 58 sec) and the resaturation was rapid through oxygen flushing (around 26 sec). Mice were exposed for 30 cycles/hour, 8 hours/day (during their sleep period) for 14 (protocol 1) or 28 (protocol II) days. Control animals were exposed to IA in an identical chamber flushed with the same alternating period with air.

Lung extraction

Mice were deeply anesthetized with intra-peritoneal ketamine/xylazine injection (100 mg/kg and 20 mg/kg respectively) and were sacrificed by section of the abdominal aorta. In order to access to the

lung, trachea was cannulated and then, a thoracotomy was performed. Lung was rinsed by an injection of physiological saline through the pulmonary artery. After that, right pulmonary lobes (superior, middle, inferior and post-caval lobes) were isolated through a ligation to the hilum to prevent the passage of the instilled products. The left lobe was inflated and fixed with 4% paraformaldehyde at a pressure of 20 cm H₂O through the cannula. Heart and lungs were removed en bloc. The right lung lobes were separated, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 ° C for RNA and Proteins assays. The left lobes was placed in 20ml 4% paraformaldehyde for 24 hours and then embedded in paraffin. Sections were cut at 5µm thickness for histological staining.

Histological staining

Left pulmonary lobe sections were deparaffinised with xylene, rehydrated and rinsed before Hematoxylin – eosin (HE) or Masson's trichrome (MT) staining. For HE staining, lung sections were stained with Hematoxylin (REF du produit, 10 min), embedded in 80% ethanol (5min) and then incubated with alcoholic eosin (REF du produit, 2 min). For MT staining, lung sections were incubated with phosphomolybdic/phosphotungstic acid solution (5 min), stained with aniline blue solution (5min), and then rinsed with acetic acid solution (2 min). After HE or MT staining process, sections were washed, mounted, dehydrated with Ethanol, cleared with xylene and coverslipped using histological mounting medium for microscopic analysis.

Quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction

Total RNA was isolated from right lung tissues (superior lobe) using TRIzol reagent protocol (Thermoscientific). 1µg of mRNA was used to synthesize cDNA using Maxima first strand cDNA synthesis kit for RT-qPCR (Thermoscientific) according to the manufacturer's instructions.

Resulting cDNA samples were diluted to 1/10^e and amplified by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) using SYBR Green (Absolute SYBR Green Rox Mix; Thermo Scientific) with specific genes primers designed to have a 25–30 cycle threshold values (Table 1).

As an internal control, 18s was used to verify the equality of cDNA quantity in each condition. Relative quantification of gene expression was performed using the 2^{-ΔΔCt} method reported to basal condition.

Lung protein extraction and immunoblotting analysis

Total proteins were isolated from right lung tissues (inferior lobe). Lung was homogenized on ice using an Ultra-Turrax homogenizer in RIPA protein extraction buffer (50 mM TRIS-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate with adjusted pH 3.7) supplemented with Complete Protease Inhibitor Cocktail (Thermoscientific). Proteins concentration was determined using BCA kit (Thermoscientific) according to the manufacturer's instructions.

Forty micrograms (40 µg) of proteins were used for western blotting according to standard procedures. Briefly, proteins were electrophoresed in denaturised conditions (SDS-PAGE), transferred to a nitrocellulose membrane and blocked 1 h at room temperature in 0.1% TBS-Tween solution supplemented with 5% fat free milk. Membranes were then blotted at 4°C overnight with specific primary antibodies (Table 2). Protein ratios or expression levels were normalized to β-actin protein expression level, used as an equal loading control.

Evaluation of caspase 3/7 activity

Apoptosis induction was quantified by the measurement of caspase 3/7 relative activity using Caspase-Glo 3/7[®] assay (Promega) according to the manufacturer's instruction. 20µl of reagent containing a proluminescent caspase 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.

Data and statistical analysis

In our study, all data and statistical analysis were realized using GraphPad Prism[®] software. Results are presented as mean ± standard deviations (SD). D'Agostino-Pearson omnibus normality test was realised to assess the distribution of the data. Survival rate was estimated by the method of Kaplan-Meier and compared by the log-rank test.

Repeated measures ANOVA with Greenhouse-Greisser correction followed by Bonferroni's multiple comparisons test were performed or Friedman test followed by Dunn's multiple comparisons test was performed to estimate the difference in mice weight as compared to initial weight. These tests were performed only on mice which survived throughout the study. Unpaired t-test with Welch's correction and Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison tests were applied to compare the difference in mice weight between two different groups and more than two groups respectively. These tests were performed on all mice including those died during the study.

To analyse the effect of Bleomycin treatment or intermittent hypoxia exposure versus saline or intermittent air exposure on ER stress markers and pro-fibrotic markers expression and quantification, we compared each time the difference between two groups and row data were submitted to a Mann-Whitney test. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

Results

Bleomycin induced mice mortality, weight loss, lung fibrosis and expression of molecular stress markers.

BLM (3.5 IU/g) instillation induced progressive mice weight loss, significant from day 6 (Figure 2B), and an increase in mortality, significant after day 11 (Figure 2A). At day 15, at the end of the experiment, 76% of mice treated with BLM were alive. At the lung level, BLM instillation induced alveolar epithelium damages and fibrogenesis. Haematoxylin-eosin (H&E) and Masson's trichrome (MT) staining (Figure 2C) revealed lung architectural changes and collagen deposition. In addition, collagen proportion (Figure 2D) was significantly higher compared to saline control. Moreover, BLM instillation significantly increased the expression of ER stress markers: spliced XBP1 (sXBP1), cleaved ATF6 (ATF6N) and CHOP, with an increasing trend for chaperone proteins GRP78 and GRP75 (Figure 2E and 2F). Interestingly, ATF4 expression was significantly decreased with BLM treatment. In parallel, a significant induction of extracellular matrix proteins mRNA: *Collagen1a1*, *Collagen3a1*, and *Fibronectin1* (figure 2G) and pro-fibrotic markers: *Cxcl12*, *Pdgf-β* and *Serpin1* (Figure 2H) was observed.

Intermittent hypoxia preconditioning is necessary to strengthen lung fibrosis induced by Bleomycin.

To document the impact of OSA on the severity of the pulmonary fibrosis, mice were double challenged with bleomycin instillation to develop lung fibrosis on one hand, and exposed to intermittent hypoxia on the other hand. Our results showed that intermittent hypoxia exposure did not increase mortality after 14 or 28 days in saline groups (Figure 3A, saline/IH 14d, saline/IH 28d). Double challenge of BLM instillation and IH exposure leads to a more important, but not significant weight loss, advanced the beginning of mortality and increased mortality rate from 23,5% to 43% (figure 3B). When mice were instilled with BLM and then exposed to HI (BLM (3,5 UI/g)/IH 14d groups vs BLM 3,5IU/g IA), no difference was observed in lung histology (Figure 3C) and collagen deposition and quantification (Figure 3D). On the contrary, when mice were pre-exposed to IH, we observed a compact lung structure with alveolar collapse (H&E staining, Figure 3C), a reduction of alveolar space (Figure 3C) and an excessive extracellular matrix synthesis and collagen deposition (Figure 3C and 3D).

Intermittent hypoxia exposure extended to 28 days is necessary to induce molecular stress markers in lung

In order to understand the mechanisms involved in the worsening effect of intermittent hypoxia on lung fibrosis, we were interested in the effect of intermittent hypoxia exposure alone in the lung

(Figure 4). No difference of the alveolar epithelium histology was observed between 14 days or 28 days of IH exposure (Figure 4A, H&E staining). However, 28 days of IH exposure led to an increase trend of collagen proportion in alveolar epithelium (Figure 4A, MT staining and 4B). 28 days of IH induced increase expression of ER stress markers ATF4, GRP75 and CHOP (Figure 4C and 4D) and no modulation of sXBP1 and GRP78 (Figure 4D). The expression of ATF6N was in contrary significantly decrease (Figure 4D). IH exposure during 14 days leads to a significant increase in *Collagen 1a1* mRNA expression (Figure 4E). However, 28 days of IH exposure were necessary to improve this result and to show a significant increase in *Collagen 1a1* and *Collagen 3a1* expression (Figure 4E) and pro-fibrotic factors *Cxcl12* and *Pdgf-β* expression (Figure 4F). However, no modulation was shown for *Fibronectin 1* and *Serpin1* mRNA expression (Figure 4E and 4F).

No impact of IH preconditioning on Bleomycin-induced molecular markers in lung

To document the molecular impact of IH preconditioning on the severity of BLM-induced lung fibrosis, classical molecular markers of lung fibrosis were studied (Figure 5). IH preconditioning doesn't modify the expression of BLM-induced stress markers XBP1, ATF6N, ATF4, GRP78, GRP75, and CHOP (Figure 5A and 5B). Similarly, no modulation on the expression of lung extracellular matrix components *Collagen 1a1*, *Collagen 3a1* and *Fibronectin 1* (Figure 5C) and pro-fibrotic markers *Cxcl12*, *Pdgf-β* and *Serpin 1* (Figure 5D) were observed.

Intermittent hypoxia preconditioning worsened the effect of low dose BLM on lung fibrosis and molecular markers expression

In order to overcome the major effect of BLM on the molecular impact of IH on lung fibrosis, mice were instilled with low dose of BLM. No mortality was observed in the three groups BLM (2UI/g)/IA, BLM (2UI/g)/IH 28 days, or IH 28 days (data not shown). Mice body weight was not affected by low dose BLM instillation (Figure 6A). Interestingly, in double challenged BLM (2UI/g)/IH 28 days group, we observed significant mice weight decrease as compared to BLM (2UI/g)/IA groups. In addition, we observed that IH preconditioning significantly increase the severity of lung fibrosis induced by low dose of BLM (Figure 6B). Indeed, a severe thickening in lung structure and a more accentuated alveolar collapse with a total loss of alveolar space was observed (H&E staining, Figure 6B). Furthermore, IH preconditioning induced an excessive extracellular matrix synthesis with an important proportion of collagen deposition (MT staining, figure 6B and 6C).

As compared to saline/IA groups, low dose of BLM also induced significantly ER stress markers (sXBP1, ATF6N and GRP78) protein levels (figure 6D, 6E), Collagens (*Collagen1a1*, *Collagen 3a1*) and profibrotic factors (*Cxcl12*, *Pdgf-β* and *Serpin 1*) mRNA expression (Figure 6 F, G). Interestingly, IH preconditioning significantly induced ATF6N protein level (Figure 6E) but has no impact on GRP78, CHOP and ATF4 protein expression (Figure 6D, 6E) as compared to BLM (2IU/g)/IA groups. Increasing trend for sXBP1 protein level was also showed. Moreover, a significant increase in *Collagen1a1*, *Collagen 3a1*, *Cxcl12* and *Serpin1* mRNA expression was induced by IH preconditioning (BLM (2IU/g)/IH groups vs BLM (2IU/g)/IA, Figure 6F, 6G), but no modification was observed for *Pdgf-β* mRNA expression (Figure 6G).

Discussion

Our study aims to progress in understanding the link between OSA and IPF (Gille et al., 2018) and to decipher the mechanism implicated in the worsening effect of intermittent hypoxia in the severity of lung fibrogenesis previously observed (Gille et al., 2018). Here, we have hypothesized that this effect would be secondary, at least in part, to increased cellular ER stress.

In our experimental conditions, histological analysis of mice lungs exposed to both IH and BLM instillation didn't show aggravating effect of IH on lung fibrosis severity at day 14. However, when mice were exposed to longer time of IH exposure (28 days) or to IH before induction of lung fibrosis by BLM instillation, we observed a significant weight loss, and an aggravated lung fibrosis characterized by a thicker lung structure with an excessive increasing in collagen deposition as compared to BLM alone.

28 days of IH exposure alone significantly increased the induction of Collagen 1a1 and Collagen 3a1 mRNA expression in whole lung extract and protein deposition in lung parenchyma, two fundamentals events in fibrosis development (Hansen et al., 2016). Furthermore, and in agreement with the study of Shi et al (Shi et al., 2020) IH significantly increased the expression of pro-fibrotic markers PDGF- β and CXCL12mRNA. CXCL12 and PDGF- β are well described in the pathogenesis of IPF (Xu et al., 2020) and well known to induce the proliferation, and migration of fibroblasts (Nishioka et al., 2013), and chemoattract circulating fibrocytes (Phillips et al., 2004). 28 days exposure of IH exposure also induced an increase expression of ER stress markers ATF4, ATF6, GRP75 and CHOP. These finding were in agreement with a recent study that shows an induction of ER stress ATF4 marker in lung after four weeks of IH exposure (Shi et al., 2020).

The major impact of IH on lung fibrosis was observed when IH was started 14 days before induction of lung fibrosis by intratracheal instillation of a 2UI/kg dose of BLM. In our model, BLM treatment at low (2UI/kg) or high (3,5UI/kg) dose increased expression of extracellular matrix component (Collagens) and pro-fibrotic mediator expression CXCL12, PDGF β and serpin 1 and expression of ER stress markers XBP1, ATF6 and GRP78 as reported by other (Delbrel et al., 2018; Hsu et al., 2017). The origin of ER stress observed in IPF patients biopsies and mice lung developing experimental fibrosis is not completely understood and the implication of an hypoxic microenvironment of AEC cells has been proposed (Burman et al., 2018; Delbrel et al., 2018; Tzouveleakis et al., 2007). IH effects on ER stress markers induction are widely studied in several organs, particularly in cardiac tissue (Belaidi et al., 2016; Moulin et al., 2020, 2020). IH exposure induced different ER stress markers (GRP78, CHOP, XBP1 mRNA) in cardiomyocytes in mice model of ischemia-reperfusion injury (Belaidi et al., 2016). In their study in the lung, Shi et al, suggested that the lung ER

stress induced by IH is mostly mediated by activation of the PERK/ATF4 pathway. The activation of PERK/ATF4 pathway could also amplify an anti-oxidative response via NRF2 transcription factors activation (Sarcinelli et al., 2020) and oxidative stress response is known as major deleterious consequence of IH in lung (Tuleta et al., 2016). This results was all the more interesting that the NF- κ B/NRF2 signaling pathway has been recently pointed to partly explain the deleterious impact of IH on lung fibrogenesis (Kang et al., 2020). PERK/ATF4 pathway was also implicated in cells apoptosis mediated notably via pro-apoptotic protein CHOP which was induced by prolonged intermittent hypoxia exposure in our model. Other study in cardiac tissue have suggest an existence of physical interaction of ATF4 with the hypoxia inducible factors (HIF-1 α). Interestingly HIF-1 α induction has been reported in cardiomyocytes exposed to IH, and proposed to participate in deleterious effect of IH in this organ (Moulin et al., 2020). We and other reported by immunohistochemistry induction of HIF-1 α specifically in alveolar cells of mice developing experimental pulmonary fibrosis (Delbrel et al., 2019; Goodwin et al., 2018). In our conditions HIF-1 α induction was not detected by western blot in whole lung homogenates of mice exposed to IH (data not shown) but the experimental approach used cannot allow us to exclude its participation in the worsening effect of IH. In our study IH worsening effect on lung fibrosis seems principally mediated through ATF6 signaling pathway (perhaps also through IRE1-XBP1), but the precise mechanism remains to be determined.

We also observed an additive effect of IH exposure on the expression of Collagen 1a1, CXCL12 and Serpin 1 mRNA expression as compared to mice treated with BLM alone. Interestingly, IH and BLM both induced the expression of Serpin 1 (PAI-1 in Human). PAI-1 is showed up-regulated in AEC II cells from IPF patient (Jiang et al., 2017), and could plays a critical role in the development of lung fibrosis (Rabieian et al., 2018) through induction of cell senescence (Rana et al., 2020). Interestingly, cellular senescence has also been proposed to explain the pathophysiology of IPF (Liu and Liu, 2020), and we cannot exclude its implication in the aggravating effect of IH. Futures studies aimed to decipher the implication of cell senescence and its relationship with ER stress in the worsening effect of IH in lung fibrosis would be essential to go further in the understanding of the molecular mechanisms implicated in the lung fibrogenesis.

In this study we showed that either 28 days exposure of IH or BLM treatment induced ER stress, but distinct UPR signalling pathway are activated. We showed an additive and worsening effect of IH pre-conditioning on lung fibrosis through the expression of ER stress and pro-fibrotic markers. In conclusion, we demonstrated that IH preconditioning exacerbate lung fibrosis in mice, and we established that this effect was partly mediated by the induction of ER stress, the activation of the UPR and the induction of pro-fibrotic factors expression in the lung.

Figure Legends

Figure 1: Experimental designs of Bleomycin instillation and intermittent hypoxia exposure.

Our study was based on two experimental designs. In the experimental design I, mice were instilled intratracheally with saline or Bleomycin (BLM) (3.5 IU/g) at day 0 and exposed to intermittent hypoxia (IH; 30 cycles/hour, 8 hours/day, Nadir 7% O₂) or intermittent air (IA) at day 1. Mice were then sacrificed at day 14 of exposure (therefore day 15 of BLM instillation) and lung was extracted. In the experimental design II, mice were exposed to intermittent hypoxia (30 cycles/hour, 8 hours/day, Nadir 7% O₂) or intermittent air at day 0 and instilled intratracheally with saline or BLM (3.5 or 2 IU/g) at day 14 of exposure. Mice were then sacrificed at day 28 of exposure and lung was extracted.

Figure 2: Characterisation of Bleomycin-induced lung fibrosis mice model.

Saline or Bleomycin (BLM) (3.5 IU/g) was instilled intra-tracheally in mice at d0. Mice were then exposed to intermittent air (IA) at d1. Mice body weight variation and vital status were checked daily. Mice were sacrificed at d15 of BLM instillation. **(A)** Kaplan-Meier curve representing mice survival percentage after BLM (3.5 IU/g) or saline instillation and IA exposure (n=12 for saline/IA and n=17 for BLM/IA group) compared by the log-rank test **(B)** Variation of mice body weight each day after BLM (3.5 IU/g) or saline instillation and IA exposure. Weight loss or gain was calculated by the difference (Δ) between the daily mice weight (dx) and the mice initial weight at day 0 (Δ weight = dx-d0). Repeated measures ANOVA was performed to evaluate the difference in delta weight relative to initial weight (Δ weight (dx-d0) versus initial weight at d0, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001). Difference on delta weight between saline/IA and BLM/IA group was evaluated by unpaired t test (saline/IA versus BLM (3.5 IU/g)/IA, ^sp<0.05, ^{ss}p<0.01, ^{sss}p<0.001, ^{ssss}p<0.0001) with n=12 for saline/IA and n=17 for BLM/IA group. **(C)** Histological staining of lung sections. Hematoxylin-eosin (H&E) staining was used to assess lung histology and masson's trichrome (MT) for visualization of lung collagen deposition. Sections of 5 μ m paraffin-embedded left lung were prepared from mice after 15 days of BLM (3.5 IU/g) or saline instillation and IA exposure. Pictures shown are representative of multiple experiments (n>10) **(D)** Quantification of Collagen deposition after MT staining. Area occupied by collagen (blue staining) was reported to the total area of the left lung and percentage of collagen present was quantified using HistoLab Image Analysis Software. Mann-Whitney test was applied to compare the two groups with n=3 for saline/IA and n=9 for BLM/IA group. **(E)** Western blot analysis of ER stress markers (sXBP1, ATF6N, ATF4, GRP78, GRP75 and CHOP) protein expression. Western blot was performed on right lung (inferior lobe) total lysates from mice after 15 days of BLM (3.5 IU/g) or saline instillation and IA exposure. Blot shown are representative of six experiments. **(F)** Quantification of BLM effect on ER stress markers protein expression using image Lab software. Protein expression was normalized to β -Actin and BLM effect on ER stress markers expression is presented as fold induction normalized to

the mean value of controls (saline/IA) and reported to 1. Raw data were submitted to Mann-Whitney test to compare the two groups with n=11 for saline/IA and n=9 for BLM/IA group **(G)** mRNA expression of *Collagen 1a1*, *Collagen 3a1* and *Fibronectin1* quantified by RT-qPCR. **(H)** mRNA expression of pro-fibrotic markers (*Cxcl12*, *Pdgf-β* and *Serpin1*) quantified by RT-qPCR. RT-qPCR was performed on right lung total lysates (superior lobe) from mice after 15 days of BLM (3.5 IU/g) or saline instillation and IA exposure. Relative quantification of mRNA gene expression was realized using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method with 18s as an internal control. BLM effect on *Collagen1a1*, *Collagen 3a1* *fibronectin1* and pro-fibrotic markers expression (*Cxcl12*, *Pdgf-β* and *Serpin1*) is presented as fold induction normalized to the mean value of controls (saline/IA) and reported to 1. Raw data were submitted to Mann-Whitney test to compare the two groups with n=12 for saline/IA and n=9 for BLM/IA group. Y axis is represented in two segments with both bottom and top at 50% length. (saline/IA versus BLM (3.5 IU/g)/IA *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001).

Figure 3: Impact of intermittent hypoxia exposure on Bleomycin-induced lung fibrosis in mice.

*Intermittent hypoxia (IH) exposure was performed according to two different protocols. In the first, mice were exposed to IH or IA at day 1 after BLM (3.5 IU/g) or saline instillation, and then sacrificed after 15 days. The second consisted in IH preconditioning: IH or IA exposure was performed at day 0 and BLM or saline instillation was performed at day 14, then mice were sacrificed at day 28. Mice body weight variation and vital status were checked daily. (A) Kaplan-Meier curve representing mice survival percentage after BLM (3.5 IU/g) or saline instillation at d0 or d14 and IH or IA exposure during 14 days or 28 days. The log-rank test was performed with Saline/IA (n=12), BLM/IA (n=17), Saline/IH14d (n=9), Saline/IH 28d (n=8), BLM/IH 14d (n=7) and BLM/IH 28d (n=10). (B) Variation of mice body weight each day after BLM (3.5 IU/g) or saline instillation and IH or IA after 14 days or 28 days exposure. Weight loss or gain was calculated by the difference (Δ) between the daily mice weight (dx) and the mice initial weight at day 0 (Δ weight = dx-d0). Repeated measures ANOVA was applied for saline/IH 14d and BLM/IA (instillation days 0) and Friedman test was used for all others groups to evaluate the difference in delta weight relative to initial weight at days 0 both for the two protocols (Δ weight (dx-d0) versus weight at d0, *p<0.05, ***p<0.001, ****p<0.0001) or relative to mice weight at days 14 after BLM instillation in the second protocol (Δ weight (dx-d14) versus weight at d14, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001). Kruskal-Wallis test was used to compare the difference between different groups (the symbol \$ was used if the difference was significant) (C) Histological staining of lung sections. Hematoxylin-eosin (H&E) staining was used to assess lung histology and masson's trichrome (MT) for visualization of lung collagen deposition. Sections of 5µm paraffin-embedded left lung were prepared from mice after 15 days of BLM (3.5 IU/g) instillation (at d0 or d14) and 14 days or 28 days of IH or IA*

exposure. Pictures shown are representative of multiple experiments (n=4 for BLM/IH 14d groups and n ≥ 7 for other groups). **(D)** Quantification of Collagen deposition after MT staining. Area occupied by collagen (blue staining) was reported to the total area of the left lung and percentage of collagen present was quantified using HistoLab Image Analysis Software. Kruskal-Wallis test was applied to compare the difference between all groups (BLM/IA (n=9), BLM/IH 14d (n=4) and BLM/IH 28d (n=7)).

Figure 4: Effect of short or middle term intermittent hypoxia exposure in lung.

Mice were instilled with saline at day 0 or day 14 and exposed to intermittent hypoxia or intermittent air during 14 days or 28 days. **(A)** Histological staining of lung sections. Hematoxylin-eosin (H&E) staining was used to assess lung histology and masson's trichrome (MT) for visualization of lung collagen deposition. Sections of 5µm paraffin-embedded left lung were prepared from mice after saline instillations and 14 days or 28 days of IH or IA exposure. Pictures shown are representative of multiple experiments (n ≥ 6). **(B)** Quantification of Collagen deposition after MT staining. Area occupied by collagen (blue staining) was reported to the total area of the left lung and percentage of collagen present was quantified using HistoLab Image Analysis Software. Kruskal-Wallis test was applied to compare the difference between all groups (Saline/IA (n=6), saline/IH 14d (n=7) and saline/IH 28d (n=8)). **(C)** Western blot analysis of ER stress markers (sXBP1, ATF6N, ATF4, GRP78, GRP75 and CHOP) protein expression. Western blot was performed on right lung total lysates (inferior lobe) from mice after saline instillation and exposed 14 days or 28 days to IH or IA. Blot shown are representative of four experiences. **(D)** Quantification of IH (14d or 28d) exposure effect on ER stress markers expression using image Lab software. Protein expression was normalized to β-Actin and IH effect on ER stress markers expression is presented as fold induction normalized to the mean value of controls (saline/IA) and reported to 1. **(E)** mRNA expression of *Collagen 1a1*, *Collagen 3a1* and *Fibronectin1* quantified by RT-qPCR. **(H)** mRNA expression of pro-fibrotic markers (*Cxcl12*, *Pdgf-β* and *Serpin1*) quantified by RT-qPCR. RT-qPCR was performed on right lung total lysates (superior lobe) from mice after saline instillation and 14 days or 28 days of IH or IA exposure. Relative quantification of mRNA gene expression was realized using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method with 18s as an internal control. IH (28d or 14d) exposure effect on *Collagen1a1*, *Collagen 3a1*, *Fibronectin1* and pro-fibrotic markers expression (*Cxcl12*, *Pdgf-β* and *Serpin1*) is presented as fold induction normalized to the mean value of controls (saline/IA) and reported to 1. Mann-Whitney test was applied to compare the two groups (Saline/IA (n=9) versus saline/IH 14d (n=9) and saline/IA (n=12) versus saline/IH 28d (n=8)). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figure 5: Impact of intermittent hypoxia preconditioning on BLM-induced fibrosis molecular markers in lung.

Mice were exposed to IH or IA at day 0 and BLM (3.5 IU/g) instillation was performed at day 14 of exposure, then mice were sacrificed at day 28. **(A)** Western blot analysis of ER stress markers (sXBP1, ATF6N, ATF4, GRP78, GRP75 and CHOP) protein expression. Western blot was performed on right lung total lysates (inferior lobe) from mice after 14 days BLM instillation next to 14 days of IH exposure or IH or IA exposure alone for 28d. Blot shown is representative of four experiences. **(B)** Quantification of IH pre-conditioning exposure effect on BLM induced ER stress markers expression using image Lab software. Protein expression was normalized to β -Actin and IH preconditioning effect on BLM induced ER stress markers expression is presented as fold induction normalized to the mean value of controls (BLM/IA) and reported to 1. **(C)** mRNA expression of *Collagen 1a1*, *Collagen 3a1* and *Fibronectin1* quantified by RT-qPCR. **(D)** mRNA expression of pro-fibrotic markers (*Cxcl12*, *Pdgf- β* and *Serpin1*) quantified by RT-qPCR. RT-qPCR was performed on right lung total lysates (superior lobe) from mice after 14 days BLM instillation next to 14 days of HI exposure or IH or AI exposure alone for 28d. Relative quantification of mRNA gene expression was realized using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method with 18s as an internal control. IH preconditioning effect on BLM induced *Collagen1a1*, *Collagen 3a1*, *Fibronectin1* and pro-fibrotic markers expression (*Cxcl12*, *Pdgf- β* and *Serpin1*) is presented as fold induction normalized to the mean value of controls (BLM/IA) and reported to 1. Mann-Whitney test was applied to compare the two groups (BLM/IA (n=9) versus BLM/IH 28d (n=7)).

Figure 6: Impact of intermittent hypoxia preconditioning on low dose BLM-induced lung fibrosis.

Mice were exposed to IH or IA at day 0 and low dose BLM (2 IU/g) or saline instillation was performed at day 14 of exposure, then mice were sacrificed at day 28. **(A)** Variation of mice body weight each day after IH or IA exposure during 28 days in mice instillation by low dose BLM (2 IU/g) or saline solution at day 14. Graph represent body weights of mice after BLM (2 IU/g) or saline instillation after 14 days HI preconditioning. Weight loss or gain was calculated by the difference (Δ) between the daily mice weight (dx) and the mice weight at day 14 (Δ weight = dx-d14). Repeated measures ANOVA was applied for saline/IA (n=12) and BLM/IH 28d (n=9) and Friedman test was used for BLM/IA (n=12) to evaluate the difference in delta weight relative to mice weight at days 14 after BLM instillation (Δ weight (dx-d14) versus weight at d14, ^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01). Kruskal-Wallis test was used to compare the difference between the three different groups (BLM/IA versus BLM/IH 28d: ^{\$\$\$}p<0.01, ^{\$\$\$\$}p<0.001). **(B)** Histological staining of lung sections. Hematoxylin-eosin (H&E) staining was used to assess lung histology and masson's trichrome (MT) for visualization of lung collagen deposition. Sections of 5 μ m paraffin-embedded left lung were prepared from mice after IH (28d) or IA exposure and low dose BLM or saline instillation. Pictures shown are representative of multiple experiments (n \geq 7). **(C)** Quantification of

Collagen deposition after MT staining. Area occupied by collagen (blue staining) was reported to the total area of the left lung and percentage of collagen present was quantified using HistoLab Image Analysis Software. Kruskal-Wallis test was applied to compare the difference between all groups (Saline/IA (n=6), BLM/IA (n=12) and BLM/IH 28d (n=9)). **(D)** Western blot analysis of ER stress markers (sXBP1, ATF6N, ATF4, GRP78, GRP75 and CHOP) protein expression. Western blot was performed on right lung total lysates (inferior lobe) from mice after 14 days low dose BLM instillation next to 14 days of HI exposure or IH or AI exposure alone for 28d. Blot shown is representative of four experiences. **(E)** Quantification of IH pre-conditioning exposure effect on low dose BLM (2UI / g) induced ER stress markers expression using image Lab software. Protein expression was normalized to β -Actin, low dose BLM (2 UI / g) effect alone or IH preconditioning effect on BLM induced ER stress markers expression is presented as fold induction normalized to the mean value of controls (Saline/IA) and reported to 1. Black histogram represented the effect of for BLM alone and Black/white histogram represent the effect of IH pre-conditioning exposure on low dose BLM (2UI / g) instillation. **(F)** mRNA expression of *Collagen 1a1* and *Collagen 3a1* quantified by RT-qPCR. **(G)** mRNA expression of pro-fibrotic markers (*Cxcl12*, *Pdgf- β* and *Serpin1*) quantified by RT-qPCR. RT-qPCR was performed on right lung total lysates (superior lobe) from mice after 14 days BLM instillation next to 14 days of HI exposure or IH or AI exposure alone for 28d. Relative quantification of mRNA gene expression was realized using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method with 18S as an internal control. Low dose BLM (2 UI / g) alone or IH preconditioning effect on *Collagen1a1*, *Collagen 3a1* and pro-fibrotic markers expression is presented as fold induction normalized to the mean value of controls (Saline/IA) and reported to 1. Black histogram represented the effect of for BLM alone and Black/white histogram represent the effect of IH pre-conditioning exposure on low dose BLM (2UI / g) instillation. Mann-Whitney test was applied to compare each two groups: saline/IA (n=7) versus BLM/IA (n=12) with significant difference represented by * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ and BLM/IA (n=12) versus BLM/IH 28d (n=9) with significant difference represented by $\hat{s}p < 0.05$.

Table 1: Summary table of primers used for Real-Time Polymerase Chain Reaction.

Gene	Forward Primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>Fibronectin 1</i>	TGGTGGCCACTAAATACGAA	GGAGGGCTAACATTCTCCAG
<i>Collagen 1a1</i>	GTGGTGACAAGGGTGAGACA	GAGAACCAGGAGAACCAGGA
<i>Collagen 3a1</i>	TACACCTGCTCCTGTGCTTC	CATTCTCCCACTCCAGACT
<i>Serpin 1</i>	GCACAACCCGACAGAGACAA	ATGAAGGCGTCTTCCAC
<i>Cxcl 12</i>	CCTTCAGATTGTTGCAAGGCTG	TCCTTTGGGCTGTTGTGCTT
<i>Pdgf β</i>	TCGCCTGCAAGTGTGAGACA	CCGAATGGTCACCCGAGCTT

Table 2: Summary table of antibodies used for western blot analysis

Antibodies (anti-)	Type	Host	Dilution	Reference	Manufacturer
β-ACTIN		Mouse	1/5000	A5316	Sigma
CHOP		Rabbit	1/1000	NBP2 – 66856	Novus
ATF6-N		Mouse	1/1000	Clone 1-7 MAB 6762	Abnova
ATF4	Primary	Rabbit	1/1000	SC-200 (C-20)	Santa Cruz
GRP 78	antibodies	Rabbit	1/1000	ADI-SPA-7680050	Enzo
GRP 75		Rabbit	1/1000	D 175 9661L	Cell Signaling
sXBP1		Mouse	1/1000	SC-8015 (F-4)	Santa Cruz
Anti-mouse IgG HRP	Secondary	Goat	1/3000	P0447	Dako
Anti-rabbit IgG HRP	antibodies	Goat	1/3000	P0448	Dako

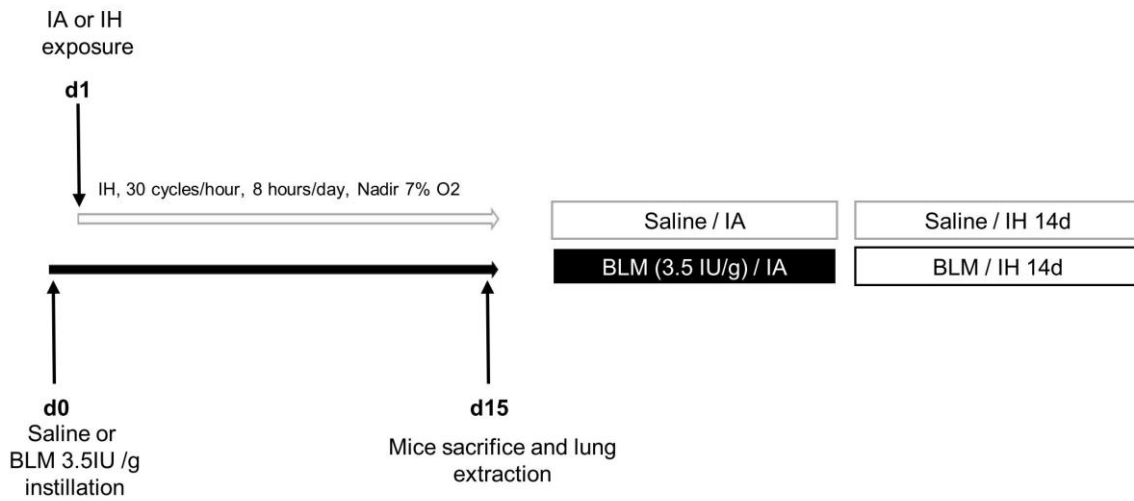
- Allen, J.T., Spiteri, M.A., 2002. Growth factors in idiopathic pulmonary fibrosis: relative roles. *Respiratory Research* 3, 13. <https://doi.org/10.1186/rr162>
- Andrade, D.C., Haine, L., Toledo, C., Diaz, H.S., Quintanilla, R.A., Marcus, N.J., Iturriaga, R., Richalet, J.-P., Voituron, N., Del Rio, R., 2018. Ventilatory and Autonomic Regulation in Sleep Apnea Syndrome: A Potential Protective Role for Erythropoietin? *Front Physiol* 9, 1440. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01440>
- Badran, M., Ayas, N., Laher, I., 2014. Cardiovascular complications of sleep apnea: role of oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev* 2014, 985258. <https://doi.org/10.1155/2014/985258>
- Barratt, S.L., Creamer, A., Hayton, C., Chaudhuri, N., 2018. Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF): An Overview. *J Clin Med* 7. <https://doi.org/10.3390/jcm7080201>
- Belaidi, E., Thomas, A., Bourdier, G., Moulin, S., Lemarié, E., Levy, P., Pépin, J.-L., Korichneva, I., Godin-Ribuot, D., Arnaud, C., 2016. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.02.096>
- Braun, R.K., Broytman, O., Braun, F.M., Brinkman, J.A., Clithero, A., Modi, D., Pegelow, D.F., Eldridge, M., Teodorescu, M., 2018. Chronic intermittent hypoxia worsens bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *Respir Physiol Neurobiol* 256, 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2017.04.010>
- 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., 2018. Localized hypoxia links ER stress to lung fibrosis through induction of C/EBP homologous protein. *JCI Insight* 3. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.99543>
- C, M., I, B., K, A., G, P., I, G., G, V., N, S., Se, S., 2015. Obstructive Sleep Apnea Should Be Treated in Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis [WWW Document]. *Sleep & breathing = Schlaf & Atmung*. <https://doi.org/10.1007/s11325-014-1033-6>
- Cottin, V., 2017. [French recommendations for idiopathic pulmonary fibrosis: An updated working document for clinicians]. *Rev Mal Respir* 34, 789–790. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2017.09.005>
- Delbrel, E., Soumare, A., Naguez, A., Label, R., Bernard, O., Bruhat, A., Fafournoux, P., Tremblais, G., Marchant, D., Gille, T., Bernaudin, J.-F., Callard, P., Kambouchner, M., Martinod, E., Valeyre, D., Uzunhan, Y., Planès, C., Boncoeur, E., 2018. HIF-1 α triggers ER stress and CHOP-mediated apoptosis in alveolar epithelial cells, a key event in pulmonary fibrosis. *Sci Rep* 8, 17939. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36063-2>
- Delbrel, E., Uzunhan, Y., Soumare, A., Gille, T., Marchant, D., Planès, C., Boncoeur, E., 2019. ER Stress is Involved in Epithelial-To-Mesenchymal Transition of Alveolar Epithelial Cells Exposed to a Hypoxic Microenvironment. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20061299>
- Dempsey, O.J., 2006. Clinical review: idiopathic pulmonary fibrosis--past, present and future. *Respir Med* 100, 1871–1885. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2006.08.017>
- Dewan, N.A., Nieto, F.J., Somers, V.K., 2015. Intermittent Hypoxemia and OSA. *Chest* 147, 266–274. <https://doi.org/10.1378/chest.14-0500>
- Gille, T., Didier, M., Boubaya, M., Moya, L., Sutton, A., Carton, Z., Baran-Marszak, F., Sadoun-Danino, D., Israël-Biet, D., Cottin, V., Gagnadoux, F., Crestani, B., d'Ortho, M.-P., Brillet, P.-Y., Valeyre, D., Nunes, H., Planès, C., collaborators, 2017. Obstructive sleep apnoea and related comorbidities in incident idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* 49. <https://doi.org/10.1183/13993003.01934-2016>
- Gille, T., Didier, M., Rotenberg, C., Delbrel, E., Marchant, D., Sutton, A., Dard, N., Haine, L., Voituron, N., Bernaudin, J.-F., Valeyre, D., Nunes, H., Besnard, V., Boncoeur, E., Planès, C., 2018. Intermittent Hypoxia Increases the Severity of Bleomycin-Induced Lung Injury in Mice. *Oxid Med Cell Longev* 2018, 1240192. <https://doi.org/10.1155/2018/1240192>
- 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 TGF β -dependent epithelial-

- mesenchymal-transition and collagen-synthesis. *Respir. Res.* 19, 138.
<https://doi.org/10.1186/s12931-018-0841-9>
- Goodwin, J., Choi, H., Hsieh, M.-H., Neugent, M.L., Ahn, J.-M., Hayenga, H.N., Singh, P.K., Shackelford, D.B., Lee, I.-K., Shulaev, V., Dhar, S., Takeda, N., Kim, J.-W., 2018. Targeting Hypoxia-Inducible Factor-1 α /Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1 Axis by Dichloroacetate Suppresses Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 58, 216–231.
<https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0186OC>
- Guilleminault, C., Stoohs, R., Clerk, A., Cetel, M., Maistros, P., 1993. A Cause of Excessive Daytime Sleepiness: The Upper Airway Resistance Syndrome. *CHEST* 104, 781–787.
<https://doi.org/10.1378/chest.104.3.781>
- Hansen, N.U.B., Karsdal, M.A., Brockbank, S., Cruwys, S., Rønnow, S., Leeming, D.J., 2016. Tissue turnover of collagen type I, III and elastin is elevated in the PCLS model of IPF and can be restored back to vehicle levels using a phosphodiesterase inhibitor. *Respir Res* 17.
<https://doi.org/10.1186/s12931-016-0394-8>
- Hsu, H.-S., Liu, C.-C., Lin, J.-H., Hsu, T.-W., Hsu, J.-W., Su, K., Hung, S.-C., 2017. Involvement of ER stress, PI3K/AKT activation, and lung fibroblast proliferation in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Sci Rep* 7, 14272. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14612-5>
- Jiang, C., Liu, G., Luckhardt, T., Antony, V., Zhou, Y., Carter, A.B., Thannickal, V.J., Liu, R., 2017. Serpine 1 induces alveolar type II cell senescence through activating p53-p21-Rb pathway in fibrotic lung disease. *Aging Cell* 16, 1114–1124. <https://doi.org/10.1111/accel.12643>
- Kang, H.H., Kim, I.K., Yeo, C.D., Kim, S.W., Lee, H.Y., Im, J.H., Kwon, H.Y., Lee, S.H., 2020. The Effects of Chronic Intermittent Hypoxia in Bleomycin-Induced Lung Injury on Pulmonary Fibrosis via Regulating the NF- κ B/Nrf2 Signaling Pathway. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*.
<https://doi.org/10.4046/trd.2020.0112>
- Kim, S.W., Kim, I.K., Yeo, C.D., Kang, H.H., Ban, W.H., Kwon, H.Y., Lee, S.H., 2020. Effects of chronic intermittent hypoxia caused by obstructive sleep apnea on lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Experimental Lung Research* 46, 341–351.
<https://doi.org/10.1080/01902148.2020.1804646>
- 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., 2008. Epithelial endoplasmic reticulum stress and apoptosis in sporadic idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178, 838–846. <https://doi.org/10.1164/rccm.200802-313OC>
- Lancaster, L.H., Mason, W.R., Parnell, J.A., Rice, T.W., Loyd, J.E., Milstone, A.P., Collard, H.R., Malow, B.A., 2009. Obstructive sleep apnea is common in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 136, 772–778. <https://doi.org/10.1378/chest.08-2776>
- Liu, R.-M., Liu, G., 2020. Cell senescence and fibrotic lung diseases. *Exp. Gerontol.* 132, 110836.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.110836>
- Mermigkis, C., Bouloukaki, I., Antoniou, K.M., Mermigkis, D., Psathakis, K., Giannarakis, I., Varouchakis, G., Siafakas, N., Schiza, S.E., 2013. CPAP therapy in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and obstructive sleep apnea: does it offer a better quality of life and sleep? *Sleep and Breathing: International Journal of the Science and Practice of Sleep Medicine* 17, 1137. <https://doi.org/10.1007/s11325-013-0813-8>
- Mermigkis, C.M., Tsakanika, K., Polychronopoulos, V., Karagianidis, N., Mermigkis, D., Bouros, D., 2001. Expression of bcl-2 protein in bronchoalveolar lavage cell populations from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Acta Cytol* 45, 914–918.
<https://doi.org/10.1159/000328363>
- Moulin, S., Thomas, A., Arnaud, C., Arzt, M., Wagner, S., Maier, L.S., Pépin, J.-L., Godin-Ribuot, D., Gaucher, J., Belaidi, E., 2020. Cooperation Between Hypoxia-Inducible Factor 1 α and Activating Transcription Factor 4 in Sleep Apnea-Mediated Myocardial Injury. *Canadian Journal of Cardiology* 36, 936–940. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2020.04.002>

- Nishioka, Y., Azuma, M., Kishi, M., Aono, Y., 2013. Targeting platelet-derived growth factor as a therapeutic approach in pulmonary fibrosis. *The Journal of Medical Investigation* 60, 175–183. <https://doi.org/10.2152/jmi.60.175>
- Phillips, R.J., Burdick, M.D., Hong, K., Lutz, M.A., Murray, L.A., Xue, Y.Y., Belperio, J.A., Keane, M.P., Strieter, R.M., 2004. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J. Clin. Invest.* 114, 438–446. <https://doi.org/10.1172/JCI20997>
- Plataki, M., Koutsopoulos, A.V., Darivianaki, K., Delides, G., Siafakas, N.M., Bouros, D., 2005. Expression of apoptotic and antiapoptotic markers in epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 127, 266–274. <https://doi.org/10.1378/chest.127.1.266>
- Pun, M., 2020. Human model of obstructive sleep apnea: how incomplete is it? *J Appl Physiol* (1985) 129, 47. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00360.2020>
- Rabieian, R., Boshtam, M., Zareei, M., Kouhpayeh, S., Masoudifar, A., Mirzaei, H., 2018. Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 as a Regulator of Fibrosis. *J. Cell. Biochem.* 119, 17–27. <https://doi.org/10.1002/jcb.26146>
- Rana, T., Jiang, C., Liu, G., Miyata, T., Antony, V., Thannickal, V.J., Liu, R.-M., 2020. PAI-1 Regulation of TGF- β 1-induced Alveolar Type II Cell Senescence, SASP Secretion, and SASP-mediated Activation of Alveolar Macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 62, 319–330. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2019-0071OC>
- Salton, F., Volpe, M.C., Confalonieri, M., 2019. Epithelial–Mesenchymal Transition in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Medicina (Kaunas)* 55. <https://doi.org/10.3390/medicina55040083>
- Sarcinelli, C., Dragic, H., Piecyk, M., Barbet, V., Duret, C., Barthelaix, A., Ferraro-Peyret, C., Fauvre, J., Renno, T., Chaveroux, C., Manié, S.N., 2020. ATF4-Dependent NRF2 Transcriptional Regulation Promotes Antioxidant Protection during Endoplasmic Reticulum Stress. *Cancers (Basel)* 12. <https://doi.org/10.3390/cancers12030569>
- 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, 136–151. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-134-2-200101160-00015>
- Sforza, E., Roche, F., 2016. Chronic intermittent hypoxia and obstructive sleep apnea: an experimental and clinical approach. *Hypoxia (Auckl)* 4, 99–108. <https://doi.org/10.2147/HP.S103091>
- Shi, Z., Xu, L., Xie, H., Ouyang, R., Ke, Y., Zhou, R., Yung, W.-H., 2020. Attenuation of intermittent hypoxia-induced apoptosis and fibrosis in pulmonary tissues via suppression of ER stress activation. *BMC Pulm Med* 20, 92. <https://doi.org/10.1186/s12890-020-1123-0>
- Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M., Samali, A., 2006. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 7, 880–885. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400779>
- 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, 30972–30980. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.181164>
- Tanjore, H., Lawson, W.E., Blackwell, T.S., 2013. Endoplasmic reticulum stress as a pro-fibrotic stimulus. *Biochim. Biophys. Acta* 1832, 940–947. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.11.011>
- Tuleta, I., Pizarro, C., Nickenig, G., Juergens, U., Skowasch, D., 2016. Deleterious effects of intermittent hypoxia on lung tissue. *European Respiratory Journal* 48. <https://doi.org/10.1183/13993003.congress-2016.PA2070>
- Tzouveleakis, A., Harokopos, V., Papatountas, T., Oikonomou, N., Chatziioannou, A., Vilaras, G., Tsiambas, E., Karameris, A., Bouros, 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, 1108–1119. <https://doi.org/10.1164/rccm.200705-683OC>

- Willis, B.C., Liebler, J.M., Luby-Phelps, K., Nicholson, A.G., Crandall, E.D., du Bois, R.M., Borok, Z., 2005. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* 166, 1321–1332. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)62351-6](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)62351-6)
- Xu, Z., Mo, L., Feng, X., Huang, M., Li, L., 2020. Using bioinformatics approach identifies key genes and pathways in idiopathic pulmonary fibrosis. *Medicine (Baltimore)* 99, e22099. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000022099>
- Young, T., Palta, M., Dempsey, J., Skatrud, J., Weber, S., Badr, S., 1993. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med* 328, 1230–1235. <https://doi.org/10.1056/NEJM199304293281704>

Experimental design I



Experimental design II

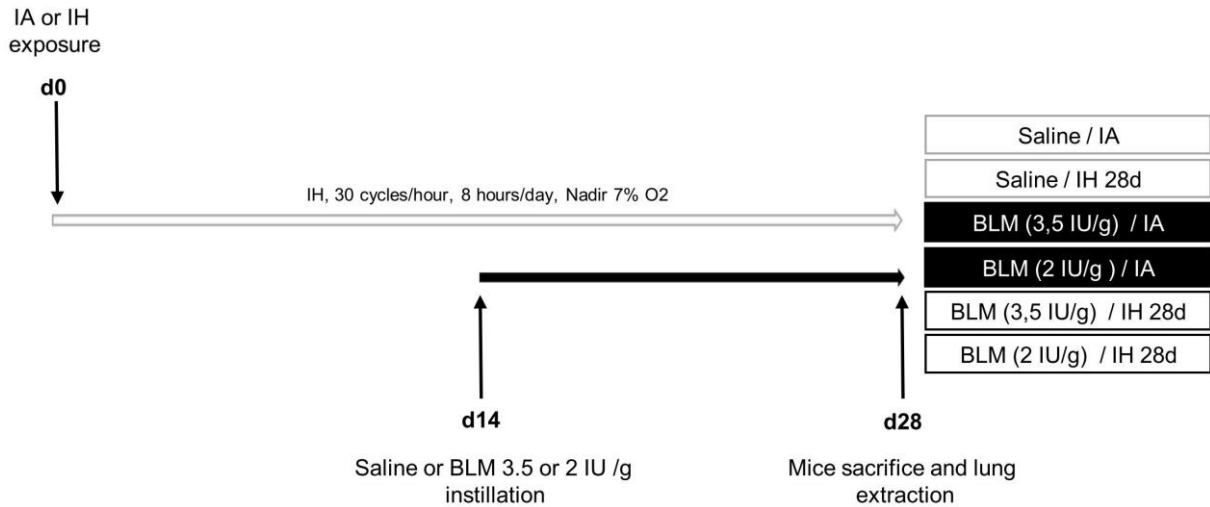


Figure 1: Experimental designs of Bleomycin instillation and intermittent hypoxia exposure

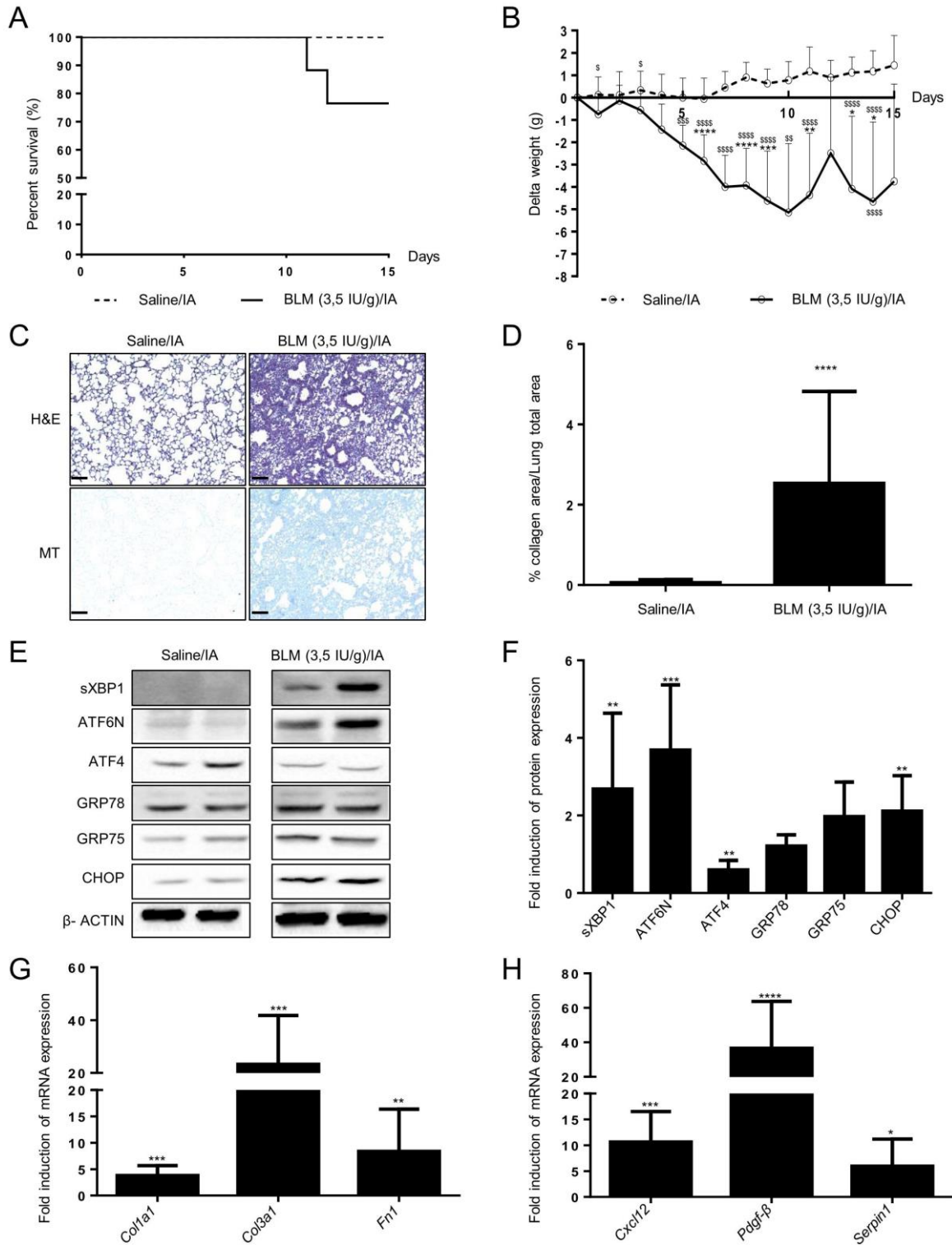


Figure 2: Characterisation of Bleomycin-induced lung fibrosis mice model.

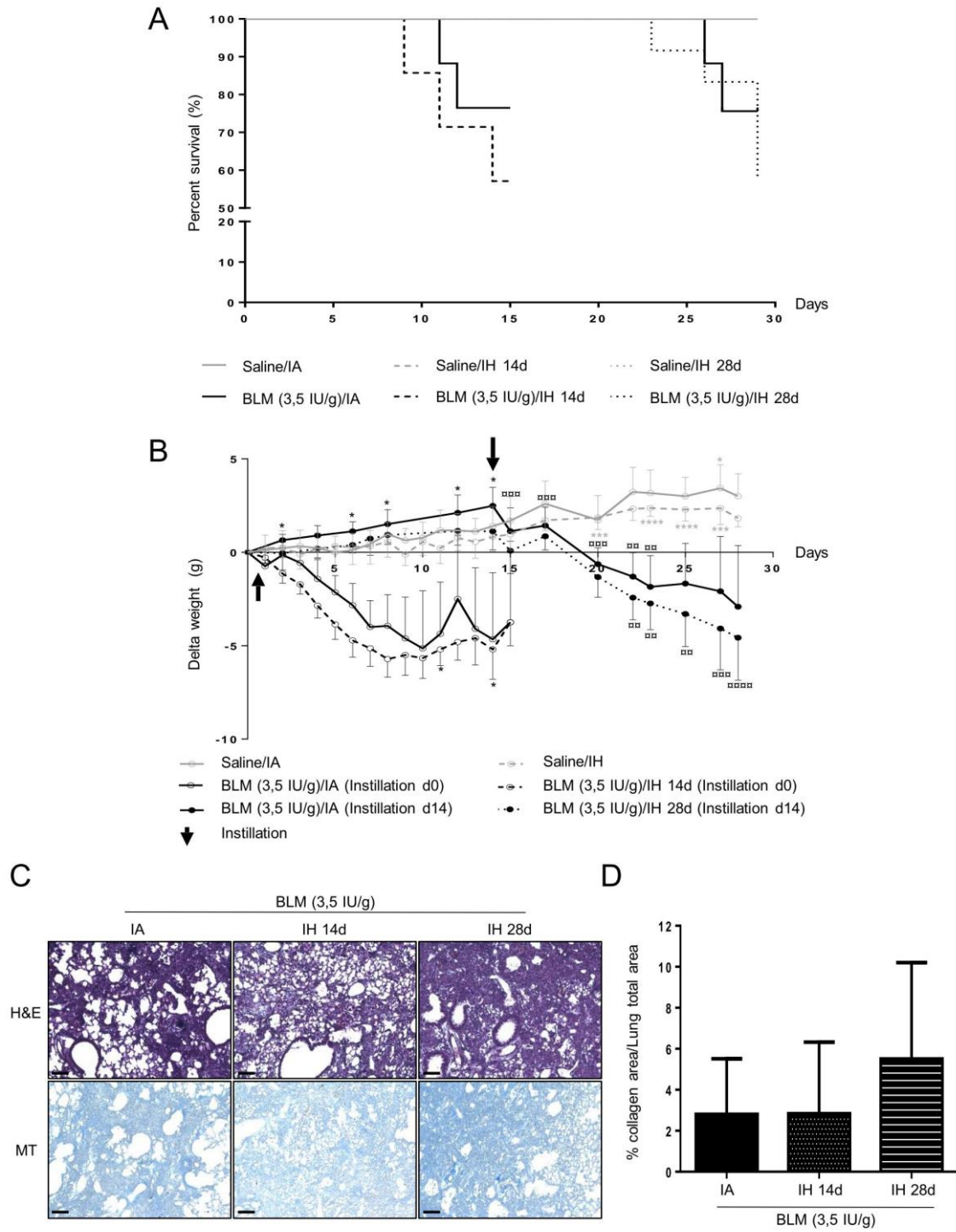


Figure 3: Impact of intermittent hypoxia exposure on Bleomycin-induced lung fibrosis in mice.

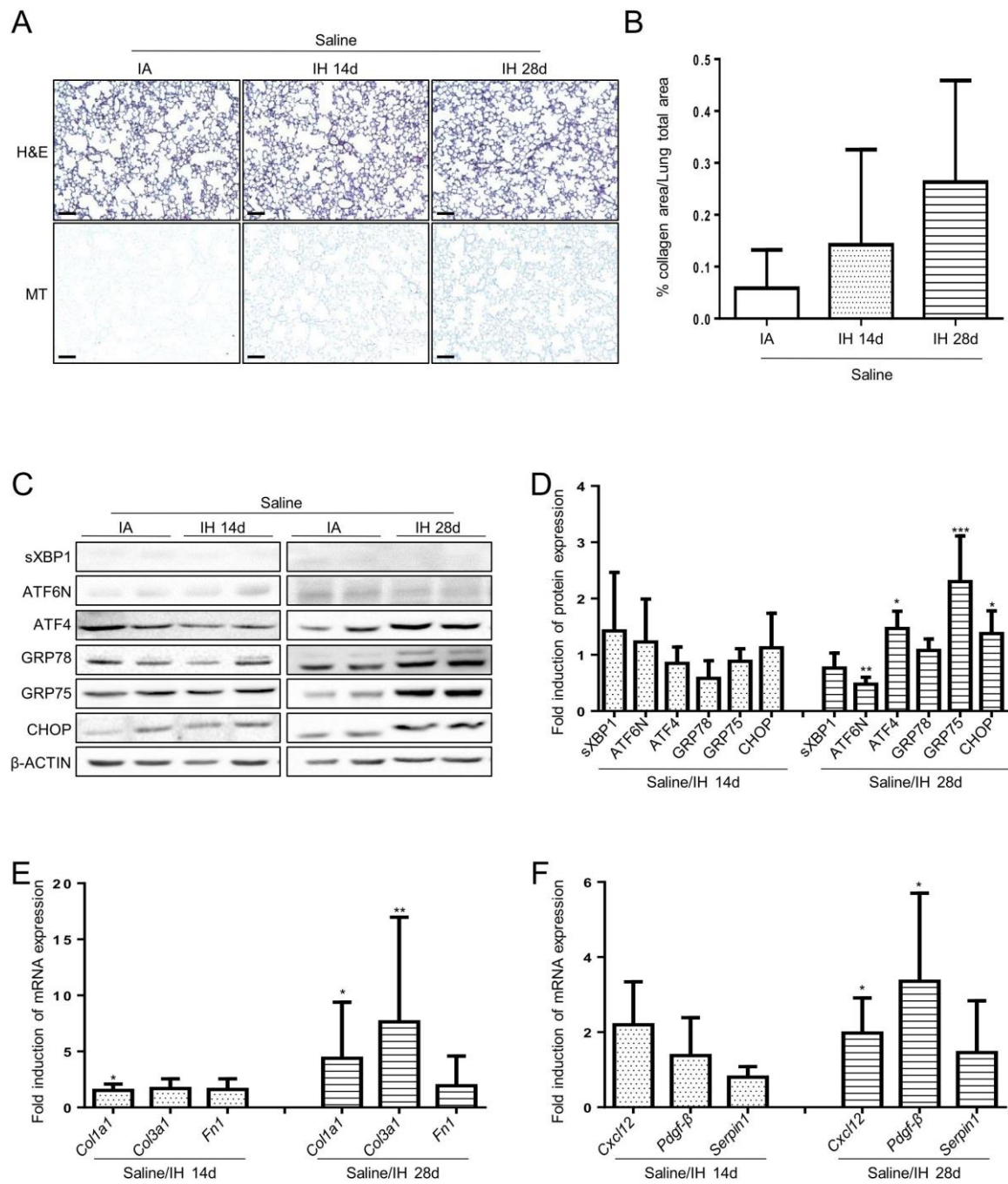


Figure 4: Effect of short or middle term intermittent hypoxia exposure in lung.

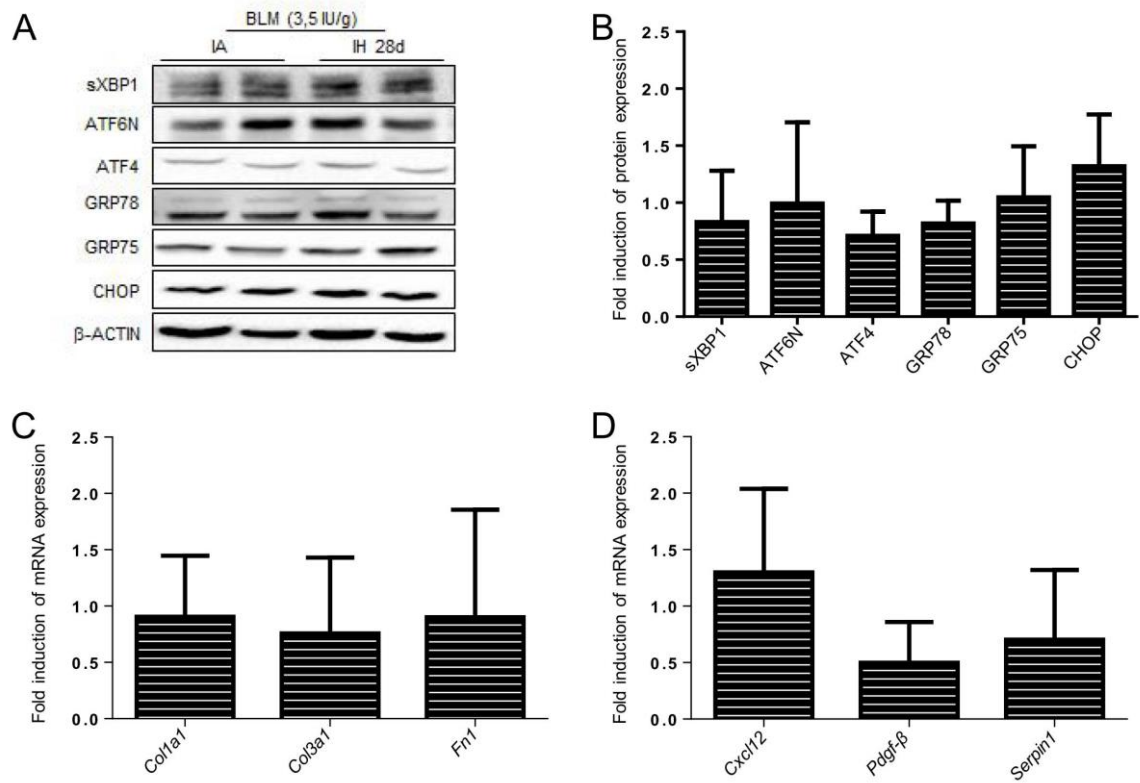


Figure 5: Impact of intermittent hypoxia preconditioning on BLM-induced fibrosis molecular markers in lung.

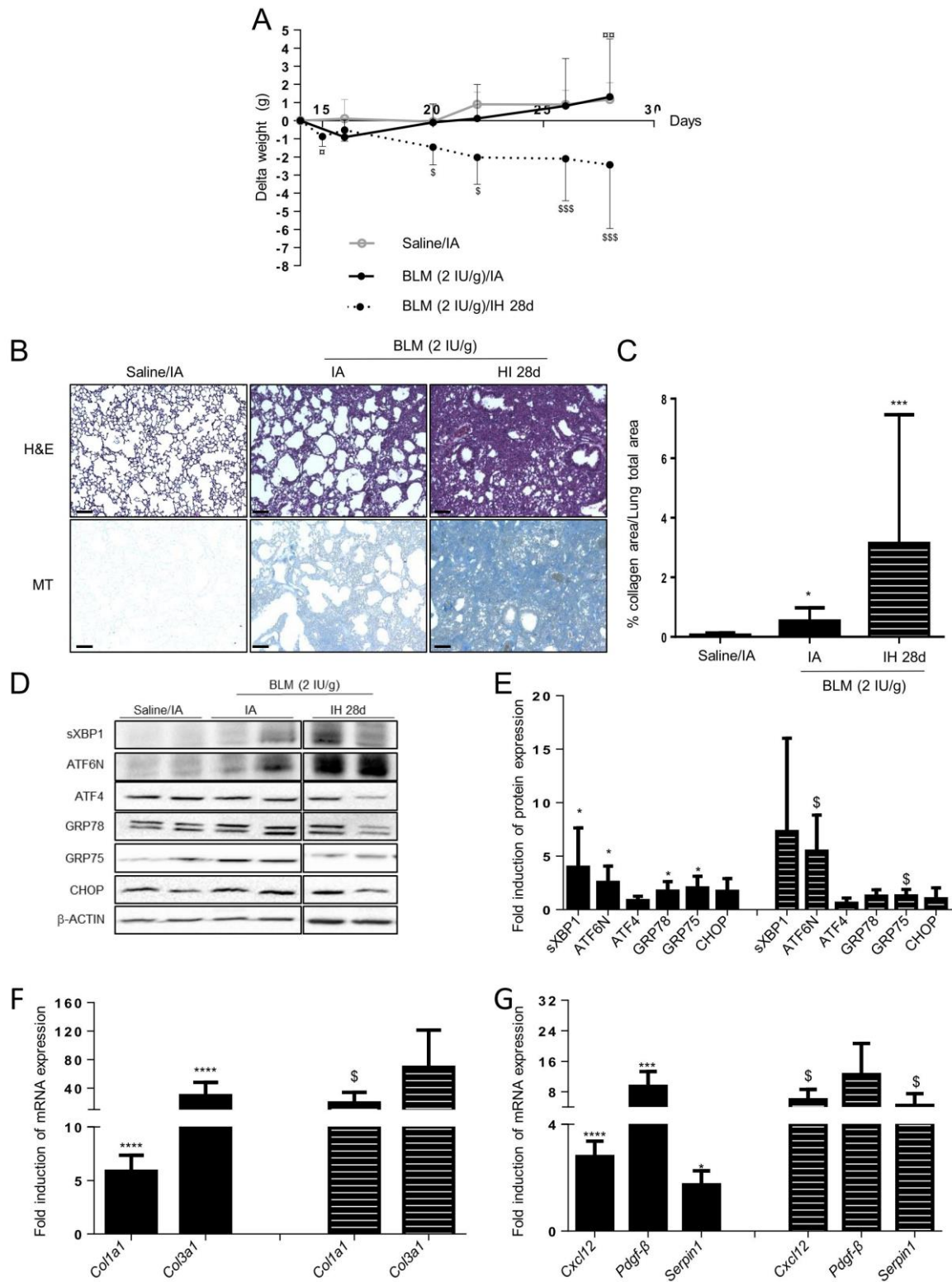


Figure 6: Impact of intermittent hypoxia preconditioning on low dose BLM-induced lung fibrosis.

II.3.2 Conclusion de l'article 2

Dans cette étude nous avons mis en évidence qu'une exposition prolongée (4 semaines) à l'HI induisait l'expression des marqueurs de stress du RE et des facteurs pro-fibrosants au niveau pulmonaire chez les animaux contrôles (groupe saline). De plus, nous avons observé une aggravation de la fibrose pulmonaire induite par la BLM lorsque les animaux étaient pré-exposés à l'HI, notamment lorsqu'une dose faible de BLM était utilisée. De manière intéressante, cette aggravation de la fibrose par l'HI était accompagnée d'une exacerbation de l'expression des marqueurs de stress du RE et de l'expression des facteurs pro-fibrosants. Ces résultats suggèrent que l'aggravation de la fibrose pulmonaire par l'HI serait secondaire au moins en partie à l'induction d'un stress du RE et les facteurs pro-fibrosants.

Dans ce contexte, l'implication d'autres mécanismes moléculaires n'est pas à exclure. En effet, dans le processus de fibrogénèse d'autres stress sont également impliqués tels que le stress oxydant, l'inflammation et l'apoptose qui pourraient jouer un rôle clé. Ces facteurs de stress sont également induits en réponse à l'HI.

Dans la suite de l'étude, nous avons donc analysé l'expression des marqueurs de stress oxydant (GPx, catalase, NRF2 et ROS), de l'inflammation (IL1 β , IL6, CXCL1, NFkB-p50 et la MPO), de l'apoptose (PARP clivée, activité des caspases3/7et BNIPL3) ainsi que d'autres marqueurs de stress du RE non présentés dans l'étude 2 (p-eIF2 α et GRP94).

II.4 Impact d'un pré-conditionnement à l'HI sur l'induction du stress oxydant, de l'apoptose et de l'inflammation dans le modèle de souris instillées à la BLM

Cette analyse a été effectuée sur les prélèvements pulmonaires issus de l'étude 2. Les souris ont été préexposées 14 jours à l'HI (30 cycles/h, 8h/jour, nadir 7% O₂) ou à l'AI puis instillées à la BLM (3.5UI/g) ou au sérum saline et sacrifiées au 28^{ème} jour d'expérimentation.

II.4.1 Impact sur l'expression des marqueurs de stress oxydant

Afin d'étudier le stress oxydatif, nous avons analysé l'expression des enzymes antioxydantes (catalase et GPx) ainsi que l'expression du facteur de transcription NRF2, majoritairement impliqué dans la transcription des gènes de la réponse antioxydante (Figure 20A, 20B, 20C).

Nos résultats montrent que la BLM tend à diminuer l'expression de la GPx (Figure 20A). En outre, une diminution significative de l'expression de la catalase (Figure 20B) comparativement au groupe contrôle (AI-Saline) est observée.

L'exposition à l'HI seule a induit une légère tendance à l'augmentation de l'expression de la catalase comparativement au groupe contrôle (groupe HI-Saline *versus* groupe AI-Saline) (Figure 20B). Nous n'observons pas d'effet de l'HI ni sur l'expression de la GPx (Figure 20A) ni sur l'expression de NRF2 (Figure 20C).

Dans le groupe ayant reçu une double agression (groupe HI-BLM), on observe une tendance à la diminution de l'expression de la GPx par rapport au groupe contrôle AI-BLM (Figure 20A). Cependant, aucune différence de l'expression de la catalase ni de NRF2 n'est observée entre le groupe AI-BLM *versus* le groupe AI-Saline ni entre le groupe HI-BLM *versus* le groupe AI-BLM (Figure 20C).

La génération des ROS a également été évaluée chez ces souris par une sonde CM-H2DCFDA (diacétate de 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine). Le principe est que la fluorescence émise par cette sonde est proportionnelle à la quantité de ROS. Nos résultats montrent une diminution significative de l'intensité de fluorescence en réponse à la BLM (Figure 20D, groupe AI-BLM *versus* AI-Saline). D'autre part, il n'y a ni un effet de l'exposition à l'HI seule ni un effet aggravant de l'HI sur l'intensité de fluorescence de la sonde dans le groupe HI-BLM (Figure 20D).

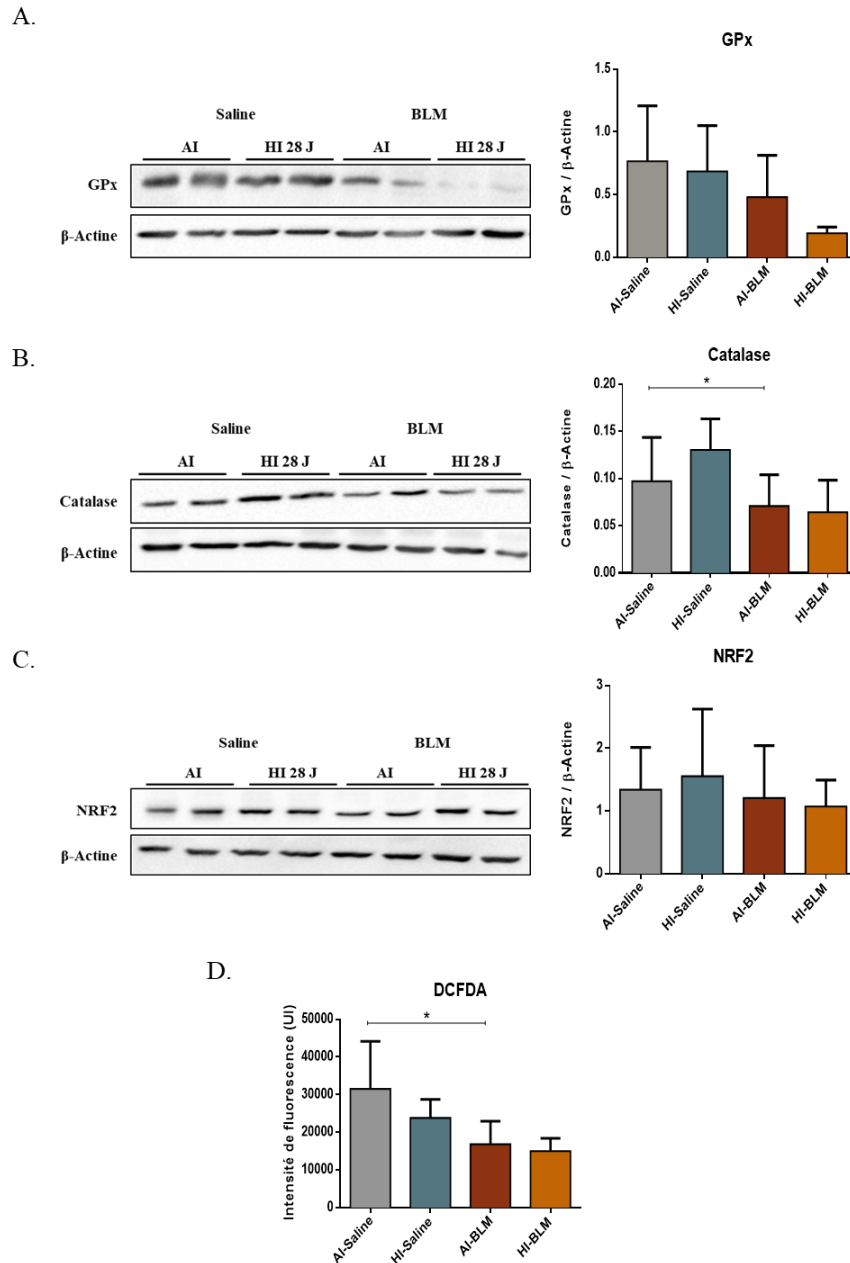


Figure 20: Analyse de l'expression des marqueurs de stress oxydant.

Les souris ont été exposées à l'HI ou à l'AI à J0 puis une instillation de BLM (3,5 UI/g) ou du saline a été réalisée à J14. Le sacrifice et les prélèvements des poumons ont été réalisés à J28. **A, B, C**) Analyse par WB des marqueurs anti-oxydants (GPx, catalase, NRF2) sur des lysats de protéines totales du lobe inférieur du poumon droit. Pour chaque marqueur un blot représentatif (à gauche) ainsi qu'une quantification (à droite) de l'expression des protéines, rapportée à l'actine ont été représentés. **D**) Analyse par une sonde H2DCFDA de la génération des ROS. La sonde a été préparée à une concentration de 50 μ M dans du tampon d'extraction de protéines (RIPA). Par la suite, 40 μ l de cette préparation ont été ajoutées à une quantité de 40 μ g de lysats de protéines totales du lobe inférieur du poumon droit. Une lecture de fluorescence a été ensuite réalisée. Dans chaque groupe, n = 7 à 11 souris. Les données brutes ont été soumises au test non paramétrique « Kruskal-Wallis »; * : p < 0,05.

II.4.2 Impact sur l'expression des marqueurs d'inflammation

Nous avons par la suite analysé l'expression des marqueurs pro-inflammatoires chez les mêmes souris (Figure 21).

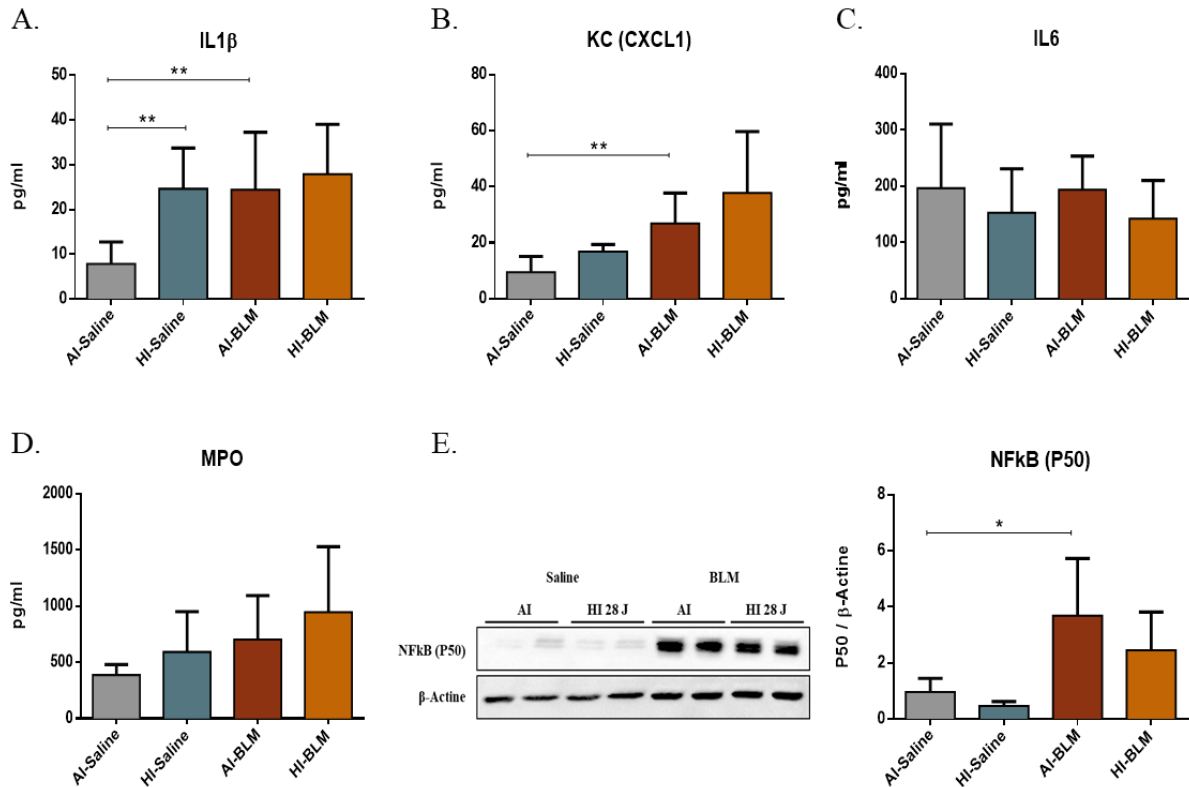


Figure 21: Analyse de l'expression des marqueurs d'inflammation.

Les souris ont été exposées à l'HI ou à l'AI à J0 puis une instillation de BLM (3,5 UI/g) ou du saline a été réalisée à J14. Le sacrifice et les prélèvements des poumons ont été réalisés à J28. **A, B, C, D**) Dosage par ELISA de la teneur en IL1 β , CXCL1(KC), IL6 et en MPO (myéloperoxydase) dans des lysats de protéines totales du lobe inférieur du poumon droit. Les dosages ELISA ont été effectués sur 50 μ g de protéines totales pour IL1 β , CXCL1(KC) et IL6 et 10 μ g de protéines totales pour la MPO. **E**) Analyse par WB de l'expression de la sous unité P50 de NFkB sur des lysats de protéines totales du lobe inférieur du poumon droit. Un blot représentatif (à gauche) ainsi qu'une quantification (à droite) de l'expression des protéines, rapportée à l'actine ont été représentés. Dans chaque groupe, n = 7 à 11 souris. Les données brutes ont été soumises au test non paramétrique « Kruskal-Wallis »; * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01.

La comparaison entre le groupe AI-Saline et le groupe AI-BLM montre que le traitement à la BLM induit une augmentation significative de la concentration de deux médiateurs pro-inflammatoires d'IL1 β (Figure 21A) et KC(CXCL1) (Figure 21B) ainsi qu'une induction significative de l'expression de NFkB-P50 (Figure 21E). Nous n'avons pas observé d'effet significatif de BLM sur l'IL6 et la MPO (Figure 21C, 21D).

L'exposition à l'HI entraîne une augmentation significative de la concentration d'IL1 β (Figure 21A) comparativement au contrôle (groupe HI-Saline *versus* groupe AI-Saline). Cependant, nous n'avons pas observé d'effet significatif de L'HI sur les autres marqueurs pro-inflammatoires dosés par ELISA (CXCL1, IL6, MPO) ni sur l'expression de NF κ B-P50 analysée par WB.

Enfin, lors de la double agression, nous n'avons pas noté d'effet exacerbé dans le groupe HI-BLM comparativement au groupe contrôle AI-BLM sur tous les marqueurs analysés (Figure 21).

II.4.3 Impact sur l'expression des marqueurs d'apoptose

L'apoptose des CEA est largement décrite comme élément majeur dans la fibrogénèse, et l'expression de différents marqueurs d'apoptose ont été retrouvée chez les patients FPI notamment au niveau des CEA (Maeyama et al. 2001; Plataki et al. 2005). Parmi ceux-ci, trois facteurs ont retenu notre attention dans cette étude : BNIP3L, les caspases 3/7 et PARP (Figure 22). En effet, l'expression du facteur pro-apoptotique Bnip3L est induite en réponse à l'hypoxie et associée à une induction de l'activité des caspases 3/7 (Bernard et al. 2018; Gille et al. 2018). Par ailleurs, les caspases 3/7 sont des caspases effectrices responsables du clivage de la protéine PARP impliquée dans le signal pro-apoptotique et leur expression ainsi que celle de PARP clivée a été rapportée en réponse à l'hypoxie (Delbrel et al. 2018) ou à l'HI (Gille et al. 2018) respectivement.

L'analyse des résultats montre un effet significatif de la BLM sur l'expression de PARP clivée et de Bnip3L (Figure 22A, 22C) par rapport au contrôle (groupe AI-BLM *versus* groupe AI-Saline). Cependant, il n'y a pas d'effet significatif de la BLM sur l'activité des caspases 3/7 (Figure 22B).

L'exposition à l'HI n'a pas montré d'effet significatif sur ces marqueurs pro-apoptotiques (PARP clivée, activité des caspases 3/7, Bnip3L) comparativement au contrôle (HI-Saline *versus* AI-Saline). De plus, un effet exacerbateur de l'HI n'a pas été observé dans HI-BLM par rapport au groupe AI-BLM (Figure22).

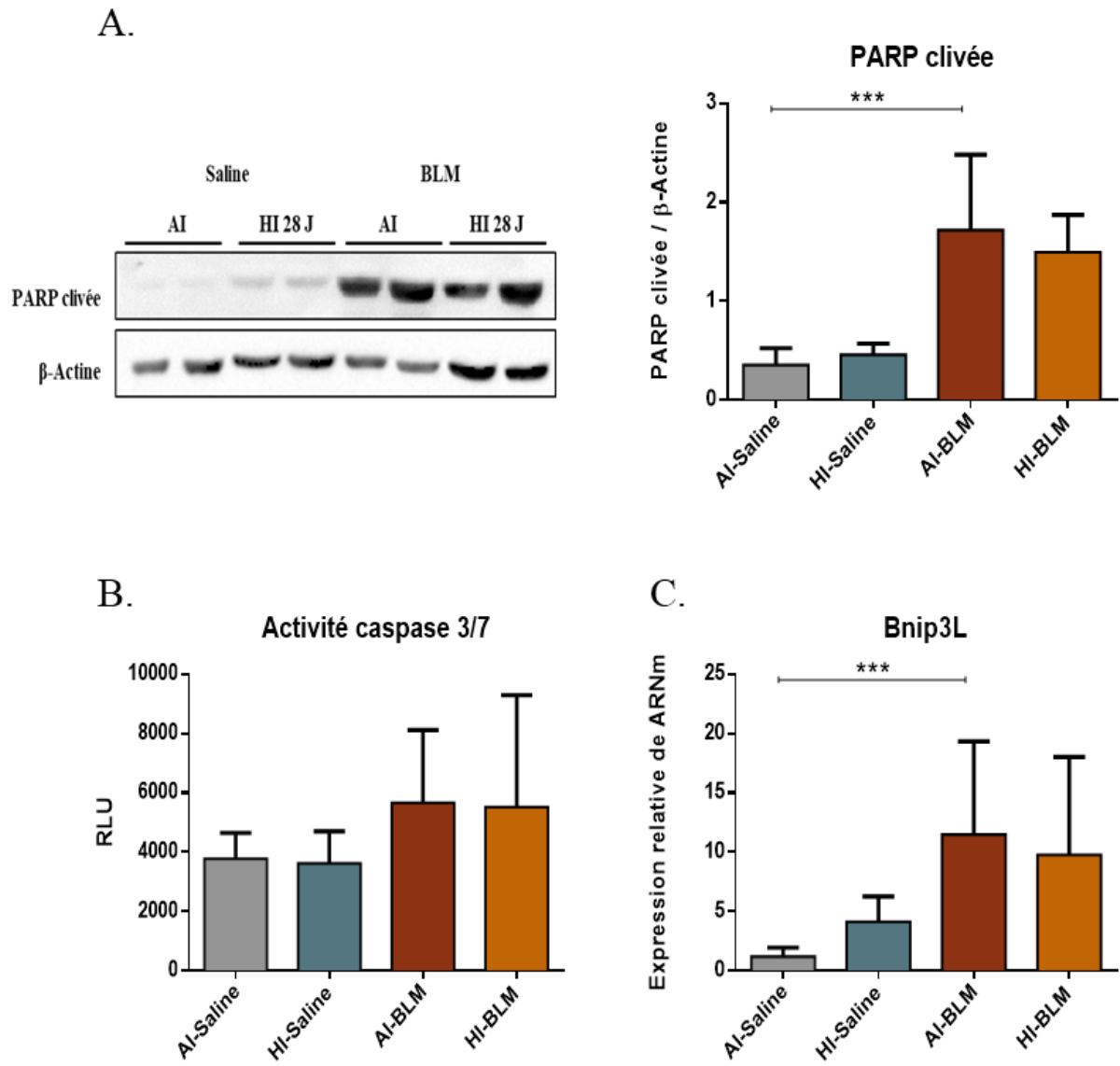


Figure 22: Analyse de l'expression des marqueurs d'apoptose dans le lysat de poumon total.

Les souris ont été exposées à l'HI ou à l'AI à J0 puis une instillation de BLM (3,5 UI/g) ou du saline a été réalisée à J14. Le sacrifice et les prélèvements des poumons ont été réalisés à J28. **A)** Analyse par WB de l'expression du PARP clivée sur des lysats de protéines totales du lobe inférieur du poumon droit. Un blot représentatif (à gauche) ainsi qu'une quantification (à droite) de l'expression des protéines, rapportée à l'actine ont été représentés. **B)** Analyse de l'activité des caspases 3/7 dans des lysats totaux du lobe inférieur du poumon droit. 20 μ l du substrat des caspases 3/7 proluminescent ont été ajoutées à 5 μ g des extraits protéiques pulmonaires. Le clivage du substrat par les caspases 3/7 donne un produit luminescent. La lecture de la luminescence a été effectuée et est proportionnelle à l'activité des caspases 3/7. **C)** Quantification de l'expression des ARNm par RT-qPCR de Bnip3L a été réalisée sur des extraits d'ARN totaux du lobe supérieur du poumon droit. Dans chaque groupe, n = 7 à 11 souris. Les données brutes ont été soumises au test non paramétrique « Kruskal-Wallis »; *** : p < 0,001.

II.4.4 Impact sur l'expression d'autres marqueurs de stress du RE

Dans cette étude, nous avons également testé l'impact de l'HI sur différents acteurs des trois voies de l'UPR. Pour cela, en plus des différents marqueurs présentés dans l'article 2, nous avons étudié l'expression de la protéine phospho-eIF2 α et de l'ARNm de la chaperonne Grp94 (Figure 23).

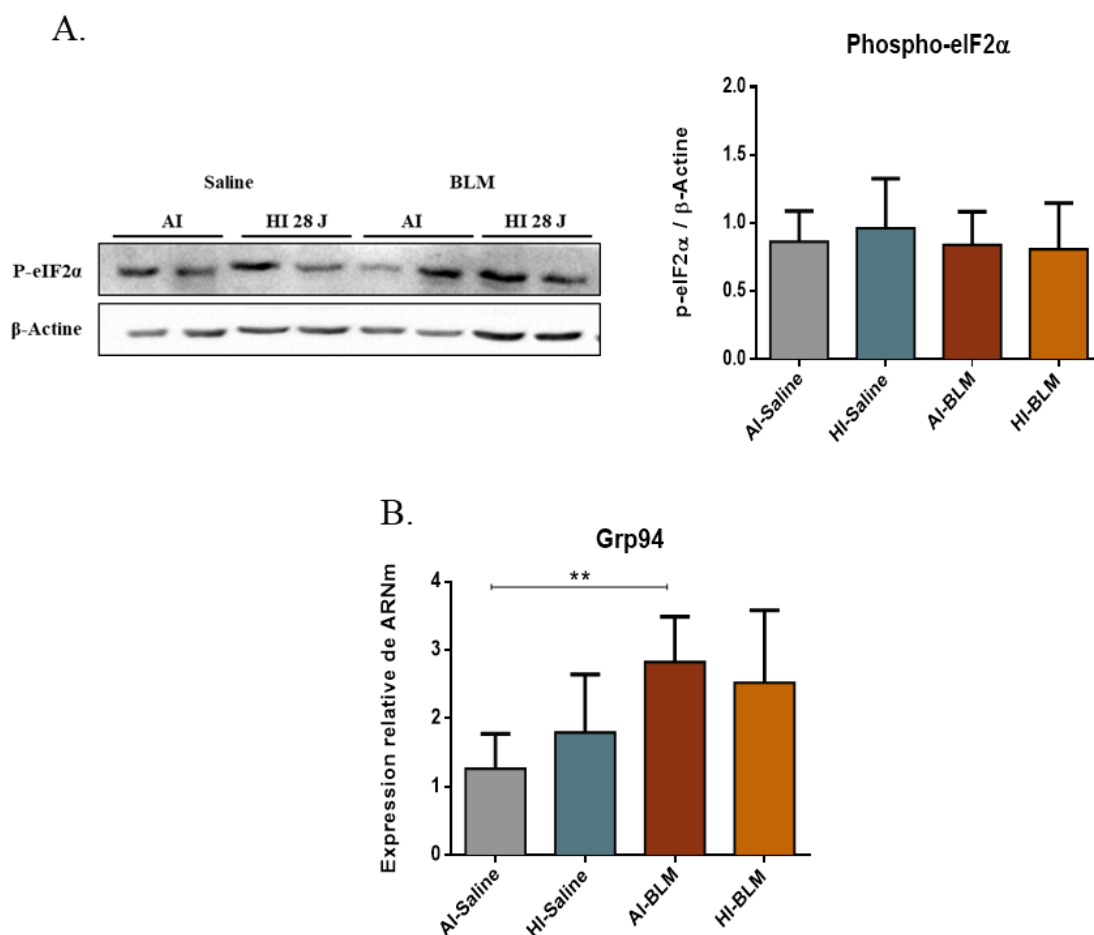


Figure 23: Analyse de l'expression d'autres marqueurs du stress du RE.

Les souris ont été exposées à l'HI ou à l'AI à J0 puis une instillation de BLM (3,5 UI/g) ou du saline a été réalisée à J14. Le sacrifice et les prélèvements des poumons ont été réalisés à J28. A) Analyse par WB de l'expression du phospho-eIF2 α sur des lysats de protéines totales du lobe inférieur du poumon droit. Un blot représentatif (à gauche) ainsi qu'une quantification (à droite) de l'expression des protéines, rapportée à l'actine ont été représentés. C) Quantification de l'expression des ARNm par RT-qPCR de Grp94 a été réalisée sur des extraits d'ARN totaux du lobe supérieur du poumon droit. Dans chaque groupe, $n = 7$ à 11 souris. Les données brutes ont été soumises au test non paramétrique « Kruskal-Wallis »; **: $p < 0,01$.

Nos résultats montrent que l'expression du facteur phospho-eIF2 α n'est pas modulée quelle que soit la condition (Figure 23A). Par ailleurs, on note une augmentation significative de l'expression des ARNm de Grp94 en réponse à la BLM par rapport au contrôle (AI-BLM versus AI-Saline) (Figure 23B).

L'exposition à l'HI n'a pas entraîné d'effet significatif sur l'expression de Grp94 comparativement au contrôle (HI-Saline versus AI-Saline). De plus, un effet aggravant de l'HI n'a pas été observé dans le groupe HI-BLM par rapport au groupe AI-BLM (Figure 23B).

Conclusion Partie IV

Ces résultats complémentaires montrent que la BLM (14 jours) a des effets pro-oxydants, pro-inflammatoires, pro-apoptotiques et induit l'expression des marqueurs du stress du RE. L'exposition à l'HI pendant 28 jours aurait un effet pro-inflammatoire mis en évidence par l'induction significative d'IL1 β . Cependant, il n'y a pas d'effet significatif de l'HI seule sur l'expression des autres marqueurs analysés. De plus, la double agression n'a pas montré d'effet exacerbant de l'HI sur les différents marqueurs induits par la BLM.

L'absence de l'effet de l'HI seule ou combinée à la BLM sur l'expression des marqueurs de stress oxydant, de l'inflammation et de l'apoptose suggère que dans nos conditions, ils ne seraient pas impliqués dans l'effet aggravant de l'HI sur la fibrose pulmonaire. De ce fait, nous avons suggéré que la sénescence cellulaire, événement également décrit dans la fibrogénèse, pourrait être majoritairement impliquée. La sénescence se définit comme un arrêt de la croissance cellulaire afin de limiter la prolifération anormale de cellules endommagées. Les cellules sénescents, métaboliquement actives, se caractérisent par l'expression des protéines inhibitrices du cycle cellulaire p53, p27^{KIP1}, p16^{Ink4a}, suppresseurs de tumeurs (Dodig, Čepelak, et Pavić 2019) mais aussi par une augmentation de l'activité β -galactosidase lysosomiale (B. Y. Lee et al. 2006) et l'expression de l'histone H2A phosphorylée (γ H2AX) en réponse au dommage à l'ADN (Z.-Y. He et al. 2016). La sénescence cellulaire pourrait être impliquée dans l'aggravation de la fibrose pulmonaire par l'HI. En effet, les marqueurs de sénescence ont été retrouvés exprimés dans les CEA de patients atteints de FPI (Disayabutr et al. 2016; Tian et al. 2019). De plus, une étude récente a montré qu'une exposition à l'HI induisait une sénescence des préadipocytes humains en culture avec une augmentation du pourcentage de cellules positives à la β -galactosidase et la localisation nucléaire des marqueurs p16^{Ink4a} et γ H2AX (Polonis et al. 2020).

Afin de tester une éventuelle implication de la sénescence dans l'effet aggravant de l'HI, nous avons analysé l'expression des marqueurs de sénescence cellulaire (p53, p27^{KIP1}, p16^{Ink4a}) dans nos conditions expérimentales.

II.5 Etude de l'implication de la sénescence cellulaire dans l'effet aggravant de l'HI sur la fibrose pulmonaire

Dans cette partie nous avons analysé les prélèvements pulmonaires issus des souris pré-exposées à l'HI (30 cycles/h, 8h/jour, nadir : 7% O₂) ou à l'AI et instillés à la BLM (2UI/g) ou au saline à J14. Les souris ont été par la suite réexposées pendant 14 jours supplémentaires et sacrifiées à J28. L'analyse de l'expression des marqueurs de sénescence (p53, p16^{ink4a} et p27^{KIP1}) a été effectuée par western blot sur des lysats de poumon total.

Nos résultats montrent que l'instillation de BLM induit une tendance à l'augmentation de l'expression de p53 et p16^{ink4a} (Figure 24A, 24B) mais pas d'effet sur l'expression de la protéine p27^{KIP1} (Figure 24C) par rapport au groupe contrôle (AI-BLM versus AI-Saline).

L'exposition à l'HI seule n'a pas d'effet significatif sur l'expression de p53 et p16^{ink4a} (Figure 24A, 24B) avec une tendance à l'augmentation pour la protéine p27^{KIP1} (Figure 24C) par rapport à la condition contrôle (AI-Saline).

Cependant, une différence non significative a été observée entre le groupe HI-BLM versus le groupe AI-BLM. En effet, l'HI semble induire un effet exacerbant sur l'effet de la BLM concernant les protéines p53 et p16^{ink4a} (Figure 24A, 24B).

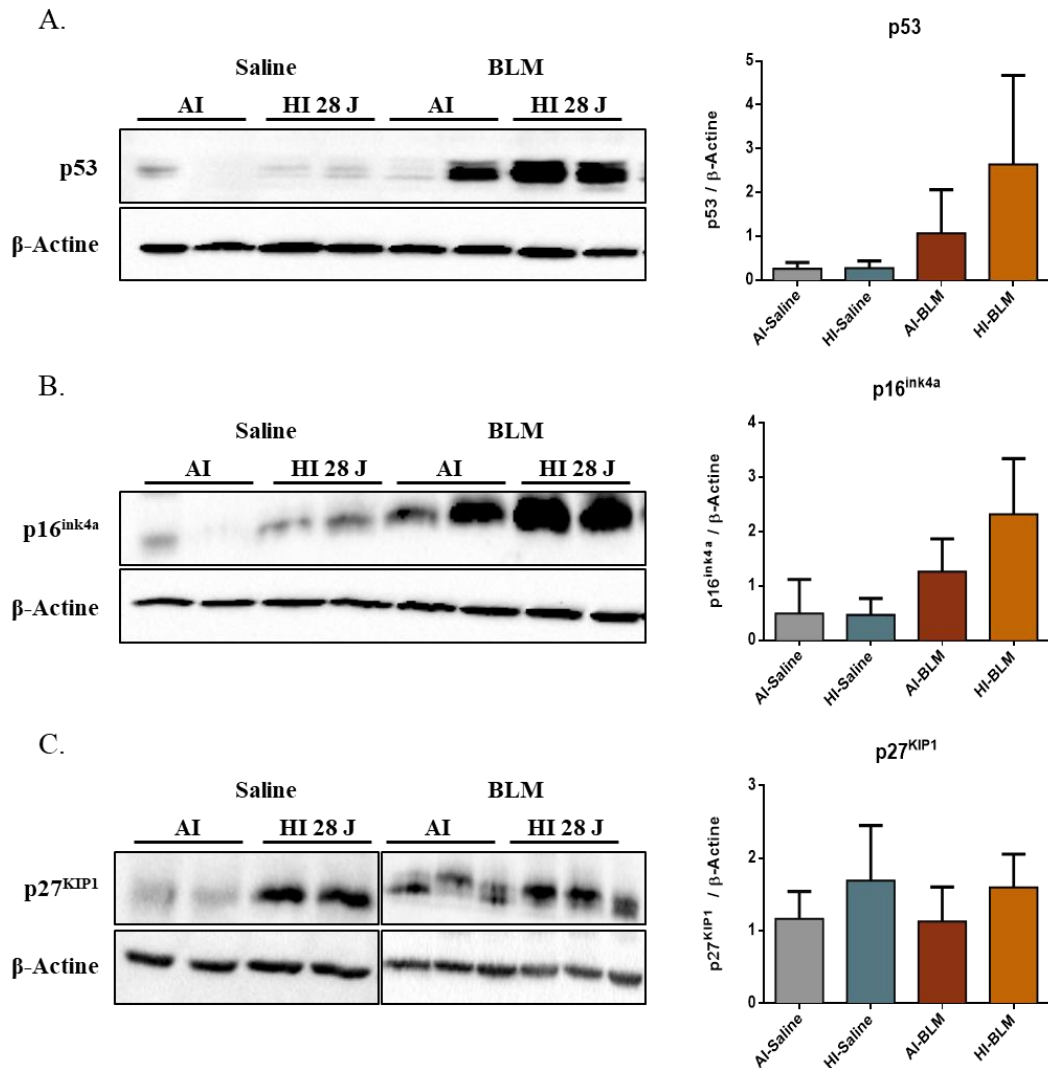


Figure 24: Analyse de l'expression d'autres marqueurs de sénescence par WB.

Les souris ont été exposées à l'HI ou à l'AI à J0 puis une instillation de BLM (2 UI/g) ou du saline a été réalisée à J14. Le sacrifice et les prélèvements des poumons ont été réalisés à J28. Analyse par WB de l'expression de la protéine **A) P53**, **B) P16^{ink4a}**, **C) P27^{KIP1}** sur des lysats de protéines totales du lobe inférieur du poumon droit. Un blot représentatif (à gauche) ainsi qu'une quantification (à droite) de l'expression des protéines, rapportée à l'actine ont été représentés. Dans chaque groupe, $n = 7$ à 11 souris. Les données brutes ont été soumises au test non paramétrique « Kruskal-Wallis ».

Conclusion Partie V

Les résultats préliminaires obtenus dans cette étude ont montré que l'expression des marqueurs de sénescence était modulée en réponse à la BLM et/ou à l'HI. Nous avons observé que la BLM seule modulerait l'expression des protéines p53 et p16^{ink4a} et que l'HI seule aurait plutôt pour cible l'expression de la protéine p27^{KIP1}. Cependant, la préexposition à l'HI semble exacerber l'expression des marqueurs modulés par la BLM (p53 et p16^{ink4a}).

DISCUSSION GENERALE

L'objectif de la thèse était de comprendre l'impact du SAOS chez les patients atteints de FPI sur le plan histologique qui reflète le degré de la gravité de la fibrose pulmonaire, mais également d'un point de vue moléculaire. Pour répondre à nos objectifs, nous avons utilisé un modèle murin de double agression avec une fibrose pulmonaire induite par instillation intratrachéale de BLM et une exposition à de l'HI élément pathogénique majeur du SAOS. Nous avons montré que l'exposition à l'HI exacerbe la fibrose pulmonaire et que cet effet serait secondaire au moins en partie à une induction d'un stress du RE.

Les résultats présentés dans la partie précédente ont pour la plupart été discutés dans les publications associées à ce travail. Le but de cette discussion générale n'est pas de reprendre l'ensemble des points soulevés mais de mettre en avant les plus intéressants, de discuter les résultats non publiés et de mettre en perspective l'ensemble de ces données au regard de la littérature existante.

I Considération méthodologique

I.1 Intérêts et limites du modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine

La BLM est un antibiotique chimiothérapeutique et identifié comme agent pro-fibrosant entraînant une toxicité et une fibrose pulmonaire chez les patients traités. L'instillation intratrachéale de BLM chez la souris est largement caractérisée et utilisée comme modèle d'étude de la fibrose pulmonaire (Moore et Hogaboam 2008). Dans ce modèle plusieurs aspects histologiques et moléculaires caractéristiques de la FPI ont été décrits tels que l'épaississement interstitiel et un collapsus alvéolaire accompagnés par une apoptose des CEA, la présence de CEA II hyperplasiques, le relargage des cytokines pro-fibrosantes, la prolifération des fibroblastes synthétisant du collagène et la présence de foyers fibroblastiques (Moore et Hogaboam 2008; Williamson, Sadofsky, et Hart 2015). Néanmoins, ce modèle présente quelques limites. En effet, contrairement à la FPI chez l'homme, la fibrose induite par la BLM a été sévèrement critiquée en raison de la rapidité de son développement, le pic inflammatoire précédant la fibrose (J8) (Izbicki et al. 2002) ainsi que sa résorption généralement entre 21 et 28 jours après l'instillation (Tashiro et al. 2017). De plus, la distribution de la fibrose induite par la BLM est différente de celle de la FPI. En effet, dans la FPI, la fibrose se développe avec une prédominance plutôt dans la région basale et sous pleurale contrairement à celle induite par

la BLM avec une distribution dominante dans la région bronchiolo-centrique (Williamson, Sadofsky, et Hart 2015).

I.2 Intérêts et limites du modèle d'hypoxie intermittente

L'HI est considérée comme l'élément pathogénique majeur du SAOS. Elle est largement utilisée dans la recherche expérimentale chez les modèles animaux pour simuler le stress d'hypoxie - réoxygénation qui se produit lors du SAOS (Chopra, Polotsky, et Jun 2016). Cependant, ce modèle ne reproduit pas l'intégralité des aspects physiopathologiques du SAOS. En effet en plus de l'HI, d'autres évènements sont également décrits tels que l'hypercapnie intermittente, la diminution répétée de la pression intra-thoracique lors de l'effort respiratoire pour restaurer la perméabilité des VAS et la fragmentation du sommeil due aux micro-réveils nocturnes (Eckert et Malhotra 2008). De plus, les évènements obstructifs lors du SAOS pourraient induire des forces de traction importantes à la périphérie du poumon par le biais des variations de la pression pleurale (Lederer et al. 2009; J. S. Kim et al. 2017). Ce stress de traction a été rapporté comme une cause de micro-agressions alvéolaires conduisant à la FPI (Leslie 2012; J. S. Kim et al. 2017).

Cependant, notre projet avait pour objectif de documenter les effets de l'HI sur l'évolution de la FPI. En effet, les effets délétères du SAOS ont été fortement attribués à l'HI nocturne et considéré comme un facteur de morbidité et de la mortalité du SAOS. En effet, une exposition à l'HI seule induisait un dysfonctionnement cardiovasculaire, métabolique et neurologique (Dewan, Nieto, et Somers 2015a). De fait et afin d'éviter les éléments confondants, nous sommes limités à ce seul paramètre.

I.3 Impact du protocole : biais expérimental ?

L'analyse des cartographies de poumons issus de la première et de la deuxième étude a montré une différence de sévérité de la fibrose chez les animaux BLM/AI (Article 1 *versus* article 2) et BLM/HI (article 1 *versus* article 2). En effet, les deux séries ont été réalisées par des expérimentateurs différents et avec des protocoles d'HI différents. On peut alors supposer la présence d'un biais expérimentateur et/ou protocole dépendant. Le protocole suivi dans la première l'étude était de 40 cycles/h, 8h/jour, nadir 6% O₂ ; alors que dans la seconde étude il était de 30 cycles/h, 8h/jour, nadir 7% O₂.

Les protocoles d'exposition des animaux à l'HI consistent à modifier différents paramètres (durée, fréquence et FiO_2) définissant ainsi la sévérité de l'HI. Parmi ces paramètres, la fréquence des événements d'hypoxie-réoxygénation, qui est un index de l'indice clinique d'apnée-hypopnée (IAH) chez les patients, semble jouer un rôle important (REF). En effet, le nombre de cycles d'hypoxie-réoxygénation pourrait entraîner des effets bénéfiques ou délétères en fonction de leurs fréquences (Dale, Ben Mabrouk, et Mitchell 2014; Navarrete-Opazo et Mitchell 2014). Dans la littérature, différents protocoles allant de 2 cycles /h à 60 cycles /h sont retrouvés (Farré et al. 2018).

Un autre paramètre important dans la définition de la sévérité de l'HI est la fraction d'oxygène dans l'air inspiré (FiO_2) pouvant aller de 4% d' O_2 à 15 % d' O_2 . Des effets doses ont été retrouvés suggérant une corrélation négative entre la FiO_2 et la sévérité de l'hypoxie (Farré et al. 2018; Lim et al. 2016).

De fait, les protocoles utilisés dans ce travail doctoral sont considérés comme sévères, avec un degré plus important dans le premier protocole, pouvant ainsi expliquer les différences observées.

II Impact de l'Hypoxie intermittente sur les lésions pulmonaires induites par la BLM

Le lien de causalité entre la FPI et le SAOS n'est pas clair et les études ayant pour but de comprendre la relation entre ces deux pathologies sont rares. Le SAOS pourrait apparaître avant ou avec le développement de la FPI. Ceci a été suggéré dans une étude qui a montré une forte prévalence du SAOS modéré à sévère dans les FPI incidentes (Gille et al. 2017). Durant ce travail doctoral, nous avons testé deux protocoles d'exposition à l'HI : une exposition concomitante à l'instillation de BLM (Article 1 et protocole I de l'article 2) et un pré-conditionnement suivi d'une instillation de BLM (protocole II de la seconde étude).

Dans notre première étude (Article 1, Gille et al. 2018), nous avons montré une augmentation de l'inflammation pulmonaire, une augmentation de l'apoptose de cellules pulmonaires, une surmortalité et une aggravation de la fibrose pulmonaire dans le groupe ayant subi une double agression par rapport aux autres groupes. Cette étude suggère que l'HI rencontrée dans le SAOS pourrait être un facteur aggravant de la FPI chez les patients en exacerbant l'inflammation pulmonaire et la fibrose pulmonaire. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par (Braun et al. 2018). Cette équipe a réalisé une instillation intratrachéale

de la BLM chez le rat à J0, puis une exposition à de l'HI à J5 (30 cycles/h, 10h/jour, nadir : 10% O₂) puis l'analyse a été effectuée à J14 et à J35 post instillation de BLM. Dans cette étude, les auteurs ont montré une augmentation des quantités pulmonaires d'hydroxyproline, de la fibrose et une surexpression des ARNm du collagène 1a1, du collagène 1a5 et du CTGF (CCN2) chez les rats de groupe BLM+HI à J35 (correspondant à 30 jours d'HI).

Par ailleurs, notre étude (Gille et al. 2018) a montré que l'exposition concomitante à l'HI semble moduler des mécanismes distincts à différents temps de la lésion pulmonaire induite par la BLM. En effet dans la phase aiguë inflammatoire (J4, J8), les effets exacerbant de l'HI en histologie ont été observés sur l'étendue des infiltrats inflammatoires alvéolaires et interstitiels. Cependant dans la phase chronique fibrosante (J21), ces effets ont été observés sur l'étendue de la fibrose avec un remaniement tissulaire et un dépôt de la MEC de façon excessive. De manière contradictoire, dans la nouvelle série d'exposition concomitante à 14 jours d'HI (période qui serait incluse dans la phase fibrosante), nous n'avons pas observé d'effet aggravant de l'HI ni sur la fibrose pulmonaire ni sur les infiltrats inflammatoires. Ceci pourrait s'expliquer soit par une différence de sévérité de l'HI entre nos deux études, soit par l'absence d'effets de l'HI à ce temps, comme observé dans l'étude de Braun et collaborateurs (Braun et al. 2018).

Nos résultats montrent que la fibrose pulmonaire observée 14 jours après instillation de BLM est plus sévère lorsque les animaux sont pré-exposés à l'HI (protocole II, article 2). Ces résultats sont cohérents avec deux publications récentes montrant l'effet aggravant d'un pré-conditionnement à l'HI sur la fibrose pulmonaire induite par la BLM (Kang et al. 2020) et sur la lésion pulmonaire aiguë induite par le lipopolysaccharide (LPS) (S. W. Kim et al. 2020).

Conclusion intermédiaire

L'exposition à l'HI exacerbe les lésions pulmonaires (aiguë et chronique) induites par la BLM. Cependant, ces lésions semblent plus sévères lorsque les animaux sont pré-exposés à l'HI. Cet effet aggravant de l'HI peut être lié à la mise en jeu de plusieurs voies de signalisation conduisant aux événements cellulaires classiquement observés dans la FPI. Parmi les acteurs moléculaires impliqués, nous nous sommes intéressés aux marqueurs de l'Inflammation, de l'apoptose, du stress oxydant et du Stress du RE.

III Marqueurs moléculaires impliqués

Afin de comprendre l'impact du SAOS dans l'initiation, le développement et le maintien de la FPI, nous avons entrepris d'identifier des mécanismes moléculaires impliqués dans l'exacerbation de la fibrose pulmonaire au travers d'acteurs clés communs.

III.1 Inflammation, apoptose, stress oxydant, Stress du RE

Parmi les mécanismes moléculaires communs impliqués dans les effets de l'HI et dans la fibrogénèse pulmonaire, nous nous sommes intéressés au stress du RE, le stress oxydant, l'inflammation et l'apoptose. Parmi les conséquences directes de l'HI nocturne, sont fréquemment rapportées la production de ROS, et la présence de marqueurs de l'inflammation (Lavie 2008). L'apoptose quant à elle serait particulièrement impliquée dans la physiopathologie de la FPI (M. Selman et al. 2001; King, Pardo, et Selman 2011).

Dans notre première étude (Gille et al. 2018), nous avons observé que durant la phase inflammatoire post instillation à la BLM (J4 et J8), l'HI exacerbe l'inflammation pulmonaire, le stress oxydant et de l'apoptose des CEA. L'hypothèse est que ces phénomènes pourraient être impliqués dans l'effet aggravant de l'HI sur la fibrose pulmonaire (Gille et al. 2018).

Dans notre seconde étude (Article 2, Haine et al.- à soumettre) nous n'avons pas retrouvé d'exacerbation de l'expression des marqueurs du stress oxydant, de l'inflammation et de l'apoptose par l'HI à J14, lorsque la fibrose pulmonaire est installée (Figure 20, 21 et 22 des résultats supplémentaires). Une des hypothèses serait que ces différents événements interviendraient plus précocement. En effet une réponse inflammatoire et un stress oxydant plus marqués ont été observés lors d'une lésion pulmonaire aiguë induite par une instillation intratrachéale de LPS (Dong et Yuan 2018). Dans ce modèle, un effet exacerbateur d'une préexposition à l'HI a été également rapporté (S. W. Kim et al. 2020). En effet, cette équipe a montré des lésions pulmonaires plus sévères avec une inflammation, une fibrose, un stress oxydatif et une apoptose plus marqués (S. W. Kim et al. 2020). Nos résultats et l'ensemble de ces données suggèrent que les acteurs moléculaires impliqués dans l'effet aggravant de l'HI sur la fibrose pourraient être différents de ceux impliqués dans le cas d'une lésion pulmonaire aiguë inflammatoire telle que rencontrée dans le SDRA.

La présence de marqueurs du stress du RE a été retrouvée dans les biopsies de patients FPI (Korfei et al. 2008) ainsi que dans des modèles animaux de fibrose pulmonaire induite par

la BLM (Hsu et al. 2017). De plus, un stress du RE est également induit en réponse à l'HI dans certains organes tels que le cœur (Belaidi et al. 2016). De fait, l'effet aggravant de l'HI sur la fibrose pulmonaire pourrait être un mécanisme secondaire à l'induction du stress du RE. Dans nos modèles, l'analyse de l'expression des marqueurs de stress du RE montre que l'exposition concomitante à l'HI ou le préconditionnement n'ont pas le même effet. De manière intéressante, nous n'avons pas mis en évidence d'augmentation de l'expression des acteurs moléculaires des voies de l'UPR dans le cas de l'exposition concomitante à l'HI alors qu'un rôle exacerbant avec une augmentation de l'expression des marqueurs de stress du RE induits en réponse à la BLM ont été retrouvés dans le cas d'un préconditionnement (protocole II et l'article 2).

De même, nous avons montré que l'exposition à l'HI seule pendant 14 jours n'a pas d'effets significatifs sur l'expression des marqueurs du stress de RE, des facteurs pro-fibrosants (article 2), des marqueurs du stress oxydant, de l'inflammation et de l'apoptose (résultats non présentés). En revanche, il semble que lorsque la fibrose pulmonaire est initiée après 14 jours d'exposition à l'HI il y ait des modifications au niveau moléculaire de l'expression des marqueurs pro-fibrosants. Ainsi, nous supposons qu'après 14 jours d'exposition à l'HI, le poumon serait fragilisé par les micro-agressions répétées de l'épithélium exposé à l'HI, ce qui favoriserait le développement d'une fibrose plus sévère. Cette hypothèse est soutenue par une publication récente qui a confirmé un effet aggravant d'un préconditionnement à l'HI sur la fibrose pulmonaire induite par la BLM (Kang et al. 2020). En outre, comme nous l'avons montré dans la présente étude (article 2), les voies du stress du RE (UPR) pourraient être impliquées dans les effets de l'HI sur la fibrose. Néanmoins d'autres voies de signalisation peuvent être mises en jeu. En effet il a été montré que l'aggravation de la fibrose par l'HI pouvait également être due à l'induction de la voie de signalisation NFkB / Nrf2 (Kang et al. 2020).

Par ailleurs, l'analyse de l'expression des marqueurs de stress du RE dans les différentes conditions de notre étude a été effectuée dans des lysats pulmonaires totaux. En effet, les événements de l'HI pourraient être spécifiques à un type cellulaire pulmonaire particulier. Dans ce cas-là, si ce type de cellule représente la minorité de celles constituant lysat total de poumon comme le cas des CEA (~15%), il serait très probable qu'un éventuel effet de l'HI sur le stress du RE ou autres soit masqué ou dilué dans les lysats des autres types cellulaires. Ceci est également probable dans le cas de macrophages ou de fibroblastes.

III.2 Importance du protocole d'HI et/ou de la dose de BLM

Les effets de l'exposition à l'HI étaient discrets. En effet, l'analyse de l'expression des marqueurs de stress du RE n'a pas montré d'effet de l'exposition à l'HI seule pendant 4, 8, 14 et 21 jours. Il fallait 28 jours d'exposition pour observer des modifications significatives de l'expression des marqueurs de stress du RE (ATF4, CHOP, GRP75), de l'expression des ARNm des facteurs pro-fibrosants ainsi que les dépôts de collagène au niveau du parenchyme pulmonaire. Ces résultats sont concordants avec l'étude de Shi et collaborateurs qui démontrent un effet de l'HI au niveau pulmonaire au bout de 4 semaines d'exposition (Shi et al. 2020). Ces résultats nous permettent de compléter les études portant sur l'impact de l'HI dans différents organes et de définir le temps nécessaire à l'apparition de l'expression des marqueurs de stress du RE dans le poumon. En effet, alors qu'il semble falloir 28 jours d'exposition à l'HI pour observer des effets moléculaires dans les poumons, 14 jours semblent suffisant dans le cœur (Belaidi et al. 2016). D'autre part, l'analyse de l'expression des marqueurs de l'inflammation, du stress oxydant et de l'apoptose après 28 jours d'exposition à l'HI n'a pas montré de variations significatives comparativement au contrôle au groupe exposé à l'AI, à l'exception pour l'IL1 β . Ce résultat surprenant a également été rapporté récemment par Kim et al, pour des temps d'exposition de 4 semaines (S. W. Kim et al. 2020). Cependant, dans une étude plus longue, où les animaux ont été exposés 6 semaines à l'HI, on observe un effet sur les marqueurs pro-inflammatoires (Kang et al. 2020). Ces différents résultats suggèrent qu'un temps d'exposition supérieur à 4 semaines pourrait être nécessaire pour observer ces marqueurs.

Concernant l'effet de la dose de BLM, nos résultats ont montré que l'utilisation d'une faible dose (2UI /g) entraînait des remaniements du parenchyme pulmonaire et un dépôt de collagène conduisant à une fibrose pulmonaire moins importante que celle observée avec une dose plus forte (3,5 UI/g). Ce résultat est cohérent avec la littérature qui montre un effet dose de la BLM (S. N. Kim et al. 2010). Sur le plan moléculaire, l'instillation des deux doses de BLM conduit à une induction de l'expression des marqueurs de stress du RE et des facteurs pro-fibrosants, tels que décrit dans la littérature (Hsu et al. 2017; Delbrel et al. 2018).

Par ailleurs, en fonction de la dose de BLM et/ou de la durée de l'HI des réponses moléculaires différentes pourraient être mises en jeu. En effet, dans le cas du préconditionnement à l'HI, bien que l'on observe histologiquement un effet aggravant sur la sévérité de la fibrose aux deux doses de BLM utilisées, les effets moléculaires ne sont détectés que lorsque l'on utilise une faible de dose. Ces résultats laissent penser que les effets

moléculaires de l'HI, plus subtiles, pourraient être masqués par les effets induits par la forte dose de BLM.

IV Autres évènements cellulaires dans la FPI: rôle de la sénescence et de l'autophagie

La physiopathologie de la FPI est complexe et comporte plusieurs évènements moléculaires et cellulaires jouant un rôle clé dans le dysfonctionnement des CEA. Parmi ces mécanismes, la sénescence cellulaire est de plus en plus décrite. En effet, plusieurs études ont rapporté chez les patients FPI une sénescence à la fois des CEA et des fibroblastes pulmonaires (Álvarez et al. 2017; R.-M. Liu et Liu 2020). La sénescence cellulaire est un processus régulé avec à la fois des effets physiologiques bénéfiques (suppression tumorale) et des effets pathologiques néfastes lorsque ce processus est perturbé. Nos résultats préliminaires représentés dans la figure 24, montrent une tendance à l'augmentation des marqueurs de sénescence induits par la BLM (p53 et p16^{Ink4a}), chez les souris préexposées à l'HI (groupe HI/BLM) contrairement à celles pré-exposées à l'AI (groupe AI/BLM). Bien que ces résultats préliminaires restent à confirmer avec un plus grand nombre d'animaux, ils laissent suggérer l'implication de la sénescence dans l'effet aggravant de l'HI sur la fibrose pulmonaire. De manière intéressante, le phénomène de sénescence a été décrit très récemment comme élément moléculaire majeur impliqué dans la pathogénicité de l'HI chez les patients SAOS (Polonis et al. 2020). En effet, l'analyse du tissu adipeux abdominal sous-cutané des patients SAOS a montré qu'ils avaient un pourcentage significativement plus élevé de cellules avec une localisation nucléaire de γ H2AX (un autre marqueur de sénescence) et de p16^{Ink4a} comparativement aux individus non-SAOS. *In vitro*, l'exposition des préadipocytes humains à l'HI induit la sénescence avec une augmentation de l'expression de la protéine p16^{Ink4a} ainsi que le nombre de cellules β -galactosidase positives (caractéristique de cellules sénescents) (Polonis et al. 2020).

Il semble que l'HI induise également des mécanismes d'autophagie. L'autophagie est un processus médié par le lysosome intracellulaire, qui joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie entre la synthèse, la dégradation et le recyclage des organites et des protéines. Elle constitue également un mécanisme de protection essentiel pendant le stress du RE (Ogata et al. 2006; Bartolome, Guillen, et Benito 2012; Verfaillie et al. 2010). En effet, la stimulation de l'autophagie est parmi les mécanismes adaptatifs mis en place lors de l'activation des voies UPR, dans le but de restaurer l'homéostasie du RE. Comme le protéasome, l'autophagie

constitue une voie de dégradation des protéines mal repliées ou agrégées (Verfaillie et al. 2010). Ainsi, il a été montré que les trois voies UPR sont capables d'induire l'autophagie (Akhter et al. 2020). En effet, l'induction de l'autophagie *via* la voie de l'UPR PERK / eIF2 α / ATF4 a été observée suite à une exposition à l'HI et constituerait une réponse protectrice à l'apoptose des cellules pancréatiques (Song et al. 2018). De même l'HI pourrait également augmenter l'autophagie au niveau des cellules cardiaque et prévenir ainsi du stress du RE et de l'apoptose (Chang et al. 2019).

En parallèle, des données de la littérature ont rapporté une autophagie insuffisante chez les patients FPI (Patel et al. 2012; Araya et al. 2012). Cette diminution d'activité autophagique pourrait être une des conséquences de la sécrétion importante de TGF- β 1 au niveau pulmonaire (Patel et al. 2012) et participerait à la mise en place d'une sénescence cellulaire accélérée des cellules épithéliales et à la différenciation des myofibroblastes (Araya et al. 2012; Hill et al. 2019). Ces résultats chez le patient ont été confortés par l'utilisation de modèles animaux. En effet, dans le modèle de fibrose pulmonaire induite par la BLM, l'expression du facteur suppresseur de tumeur lié à l'autophagie EI24 (Etoposide-induced protein 2.4) est diminuée et l'injection d'un plasmide surexprimant EI24 retarde la progression de la fibrose pulmonaire (Xiaohuan Zhang et al. 2020). De plus, une déficience en Atg4b (autophagy related gene) nécessaire à la formation de l'autophagosome conduit à une fibrose plus étendue et plus sévère avec une accumulation accrue de collagène chez la souris (Cabrera et al. 2015). Ces résultats observés chez les patients FPI et les modèles animaux de fibrose sont en contradiction avec ce qui observé lors d'une exposition à l'HI. Cependant aucune donnée clinique concernant la présence d'un SAOS ou non n'a été mentionnée chez les patients des études d'Araya et al. 2012 et Hill et al. 2019. D'autre part, du fait de l'absence de données à ce sujet, il est difficile de conclure sur l'impact de l'HI sur l'autophagie pulmonaire.

Conclusion intermédiaire : Le stress du RE et l'induction des voies de l'UPR semblent impliqués dans plusieurs éléments pathogéniques communs à la fibrose pulmonaire et à l'HI. De ce fait il pourrait constituer un élément central critique dans l'aggravation de la fibrose pulmonaire par l'HI. Cependant des interconnexions avec d'autres voies majoritairement impliquées ne sont pas à exclure.

CONCLUSION GENERALE

Cette étude contribue à une meilleure prise en considération de l'impact du SAOS notamment sa forme sévère, et de l'HI qui le caractérise, dans la fibrogénèse. L'ensemble des résultats obtenus durant ma thèse nous ont permis de documenter l'impact de l'HI sur la fibrose pulmonaire au niveau tissulaire et moléculaire. Dans la première partie de l'étude, nous avons montré que l'exposition à l'HI exacerbait l'inflammation et la fibrose pulmonaire induite par la BLM. Dans la seconde, nous avons approfondi notre recherche au niveau moléculaire et nous avons mis en évidence que l'exposition à l'HI exacerbait l'expression de plusieurs marqueurs du stress du RE déjà induits en réponse à la BLM.

Ainsi notre étude propose que le stress du RE, élément majeur impliqué dans différents processus cellulaires décrits dans la fibrogénèse tels que la TEM (Delbrel et al. 2019) et l'apoptose (Delbrel et al. 2018), mais également dans l'activation de différents processus cellulaires conduisant à la dysfonction des CEA et à la perte du phénotype épithélial, tels que l'autophagie (Ogata et al. 2006) et la sénescence (H. S. Kim et al. 2019) pourrait également jouer un rôle majeur dans l'effet exacerbateur de l'HI. Cependant, durant mon doctorat, nous n'avons pas abordé d'une manière exhaustive tous les mécanismes possibles et nous n'excluons pas que d'autres évènements qu'il reste à définir pourraient être également impliqués dans les effets de l'HI sur l'aggravation de la fibrose.

PERSPECTIVES

L'objectif de la suite du travail sera de documenter le rôle du stress du RE dans les évènements cellulaires associés au développement de la fibrose et décrit dans la réponse à l'exposition à l'HI. Pour cela, nous avons prévu une étude à différentes échelles : *in vivo* en complémentarité avec ce travail réalisé mais aussi des approches *in vitro* et *ex vivo* permettant une étude plus en détail de la mécanistique des effets de l'HI à l'échelle cellulaire et moléculaire. Enfin nous pourrions également envisager une étude chez les patients.

I Confirmation de l'implication du stress du RE et recherche d'autres mécanismes

Afin de s'affranchir des différentes limites du modèle de fibrose pulmonaire induite par l'instillation intratrachéale d'une dose unique de BLM citées précédemment, nous proposons d'étudier l'effet de la double agression BLM/HI dans un modèle murin d'instillations répétées de BLM à des doses très faibles. Ce modèle décrit en littérature (Degryse et al. 2010) et développé dans le laboratoire par une doctorante de notre équipe (Céline-Hivda Yegen) serait plus pertinent que celui utilisé dans la présente étude. En effet, l'instillation répétée de la BLM mime les agressions répétées de l'épithélium alvéolaire avec un développement progressif de la fibrose pulmonaire sans phase inflammatoire importante (Degryse et al. 2010) (Yegen et al., observations non publiées). De plus, la fibrose induite dans ce modèle est stable dans le temps avec une large distribution des lésions dans les différents lobes pulmonaires ainsi qu'une homogénéité interindividuelle entre les différents animaux (Yegen et al., observations non publiées). Ce modèle sera exposé à de l'HI (exposition concomitante et/ou préconditionnement) à des temps plus au moins longs. L'impact de l'HI sur la fibrogénèse sera étudié au niveau histologique, et moléculaire tel que présenté dans mon travail de thèse.

Par ailleurs, nous pourrions étudier l'impact de l'HI sur les évènements cellulaires classiquement décrits dans la fibrogénèse : l'apoptose, la TEM, la sénescence ou l'autophagie. L'implication du stress du RE dans ces différents évènements sera évaluée en prétraitant, ou cotraitant les animaux avec des inhibiteurs pharmacologiques du stress du RE. Parmi les molécules disponibles nous pourrions utiliser le 4-PBA ou le TUDCA dont l'efficacité sur le développement de la fibrose induite par la BLM (Hsu et al. 2017) ainsi que sur un modèle d'HI (Belaidi et al. 2016) a déjà été démontrée.

II Documenter au niveau cellulaire les effets de l'HI

Il est très important de définir l'effet de l'HI sur les différents types cellulaires pulmonaires impliqués dans la pathogénèse de la FPI (CEA, macrophages et fibroblastes). Ceci nous permettrait de déterminer, au niveau de chaque type cellulaire, les mécanismes mis en place lors de l'exposition à l'HI et contribuant à l'effet aggravant sur la fibrogénèse pulmonaire.

Dans la physiopathologie de la FPI, les CEA, les fibroblastes et les macrophages sont impliqués dans les mécanismes de fibrogénèses *via* la production de facteurs pro-fibrosants aboutissants à la formation d'un tissu cicatriciel rigide :

- Les CEA (notamment de type II) sont incapables de répondre de manière appropriée aux micro-agressions répétées, perdent ainsi leur capacité régénératrice et réparatrice et subissent un dysfonctionnement (TEM (Willis et al. 2005), leur sénescence (Disayabutr et al. 2016; Tian et al. 2019)) aboutissant à la production de médiateurs pro-fibrosants tels que le TGF- β et le PDGF (Antoniades et al. 1990; Khalil et al. 1996; M. Selman 2006) favorisant la migration, la prolifération et l'activation des fibroblastes (Khalil et al. 1996; M. Selman 2006; Moisés Selman et Pardo 2014).
- Les fibroblastes pulmonaires qui développeraient une résistance à l'apoptose (B. D. Uhal 2008) et pourraient subir une sénescence (Álvarez et al. 2017), induisent à leur tour des dommages supplémentaires de l'épithélium alvéolaire et de la membrane basale. Ils sécrètent d'une manière excessive des facteurs pro-fibrosants et de la MEC favorisant ainsi un remodelage du tissu pulmonaire et un déclin de la fonction respiratoire (M. Selman et al. 2001; Moisés Selman et Pardo 2014).
- les macrophages et leur polarisation en type M2 sont également impliqués dans ce processus. Une infiltration dominante des macrophages M2 dans les zones de fibrose pulmonaire a été rapportée et agirait comme un régulateur vital de la fibrogénèse. En effet, les macrophages M2 activés peuvent produire des médiateurs pro-fibrosants tels que le TGF- β et le PDGF conduisant à une activation continue des fibroblastes et la prolifération des myofibroblastes (L. Zhang et al. 2018).

Afin de définir les effets de l'HI sur ces différents types cellulaires, une étude histologique par immunohistochimie sera nécessaire dans notre modèle *in vivo*. Ceci nous permettra de localiser les différents marqueurs induits par l'HI et d'identifier les types cellulaires concernés. Les résultats préliminaires d'analyse immunohistochimiques sur des

coupes de poumon issues de notre modèle ont révélé une expression des marqueurs de stress du RE à la fois dans les CEA et les macrophages (Master 2 de Juliette BRAVAIS, résultats non montrés).

En parallèle de cette étude sur ce modèle animal, nous envisageons une étude *ex vivo* et *in vitro* afin de définir à l'échelle cellulaire l'impact d'une exposition à l'HI sur des lignées ou des cultures primaires de cellules pulmonaires (CEA, fibroblastes, macrophages).

Ex vivo, nous proposons d'étudier les effets de l'HI sur ces différents types cellulaires dans leur microenvironnement. Ceci pourrait apporter des réponses sur les types de dialogues cellule-cellule et cellule-microenvironnement. Cette étude peut être réalisée par la technique de « Lung Slices » (G. Liu et al. 2019). Il s'agit d'une approche *ex vivo* qui consiste à mettre en culture des tranches de poumons issus de différents modèles animaux. Cette technique permet de maintenir l'architecture et la cellularité complexe des voies respiratoires et du parenchyme mais aussi les interactions complexes cellule-cellule dans le poumon. L'objectif sera alors de traiter nos souris avec le même protocole de BLM pour développer une fibrose pulmonaire puis réaliser une extraction du poumon pour réaliser des « Lung Slices ». Ces tranches de poumon seront ensuite exposées à de l'HI en utilisant un système adapté pour les études de cultures biologiques *in vitro*. Brièvement, le principe de ce système consiste à réaliser les cycles d'HI avec des injections répétitives de gaz (O₂, N₂, CO₂) dans des plaques de cultures perméables à ces différents gaz en conditions normobariques (Minoves et al. 2017). Sur ces tranches de poumon, nous proposons de définir l'effet de l'HI sur l'expression et la localisation des différents marqueurs étudiés durant ce doctorat (stress du RE, stress oxydant...). Nous pourrions par la suite les traiter avec des inhibiteurs du stress du RE pour confirmer son implication dans l'effet aggravant de l'HI. De plus, cette technique permettra d'obtenir le sécrétome de ce complexe cellulaire dans un microenvironnement hypoxique et dans les différentes conditions de traitement pharmacologiques pour l'analyser.

Dans la partie *in vitro*, nous envisageons d'exposer des lignées ou des cultures primaires de ces différents types cellulaires à l'HI avec le même système. Ceci nous permettra de cibler un type cellulaire particulier indépendamment des autres cellules. Nous étudierons les effets de l'HI au niveau moléculaire et cellulaire avec les changements phénotypiques que l'HI pourrait induire. Nous analyserons l'expression des marqueurs de stress du RE, de TEM, de stress oxydant, de l'inflammation, de sénescence, d'apoptose et encore d'autophagie. Avec cette approche, nous avons également l'avantage de pouvoir cibler les acteurs moléculaires clés et de vérifier leur implication en traitant des cellules avec des molécules pharmacologiques

inhibitrices ou inductrices. On peut également utiliser la méthode de transfection pour inhiber (stratégie siRNA) ou surexprimer (plasmide) certains acteurs de manière précise.

Les résultats de ces différentes approches (*in vitro*, *in vivo*, *ex vivo*) nous permettront de mieux documenter les effets de l'HI au niveau pulmonaire à diverses échelles : tissulaire, cellulaire et moléculaire.

III Validation des résultats sur des prélèvements de patients FPI et/ou SAOS

Nous envisageons de réaliser des analyses sur les prélèvements (biopsies, sérums) de patients atteints de FPI avec ou sans SAOS (modéré à sévère) et leurs contrôles (patients SAOS sans FPI).

Dans un premier temps, nous envisageons de faire une analyse protéomique ou transcriptomique sur des biopsies de ces patients. Ceci nous permettrait d'établir une signature moléculaire dans chaque groupe de patients et d'identifier les acteurs moléculaires communs.

Par la suite, une analyse histologique sur des biopsies pulmonaires de ces patients serait également importante avec des marquages ciblant les différents facteurs identifiés dans les premières approches. Nous envisageons de faire cette analyse avec la technique « Hyperion » qui consiste à réaliser une analyse histologique à grande échelle d'une coupe tissulaire préalablement marquée par un panel d'anticorps ciblant plusieurs facteurs.

Enfin, une recherche de biomarqueurs identifiables au niveau des sérums chez ces patients serait également importante. Il s'agira de rechercher, par exemple, les marqueurs de stress du RE au niveau sérique tel que la protéine GRP78 sécrétée, qui a été proposée comme un biomarqueur circulant dans le diagnostic précoce du cancer du poumon (F et al. 2018).

En conclusion, ces différentes études nous permettraient de mieux comprendre l'impact du SAOS chez les patients FPI et d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles pouvant permettre un ciblage spécifique pour des traitements futurs.

ANNEXES

Utilisation potentielle de l'érythropoïétine au niveau pulmonaire

L'érythropoïétine (Epo) est une hormone glycoprotéique produite majoritairement par le rein chez l'adulte et jouant un rôle important dans la synthèse de globules rouges (Bunn 2013). Différents groupes cellulaires ont été identifiés comme produisant de l'Epo et/ou exprimant son récepteur (Epo-R) suggérant ainsi des fonctions physiologiques supplémentaires non érythropoïétiques à l'Epo. Parmi ces groupes on trouve la rétine, les testicules, le système nerveux central ou encore le poumon (Gassmann et al. 2003; Jelkmann 2007). En effet, outre sa fonction bien documentée dans l'érythropoïèse, l'Epo joue un rôle dans le contrôle ventilatoire (Soliz et al. 2005; Voituron et al. 2014), mais également un rôle cytoprotecteur dans de nombreux organes. Ainsi des effets cardioprotecteurs (Parsa et al. 2003), rénoprotecteurs (J. Zhang et al. 2018), et neuroprotecteurs (Rey et al. 2019) ont été attribués à l'Epo. Ce rôle cytoprotecteur proviendrait de propriétés anti-inflammatoires (Xiang Zhang, Li, et Xiao 2012), anti-apoptotiques (Ghezzi et Brines 2004), anti-oxydatives (Bailey et al. 2014) et anti-fibrosantes (Lu et al. 2012; Geng, Hu, et Lian 2015). Par ailleurs, il a été rapporté que l'Epo exerce ces différentes fonctions sur deux récepteurs membranaires distincts. En effet, ses fonctions érythropoïétiques seraient induites *via* sa liaison à son récepteur homodimère (EpoR). Cependant, les fonctions cytoprotectrices seraient médiées par sa liaison à son récepteur hétérodimère (Epo-R / β common receptor ou β cR) (Brines et al. 2004; Chateauvieux et al. 2011). Le potentiel thérapeutique de l'Epo a été décrit comme piste intéressante pour traiter divers troubles pathologiques notamment les affections liées au système nerveux (Sirén et al. 2009; Rey et al. 2019), mais également dans le traitement de lésions pulmonaires aiguës (Kakavas et al. 2011). Son utilisation pourrait être intéressante dans le cas de fibrose pulmonaire, grâce à son effet anti-fibrosant rapporté au niveau cardiaque (Lu et al. 2012), rénal (Geng, Hu, et Lian 2015), et pulmonaire (Yoshimi et al. 2008). Cependant, du fait de son rôle dans l'érythropoïèse, son utilisation peut-être néfaste chez les patients et son utilisation en pneumologie nécessite de plus amples recherches. À ce titre, plusieurs dérivés de l'Epo tels que l'Epo carbamylée ont été développés pour limiter ces effets secondaires érythropoïétiques. En effet, ces molécules ont la spécificité d'assurer uniquement les fonctions cytoprotectrices sans augmenter la production de globule rouge en se liant uniquement sur le récepteur hétérodimérique (Leist et al. 2004). L'utilisation de ces dérivés en thérapie serait alors moins délétère.

Durant mon doctorat, nous nous sommes intéressés aux effets protecteurs de l'Epo. Plus précisément, nous nous sommes intéressés à l'impact d'une sous-expression de l'Epo dans un contexte d'agression pulmonaire, dans la réponse à l'exposition à HI, à l'induction d'un SDRA ou d'une fibrose pulmonaire.

Cette partie du travail peut être divisée en trois grands chapitres :

Chapitre I : Utilisation potentielle de l'Epo en thérapie dans le traitement du SAOS

Chapitre II : Caractérisation de l'effet protecteur de l'Epo au niveau pulmonaire dans un modèle murin d'agression pulmonaire aiguë

Chapitre III : Utilisation potentielle de l'Epo en thérapie dans le traitement des pathologies pulmonaires

I Utilisation potentielle de l'Epo en thérapie dans le traitement du SAOS

Dans une première revue de littérature (Andrade et al. 2018), nous avons documenté les effets potentiellement protecteurs de l'Epo dans le cas du SAOS notamment *via* ces activités anti-inflammatoires et anti-oxydatives.

Ventilatory and Autonomic Regulation in Sleep Apnea Syndrome: A Potential Protective Role for Erythropoietin?

David C Andrade, **Liasmine Haine**, Camilo Toledo, Hugo S Diaz, Rodrigo A Quintanilla, Noah J Marcus, Rodrigo Iturriaga, Jean-Paul Richalet, Nicolas Voituron, Rodrigo Del Rio. *Front Physiol.* 2018 Oct 16;9:1440. doi: 10.3389/fphys.2018.01440. eCollection 2018.

I.1 Résumé de la revue 1

Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) est la forme la plus courante de troubles respiratoires du sommeil et est associé à un large éventail de morbidités cardiovasculaires. Il a été proposé que pendant le SAOS, la commande centrale respiratoire (CCR) soit affectée par des signaux afférents exagérés provenant de chémorécepteurs périphériques / centraux, ce qui entraîne une instabilité ventilatoire perpétuant la génération d'apnées. Les traitements axés sur la diminution de l'hyperactivité des chémorécepteurs périphériques / centraux peuvent être utiles pour améliorer l'instabilité ventilatoire chez les patients atteints de SAOS. Des études antérieures indiquent que le stress oxydatif et l'inflammation sont des acteurs clés de l'augmentation de l'activité chémoréflexe périphérique / centrale associée au SAOS. Des données récentes suggèrent que l'érythropoïétine (Epo) pourrait également être impliquée dans la modulation de l'activité chémoréflexe puisque les récepteurs à l'Epo fonctionnels sont exprimés de manière constitutive dans les cellules de chémorécepteurs périphériques et centraux. De plus, il existe des preuves que l'Epo a des effets anti-oxydants / anti-inflammatoires. En conséquence, nous proposons que le traitement à l'Epo pendant le SAOS puisse réduire l'activité chémoréflexe périphérique / centrale accrue et normaliser l'activité de la CCR qui à son tour peut aider à abroger l'instabilité ventilatoire. Dans cet article de perspective, nous discutons des effets bénéfiques potentiels de l'administration de l'Epo sur la régulation ventilatoire dans le contexte du SAOS.



Ventilatory and Autonomic Regulation in Sleep Apnea Syndrome: A Potential Protective Role for Erythropoietin?

David C. Andrade^{1,2}, Liasmine Haine³, Camilo Toledo^{1,4}, Hugo S. Diaz^{1,5}, Rodrigo A. Quintanilla⁵, Noah J. Marcus⁶, Rodrigo Iturriaga⁷, Jean-Paul Richalet⁸, Nicolas Voituron^{3†} and Rodrigo Del Rio^{1,4,8*†}

¹ Laboratory of Cardiorespiratory Control, Department of Physiology, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile, ² Centro de Investigación en Fisiología del Ejercicio, Facultad de Ciencias, Universidad Mayor, Santiago, Chile, ³ Laboratoire Hypoxie and Poumon – EA2363, Université Paris 13, Paris, France, ⁴ Centro de Envejecimiento y Regeneración (CARE), Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile, ⁵ Centro de Investigación Biomédica, Universidad Autónoma de Chile, Santiago, Chile, ⁶ Department of Physiology and Pharmacology, Des Moines University, Des Moines, IA, United States, ⁷ Laboratorio de Neurobiología, Department of Physiology, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile, ⁸ Centro de Excelencia en Biomedicina de Magallanes (CEBIMA), Universidad de Magallanes, Punta Arenas, Chile

OPEN ACCESS

Edited by:

Rohit Ramchandra,
University of Auckland, New Zealand

Reviewed by:

Alessandro Silvani,
Università degli Studi di Bologna, Italy
Melissa L. Bates,
The University of Iowa, United States

*Correspondence:

Rodrigo Del Rio
rdelrio@bio.puc.cl

† These authors have contributed
equally to this work as senior authors

Specialty section:

This article was submitted to
Integrative Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 14 June 2018

Accepted: 21 September 2018

Published: 16 October 2018

Citation:

Andrade DC, Haine L, Toledo C,
Diaz HS, Quintanilla RA, Marcus NJ,
Iturriaga R, Richalet J-P, Voituron N
and Del Rio R (2018) Ventilatory
and Autonomic Regulation in Sleep
Apnea Syndrome: A Potential
Protective Role for Erythropoietin?
Front. Physiol. 9:1440.
doi: 10.3389/fphys.2018.01440

Obstructive sleep apnea (OSA) is the most common form of sleep disordered breathing and is associated with wide array of cardiovascular morbidities. It has been proposed that during OSA, the respiratory control center (RCC) is affected by exaggerated afferent signals coming from peripheral/central chemoreceptors which leads to ventilatory instability and may perpetuate apnea generation. Treatments focused on decreasing hyperactivity of peripheral/central chemoreceptors may be useful to improving ventilatory instability in OSA patients. Previous studies indicate that oxidative stress and inflammation are key players in the increased peripheral/central chemoreflex drive associated with OSA. Recent data suggest that erythropoietin (Epo) could also be involved in modulating chemoreflex activity as functional Epo receptors are constitutively expressed in peripheral and central chemoreceptors cells. Additionally, there is some evidence that Epo has anti-oxidant/anti-inflammatory effects. Accordingly, we propose that Epo treatment during OSA may reduce enhanced peripheral/central chemoreflex drive and normalize the activity of the RCC which in turn may help to abrogate ventilatory instability. In this perspective article we discuss the potential beneficial effects of Epo administration on ventilatory regulation in the setting of OSA.

Keywords: erythropoietin, peripheral chemoreflex, central chemoreflex, chronic intermittent hypoxia, sleep apnea

INTRODUCTION

Sleep apnea (SA) syndrome is a pathological condition characterized by recurrent airway obstruction or cessation of breathing during sleep (Gislason et al., 1988; Epstein et al., 2009; Dempsey et al., 2010) resulting in hypercapnia and hypoxemia/oxyhemoglobin desaturation (Badran et al., 2014a). The collapse of the upper airway during obstructive events is likely attributable to both anatomical and non-anatomical determinants (Dempsey et al., 2010) including changes in central and peripheral respiratory drive (Solin et al., 2000; Kara et al., 2003; Dempsey et al., 2012).

Acutely, activation of peripheral and/or central chemoreflexes during apneic episodes is associated with micro-arousals and sleep fragmentation, as well as increases in ventilation, sympathetic nerve activity, blood pressure, and heart rate. Repetitive apneas as observed in SA syndrome are associated with increased diurnal drowsiness, neurocognitive dysfunction, and cardiovascular morbidity (Young et al., 2002; Gozal, 2013; Konecny et al., 2014). In clinical populations, cardiovascular morbidity in SA patients is often associated with enhanced activity of the sympathetic nervous system, and numerous studies indicate that this increased sympathetic activity stems from a heightened carotid body chemoreflex (CBC) (Narkiewicz et al., 1998; Mansukhani et al., 2015; Iturriaga, 2017). In addition to affecting autonomic outflow, aberrant CBC activity may also have adverse effects on the central respiratory control network.

Central respiratory control is finely regulated by a neural network located mainly in the ponto-medullary region of the brainstem (Richter and Spyer, 2001). In the face of hypoxic or hypercapnic challenge, maintenance of ventilatory and cardiovascular homeostasis is achieved by activation of peripheral and central chemoreceptors and subsequent modulation of this ponto-medullary respiratory control network (Marshall, 1994). It has been proposed that information from these sensory afferents is sufficient to stimulate the central respiratory control system and alter respiratory pattern independent of acidification of cerebrospinal fluid (Guyenet et al., 2017).

Pathological insults associated with central or obstructive apneas can alter chemoreceptor function, change chemoreflex integration in the central nervous system, and/or alter the properties of the central respiratory network (Gozal, 1998; Jokic et al., 2000; Harper et al., 2005; Katz et al., 2009; Carroll et al., 2010). Previous work suggests that enhanced peripheral chemoreflex activation has central effects that contribute to respiratory instability (Levy et al., 2008) and thus may play a role in perpetuating SA via creation of a positive feedback loop. Indeed, several studies have shown that increases in carotid body (CB) and central chemoreflex drive play an important role in the pathophysiology of obstructive sleep apneas (OSA) (For review see Dempsey et al., 2010).

The seminal pathological insult occurring during apneas is the repeated exposure to episodes of hypoxia-reoxygenation. This chronic intermittent hypoxia (CIH) exposure is mechanistically linked to increased peripheral chemoreflex drive, and is associated with oxidative stress and inflammation (Del Rio et al., 2011; Iturriaga et al., 2014; Iturriaga, 2017). Thus many of the major morbidities associated with SA as well as respiratory instability itself may be related to aberrant chemoreflex activation prior to and during exposure to intermittent hypoxia associated with apneic episodes. Therefore, therapies aimed at reducing chemoreflex sensitivity may be beneficial in preventing the pathophysiological sequelae of SA as well as potentially reducing the frequency of apneic episodes generated by respiratory instability.

Accordingly, several rodent models have been developed to study the pathophysiological mechanisms that contribute to enhanced peripheral and central chemoreflex drive, utilizing CIH exposure (Iturriaga et al., 2005, 2014; Rey et al., 2006; Del

Rio et al., 2011). The usefulness of these models is confirmed by findings that CIH results in heightened CB activity and ventilatory chemoreflex gain in response to hypoxia (Rey et al., 2004; Del Rio et al., 2010, 2012, 2016), as well as chemoreflex-mediated increases in sympathetic activity and blood pressure (Marcus et al., 2010; Del Rio et al., 2016).

CHEMORECEPTORS, RESPIRATORY CONTROL AND CARDIOVASCULAR REGULATION IN THE SETTING OF SLEEP APNEA

Sleep apnea syndrome is characterized by two types of events, (i) OSA and (ii) central sleep apneas (CSA). OSA is characterized by partial or complete occlusion of the upper airways during sleep; while CSA is characterized by a marked decrease in respiratory motor drive resulting from a reduction in the activity of the central respiratory network (Malhotra and Owens, 2010). It has been proposed that heightened chemoreflex gain may contribute to SA by destabilizing central respiratory network control of airway tone and/or ventilation (Del Rio et al., 2016). The process by which chemoreflex gain affects respiratory stability is often described using a control-systems engineering concept referred to as "loop gain" (Khoo, 2000).

In this application, "loop gain" can be thought of as the ratio of the size of a response (change in ventilation) to the size of a disturbance (change in PaCO₂). The components of loop gain include controller gain, plant gain, and feedback gain. Controller gain represents the ventilatory response to PaCO₂, plant gain represents the blood gas response to a change in ventilation, and feedback gain represents the delay associated with relaying the feedback signal (PaCO₂) to the controller (chemoreceptors). Khoo (2000) explained that there is a chain of events, which is at the origin of ventilatory instability and attendant oscillation of ventilatory drive. Either obstructive or central apneas result in increased PaCO₂ and activation of chemoreceptors. The duration of the oscillatory response and its magnitude are determined by the effect of ventilatory changes on PaCO₂ (i.e., the "plant gain"), as well as by the strength of the chemoreflex response (i.e., the "controller gain"). According to this paradigm, higher loop gain is associated with greater probability of breathing instability as chemoreflex responses to changes in PaCO₂ are likely to be disproportionate and result in ventilatory overshoots that reduce PaCO₂ below the apneic threshold. Conversely, lower loop gains results in a more robust respiratory network which is less prone to instability and development of periodic breathing (Malhotra and Owens, 2010). With respect to the specific topics covered in this perspective article, an increase in the gain of peripheral and central chemoreceptors (controller gain) may trigger ventilatory instability and contribute to higher apnea incidence. In concordance with this notion, it has been shown in experimental low output heart failure, a condition characterized by increased apnea incidence, that peripheral chemoreceptor ablation stabilized ventilation and greatly attenuated apnea incidence (Marcus et al., 2014). In addition, selective elimination

of central chemosensory neurons from the ventral medullary surface increases the apneic threshold toward eupneic ventilatory values (Takakura et al., 2008). Taken together, these studies suggest a role of both peripheral and central chemoreceptors in the development of oscillatory breathing patterns and increased apnea incidence.

Peripheral Chemoreceptors

Peripheral chemoreceptors detect changes in arterial blood gases (mainly hypoxemia) and respond by activating the sympathetic nervous system and increasing ventilation to restore blood-gas homeostasis (Kara et al., 2003). Hypoxia-induced hyperventilation is mainly triggered by activation of the CB and to some extent by activation of the aortic body (located on the aortic arch) (Miller and Tenney, 1975; Brophy et al., 1999). The CB chemoreceptors are the main peripheral arterial chemoreceptor and are located in the bifurcation of the carotid artery. They are composed of clusters of chemoreceptor cells (type I cells) surrounded by glial cells (type II cells) (Iturriaga and Alcayaga, 2004). Type I cells are considered polymodal receptors since they respond to a wide variety of stimuli such as changes in arterial levels of pO₂, pCO₂, pH, blood flow, and temperature (Gonzalez et al., 1994). Upon activation by hypoxia, type I cells release ACh and ATP which interact with receptors on the sensory nerve fibers of the carotid sinus nerve (Gonzalez et al., 1994). The precise biochemical nature of the transmitter released by type I cells during hypoxic stimulation has not been completely identified since more than one molecule has been shown to be released (ACh and ATP) (Iturriaga and Alcayaga, 2004). Moreover, several peptides hormones and neurotransmitters serve as excitatory and inhibitory modulators of CB chemosensitivity (i.e., NO, histamine, and AngII) (Iturriaga and Alcayaga, 2004; Del Rio et al., 2008).

Hypoxic hyperventilation seems synchronous with the increase of the discharge frequency of the sinus nerve fibers (Vizek et al., 1987). The first central integration of sensory information from the peripheral chemoreceptors and the main areas sensory fibers from the sinus nerve project to the commissural and middle divisions of the nucleus of the solitary tract (cNTS and mNTS, respectively) (Claps and Torrealba, 1988; Finley and Katz, 1992). Neurons of the cNTS and mNTS integrate and relay information from peripheral chemoreceptors to other regions of the central nervous system to ultimately orchestrate the hypoxic hyperventilatory response (Ponikowski and Banasiak, 2001; Rosin et al., 2006; Smith et al., 2010). In addition, CB stimulation also triggers activation of the sympathetic nervous system to maintain adequate arterial pressure in the face of hypoxic vasodilation (Schultz and Sun, 2000). While normal CB function contributes to maintenance of blood gas homeostasis, pH regulation, and tissue perfusion, mounting evidence indicates that maladaptive changes in CB function contribute to a variety of cardiovascular and metabolic disease states (Schultz et al., 2015).

Central Chemoreceptors

Central chemoreceptors are located mainly on the ventral surface of the medulla (Nattie and Li, 2012). In response to changes in cerebrospinal fluid CO₂/H⁺ content, central chemoreceptor

neurons send excitatory signals directly to respiratory control centers to increase breathing rate (Guyenet et al., 2005). Importantly, stimulation of central chemoreceptors also elicits an increase in sympathetic outflow mainly by their projections to pre-sympathetic control areas (Moreira et al., 2006). The precise localization of central chemoreceptors within the brain and the circuitry that is activated by CO₂/H⁺ stimulation is still controversial. However, the retrotrapezoid nucleus (RTN) appears to play a pivotal role in the regulation of the hypercapnic ventilatory response (Guyenet and Bayliss, 2015). The RTN is mostly composed of a group of neurons that are activated by changes in cerebrospinal fluid CO₂ and/or pH that projects to areas related to respiratory control (Lazarenko et al., 2009; Guyenet and Mulkey, 2010; Guyenet et al., 2012; Wang et al., 2013). RTN chemosensitive neurons are rhythmically active and have been shown to be activated by low pH *in vivo* and *in vitro* (Lazarenko et al., 2009; Wang et al., 2013). Interestingly, it has been shown that partial elimination of RTN chemosensory neurons (~70%) in healthy rats increases the apneic threshold (Takakura et al., 2008), meaning apneic events occur at a higher end-tidal CO₂. Therefore, it is plausible to hypothesize that RTN chemoreceptor neurons activity/sensitivity may contribute to ventilatory instability. In this regard, a higher ventilatory response following hypercapnia would play a major role in apnea development as enhanced CO₂ “wash-out” would drop PaCO₂ close to or below the apneic threshold (Topor et al., 2001). Indeed, studies in patients with heart failure have shown that apneas result in enhanced chemoreflex responses which result in a resting eupneic PtCO₂ being closer to the apneic threshold (i.e., narrowed CO₂ reserve, Xie et al., 2002). Furthermore, patients with heart failure that have OSA show increased ventilatory responses to hypercapnia (Solín et al., 2000). Thus, alterations in RTN chemoreceptor neuron function may contribute to apnea incidence in OSA patients by altering the apneic threshold itself or the eupneic “proximity” to the apneic threshold.

Cellular Mechanisms of Enhanced Chemoreceptor Activity in Sleep Apnea/CIH

While the precise mechanisms underlying peripheral and/or central maladaptations to CIH are not completely understood, recent evidence suggests that reconfiguration of the neuronal network involved in sympathetic regulation and breathing stability occurs (Xu et al., 2004; Del Rio et al., 2010, 2012). Numerous studies underscore the role of oxidative stress (Marcus et al., 2010; Badran et al., 2014b; Morgan et al., 2016) and inflammation (Del Rio et al., 2010, 2012) as major drivers of augmented chemoreflex drive observed in the CIH model. Indeed, experimental CIH is associated with elevation of sympathetic outflow which is dependent on ROS production at the level of the peripheral chemoreceptors (Marcus et al., 2010; Braga et al., 2011). Taken together these studies suggest that novel treatments capable of reducing oxidative stress and/or inflammation at the level of the peripheral chemoreceptors may have potential therapeutic value for the treatment of SA-related

autonomic and ventilatory dysregulation and by extension SA-related cardiovascular morbidities (i.e., systemic hypertension).

Despite numerous studies exploring the role of central nervous system ROS in cardiovascular disease, little is known about the role of ROS in the processing of the cardiovascular reflexes within the brainstem (Braga et al., 2011). CIH and Angiotensin II-derived ROS play a crucial role in the modulation of baroreceptor and chemoreceptor function, but also have been shown to play a role in altered neurotransmission in brainstem sympathetic control areas like the NTS and the RVLM (Gao et al., 2005; Nunes et al., 2010; Braga et al., 2011; Del Rio et al., 2016). To date, no studies have addressed the potential role of CIH-derived ROS on central chemoreceptor regions such as the RTN. Additional studies are needed to determine any possible contribution of RTN neurons and the central chemoreflex on the cardiovascular disturbances observed in CIH. Considering that both peripheral and central chemoreceptors potentially contribute to the pathophysiology of OSA and that oxidative stress and inflammation play important roles in abnormal chemoreceptor physiology, it is reasonable to propose that new therapeutic strategies targeting oxidative stress and inflammation may have a positive impact on aberrant peripheral and central chemoreceptor function.

ERYTHROPOIETIN AND INTERACTION WITH ITS RECEPTOR

Erythropoietin (Epo) is a small signaling molecule produced in the kidney and whose primary known function is the stimulation of erythropoiesis in the bone marrow (Donnelly, 2001; Dzierzak and Philipsen, 2013); however, Epo also has anti-oxidative effects. Epo directly activates intracellular anti-oxidant mechanisms such as heme oxygenase-1 and glutathione peroxidase, and Epo may inhibit iron-dependent oxidative injury indirectly by inducing iron depletion (Katavetin et al., 2007). The Epo receptor (Epo-R) is present on the surface of erythroid progenitors as a homodimer of two identical Epo-R subunits (Livnah et al., 1999), and Epo binds its receptor with very high affinity (Bunn, 2013). However, there is evidence that Epo has non-hematopoietic activity which is mediated by a β common receptor, a heterodimer with one Epo-R monomer and CD31 (Leist et al., 2004; Chen et al., 2015). In addition to the kidney derived Epo, there is ample evidence to indicate that Epo is also produced outside of the kidney. Indeed, Epo mRNA has been detected in lungs, testis, heart, and brain in rodents (Tan et al., 1992; El Hasnaoui-Saadani et al., 2013; Pichon et al., 2016). Cells from the retina, testes, lungs, and some neurons and glial cells of the central nervous system have been shown to constitutively express several components of the Epo signaling pathway (Digicaylioglu et al., 1995; Gassmann et al., 2003; Grimm et al., 2004; Jelkmann, 2007; Yasuda et al., 2010) and expression of its target receptor (Epo-R) is found in endothelial cells, smooth muscle cells, retinal tissue, testis, and the central nervous system (Masuda et al., 1994; Ammarguella et al., 1996; Marti et al., 1997; Bernaudin et al., 1999; Gassmann et al., 2003). Taken together, these studies suggest a role for Epo in regulation of physiological functions other than erythropoiesis

(Gassmann et al., 2003). Indeed, recent data suggests that Epo regulates the control of breathing via central and peripheral actions (Soliz et al., 2005; Brugniaux et al., 2011; Voituron et al., 2014).

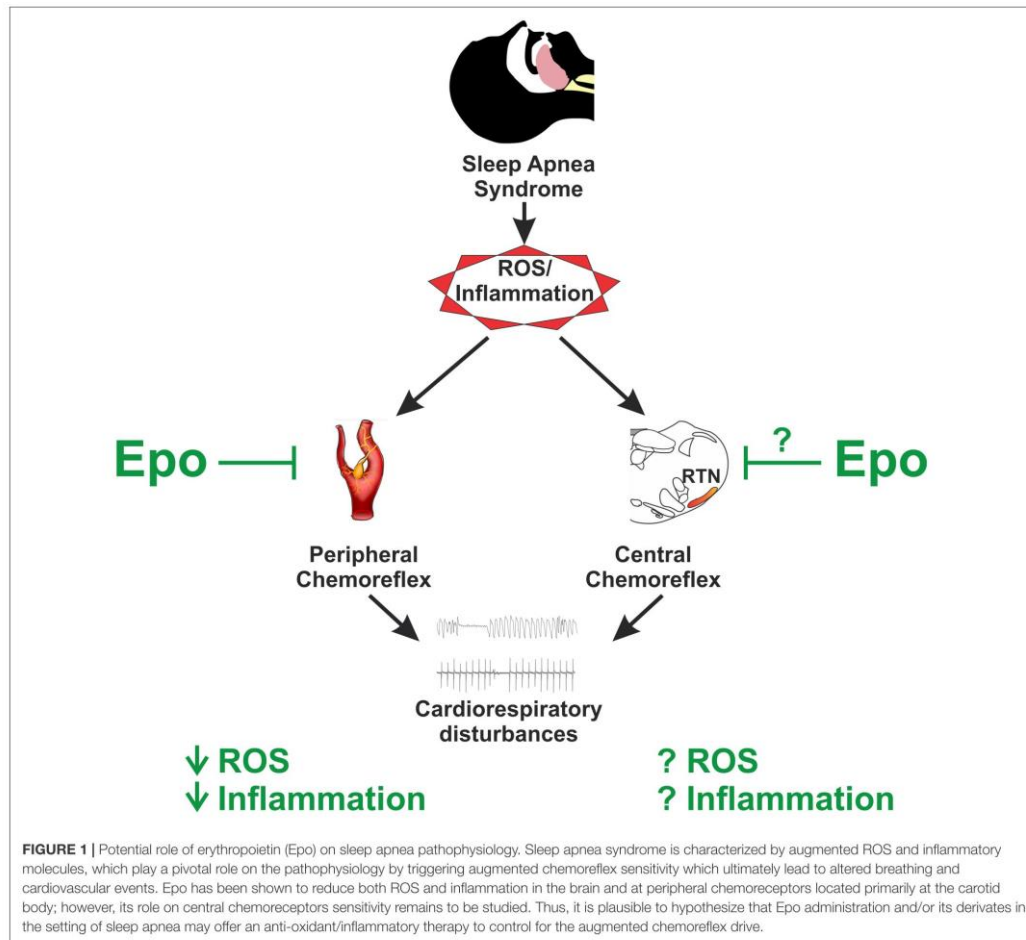
ERYTHROPOIETIN AND RESPIRATORY REGULATION

A number of studies provide evidence that Epo plays a role in control of breathing. The Epo-R is expressed in the pre-Bötzinger complex, a key region in the brainstem involved in ventilatory rhythmogenesis and regulation (Soliz et al., 2005). Epo increases dopamine release and tyrosine hydroxylase (TH) activity in cells with neural characteristics (Masuda et al., 1994; Koshimura et al., 1999; Yamamoto et al., 2000; Tanaka et al., 2001), and Epo-R is specifically expressed in TH-positive cell groups in the brainstem (Soliz et al., 2005). Furthermore, overexpression of Epo increase brainstem catecholamine turnover in mice (Soliz et al., 2005). Interestingly, the Epo found in the central nervous system does not reach the systemic circulation due to the lack of permeability of the blood-brain barrier (Gassmann et al., 2003). These results strongly suggest that Epo-derived from the central nervous system itself must play a physiological role “*in situ*” as a local regulator of neuronal function (Jelkmann, 2007).

In addition to altering the metabolism of catecholamines in the brainstem, Epo has been shown to have similar effects in the CB, and has been shown that one injection of human recombinant Epo reduce the tidal volume during hypoxic stimulus in humans and mice (Soliz et al., 2005, 2009; Lifshitz et al., 2009). In support of this notion, recent studies have shown that Epo is released within the RVLM during hypoxic stimulation (Oshima et al., 2018), and that Epo-R is constitutively expressed in peripheral and central structures involved in ventilatory chemoreflex control (Digicaylioglu et al., 1995; Soliz et al., 2005; Lam et al., 2009; Voituron et al., 2014). Epo is known to regulate hypoxic ventilatory response (HVR) in mice by interacting with brainstem and CB (Soliz et al., 2005). The ventilatory response to hypoxia is a sex dependent response, being more pronounced in female sex (Joseph et al., 2000, 2002). Interestingly, Epo has sexually dimorphic effects on the ventilatory response to hypoxia. Indeed, it tends to increase the HVR in female mice and in women via interaction with sex steroid hormones (Soliz et al., 2009). Besides its well-known role in erythropoiesis and influence on control of breathing, Epo also exerts important cytoprotective effects.

ERYTHROPOIETIN AS A PROTECTIVE MOLECULE DURING EXPOSURE TO INTERMITTENT HYPOXIA

It has been shown that Epo exerts a neuroprotective role in several diseases due to its anti-apoptotic (Sirén and Ehrenreich, 2001), anti-cytotoxic (Morishita et al., 1997), anti-oxidative (Koshimura et al., 1999), and anti-inflammatory



(Villa et al., 2003) properties. Increases in oxidative stress and inflammation are recognized as key mediators affecting control of breathing and cardiovascular function following exposure to CIH in rodents (Del Rio et al., 2010, 2011, 2012, 2016; Marcus et al., 2010; Iturriaga et al., 2014). It has been shown that CIH induces oxidative stress in the CB and potentiation of CB-mediated chemoreflex drive (Del Rio et al., 2010; Marcus et al., 2010). In addition, increased expression of pro-inflammatory cytokines in the CB has been shown following exposure to CIH (Del Rio et al., 2011, 2012). Furthermore, we showed that ibuprofen treatment selectively reduces central inflammation in the NTS in rats exposed to CIH, and that ibuprofen treatment decreases the ventilatory response to hypoxia (Del Rio et al., 2012). Taken together, these results suggest that oxidative stress and

inflammation acting predominantly on chemoreflex pathways are involved in the altered chemoreflex function and attendant autonomic dysregulation following CIH. Thus, it is plausible that administration of Epo could have a positive effect on control of breathing and autonomic function during/after exposure to CIH (Figure 1).

CONCLUSION

Sleep apnea syndrome, characterized by cyclic and repeated exposure to brief episodes of hypoxia and hypercapnia, is recognized as a major public health problem worldwide. SA can occur as a result of upper airway obstruction and/or as a result of abnormal respiratory control resulting from aberrant

peripheral and central chemoreflex function. Currently, there are no treatments that specifically target abnormal control of breathing in SA. Epo has recently been shown to have novel neuroprotective properties associated with anti-oxidant and anti-inflammatory effects. Increases in oxidative stress and inflammation are both recognized as key mediators in respiratory and cardiovascular disturbances following exposure to CIH. Accordingly, we propose that future studies should address the potential beneficial effect of Epo or Epo-like compounds on cardio-respiratory function during or after exposure to CIH. Epo-induced erythropoiesis could be detrimental in patients with SA therefore, developing new Epo-derived compounds that can bind to the Epo-R with little or no effect on erythropoiesis would be optimal in terms of therapeutic value.

In summary, uncovering a role for Epo in the regulation of the ventilatory response to hypoxia and/or hypercapnia as well as ventilatory instability will open new avenues in the field of control of breathing in the pathological setting of SA. Furthermore,

determining the potential therapeutic efficacy of Epo or Epo-derived compounds on the enhanced chemoreflex sensitivity observed during CIH will be of potential therapeutic value.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors have approved the final version of the manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed.

FUNDING

This work was supported by FONDECYT 1180172 grants from the National Fund for Scientific and Technological Development of Chile and ECOS-CONICYT CS1603.

REFERENCES

- Ammarguella, F., Gogusev, J., and Drüeke, T. B. (1996). Direct effect of erythropoietin on rat vascular smooth-muscle cell via a putative erythropoietin receptor. *Nephrol. Dial. Transplant.* 11, 687–692. doi: 10.1093/oxfordjournals.ndt.a027361
- Badran, M., Ayas, N., and Laher, I. (2014a). Cardiovascular complications of sleep apnea: role of oxidative stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014:985258. doi: 10.1155/2014/985258
- Badran, M., Ayas, N., and Laher, I. (2014b). Insights into obstructive sleep apnea research. *Sleep Med.* 15, 485–495. doi: 10.1016/j.sleep.2014.01.009
- Bernaudeau, M., Marti, H. H., Roussel, S., Divoux, D., Nouvelot, A., MacKenzie, E. T., et al. (1999). A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19, 643–651. doi: 10.1097/00004647-199906000-00007
- Braga, V. A., Colombari, E., and Jovita, M. G. (2011). Angiotensin II-derived reactive oxygen species underpinning the processing of the cardiovascular reflexes in the medulla oblongata. *Neurosci. Bull.* 27, 269–274. doi: 10.1007/s12264-011-1529-z
- Brophy, S., Ford, T. W., Carey, M., and Jones, J. F. (1999). Activity of aortic chemoreceptors in the anesthetized rat. *J. Physiol.* 514, 821–828. doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.821ad.x
- Brugniaux, J. V., Pialoux, V., Foster, G. E., Duggan, C. T., Eliasziw, M., Hanly, P. J., et al. (2011). Effects of intermittent hypoxia on erythropoietin, soluble erythropoietin receptor and ventilation in humans. *Eur. Respir. J.* 37, 880–887. doi: 10.1183/09031936.00156009
- Bunn, H. F. (2013). Erythropoietin. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3:a011619. doi: 10.1101/cshperspect.a011619
- Carroll, M. S., Patwari, P. P., and Weese-Mayer, D. E. (2010). Carbon dioxide chemoreception and hypoventilation syndromes with autonomic dysregulation. *J. Appl. Physiol.* 108, 979–988. doi: 10.1152/jappphysiol.00004.2010
- Chen, X., Wang, C. C., Song, S. M., Wei, S. Y., Li, J. S., Zhao, S. L., et al. (2015). The administration of erythropoietin attenuates kidney injury induced by ischemia/reperfusion with increased activation of Wnt/ β -catenin signaling. *J. Formos. Med. Assoc.* 114, 430–437. doi: 10.1016/j.jfma.2015.01.007
- Claps, A., and Torrealba, F. (1988). The carotid body connections: a WGA-HRP study in the cat. *Brain Res.* 455, 123–133. doi: 10.1016/0006-8993(88)90121-7
- Del Rio, R., Andrade, D. C., Lucero, C., Arias, P., and Iturriaga, R. (2016). Carotid body ablation abrogates hypertension and autonomic alterations induced by intermittent hypoxia in rats. *Hypertension* 68, 436–445. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07255
- Del Rio, R., Moya, E. A., and Iturriaga, R. (2010). Carotid body and cardiorespiratory alterations in intermittent hypoxia: the oxidative link. *Eur. Respir. J.* 36, 143–150. doi: 10.1183/09031936.00158109
- Del Rio, R., Moya, E. A., and Iturriaga, R. (2011). Differential expression of pro-inflammatory cytokines, endothelin-1 and nitric oxide synthases in the rat carotid body exposed to intermittent hypoxia. *Brain Res.* 1395, 74–85. doi: 10.1016/j.brainres.2011.04.028
- Del Rio, R., Moya, E. A., Koenig, C. S., Fujiwara, K., Alcayaga, J., and Iturriaga, R. (2008). Modulatory effects of histamine on cat carotid body chemoreception. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 164, 401–410. doi: 10.1016/j.resp.2008.09.005
- Del Rio, R., Moya, E. A., Parga, M. J., Madrid, C., and Iturriaga, R. (2012). Carotid body inflammation and cardiorespiratory alterations in intermittent hypoxia. *Eur. Respir. J.* 39, 1492–1500. doi: 10.1183/09031936.00141511
- Dempsey, J. A., Smith, C. A., Blain, G. M., Xie, A., Gong, Y., and Teodorescu, M. (2012). Role of central/peripheral chemoreceptors and their interdependence in the pathophysiology of sleep apnea. *Adv. Exp. Med. Biol.* 758, 343–349. doi: 10.1007/978-94-007-4584-1_46
- Dempsey, J. A., Veasey, S. C., Morgan, B. J., and O'Donnell, C. P. (2010). Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol. Rev.* 90, 47–112. doi: 10.1152/physrev.00043.2008
- Digicaylioglu, M., Bichet, S., Marti, H. H., Wenger, R. H., Rivas, L. A., Bauer, C., et al. (1995). Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 3717–3720. doi: 10.1073/pnas.92.9.3717
- Donnelly, S. (2001). Why is erythropoietin made in the kidney? The kidney functions as a critmeter. *Am. J. Kidney Dis.* 38, 415–425. doi: 10.1053/ajkd.2001.26111
- Dzierzak, E., and Philipsen, S. (2013). Erythropoiesis: development and differentiation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3:a011601. doi: 10.1101/cshperspect.a011601
- El Hasnaoui-Saadani, R., Marchant, D., Pichon, A., Escoubet, B., Pezet, M., Hilfiker-Kleiner, D., et al. (2013). Epo deficiency alters cardiac adaptation to chronic hypoxia. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 186, 146–154. doi: 10.1016/j.resp.2013.01.003
- Epstein, L. J., Kristo, D., Strollo, P. J. Jr., Friedman, N., Malhotra, A., Patil, S. P., et al. (2009). Clinical guideline for the evaluation, management and long-term care of obstructive sleep apnea in adults. *J. Clin. Sleep Med.* 5, 263–276.
- Finley, J. C., and Katz, D. M. (1992). The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. *Brain Res.* 572, 108–116. doi: 10.1016/0006-8993(92)90458-L
- Gao, L., Wang, W., Li, Y. L., Schultz, H. D., Liu, D., and Cornish, K. G. (2005). Sympathoexcitation by central ANG II: roles for AT1 receptor upregulation and NAD(P)H oxidase in RVLM. *Am. J. Physiol. Heart Circ.* 288, 2271–2279. doi: 10.1152/ajpheart.00949.2004

- Gassmann, M., Heinicke, K., Soliz, J., and Ogunshola, O. O. (2003). Non-erythroid functions of erythropoietin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 543, 323–330. doi: 10.1007/978-1-4419-8997-0_22
- Gislasen, T., Lindholm, M. D., Almqvist, M., Birring, D. D. S., and Boman, M. D. (1988). Uvulopalatopharyngoplasty in the sleep apnea syndrome predictors of results. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 114, 45–51. doi: 10.1001/archotol.1988.01860130049013
- Gonzalez, C., Almaraz, L., Obeso, A., and Rigual, R. (1994). Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. *Physiol. Rev.* 74, 829–898. doi: 10.1152/physrev.1994.74.4.829
- Gozal, D. (1998). Congenital central hypoventilation syndrome: an update. *Pediatr. Pulmonol.* 26, 273–282. doi: 10.1002/(SICI)1099-0496(199810)26:4<273::AID-PPUL7>3.0.CO;2-C
- Gozal, D. (2013). Cross-Talk proposal: the intermittent hypoxia attending severe obstructive sleep apnoea does lead to alterations in brain structure and function. *J. Physiol.* 591, 379–381. doi: 10.1113/jphysiol.2012.241216
- Grimm, C., Wenzel, A., Stanescu, D., Samardzija, M., Hotop, S., Groszer, M., et al. (2004). Constitutive over expression of human erythropoietin protects the mouse retina against induced but not inherited retinal degeneration. *J. Neurosci.* 24, 5651–5658. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1288-04.2004
- Guyenet, P. G., and Bayliss, D. A. (2015). Neural control of breathing and CO₂ homeostasis. *Neuron* 87, 946–961. doi: 10.1016/j.neuron.2015.08.001
- Guyenet, P. G., Bayliss, D. A., Stornetta, R. L., Kanbar, R., Shi, Y., Holloway, B. B., et al. (2017). Interdependent feedback regulation of breathing by the carotid bodies and the retrotrapezoid nucleus. *J. Physiol.* 596, 3029–3042. doi: 10.1113/jp274357
- Guyenet, P. G., and Mulkey, D. K. (2010). Retrotrapezoid nucleus and parafacial respiratory group. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 173, 244–255. doi: 10.1016/j.resp.2010.02.005
- Guyenet, P. G., Mulkey, D. K., Stornetta, R. L., and Bayliss, D. A. (2005). Regulation of ventral surface chemoreceptors by the central respiratory pattern generator. *J. Neurosci.* 25, 8938–8947. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2415-05.2005
- Guyenet, P. G., Stornetta, R. L., Abbott, S. B., Dupuy, S. D., and Kanbar, R. (2012). The retrotrapezoid nucleus and breathing. *Adv. Exp. Med. Biol.* 758, 115–122. doi: 10.1007/978-94-007-4584-1_16
- Harper, R. M., Macey, P. M., Woo, M. A., Macey, K. E., Keens, T. G., Gozal, D., et al. (2005). Hypercapnic exposure in congenital central hypoventilation syndrome reveals CNS respiratory control mechanisms. *J. Neurophysiol.* 93, 1647–1658. doi: 10.1152/jn.00863.2004
- Iturriaga, R. (2017). Translating carotid body function into clinical medicine. *J. Physiol.* 596, 3067–3077. doi: 10.1113/jp275335
- Iturriaga, R., and Alcajaga, J. (2004). Neurotransmission in the carotid body: transmitters and modulators between glomus cells and petrosal ganglion nerve terminals. *Brain Res. Rev.* 47, 46–53. doi: 10.1016/j.brainresrev.2004.05.007
- Iturriaga, R., Andrade, D. C., and Del Rio, R. (2014). Enhanced carotid body chemosensory activity and the cardiovascular alterations induced by intermittent hypoxia. *Front. Physiol.* 5:468. doi: 10.3389/fphys.2014.00468
- Iturriaga, R., Rey, S., and Del Rio, R. (2005). Cardiovascular and ventilatory acclimatization induced by chronic intermittent hypoxia: a role for the carotid body in the pathophysiology of sleep apnea. *Biol. Res.* 38, 335–340. doi: 10.4067/S0716-97602005000400004
- Jelkmann, W. (2007). Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur. J. Haematol.* 78, 183–205. doi: 10.1111/j.1600-0609.2007.00818.x
- Jokic, R., Zintel, T., Sridhar, G., Gallagher, C. G., and Fitzpatrick, M. F. (2000). Ventilatory responses to hypercapnia and hypoxia in relatives of patients with the obesity hypoventilation syndrome. *Thorax* 55, 940–945. doi: 10.1136/thorax.55.11.940
- Joseph, V., Soliz, J., Pequignot, J., Sempore, B., Cottet-Emard, J. M., Dalmaz, Y., et al. (2000). Gender differentiation of the chemoreflex during growth at high altitude: functional and neurochemical studies. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278, 806–816. doi: 10.1152/ajpregu.2000.278.4.R806
- Joseph, V., Soliz, J., Soria, R., Pequignot, J., Favier, R., Spielvogel, H., et al. (2002). Dopaminergic metabolism in carotid bodies and high-altitude acclimatization in female rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 282, 765–773. doi: 10.1152/ajpregu.00398.2001
- Kara, T., Narkiewicz, K., and Somers, V. K. (2003). Chemoreflexes—physiology and clinical implications. *Acta Physiol.* 177, 377–384. doi: 10.1046/j.1365-201X.2003.01083.x
- Katavetin, P., Tungsanga, K., Eiam-Ong, S., and Nangaku, M. (2007). Antioxidative effects of erythropoietin. *Kidney Int. Suppl.* 72, S10–S15. doi: 10.1038/sj.ki.5002482
- Katz, D. M., Dutschmann, M., Ramirez, J. M., and Hilaire, G. (2009). Breathing disorders in Rett syndrome: progressive neurochemical dysfunction in the respiratory network after birth. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 168, 101–108. doi: 10.1016/j.resp.2009.04.017
- Khoo, M. C. (2000). Determinants of ventilatory instability and variability. *Respir. Physiol.* 122, 167–182. doi: 10.1016/S0034-5687(00)00157-2
- Konecny, T., Kara, T., and Somers, V. K. (2014). Obstructive sleep apnea and hypertension: an update. *Hypertension* 63, 203–209. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.00613
- Koshimura, K., Murakami, Y., Sohmiya, M., Tanaka, J., and Kato, Y. (1999). Effects of erythropoietin on neuronal activity. *J. Neurochem.* 72, 2565–2572. doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.0722565.x
- Lam, S. Y., Tipoe, G. L., and Fung, M. L. (2009). Upregulation of erythropoietin and its receptor expression in the rat carotid body during chronic and intermittent hypoxia. *Adv. Exp. Med. Biol.* 648, 207–214. doi: 10.1007/978-90-481-2259-2_24
- Lazarenko, R. M., Milner, T. A., Dupuy, S. D., Stornetta, R. L., West, G. H., Kievits, J. A., et al. (2009). Acid sensitivity and ultrastructure of the retrotrapezoid nucleus in Phox2b-EGFP transgenic mice. *J. Comp. Neurol.* 517, 69–86. doi: 10.1002/cne.22136
- Leist, M., Ghezzi, P., Grasso, G., Bianchi, R., Villa, P., Fratelli, M., et al. (2004). Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science* 305, 239–242. doi: 10.1126/science.1098313
- Levy, P., Pépin, J. L., Arnaud, C., Tamisier, R., Borel, J. C., Dematteis, M., et al. (2008). Intermittent hypoxia and sleep-disordered breathing: current concepts and perspectives. *Eur. Respir. J.* 32, 1082–1095. doi: 10.1183/09031936.00013308
- Lifshitz, L., Prutchi-Sagiv, S., Avneon, M., Gassmann, M., Mittelman, M., and Neumann, D. (2009). Non-erythroid activities of erythropoietin: functional effects on murine dendritic cells. *Mol. Immunol.* 46, 713–721. doi: 10.1016/j.molimm.2008.10.004
- Livnah, O., Stura, E. A., Middleton, S. A., Johnson, D. L., Jolliffe, L. K., and Wilson, I. A. (1999). Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science* 283, 987–990. doi: 10.1126/science.283.5404.987
- Malhotra, A., and Owens, R. L. (2010). What is central sleep apnea? *Respir. Care* 55, 1168–1178.
- Mansukhani, M. P., Wang, S., and Somers, V. K. (2015). Chemoreflex physiology and implications for sleep apnea – insights from studies in humans. *Exp. Physiol.* 100, 130–135. doi: 10.1113/expphysiol.2014.082826
- Marcus, N. J., Del Rio, R., Schultz, E. P., Xia, X.-H., and Schultz, H. D. (2014). Carotid body denervation improves autonomic and cardiac function and attenuates disordered breathing in congestive heart failure. *J. Physiol.* 592, 391–408. doi: 10.1113/jphysiol.2013.266221
- Marcus, N. J., Li, Y.-L., Bird, C. E., Schultz, H. D., and Morgan, B. J. (2010). Chronic intermittent hypoxia augments chemoreflex control of sympathetic activity: role of the angiotensin ii type 1 receptor. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 171, 36–45. doi: 10.1016/j.resp.2010.02.003
- Marshall, J. M. (1994). Peripheral chemoreceptors and cardiovascular regulation. *Physiol. Rev.* 74, 543–594. doi: 10.1152/physrev.1994.74.3.543
- Marti, H. H., Gassmann, M., Wenger, R. H., Kvietikova, I., Morganti-Kossmann, M. C., Kossmann, T., et al. (1997). Detection of erythropoietin in human liquor: intrinsic erythropoietin production in the brain. *Kidney Int.* 51, 416–418. doi: 10.1038/ki.1997.55
- Masuda, S., Okano, M., Yamagishi, K., Nagao, M., Ueda, M., and Sasaki, R. (1994). A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J. Biol. Chem.* 269, 19488–19493.
- Miller, M. J., and Tenney, S. M. (1975). Hypoxia-induced tachypnea in carotid-deafferented cats. *Respir. Physiol.* 23, 31–39. doi: 10.1016/0034-5687(75)90069-9
- Moreira, T. S., Takakura, A. C., Colombari, E., and Guyenet, P. G. (2006). Central chemoreceptors and sympathetic vasomotor outflow. *J. Physiol.* 577, 369–386. doi: 10.1113/jphysiol.2006.115600

- Morgan, B. J., Bates, M. L., Del Rio, R., Wang, Z., and Dopp, J. M. (2016). Oxidative stress augments chemoreflex sensitivity in rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 234, 47–59. doi: 10.1016/j.resp.2016.09.001
- Morishita, E., Masuda, S., Nagao, M., Yasuda, Y., and Sasaki, R. (1997). Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* 76, 105–116. doi: 10.1016/S0306-4522(96)00306-5
- Narkiewicz, K., van de Borne, P. J., Montano, N., Dyken, M. E., Phillips, B. G., and Somers, V. K. (1998). Contribution of tonic chemoreflex activation to sympathetic activity and blood pressure in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation* 97, 943–945. doi: 10.1161/01.CIR.97.10.943
- Nattie, E., and Li, A. (2012). Central chemoreceptors: locations and functions. *Compr. Physiol.* 2, 221–254. doi: 10.1002/cphy.c100083
- Nunes, F. C., Ribeiro, T. P., França-Silva, M. S., Medeiros, I. A., and Braga, V. A. (2010). Superoxide scavenging in the rostral ventrolateral medulla blunts the pressor response to peripheral chemoreflex activation. *Brain Res.* 1351, 141–149. doi: 10.1016/j.brainres.2010.07.001
- Oshima, N., Onimaru, H., Yamagata, A., Itoh, S., Matsubara, H., Imakiire, T., et al. (2018). Erythropoietin, a putative neurotransmitter during hypoxia, is produced in RVLM neurons and activates them in neonatal Wistar rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 314, 700–708. doi: 10.1152/ajpregu.00455.2017
- Pichon, A., Jeton, F., El Hasnaoui-Saadani, R., Hagström, L., Launay, T., Beaudry, M., et al. (2016). Erythropoietin and the use of a transgenic model of erythropoietin-deficient mice. *Hypoxia* 7, 29–39.
- Ponikowski, P., and Banasiak, W. (2001). Chemosensitivity in chronic heart failure. *Heart Fail. Monit.* 1, 126–131.
- Rey, S., Del Rio, R., and Iturriaga, R. (2006). Contribution of endothelin-1 to the enhanced carotid body chemosensory responses induced by chronic intermittent hypoxia. *Brain Res.* 1086, 152–159. doi: 10.1016/j.brainres.2006.02.082
- Rey, S., Rio, R. D., Alcayaga, J., and Iturriaga, R. (2004). Chronic intermittent hypoxia enhances carotid chemosensory and ventilatory responses to hypoxia. *J. Physiol.* 560, 577–586. doi: 10.1113/jphysiol.2004.072033
- Richter, D. W., and Spyer, K. M. (2001). Studying rhythmogenesis of breathing: comparison of in vivo and in vitro models. *Trends Neurosci.* 24, 464–472. doi: 10.1016/S0166-2236(00)01867-1
- Rosin, D. L., Chang, D. A., and Guyenet, P. G. (2006). Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. *J. Comp. Neurol.* 499, 64–89. doi: 10.1002/cne.21105
- Schultz, H. D., Marcus, N. J., and Del Rio, R. (2015). Mechanisms of carotid body chemoreflex dysfunction during heart failure. *Exp. Physiol.* 100, 124–129. doi: 10.1113/expphysiol.2014.079517
- Schultz, H. D., and Sun, S. Y. (2000). Chemoreflex function in heart failure. *Heart Fail. Rev.* 5, 45–56. doi: 10.1023/A:1009846123893
- Sirén, A. L., and Ehrenreich, H. (2001). Erythropoietin—a novel concept for neuroprotection. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 251, 179–184. doi: 10.1007/s004060170038
- Smith, C. A., Forster, H. V., Blain, G. M., and Dempsey, J. A. (2010). An interdependent model of central/peripheral chemoreception: evidence and implications for ventilatory control. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 173, 288–297. doi: 10.1016/j.resp.2010.02.015
- Solin, P., Roebuck, T., Johns, D. P., Haydn Walters, E., and Naughton, M. T. (2000). Peripheral and central ventilatory responses in central sleep apnea with and without congestive heart failure. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162, 2194–2200. doi: 10.1164/ajrccm.162.6.2002024
- Soliz, J., Joseph, V., Soulage, C., Becskei, C., Vogel, J., Pequignot, J. M., et al. (2005). Erythropoietin regulates hypoxic ventilation in mice by interacting with brainstem and carotid bodies. *J. Physiol.* 568, 559–571. doi: 10.1113/jphysiol.2005.093328
- Soliz, J., Thomsen, J. J., Soulage, C., Lundby, C., and Gassmann, M. (2009). Sex-dependent regulation of hypoxic ventilation in mice and humans is mediated by erythropoietin. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296, 1837–1846. doi: 10.1152/ajpregu.90967.2008
- Takakura, A. C., Moreira, T. S., Stornetta, R. L., West, G. H., Gwilt, J. M., and Guyenet, P. G. (2008). Selective lesion of retrotrapezoid Phox2b-expressing neurons raises the apnoeic threshold in rats. *J. Physiol.* 586, 2975–2991. doi: 10.1113/jphysiol.2008.153163
- Tan, C. C., Eckardt, K. U., Firth, J. D., and Ratcliffe, P. J. (1992). Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia. *Am. J. Physiol.* 263, 474–481.
- Tanaka, J., Koshimura, K., Sohmiya, M., Murakami, Y., and Kato, Y. (2001). Involvement of tetrahydrobiopterin in trophic effect of erythropoietin on PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 358–362. doi: 10.1006/bbrc.2001.6002
- Topor, Z. L., Johannson, L., Kasprzyk, J., and Remmers, J. E. (2001). Dynamic ventilatory response to CO₂ in congestive heart failure patients with and without central sleep apnea. *J. Appl. Physiol.* 91, 408–416. doi: 10.1152/jappl.2001.91.1.408
- Villa, P., Bigini, P., Mennini, T., Agnello, D., Laragione, T., Cagnotto, A., et al. (2003). Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J. Exp. Med.* 198, 971–975. doi: 10.1084/jem.20021067
- Vizek, M., Pickett, C. K., and Weil, J. V. (1987). Increased carotid body hypoxic sensitivity during acclimatization to hypobaric hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 63, 2403–2410. doi: 10.1152/jappl.1987.63.6.2403
- Voituron, N., Jeton, F., Cholley, Y., Hasnaoui-Saadani, R. E., Marchant, D., Quidu, P., et al. (2014). Catalyzing role of erythropoietin on the nitric oxide central pathway during the ventilatory responses to hypoxia. *Physiol. Rep.* 2:e00223. doi: 10.1002/phy.2.223
- Wang, S., Benamer, N., Zanella, S., Kumar, N. N., Shi, Y., Bévenut, M., et al. (2013). TASK-2 channels contribute to pH sensitivity of retrotrapezoid nucleus chemoreceptor neurons. *J. Neurosci.* 33, 16033–16044. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2451-13.2013
- Xie, A., Skatrud, J. B., Puleo, D. S., Rahko, P. S., and Dempsey, J. A. (2002). Apnea-hypopnea threshold for CO₂ in patients with congestive heart failure. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165, 1245–1250. doi: 10.1164/rccm.200110-0220C
- Xu, W., Chi, L., Row, B. W., Xu, R., Ke, Y., Xu, B., et al. (2004). Increased oxidative stress is associated with chronic intermittent hypoxia-mediated brain cortical neuronal cell apoptosis in a mouse model of sleep apnea. *Neuroscience* 126, 313–323. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.03.055
- Yamamoto, M., Koshimura, K., Kawaguchi, M., Sohmiya, M., Murakami, Y., and Kato, Y. (2000). Stimulating effect of erythropoietin on the release of dopamine and acetylcholine from the rat brain slice. *Neurosci. Lett.* 292, 131–133. doi: 10.1016/S0304-3940(00)01441-5
- Yasuda, Y., Hara, S., Hirohata, T., Koike, E., Yamasaki, H., Okumoto, K., et al. (2010). Erythropoietin-responsive sites in normal and malignant human lung tissues. *Anat. Sci. Int.* 85, 204–213. doi: 10.1007/s12565-010-0081-7
- Young, T., Peppard, P. E., and Gottlieb, D. J. (2002). Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165, 1217–1239. doi: 10.1164/rccm.2109080

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Andrade, Haine, Toledo, Diaz, Quintanilla, Marcus, Iturriaga, Richalet, Voituron and Del Rio. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

II Caractérisation de l'Effet protecteur de l'Epo au niveau pulmonaire dans un modèle murin d'agression pulmonaire aiguë.

Les données de littérature concernant l'action protectrice de l'Epo dans le poumon nous ont conduit à réaliser une étude expérimentale dans le laboratoire. Ce travail avait pour but d'étudier les effets protecteurs de l'Epo au niveau pulmonaire en utilisant un modèle murin sous exprimant l'Epo (souris Epo-TAg^h).

Caractérisation du rôle protecteur de l'érythropoïétine dans un modèle murin d'agression pulmonaire aiguë.

C.H.Yegen, **L.Haine**, D.Marchant, E.Boncoeur, N.Voituron. Revue des Maladies Respiratoires. Volume 37, Issue 3, March 2020, Pages 193-196.
<https://doi.org/10.1016/i.rmr.2020.02.005>

II.1 Résumé de la revue 2

Outre son rôle dans l'érythropoïèse, l'érythropoïétine (Epo) joue un rôle dans la protection tissulaire, notamment par des effets cardioprotecteurs, néphroprotecteurs et neuroprotecteurs. La présence de l'Epo et de son récepteur (Epo-R) dans le tissu pulmonaire suggère également un effet cytoprotecteur dans le poumon. Notre projet vise à documenter ce rôle en utilisant un modèle murin sous-exprimant l'Epo (Epo-TAg^h). Les résultats obtenus permettront de mieux comprendre les effets cytoprotecteurs de l'Epo mais également d'apprécier ses effets bénéfiques dans le cas d'atteintes du poumon distal.

Résumé de résultats préliminaires obtenus

Les premiers résultats préliminaires issus de cette étude *in vivo*, ont montré que la déficience en Epo induisait un œdème pulmonaire important accompagné d'une augmentation de marqueurs du stress oxydatif et d'apoptose ainsi qu'une diminution de la compliance pulmonaire en condition physiologique chez les souris Epo-TAg^h. Ceci suggère que ces souris seraient plus susceptibles à développer une pathologie pulmonaire.



Disponible en ligne sur
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



JOURNÉES DE RECHERCHE RESPIRATOIRE

Caractérisation du rôle protecteur de l'érythropoïétine dans un modèle murin d'agression pulmonaire aiguë



Characterisation of the protective role of erythropoietin in a murine model of acute lung injury

C.H. Yegen, L. Haine, D. Marchant, E. Boncoeur**,
N. Voituron*

Laboratoire Hypoxie et Poumon, UMR U1272 Inserm-Université Paris 13, 1, rue de Chablis,
93017 Bobigny cedex, France

Reçu le 12 janvier 2020 ; accepté le 12 janvier 2020
Disponible sur Internet le 4 mars 2020

MOTS CLÉS

Erythropoïétine ;
Agressions
pulmonaire ;
Cytoprotection

Résumé Outre son rôle dans l'érythropoïèse, l'érythropoïétine (Epo) joue un rôle dans la protection tissulaire, notamment par des effets cardioprotecteurs, néphroprotecteurs et neuroprotecteurs. La présence de l'Epo et de son récepteur (Epo-R) dans le tissu pulmonaire suggère également un effet cytoprotecteur dans le poumon. Notre projet vise à documenter ce rôle en utilisant un modèle murin sous-exprimant l'Epo. Les résultats obtenus permettront de mieux comprendre les effets cytoprotecteurs de l'Epo mais également d'apprécier ses effets bénéfiques dans le cas d'atteintes du poumon distal.

© 2020 SPLF. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

* Auteur correspondant.

** Co-Auteur correspondant.

Adresses e-mail : emilie.boncoeur@univ-paris13.fr (E. Boncoeur), nicolas.voituron@univ-paris13.fr (N. Voituron).

<https://doi.org/10.1016/j.rmr.2020.02.005>

0761-8425/© 2020 SPLF. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

KEYWORDS

Erythropoietin;
Lung injury;
Cytoprotection

Summary In addition to its role in erythropoiesis, erythropoietin (Epo) plays a role in tissue protection, which includes cardioprotective, nephroprotective and neuroprotective effects. The presence of Epo and its receptor (Epo-R) in pulmonary tissue also suggests a cytoprotective effect of Epo in the lung. Our project aims to document this role in a murine model under-expressing Epo. The obtained results will lead to a better understanding of the cytoprotective effects of Epo and will also give an appreciation of its beneficial effects in cases of lung injury. © 2020 SPLF. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Introduction

L'érythropoïétine et hématopoïèse

L'érythropoïétine (Epo) est une glycoprotéine de 34 kDa impliquée dans la synthèse des globules rouges [1,2]. Cette hormone est principalement synthétisée par les reins chez l'adulte et par les hépatocytes au stade fœtal [3,4]. En cas d'hypoxie ou d'anémie, certaines cellules dérivées d'hépatomes sont capables de détecter cette variation d'oxygène et ainsi augmenter leur production d'Epo [5]. Il a été montré que le facteur induit en hypoxie (HIF-1, *hypoxia-induced factor*), stabilisé en condition hypoxique, se fixerait spécifiquement sur un enhanceur (situé en 3' du gène codant pour l'Epo) ayant un rôle d'amplification de la transcription durant l'hypoxie [5,6]. L'Epo se fixe sur son récepteur (Epo-R) exprimé par les précurseurs érythroïdes situés dans les moelles osseuses. La fixation de l'Epo sur l'homodimère Epo-R induit une cascade de signalisation impliquant la voie Janus Kinase 2 (Jak2), Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) et Phospho-Inositide 3-Kinases (PI3K) [2] qui stimule la survie, la prolifération et la différenciation des réticulocytes à l'origine de l'érythropoïèse.

D'autre part, l'ARNm de l'Epo a été retrouvé dans de nombreux tissus comme les testicules, la moelle osseuse, la rate ou encore le cerveau [7–9]. La présence de l'Epo dans ces tissus suggère d'autres fonctions que celle bien décrite dans l'érythropoïèse. De manière intéressante, l'Epo est également exprimée en petite quantité par les cellules pulmonaires [10,11] et l'expression de son récepteur (Epo-R) a été décrite dans les cellules bronchiolaires et alvéolaire de type II [12].

Les effets protecteurs de l'Epo

Il est maintenant admis que l'Epo joue un rôle dans la protection neuronale grâce à ses propriétés cytoprotectrices, anti-oxydantes, anti-inflammatoires et anti-apoptotiques. Ainsi, l'injection intrapéritonéale d'Epo exogène favoriserait les processus de remodelage de l'unité neurovasculaire suite à une lésion cérébrale de type hypoxie/ischémie, renforçant ainsi le rôle neuroprotecteur de l'Epo [13,14]. En outre, l'administration d'Epo exogène a permis d'améliorer les fonctions cognitives, la mémoire spatiale et les activités motrices chez les rongeurs nouveau-nés atteints de

lésion cérébrale [15–17]. Bien qu'essentiellement mise en évidence au niveau cérébral [18], cette fonction cytoprotectrice a également été rapportée dans divers organes (Fig. 1). Ainsi, l'Epo joue également un rôle important dans la protection cardiaque [6]. De multiples données expérimentales montrent que l'administration d'Epo recombinante humaine ou de ses dérivés protège le tissu cardiaque d'une agression ischémique ou d'une séquence d'ischémie-reperfusion en réduisant la taille de l'infarctus et en améliorant la fonction ventriculaire [19]. La présence de récepteurs à l'Epo dans les cardiomyocytes de rats et d'humains, mais également au niveau des cellules endothéliales cardiaques, suggérerait son rôle dans la protection contre les infarctus du myocarde [20]. L'Epo semble également jouer un rôle dans l'angiogenèse, en stimulant la migration et la prolifération des cellules endothéliales et en participant au recrutement de cellules progénitrices endothéliales [21].

L'Epo dans le poumon : un potentiel effet protecteur ?

L'Epo et son récepteur étant exprimés dans les cellules épithéliales bronchiques et alvéolaires, un effet protecteur contre les agressions/lésions pulmonaires est envisageable et peu documenté à ce jour. Dans des modèles animaux de syndrome de détresse respiratoire aiguë ou de fibrose pulmonaire induits à la bléomycine, l'administration d'Epo permettrait de limiter la sévérité des lésions en réduisant l'infiltration des macrophages alvéolaires et l'inflammation [22]. De manière complémentaire, des données *in vitro* montrent que l'Epo serait capable de limiter l'apoptose induite par la bléomycine au niveau des cellules épithéliales alvéolaires et endothéliales [23]. Ainsi, bien que l'hypothèse de l'effet protecteur de l'Epo dans le poumon soit supportée par des données issues de la littérature, les mécanismes sous-jacents à ses effets protecteurs sur le poumon sont mal connus. Partant de ce constat, notre projet vise à documenter le rôle de l'Epo pulmonaire et de ses effets cytoprotecteurs dans un contexte d'agression aiguë.

Modèle animal

Un modèle de souris sous exprimant l'Epo (Epo-TAg^h) sera utilisé (Fig. 2). Ce modèle a été obtenu par insertion de

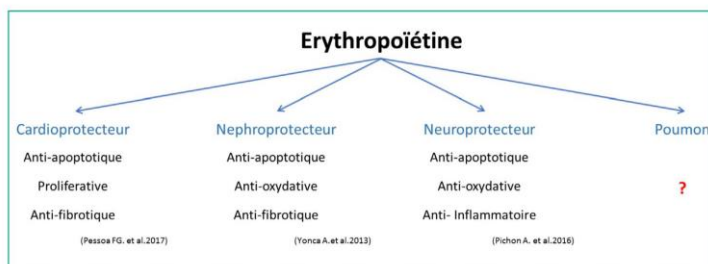


Figure 1. Effets bénéfiques de l'érythropoïétine (Epo). Des effets cytoprotecteurs de l'Epo ont été documentés au niveau cardiaque, rénal et cérébral. La présence de l'Epo et de son récepteur au niveau pulmonaire pourrait également suggérer un effet protecteur dans cet organe.

	Groupe Contrôle (Wild-Type like)	Groupe Epo-TAg ^h
Hb (g/dl)	17.1 ± 0.3	6.9 ± 0.3*
HCT (%)	54.2 ± 0.8	24.0 ± 1.6*
[Epo] plasmatique (pg/ml)	122 ± 16	53 ± 18*

Figure 2. Caractéristiques du modèle Epo-TAg^h. Les souris Epo-TAg^h présentent une diminution de la concentration plasmatique en hémoglobine (Hb) et de l'hématocrite (HCT) [24]. La concentration d'Epo ([Epo]) plasmatique est également réduite [25].

l'antigène T du virus SV40 au niveau de l'exon 1 du gène codant l'Epo [13,24], conduisant à une protéine fonctionnelle non tronquée mais produite en moins grande quantité. Le groupe contrôle sera constitué d'animaux issus des mêmes portées mais ne présentant pas de modulation de l'expression du gène codant l'Epo (*Wild-Type like*).

Valeurs ajoutées en termes de santé respiratoire

Ce projet devrait nous permettre d'identifier dans un premier temps les types cellulaires sensibles aux variations pulmonaires d'Epo, mais également de déterminer les mécanismes et les acteurs moléculaires impliqués dans ses effets cytoprotecteurs. Ces résultats nous permettront d'apprécier les conséquences des atteintes pulmonaires sur la mécanique ventilatoire et d'évaluer les effets bénéfiques de l'Epo dans le cas d'atteintes du poumon distal.

La recherche d'une anémie chez les patients atteints de pathologies pulmonaires et la mise en évidence d'une corrélation entre sévérité de la maladie et taux d'Epo seraient également intéressantes afin de confirmer l'intérêt d'étudier son rôle cytoprotecteur dans le poumon distal.

Financements

Cette étude a été financée par l'université Paris 13, la chancellerie des Université-Legs Poix (subvention 2018, NV) et l'Institut Fédératif de Recherche Biomédicale de l'Université Paris 13.

Remerciements

Les auteurs remercient Samira Varela, Sonia Antoine et Mor Sy pour les soins aux animaux ainsi que le Pr. Carole Planès et le Pr. Jean-François Bernaudin pour leurs contributions aux discussions et leurs conseils.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

- [1] Sanderson CJ. Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* 1992;79:3101–9.

- [2] Eggold JT, Rankin EB. Erythropoiesis, EPO, macrophages, and bone. *Bone* 2019;119:36–41.
- [3] Jelkmann W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur J Haematol* 2007;78:183–205.
- [4] Fisher JW. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med* 2003;228:1–14.
- [5] Coldberg MA, Dunning SP, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 1988;242:1412–5.
- [6] Semenza GL, Wang GL. 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 Bio* 1992;12:5447–54.
- [7] El Hasnaoui-Saadani R, Marchant D, Pichon A, et al. Epo deficiency alters cardiac adaptation to chronic hypoxia. *Respiratory Physiology and Neurobiology* 2013;186:146–54.
- [8] Weidemann A, Johnson RS. Nonrenal regulation of EPO synthesis. *Kidney International* 2009;75:682–8.
- [9] Deji BZ, Shang P, Danzeng WJ, et al. Expression and hypoxia adaptation analysis of the EPO gene in different tissues of plateau Tibetan pigs. *Genetics and Molecular Research* 2015;14:1700–6.
- [10] Fandrey J, Bunn H. In vivo and in vitro regulation of erythropoietin mRNA: Measurement by competitive polymerase chain reaction. *Blood* 1993;81:617–23.
- [11] Jelkmann W. Recombinant EPO production - Points the nephrologist should know. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:2749–53.
- [12] Yoshimi M, Maeyama T, Yamada M, et al. Recombinant human erythropoietin reduces epithelial cell apoptosis and attenuates bleomycin-induced pneumonitis in mice. *Respirology* 2008;13:639–45.
- [13] Pichon A, Jeton F, El Hasnaoui-Saadani R, et al. Erythropoietin and the use of a transgenic model of erythropoietin-deficient mice. *Hypoxia* 2016;4:29–39.
- [14] Iwai M, Cao G, Yin W, Stetler RA, Liu J, Chen J. Erythropoietin promotes neuronal replacement through revascularization and neurogenesis after neonatal hypoxia/ischemia in rats. *Stroke* 2007;38:2795–803.
- [15] Demers EJ, McPherson RJ, Juul SE. Erythropoietin protects dopaminergic neurons and improves neurobehavioral outcomes in juvenile rats after neonatal hypoxia-ischemia. *Pediatric Research* 2005;58:297–301.
- [16] Sola A, Wen TC, Hamrick SEG, et al. Potential for protection and repair following injury to the developing brain: A role for erythropoietin? *Pediatric Research* 2005;57:110R–7R.
- [17] Gonzalez FF, Abel R, Almi CR, Mu D, Wendland M, Ferriero D, et al. Erythropoietin sustains cognitive function and brain volume after neonatal stroke. *Dev Neurosci* 2009;31:403–11.
- [18] Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, et al. Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur JNeuroscience* 1996;8:666–76.
- [19] Sanchis-Gomar F, Garcia-Gimenez JL, Pareja-Galeano H, et al. Erythropoietin and the heart: Physiological effects and the therapeutic perspective. *Int JCardiol* 2014;171:116–25.
- [20] Kiss K, Csonka C, Pálóczi J, et al. Novel, selective EPO receptor ligands lacking erythropoietic activity reduce infarct size in acute myocardial infarction in rats. *Pharmacol Res* 2016;113:62–70.
- [21] Ribatti D, Presta M, Vacca A, et al. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood* 1999;93:2627–36.
- [22] He Q, Zhao X, Bi S, et al. Pretreatment with erythropoietin attenuates lung ischemia/reperfusion injury via Toll-like receptor-4/Nuclear factor-B (TLR4/NF- κ B) pathway. *Med Sci Monit* 2018;24:1251–7.
- [23] MacRedmond R, Singhera GK, Dorscheid DR. Erythropoietin inhibits respiratory epithelial cell apoptosis in a model of acute lung injury. *Eur Respir J* 2009;33:1403–14.
- [24] Macarlupu JL, Buvry A, Morel OE, et al. Time course of ventilator acclimatisation to hypoxia in a model of anemic transgenic mice. *Respir Physiol Neurobiol* 2006;153:14–22.
- [25] El Hasnaoui-Saadani R, Pichon A, Marchant D, et al. Cerebral adaptations to chronic anemia in a model of erythropoietin-deficient mice exposed to hypoxia. *Am J Physiol: Regulatory, Integrative & Comparative Physiology* 2009;296:R801–11.

III Utilisation potentielle de l'Epo en thérapie dans le traitement des pathologies pulmonaires

Dans ce travail, nous avons analysé dans la littérature les propriétés de l'Epo protectrices de l'Epo dans différents organes et nous avons porté un intérêt particulier aux effets bénéfiques de cette hormone et ces dérivés dans le poumon.

Erythropoietin: a promising treatment in lung diseases?

Liasmine Haine and Celine-Hivda Yegen, Dominique Marchant, Jean-Paul Richalet, Emilie Boncoeur and Nicolas Voituron.

III.1 Résumé de la revue 3

L'érythropoïétine (Epo) est une cytokine pléiotropique, essentielle pour l'érythropoïèse. L'Epo et son récepteur (Epo-R) sont produits par plusieurs tissus et il est désormais admis que l'Epo présente d'autres fonctions physiologiques que la synthèse des globules rouges. En effet, l'Epo apporte des effets cytoprotecteurs, qui consistent à prévenir ou à lutter contre les processus pathologiques. Cet article de perspective passe en revue les différents effets protecteurs de l'Epo dans plusieurs organes et tente de donner une preuve de concept sur ses effets au niveau pulmonaire. Les effets protecteurs de l'Epo dans les tissus pourraient être une approche prometteuse pour limiter les symptômes des maladies aiguës et chroniques.

1 **Title:** Erythropoietin: a promising treatment in lung diseases?

2

3

4 **Authors' names and affiliation :**

5 Liasmine Haine^{1, *}, Celine-Hivda Yegen^{1, *}, Dominique Marchant¹, Jean-Paul Richalet¹, Emilie
6 Boncoeur^{1, #}, Nicolas Voituron^{1, 2, #}

7

8 ¹ Laboratoire Hypoxie & Poumon, UMR INSERM U1272, Université Sorbonne Paris Nord.
9 Bobigny, France

10 ² Département STAPS, Université Sorbonne Paris Nord, Bobigny, France

11

12 * Both first authors contributed equally

13 # Both senior authors contributed equally

14

15

16 **Running Head:** Cytoprotective effects of Epo

17

18

19 # **Corresponding author:** Dr Emilie Boncoeur (emilie.boncoeur@sorbonne-paris-nord.fr) or Pr
20 Nicolas Voituron (nicolas.voituron@sorbonne-paris-nord.fr), Université Sorbonne Paris Nord,
21 UFR SMBH, Laboratoire "Hypoxie & Poumon", UMR INSERM U1272, 93017 Bobigny, France.

22 Tel: +33148387632

Cytoprotective effects of Epo

23

24 **Abstract**

25 Erythropoietin (Epo) is a pleiotropic cytokine, which is essential for erythropoiesis. Epo
26 and its receptor (Epo-R) are produced by several tissues and it is now admitted that Epo
27 displays other physiological functions than red blood cell synthesis. Indeed, Epo provides tissue
28 protection by anti-apoptotic, anti-oxidant, anti-inflammatory and/or anti-fibrotic pathways.
29 This article reviews the various protective effects of Epo in several organs and tried to give a
30 proof of concept about its use in lung diseases. Non-erythropoietic tissue-protective effects of
31 Epo could be a promising approach to limit acute lung injuries and chronic lung diseases
32 symptoms.

33

34 **Keywords:** Erythropoietin, Cytoprotection, Lung injuries

35

36 **I. Introduction:**

37

38 Erythropoietin (Epo), is a glycoprotein involved in the control of red blood cell
39 production. Epo is mainly synthesized by kidneys in adults (Figure 1) and by hepatocytes in
40 fetus (18, 29, 48). However, other organs were shown to express Epo mRNA such as testis,
41 heart, spleen, bone marrow or brain (19, 23, 48, 97). Expression of Epo and its specific receptor
42 (Epo-R) have been found in the neurons, glial cells and endothelial cells (4, 5, 9, 21, 24, 79, 92)
43 and in cardiac tissue (6, 10, 23, 42, 74). Our team and others showed that Epo was also
44 expressed in the lung, even if at a very low level (Figure 1) (27, 48), and expression of Epo-R has
45 been reported in almost all cells of non-pathological lung tissues (118) including bronchiolar
46 epithelial cells and type II alveolar epithelial cells (119).

47 Despite its role in erythropoiesis, Epo displays other beneficial effects such as
48 cytoprotective effects. Cytoprotective effects of Epo, which is well described at brain level,
49 consists in prevention or fight against pathological processes. Interaction between Epo and
50 Epo-R plays a key role either for embryonic neural cells development or during post-injury
51 recovery, as they stimulate neurogenesis and migration of regenerating neurons (99). Thus, Epo
52 administration was proposed as a treatment for various diseases such as traumatic brain injury
53 (37). In rats, treatment of stroke with Epo enhanced neurogenesis and angiogenesis, and
54 improved neurological function (107). In newborn rodent with brain injury, Epo administration
55 could improve cognitive functions, spatial memory and motor activities (20, 36, 59, 90). Finally,
56 in infants, a co-treatment associating Epo and hypothermic therapy has been proposed to
57 relieve hypoxic-ischemic encephalopathy (117).

58 Epo seems to play an important protective role in many organs. Interestingly, we (79)
59 and others showed that in addition to its neuroprotective effects, Epo plays a key role in
60 cardioprotection (62), renoprotection (122) or control of ventilation (79, 92, 106). Indeed,
61 following myocardial infarction, Epo administration protects cardiomyocytes against ischemic
62 injury and strengthens cardiac function (78). Thus, treatment with recombinant human Epo
63 (rHu-Epo) improves heart remodeling and limits premature death associated with chronic left
64 ventricular pressure overload (109). Moreover, Epo improves reperfusion tolerance in ischemic

Cytoprotective effects of Epo

65 kidney and thus displays also renoprotective effects (122). Epo administration was also
66 proposed as a treatment for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome (51).
67 However, little is known about the cellular mechanisms of this protective effect of Epo in the
68 lung. We reviewed here the different cytoprotective effects of this hormone (table 1, Figure 2)
69 and tried to establish a proof of concept about his role at the pulmonary level (Figure 3).

70

71 **II. Erythropoietin receptors and derivatives:**

72

73 **II.1. Epo receptors signaling pathways mediate cytoprotective effects:**

74 Cell response to extracellular Epo is mediated through the binding of Epo to cell surface
75 receptors. Hematopoietic or tissue protective effects of Epo depend on the type of Epo-
76 transmembrane receptor association (8). Thus, the interaction of Epo with the Epo-R
77 homodimer is commonly associated with cell proliferation, differentiation and apoptosis (15),
78 while interaction of Epo with a heteroreceptor consisting of Epo-R / β common receptor (β cR,
79 CD131), seems to induce protective effects (8).

80 Epo-R is a member of the type I cytokine receptor family which comprised extracellular,
81 transmembrane and intracellular domains. Epo linking to its receptor induces conformational
82 change of the receptor and the initiation of signal transduction (77). Commonly, the binding of
83 Epo to Epo-R leads to the activation of Jak2 tyrosine kinase associated with the cytoplasmic
84 juxta-membrane region of this receptor. This activation ends up, within seconds, to the nuclear
85 translocation of the transcriptional factor STAT5, the accumulation of which mediates the
86 transcription of Epo-specific target genes, involved in proliferation, apoptosis and cell
87 differentiation. However, binding of Epo to its receptors can also activate other pro-
88 proliferative signaling pathways such as the PI-3 or the Ras / MAP kinase pathway (56, 75, 114,
89 Figure 2).

90 The cytoprotective effects of Epo seem to be transduced mainly through a heterodimer
91 receptor consisting of Epo-R/ β cR. This protective effect was observed in brain (22, 77), heart
92 (8, 53) and kidney (8). It was shown that neuroprotective effects of Epo are absent in β cR-

Cytoprotective effects of Epo

93 deficient knockout mice (8, 17). Several studies have sought to understand the mechanisms
94 involved in these cytoprotective effects. Thus, in renal ischemic injury, Epo-mediated protection
95 required JAK2/Y343/STAT5 signalling axis (7) whereas in neuronal PC12 cells, Epo-protective
96 effects seemed to be linked to the activation of the AKT/GSK-3 β /caspase-3 signalling pathway
97 (116).

98 Epo effects could also be transduced by alternative Epo receptors. Indeed, binding and
99 activation of EphB4 receptor by Epo has been reported to promote tumor growth and
100 progression (80). Interestingly, a soluble form of the Epo-R (sEpo-R) has been identified in
101 human blood and many tissues including brain, liver, spleen, kidney, heart and bone marrow
102 (54). This soluble form is the result of an alternative splicing of the Epo-R mRNA that led to the
103 production of a receptor with only extracellular domain. When present in the extracellular fluid,
104 sEpo-R binds and sequester Epo in the extracellular compartment decreasing its availability
105 (91). The production of sEpo-R in response to pro-inflammatory cytokines has even been
106 proposed to explain the erythropoietin resistance observed in renal disease (54).

107

108 **II.2. Erythropoietin derivatives:**

109 Epo could be considered as a potential therapeutic agent for the treatment of various
110 diseases. However, as mentioned above, the cytoprotective effects of Epo seems to be
111 transduced through the heterodimer Epo-R/ β cR receptor (61). To achieve its protective effect,
112 the use of high doses of recombinant human Epo (rHu-Epo) have been reported in many
113 studies. However, high dose treatment is associated with side effects such as renal fibrosis,
114 increased in hematocrit level (34) with pro-thrombotic and pro-hypertensive effect (35). To
115 avoid these side effects on erythropoiesis while keeping the protective effect, chemical
116 modification and mutation of Epo have been made to generate distinct non-erythropoietic Epo
117 derivatives. Few non-erythropoietic Epo derivative molecules such as NeuroEpo, C alpha-helix
118 region of Epo (Epotris), helix B-surface peptide (pHBSP), ARA290, or Asialo erythropoietin
119 (asialoEpo) were described with cytoprotective effects (26, 28, 30, 73, 96, 120, 121). One of the
120 most used derivatives is the carbamylated Epo (cEpo). Epo carbamylation consists in the

Cytoprotective effects of Epo

121 transformation of a lysine to a homocitruline in the Epo molecule (61). This chemical
122 modification does not allows the link of Epo with the conventional Epo-R but on the contrary
123 favors the binding with Epo-R- β cR heterodimer (13) that promotes only the cytoprotective
124 effects of Epo (1). Both Epo and cEpo protective effects are related to the activation of multiple
125 signaling pathways, including STAT5, AKT, PI3K and potentially MAPK (13, 45, 102, 116, Figure
126 2) and comparable beneficial effects of cEpo and rHu-Epo were shown in the treatment of
127 neuronal tissue damages (55, 111). However, the binding of Epo or cEpo on receptors depends
128 also of its forms. In fact, in SH-SY5Y neuronal cell line, while cEpo protective effects were
129 transduced through heterodimeric receptors, rhu-Epo acted both on homo and heterodimeric
130 receptors (13). Likely, while rHu-Epo or cEpo reduced collagen type IV accumulation, only cEpo
131 treatment decreased TGF- β mRNA expression (93). This last point confirms the specificity of the
132 signalling pathway transduced by the EpoR/ β cR heterodimer receptor.

133

134 **III. Cytoprotective functions of Epo (Table 1, Figure 2)**

135

136 **III.1. Anti-apoptotic effects**

137 Erythropoietin is considered as an anti-apoptotic, tissue-protective cytokine (33). Anti-
138 apoptotic effects of Epo are widely described in the brain. As administration of Epo reduced
139 volume of infarction after middle cerebral artery occlusion, it has been suggest that Epo inhibits
140 neuronal apoptosis after brain injuries (89). At the molecular level, Epo protects neurons
141 against apoptosis through the activation of PI3K/AKT and the inhibition of ERK1/2 signaling
142 pathway (86), or through the induction of a shift on the Bcl / Bax ratio towards anti-apoptotic
143 signaling (103). Finally, neuroprotective effects after administration of the Epo could be related
144 to an increase in FAIM2 protein expression, and a modulation of the Fas / CD95 apoptotic
145 signaling pathway (57).

146 Anti-apoptotic effects of Epo were also observed at the heart level. After acute
147 myocardial infarction, Epo treatment protects the heart function by decreasing the
148 myocardial apoptosis, probably through the inhibition of the c-Jun N-terminal kinase (JNK)

Cytoprotective effects of Epo

149 pathway (62). On the other hand, another study reports that Epo may protect myocardial cells
150 from apoptosis via the JAK2/STAT5 pathway (69).

151

152 **III.2. Anti-inflammatory effects**

153 Anti-inflammatory effects of Epo were reported in various organs. In rat ischemic brain
154 injury model, injection of rHu-Epo limited neuronal death through a decrease in pro-
155 inflammatory cytokines concentration such as Tumor Necrosis Factor (TNF- α), Interleukin-6
156 (IL6), and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1) (105). In a same way, either treatment
157 of retinal pigment epithelium cells or administration of rHu-Epo in rat kidney lead to a decrease
158 in pro-inflammatory cytokines (112) and up-regulate the anti-inflammatory cytokine
159 (interleukin-10) gene expression (122). Altogether, these observations suggest that Epo could
160 modulate the balance between pro and anti-inflammatory cytokines production.

161

162 **III.3. Anti-oxidative effects**

163 Oxidative stress is frequently pointed out as an important cause of cellular damages.
164 Interestingly, Epo has been shown to display anti-oxidative/nitrosative functions. Indeed,
165 clinical studies on patients on dialysis reported that rHu-Epo therapy reduces plasma-oxidative
166 stress through a decrease in lipid peroxidation (MDA) and an increase in antioxidant enzyme
167 activities (superoxide dismutase and catalase) (47). Epo displayed anti-oxidant function through
168 the induction of the antioxidant enzyme heme oxygenase-1 (HO-1) expression. This effect has
169 been observed *in vitro* in cultured endothelial cells and *in vivo* in a rat model of chronic tubulo-
170 interstitial injury (11, 52). Moreover, Elliot-Portal and colleagues demonstrated that the
171 increase in the pro-oxidant xanthine oxidase and NADPH oxidase 2 activities observed in mice
172 exposed to chronic intermittent hypoxia (CIH) was abolished in transgenic mice overexpressing
173 Epo in brain (Tg21) (25). rHu-Epo administration could also alleviate the increase in nitrosative
174 stress observed in the heart after ischemia-reperfusion injury. Indeed, through activation of the
175 Jak2-STAT3/ERK pathway, Epo downregulates iNOS and eNOS expression, and suppresses the
176 loss of arginase II, preventing excessive formation of NO and ONOO⁻ (67).

7

Cytoprotective effects of Epo

177 Interestingly, Epo derivatives also demonstrate anti-oxidative properties. For example,
178 NeuroEpo increased cellular antioxidant defenses and reduced the oxidant activity in neurons
179 exposed to glutamate (28).

180

181 **III.4. Pro-angiogenic effects**

182 Angiogenesis and endothelial dysfunction are involved in response to stress after
183 ischemic injury and contribute to the increased prevalence of cardiovascular diseases (60). Epo
184 has been linked to angiogenesis, *i.e* endothelial cell migration and proliferation (82). *In vitro*, in
185 EA.hy926 endothelial cells line, Epo has been shown to induce Ca^{2+} influx across membrane
186 channels thus promoting cell migration (72). *In vivo*, treatment of chick embryos with rHu-Epo
187 led to a comparable angiogenic response to that observed with the fibroblast growth factor
188 (82). Therefore, rHu-Epo treatment accelerated cell proliferation, morphological and
189 biochemical differentiation, activation of MMP-2 and up-regulation of PECAM-1, VEGFR2, vWF
190 and VE-cadherin/CDH5 (58) and promoted endothelial trans-differentiation of stem cells of the
191 apical papilla. Finally, Epo also attenuated the renal micro-vascular damage observed in acute
192 kidney injury in mice through decreasing HIF-1 α , iNOS, NF- κ B and increasing Epo-R, PeCAM-1,
193 VEGF, and VEGFR-2 expression (94).

194

195 **III.5. anti-fibrotic effects**

196 Recently, several studies reported a protective effect of Epo in tissue fibrogenesis,
197 especially in the kidney and the heart. Treatment of human kidney epithelial cells (HEK-2) with
198 rHu-Epo attenuated hypoxia-induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) through up-
199 regulation of miR200b and E-cadherin expression, and on the opposite downregulation of α -
200 SMA expression (3). Likewise, in LLC-PK1 cells line, a porcine kidney cells most likely derived
201 from the proximal kidney tubules, an rHu-Epo treatment limited apoptosis and EMT induced by
202 TGF- β 1, partially through the inhibition of the Smad3 phosphorylation and nuclear
203 translocation (16). Anti-fibrotic effects of Epo were also found in heart fibrosis. Administration
204 of Epo in diabetic rat inhibited myocardial fibrosis through a reduction of TGF- β expression and

Cytoprotective effects of Epo

205 an inhibition of interstitial collagen deposition (66). Anti-fibrotic and cytoprotective effects of
206 Epo on the myocardial function has been reported on rats presenting myocardial fibrosis
207 induced by pressure overload. Indeed, by interfering with the NADPH-ERK-NF- κ B pathway,
208 administration of rHu-Epo decreased cardiac fibroblast proliferation and differentiation as well
209 as accumulation of matrix proteins in the extracellular space (108).

210 Furthermore, in the obstructed kidneys, treatment with rHu-Epo decreased the
211 expression of CXCL16, limited fibrocytes accumulation, and, as a result, attenuated renal
212 tubulo-interstitial fibrosis (32). At the molecular level, in a renal tubule-interstitial injury model,
213 administration of either Epo or cEpo reduced extracellular matrix accumulation by decreasing
214 collagen type I and fibronectin mRNA and protein expression, and limiting the number of α -
215 SMA positive cells (32, 93). Finally, in Müller glial cells pre-stimulated by high glucose and TGF-
216 β , treatment with rHu-Epo led to an inhibition of cell migration and a decreased level of α -SMA
217 and fibronectin expression, suggesting a protective role in diabetic epiretinal membrane
218 formation (68).

219

220 **III.6. Regulation of endoplasmic reticulum stress**

221 Accumulation of misfolded or immature proteins in the endoplasmic reticulum (ER)
222 compartment led to ER stress and activation of the Unfolded Protein Response (UPR), which is
223 involved in several pathological mechanisms (63). To restore ER homeostasis, the UPR is
224 activated, with, in the first step, a switch on the three UPR sensors in the lumen of the ER by
225 Glucose-Related Protein 78 (GRP78). Among cytoprotective properties of Epo, its impact on ER
226 stress was suggested. For example, Epo has been proposed as a new therapy in Gaucher
227 disease, as Epo decreased levels of GRP78 and thus reduced ER stress in fibroblasts from type II
228 Gaucher disease patients (12). Moreover, injection of rHu-Epo in diabetic rats prevented
229 cardiac dysfunction through a down-regulation of GRP78 and an increased expression of
230 calcium pump (SERCA-2a) (65). Interestingly in a rat model of myocardial infarction, the
231 improvement of heart function by Epo was also proposed to be linked to its impact on the ER.
232 Indeed, rHu-Epo down-regulates caspase-12 expression, which implication in ER-stress-related
233 cell apoptosis is well accepted (113). Moreover, Epo was shown to reduce vascular calcification

Cytoprotective effects of Epo

234 by inhibiting ER stress-mediated apoptosis through a down-regulation of ATF4 and GRP94 ER
235 stress markers (14). As in cardiomyocytes and vascular smooth muscle cells, Epo has also been
236 reported to inhibit the expression of PDI, GRP78, p-PERK and p-eIF2 alpha ER stress markers in
237 hepatocytes (43). In central nervous system, local infusion of Epo alleviated cerebral
238 ischemia/reperfusion and prevented pathological alterations from spinal cord or brain injury.
239 These effects were related to a decrease or a suppression of ER stress markers CHOP, ATF4 and
240 ATF6 (44, 124).

241

242

243 **IV. Could Epo be a promising approach to limit Lung Injury? (Figure 3)**

244 The protective role of Epo has been described in several organs, especially the kidney,
245 heart and brain. Recent studies also focused on the potentially protective effect of Epo in the
246 lung either in human diseases or in animal models of pulmonary diseases. Administration of
247 rHu-Epo was then proposed as a potential candidate for the treatment of pulmonary disorders
248 such as acute lung injury (ALI) (51). Indeed, a significant decrease in several pathophysiological
249 variables involved in ALI was observed after Epo administration. Administration of rHu-Epo
250 reduced interstitial and alveolar edema in lung injury, through a reduction in both
251 polymorphonuclear leukocyte (PMN) accumulation, and pro-inflammatory cytokines in
252 circulation and tissues (98). Overall, Epo induces pulmonary endothelium cell proliferation and
253 thus ameliorates tissue repair after acute injury (125). Moreover, this beneficial effect of rHu-
254 Epo treatment was observed in several models of lung diseases. For example, on mice model of
255 sepsis, rHu-Epo administration mitigated lung injury by inducing overexpression of pulmonary
256 Epo-R, VEGF and VEGF-R2 (41). In hyperoxic lung injury in newborn rats, Epo significantly
257 reduced the infiltration of inflammatory cells in the lung and the capillary endothelial cells
258 injury (110), and stimulated *in vitro* the proliferative capacity of endothelial cells of human
259 umbilical vein (125). Furthermore, in bleomycin-induced pneumonitis in mice, administration of
260 rHu-Epo attenuated inflammation and fibrosis (119).

261 Several studies suggest that these pulmonary protective effects were due to the
262 interaction of Epo with pathways involved in inflammation, apoptosis or fibrosis. Epo could limit

Cytoprotective effects of Epo

263 pulmonary inflammation through the interaction with the NF- κ B pathway. Indeed, in one hand
264 pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 production were inhibited, and on the other hand
265 anti-inflammatory cytokine IL-10 was up-regulated (123). In rat models of ischemia-reperfusion
266 induced lung injury, Epo treatment reduced expression and concentration of TNF- α and
267 metalloproteinase-9 in lung tissue and plasma respectively (115). In the same model, Epo
268 limited the destruction of pneumocyte ultrastructure and pulmonary apoptosis index (115)
269 through an inhibition of the TLR4- NF- κ B signaling pathway (40). In acute lung injury induced by
270 kidney ischemia-reperfusion, Epo administration improved overall lung dysfunction, *i.e.* lung
271 inflammation and apoptosis of pulmonary endothelium, probably through an interaction with
272 the Jak-STAT3 pathway (125). In endotoxaemia-induced lung injury, Epo counteracted
273 inflammatory signaling pathways by reducing pulmonary inflammation and abolishing TNF- α
274 and IL1- β production (83). Moreover, in LPS-induced acute lung injury in rat, an intra-peritoneal
275 pre-treatment with Epo suppressed pulmonary oxidative stress by decreasing MPO, MDA and
276 iNOS expression (2, 84). Finally, in a model of traumatic brain injury, administration of rHu-Epo
277 increased the pulmonary expression of anti-oxidative transcription factor NRF2 limiting the
278 development of acute lung injury (50).

279 Interestingly, a protective role of Epo has been suggested on airway epithelial cells, which
280 expressed Epo-R (119). Moreover, the treatment of either bronchiolar or alveolar epithelial
281 cells with rHu-Epo upregulated Bcl-XL / Bax expression ratio thus decreasing apoptosis (71).
282 Finally, treatment of lung fibroblasts and airway epithelial cells with rHu-Epo reduced fibro-
283 proliferation and promoted epithelial cell growth (76). Interestingly, the severity of the
284 bleomycin-induced lung fibrosis is reduced in Epo-treated mice (87, 100, 101).

285 Mesenchymal stem cells (MSCs) have been proposed as new therapies against lung
286 disease. On chronic asthmatic mouse model, treatment with MSCs over-expressing Epo, led to a
287 suppressive effect on local asthmatic airway inflammation as compared to native MSCs. This
288 effect is accompanied by a decrease in TGF- β 1, TAK1, and p38 MAPK gene expression in lung
289 tissue (39). Furthermore, Epo has been shown to enhance the protective effects of MSCs by
290 promoting angiogenesis. Thus, in a neonatal mouse model of bronchopulmonary dysplasia, an
291 attenuation of lung injury has been observed when using a combined therapy of MSC and Epo

Cytoprotective effects of Epo

292 (95). Interestingly, endothelial progenitor cells (EPCs) could also reduce the severity of acute
293 lung injury, and administration of EPCs in combination with rHu-Epo enhanced its protective
294 effects on pulmonary endothelium integrity (46). This enhancement seems to be mediated
295 through the activation of the pro-survival PI3K/AKT pathway on EPCs (46).

296 Taken together these results suggest that Epo could enhance the protective effect of various
297 therapies and that combination of Epo and MSCs or EPCs could be a promising therapy in case
298 of lung diseases.

299

300 **IV. Conclusion**

301 This review highlights the beneficial effects of Epo and its derivatives in several organs.
302 These effects seem mainly mediated by the binding of Epo on heterodimer (Epo-R/ β cR)
303 receptors. The expression of Epo-R in the lung prompted us to document the protective effects
304 of Epo in this organ. In this review, we summarize the several protective actions of Epo in the
305 lung with their anti-inflammatory, anti-apoptotic, anti-oxidative and/or anti-fibrotic
306 components. Thereby, Epo could be considered as a potential protective agent in lung injuries.
307 Further investigations regarding the mechanisms of cellular responses to Epo would provide a
308 better insight to its cytoprotective action, and would argue the development of promising
309 treatment of symptoms in acute or chronic lung diseases. In a proof of concept, a very recent
310 study suggests that rhEPO could attenuate respiratory distress syndrome due to SARS-Cov2
311 through multiple mechanisms such as cytokine modulation or anti-apoptotic effects (38).

312

313

314 **Acknowledgements**

315 The authors would like to thanks Pr Carole Planès and Jean-François Bernaudin for helpful
316 discussion.

317

318

319 **Funding**

320 This work was supported by the “Bonus Qualité Recherche” (NV, 2014 and EB, 2020) and the
321 “Institut Fédératif de Recherche Biomédicale” programs of the University Sorbonne Paris Nord.

322 This work was also supported by a Legs Poix grant (NV, 2015 and 2018).

323

324 **Competing interests**

325 None

326

327 **Author contributions**

328 E.B. and N.V. wrote the manuscript. L.H, C.H.Y., D.M. and JP.R. discussed and revised the
329 manuscript for important intellectual content.

330 All authors approved the final version of the manuscript and agree to be accountable for all
331 aspects of the work. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who
332 qualify for authorship are listed.

333

334 **Table 1: Cytoprotective functions of Epo**

335

		Organs			
		Heart	Kidney	Brain	Retine
Effects	Anti-apoptotics	Li G-Q <i>et al.</i> , 2019 (61) Ma B-X <i>et al.</i> , 2015 (68)		Si W <i>et al.</i> , 2019 (85) Siren A-L <i>et al.</i> , 2001 (88) Komnig D <i>et al.</i> , 2018 (56) Vairano M <i>et al.</i> , 2002 (102)	
	Anti-oxydative	Lu MJ <i>et al.</i> , 2012 (66)	Calò LA <i>et al.</i> , 2006 (11) Katavetin <i>et al.</i> , 2007 (51)	Elliot-Portal E <i>et al.</i> , 2018 (24) Fernando G <i>et al.</i> , 2018 (27)	
	Anti-inflammatory			Villa P <i>et al.</i> , 2003 (104)	Wang Z <i>et al.</i> , 2009 (110) Zhang J <i>et al.</i> , 2018 (120)
	Anti-Fibrotics	Lu J <i>et al.</i> , 2012 (65) Wang <i>et al.</i> , 2016 (106)	Bai J <i>et al.</i> , 2017 (3) Chen CL <i>et al.</i> , 2010 (16) Geng XC <i>et al.</i> , 2015 (31) Srisawat N <i>et al.</i> , 2008 (92)		Luo W <i>et al.</i> , 2016 (67)
	Pro-Angiogenic	Lahteenvuoto <i>et al.</i> , 2012 (59)	Stoyanoff TR <i>et al.</i> , 2018 (93)	Wang L <i>et al.</i> , 2004 (105)	
	Regulation of ER	Lu J <i>et al.</i> , 2017 (64) Weng S <i>et al.</i> , 2011 (111) Hong T <i>et al.</i> , 2011 (42)		Hong Z <i>et al.</i> , 2012 (43) Zhao H <i>et al.</i> , 2015 (122)	

336

337 **Figures legends**

338 **Figure 1: Epo, Epo-R and β cR expression in the lung.**

339 **A.** Epo protein expression in mice kidney and lung total lysates performed by western blot
340 analysis.

341 **B.** Western blot quantification with ImageLab software. Mean values of Epo protein expression
342 were compared with Mann-Withney test (Kidney versus lung, $**p<0.01$)

343 **C.** Immunohistochemistry analysis of Epo protein expression on mice lung sections compared
344 to isotypic control. Original magnification: X200, scale bars represent 50 μ m. Areas of the
345 pictures are twice enlarged (x2) and shown in the right corner of each picture. Black arrows
346 indicates cells expressing Epo .

347 **D.** Epo-R and β cR mRNA expression in mice lung total lysates performed by RT-qPCR analysis
348 using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

349

350 **Figure 2: The cytoprotective effects of Epo: main signaling pathways.**

351 Epo binding to its homodimer (Epo-R-Epo-R) or heterodimer membrane receptor (Epo-R- β cR)
352 at the cell surface induces signaling pathways involved in the anti-apoptotic (yellow), the anti-
353 inflammatory (grey), the anti-oxidative (red), the anti-anti-fibrotic (brown) effects. The green
354 arrows designate activation and the red arrows designate an inhibition (or repression).

355 The anti-apoptotic effects of Epo are mediated by several signaling pathways. Through the
356 binding of its receptor, Epo induces JAK2 homodimerization, the phosphorylation and nuclear
357 translocation of STAT5, and the activation of anti-apoptotic target genes transcription (70, 88).

358 Activation of Jak2 kinase also induces ERK1/2, PI3K/AKT pathways, which results in the
359 induction of the anti-apoptotic Bcl2 family expression and cell proliferation (85, 104).

Cytoprotective effects of Epo

360 The anti-inflammatory effect of Epo is mainly mediated by the inhibition of p65 subunit
361 phosphorylation and nuclear translocation, resulting in the repression of pro-inflammatory NF-
362 κ B-target genes (IL6, IL1 β , TNF- α ...) (64, 81).

363 Epo mediated anti-oxidative effects by the induction of NRF2 transcription, expression and
364 transcriptional activity resulting in the increased expression of anti-oxidative genes (HO-1,
365 GPx...) (31, 49).

366 Epo also modulates the TGF- β 1 signalling pathway, mediating anti-fibrotic effect. Epo inhibits
367 Smad3 phosphorylation and nuclear translocation resulting in the repression of pro-fibrotic
368 genes implicated in EMT (α -SMA, Fibronectin) (16).

369 **Abbreviations:** JAK2 (*Janus kinase 2*), STAT5 (*Signal transducer and activator of transcription 5*),
370 ERK (*Extracellular signal-regulated kinases*), PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*), AKT (*protein*
371 *kinase B*), NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), NRF2 (*Nuclear*
372 *factor (erythroid-derived 2)-like 2*), Smad (*small worm phenotype, Mothers Against*
373 *Decapentaplegic*), EMT (*Epithelio-mesenchymal transition*)

374

375 **Figure 3: Protective effects of Epo and derivatives against lung injuries.**

376 **In normal alveolus:** Intact cellular component (AEC I, AEC II, M Φ , fibroblast) and pulmonary
377 capillary.

378 **In injured alveolus:** Epo and derivatives protect lung against injury-induced tissue and cellular
379 damages leading to pulmonary diseases. Epo and derivatives treatment increase the expression
380 and activity of the anti-oxidative transcription factor NRF2 and its target genes and limits the
381 expression of pro-oxidative effectors (MDA, MPO, NT and iNOS). Epo and derivatives also
382 increase anti-apoptotic Bcl-XL/ Bax ratio and protect alveolar epithelial cells from injury-
383 induced apoptosis. Moreover, by reducing fibroproliferation, α -SMA positive cells and
384 extracellular matrix deposition, Epo and derivatives decrease lung fibrosis severity. Epo and
385 derivatives also prevent lung edema by stimulating endothelial cells proliferation and thus
386 maintaining cell integrity. Finally, Epo and derivatives protect the lung against inflammatory

Cytoprotective effects of Epo

387 injury by increasing the expression of the anti-inflammatory cytokine IL10, and limiting the
388 expression of NF- κ B -inducing pro-inflammatory factors.

389

390 **Abbreviations:** AEC (*Alveolar epithelial cells*), M Φ (*Macrophage*), Bcl-XL (*B-cell lymphoma-extra-*
391 *large*), Bax (*Bcl2 Associated X, Apoptosis Regulator*), HO-1 (*Heme oxygenase 1*), MDA
392 (*Malondialdehyde*), MPO (*Myeloperoxidase*), NT (*Nitrotyrosin*), iNOS (*Inducible nitric oxide*
393 *synthase*), TNF- α (*Tumor necrosis factor alpha*), IL (*Interleukin*), α -SMA (*alpha smooth muscle*
394 *actin*).

395

- 396 1. **Abe T, Isaka Y, Imamura R, Kakuta Y, Okumi M, Yazawa K, Ichimaru N, Tsuda H,**
 397 **Nonomura N, Takahara S, Okuyama A.** Carbamylated erythropoietin ameliorates cyclosporine
 398 nephropathy without stimulating erythropoiesis. *Cell Transpl* 21: 571–80, 2012. doi:
 399 10.3727/096368911X605501.
- 400 2. **Ardalan MR, Estakhri R, Hajipour B, Ansarin K, Asl NA, Nasirizade MR, Azar AN,**
 401 **Ghorbanihaghjou A, Vatankhah AM, Esmaili HA.** Erythropoietin Ameliorates Oxidative Stress
 402 and Tissue Injury following Renal Ischemia/Reperfusion in Rat Kidney and Lung. *Med Princ Pract*
 403 22: 70–74, 2013. doi: 10.1159/000340060.
- 404 3. **Bai J, Xiao X, Zhang X, Cui H, Hao J, Han J, Cao N.** Erythropoietin Inhibits Hypoxia-
 405 Induced Epithelial-To-Mesenchymal Transition via Upregulation of miR-200b in HK-2 Cells. *Cell*
 406 *Physiol Biochem* 42: 269–280, 2017. doi: 10.1159/000477327.
- 407 4. **Bernaudin M, Bellail A, Marti HH, Yvon A, Vivien D, Duchatelle I, Mackenzie ET, Petit E.**
 408 Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the
 409 redox-state of the brain. *Glia* 30: 271–8, 2000.
- 410 5. **Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E.** A
 411 potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood*
 412 *Flow Metab* 19: 643–51, 1999. doi: 10.1097/00004647-199906000-00007.
- 413 6. **Bin-Jaliah I, Ammar HI, Mikhailidis DP, Dallak MA, Al-Hashem FH, Haidara MA, Yassin**
 414 **HZ, Bahnasi AA, Rashed LA, Isenovic ER.** Cardiac adaptive responses after hypoxia in an
 415 experimental model. *Angiology* 61: 145–56, 2010. doi: 10.1177/0003319709352486.
- 416 7. **Breggia AC, Wojchowski DM, Himmelfarb J.** JAK2/Y343/STAT5 signaling axis is required
 417 for erythropoietin-mediated protection against ischemic injury in primary renal tubular
 418 epithelial cells. *Am J Physiol Ren Physiol* 295: F1689-95, 2008. doi:
 419 10.1152/ajprenal.90333.2008.
- 420 8. **Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfacteria A, Ghezzi P, Fratelli M, Latini R, Xie QW,**
 421 **Smart J, Su-Rick CJ, Pobre E, Diaz D, Gomez D, Hand C, Coleman T, Cerami A.** Erythropoietin
 422 mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit
 423 heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14907–12, 2004. doi: 10.1073/pnas.0406491101.
- 424 9. **Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A.**
 425 Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc*
 426 *Natl Acad Sci U S A* 97: 10526–31, 2000. doi: 10.1073/pnas.97.19.10526.
- 427 10. **Cai Z, Semenza GL.** Phosphatidylinositol-3-kinase signaling is required for
 428 erythropoietin-mediated acute protection against myocardial ischemia/reperfusion injury.
 429 *Circulation* 109: 2050–3, 2004. doi: 10.1161/01.CIR.0000127954.98131.23.
- 430 11. **Calò LA, Davis PA, Piccoli A, Pessina AC.** A Role for Heme Oxygenase-1 in the
 431 Antioxidant and Antiapoptotic Effects of Erythropoietin: The Start of a Good News/Bad News

- 432 Story? *Nephron Physiol* 103: 107–111, 2006. doi: 10.1159/000092213.
- 433 12. **Cha JR, Kim SJ, Heo TH.** Protective effect of recombinant human erythropoietin in type II
434 Gaucher disease patient cells by scavenging endoplasmic reticulum stress. *Biomed*
435 *Pharmacother* 65: 364–8, 2011. doi: 10.1016/j.biopha.2011.04.019.
- 436 13. **Chamorro ME, Wenker SD, Vota DM, Vittori DC, Nesse AB.** Signaling pathways of cell
437 proliferation are involved in the differential effect of erythropoietin and its carbamylated
438 derivative. *Biochim Biophys Acta* 1833: 1960–8, 2013. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.04.006.
- 439 14. **Chang J-R, Sun N, Liu Y, Wei M, Zhao Y, Gan L, Zhu J-X, Su X-L.** Erythropoietin
440 attenuates vascular calcification by inhibiting endoplasmic reticulum stress in rats with chronic
441 kidney disease. *Peptides* 123: 170181, 2020. doi: 10.1016/j.peptides.2019.170181.
- 442 15. **Chateauvieux S, Grigorakaki C, Morceau F, Dicato M, Diederich M.** Erythropoietin,
443 erythropoiesis and beyond. *Biochem Pharmacol* 82: 1291–303, 2011. doi:
444 10.1016/j.bcp.2011.06.045.
- 445 16. **Chen CL, Chou KJ, Lee PT, Chen YS, Chang TY, Hsu CY, Huang WC, Chung HM, Fang HC.**
446 Erythropoietin suppresses epithelial to mesenchymal transition and intercepts Smad signal
447 transduction through a MEK-dependent mechanism in pig kidney (LLC-PK1) cell lines. *Exp Cell*
448 *Res* 316: 1109–18, 2010. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.02.022.
- 449 17. **Chen J, Yang Z, Zhang X.** Carbamylated Erythropoietin: A Prospective Drug Candidate for
450 Neuroprotection. *Biochem Insights* 8: 25–9, 2015. doi: 10.4137/BCI.S30753.
- 451 18. **Dame C, Fahnenstich H, Freitag P, Hofmann D, Abdul-Nour T, Bartmann P, Fandrey J.**
452 Erythropoietin mRNA expression in human fetal and neonatal tissue. *Blood* 92: 3218–25, 1998.
- 453 19. **Deji BZ, Shang P, Danzeng WJ, Zhang H, Qiangba YZ.** Expression and hypoxia adaptation
454 analysis of the EPO gene in different tissues of plateau Tibetan pigs. *Genet Mol Res* 14: 1700–6,
455 2015. doi: 10.4238/2015.March.6.16.
- 456 20. **Demers EJ, McPherson RJ, Juul SE.** Erythropoietin protects dopaminergic neurons and
457 improves neurobehavioral outcomes in juvenile rats after neonatal hypoxia-ischemia. *Pediatr*
458 *Res* 58: 297–301, 2005. doi: 10.1203/01.PDR.0000169971.64558.5A.
- 459 21. **Digicaylioglu M, Bichet S, Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Bauer C, Gassmann M.**
460 Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc*
461 *Natl Acad Sci U A* 92: 3717–20, 1995. doi: 10.1073/pnas.92.9.3717.
- 462 22. **Ding J, Wang J, Li Q-Y, Yu J-Z, Ma C-G, Wang X, Lu C-Z, Xiao B-G.** Neuroprotection and
463 CD131/GDNF/AKT Pathway of Carbamylated Erythropoietin in Hypoxic Neurons. *Mol Neurobiol*
464 54: 5051–5060, 2017. doi: 10.1007/s12035-016-0022-0.
- 465 23. **El Hasnaoui-Saadani R, Marchant D, Pichon A, Escoubet B, Pezet M, Hilfiker-Kleiner D,**

Cytoprotective effects of Epo

- 466 **Hoch M, Pham I, Quidu P, Voituron N, Journe C, Richalet JP, Favret F.** Epo deficiency alters
467 cardiac adaptation to chronic hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol* 186: 146–54, 2013. doi:
468 10.1016/j.resp.2013.01.003.
- 469 24. **El Hasnaoui-Saadani R, Pichon A, Marchant D, Olivier P, Launay T, Quidu P, Beaudry M,
470 Duvallet A, Richalet J-P, Favret F.** Cerebral adaptations to chronic anemia in a model of
471 erythropoietin-deficient mice exposed to hypoxia. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol* 296:
472 R801–R811, 2009. doi: 10.1152/ajpregu.00119.2008.
- 473 25. **Elliot-Portal E, Laouafa S, Arias-Reyes C, Janes TA, Joseph V, Soliz J.** Brain-derived
474 erythropoietin protects from intermittent hypoxia-induced cardiorespiratory dysfunction and
475 oxidative stress in mice. *Sleep* 41, 2018. doi: 10.1093/sleep/zsy072.
- 476 26. **Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie QW, Coleman T, Kreilgaard M, Torup L, Sager
477 T, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Ghezzi P, Villa P, Fratelli M, Casagrande S, Leist M,
478 Helboe L, Gerwein J, Christensen S, Geist MA, Pedersen LO, Cerami-Hand C, Wuerth JP,
479 Cerami A, Brines M.** Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad
480 neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U A* 100: 6741–6, 2003. doi:
481 10.1073/pnas.1031753100.
- 482 27. **Fandrey J, Bunn HF.** In vivo and in vitro regulation of erythropoietin mRNA:
483 measurement by competitive polymerase chain reaction. *Blood* 81: 617–23, 1993.
- 484 28. **Fernando G, Yamila R, Cesar GJ, Ramon R.** Neuroprotective Effects of neuroEPO Using
485 an In Vitro Model of Stroke. *Behav Sci Basel* 8, 2018. doi: 10.3390/bs8020026.
- 486 29. **Fisher JW.** Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med*
487 *Maywood* 228: 1–14, 2003. doi: 10.1177/153537020322800101.
- 488 30. **Garzon F, Coimbra D, Parcerisas A, Rodriguez Y, Garcia JC, Soriano E, Rama R.**
489 NeuroEPO Preserves Neurons from Glutamate-Induced Excitotoxicity. *J Alzheimers Dis* 65:
490 1469–1483, 2018. doi: 10.3233/JAD-180668.
- 491 31. **Genc K, Egrilmez MY, Genc S.** Erythropoietin induces nuclear translocation of Nrf2 and
492 heme oxygenase-1 expression in SH-SY5Y cells. *Cell Biochem Funct* 28: 197–201, 2010. doi:
493 10.1002/cbf.1639.
- 494 32. **Geng XC, Hu ZP, Lian GY.** Erythropoietin ameliorates renal interstitial fibrosis via the
495 inhibition of fibrocyte accumulation. *Mol Med Rep* 11: 3860–3865, 2015. doi:
496 10.3892/mmr.2015.3157.
- 497 33. **Ghezzi P, Brines M.** Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. *Cell*
498 *Death Differ* 11: S37–S44, 2004. doi: 10.1038/sj.cdd.4401450.
- 499 34. **Gobe GC, Bennett NC, West M, Colditz P, Brown L, Vesey DA, Johnson DW.** Increased
500 progression to kidney fibrosis after erythropoietin is used as a treatment for acute kidney

Cytoprotective effects of Epo

- 501 injury. *Am J Physiol-Ren Physiol* 306: F681–F692, 2014. doi: 10.1152/ajprenal.00241.2013.
- 502 35. **Gobe GC, Endre ZH, Johnson DW.** Administration of erythropoietin and its derivatives in
503 renal disease: Advantages, mechanisms and concerns. *Drug Discov Today Ther Strateg* 4: 79–84,
504 2007. doi: 10.1016/j.ddstr.2007.07.001.
- 505 36. **Gonzalez FF, Abel R, Almlı CR, Mu D, Wendland M, Ferriero DM.** Erythropoietin
506 sustains cognitive function and brain volume after neonatal stroke. *Dev Neurosci* 31: 403–11,
507 2009. doi: 10.1159/000232558.
- 508 37. **Grasso G, Alafaci C, Ghezzi P.** Is erythropoietin a worthy candidate for traumatic brain
509 injury or are we heading the wrong way? *F1000Res* 5: 911, 2016. doi:
510 10.12688/f1000research.8723.1.
- 511 38. **Hadadi A, Mortezaadeh M, Kolahdouzan K, Alavian G.** Does recombinant human
512 erythropoietin administration in critically ill COVID-19 patients have miraculous therapeutic
513 effects? .
- 514 39. **Han X, Zhang F, Tan X, Liu L, Ma W, Ou-Yang H-F, Wu C-G.** EPO modified MSCs can
515 inhibit asthmatic airway remodeling in an animal model. *J Cell Biochem* 119: 1008–1016, 2018.
516 doi: 10.1002/jcb.26268.
- 517 40. **He Q, Zhao X, Bi S, Cao Y.** Pretreatment with Erythropoietin Attenuates Lung
518 Ischemia/Reperfusion Injury via Toll-Like Receptor-4/Nuclear Factor- κ B (TLR4/NF- κ B) Pathway.
519 *Med Sci Monit* 24: 1251–1257, 2018. doi: 10.12659/MSM.905690.
- 520 41. **Heitrich M, Garcia DM, Stoyanoff TR, Rodriguez JP, Todaro JS, Aguirre MV.**
521 Erythropoietin attenuates renal and pulmonary injury in polymicrobial induced-sepsis through
522 EPO-R, VEGF and VEGF-R2 modulation. *Biomed Pharmacother* 82: 606–13, 2016. doi:
523 10.1016/j.biopha.2016.05.045.
- 524 42. **Hoch M, Fischer P, Stapel B, Missol-Kolka E, Sekkali B, Scherr M, Favret F, Braun T, Eder
525 M, Schuster-Gossler K, Gossler A, Hilfiker A, Balligand JL, Drexler H, Hilfiker-Kleiner D.**
526 Erythropoietin preserves the endothelial differentiation capacity of cardiac progenitor cells and
527 reduces heart failure during anticancer therapies. *Cell Stem Cell* 9: 131–43, 2011. doi:
528 10.1016/j.stem.2011.07.001.
- 529 43. **Hong T, Ge Z, Zhang B, Meng R, Zhu D, Bi Y.** Erythropoietin suppresses hepatic steatosis
530 and obesity by inhibiting endoplasmic reticulum stress and upregulating fibroblast growth
531 factor 21. *Int J Mol Med* 44: 469–478, 2019. doi: 10.3892/ijmm.2019.4210.
- 532 44. **Hong Z, Hong H, Chen H, Wang Z, Hong D.** Protective effects of erythropoietin in
533 experimental spinal cord injury by reducing the C/EBP-homologous protein expression. *Neural
534 Res* 34: 85–90, 2012. doi: 10.1179/1743132811Y.0000000026.
- 535 45. **Hooshmandi E, Moosavi M, Katinger H, Sardab S, Ghasemi R, Maghsoudi N.** CEPO

Cytoprotective effects of Epo

- 536 (carbamylated erythropoietin)-Fc protects hippocampal cells in culture against beta amyloid-
537 induced apoptosis: considering Akt/GSK-3 β and ERK signaling pathways. *Mol Biol Rep* 47: 2097–
538 2108, 2020. doi: 10.1007/s11033-020-05309-6.
- 539 46. **Hu R, Cheng Y, Jing H, Wu H.** Erythropoietin Promotes the Protective Properties of
540 Transplanted Endothelial Progenitor Cells Against Acute Lung Injury via PI3K/Akt Pathway:
541 *Shock* 42: 327–336, 2014. doi: 10.1097/SHK.0000000000000216.
- 542 47. **Inal M, Kanbak G, Sen S, Akyuz F, Sunal E.** Antioxidant status and lipid peroxidation in
543 hemodialysis patients undergoing erythropoietin and erythropoietin-vitamin E combined
544 therapy. *Free Radic Res* 31: 211–6, 1999. doi: 10.1080/10715769900300771.
- 545 48. **Jelkmann W.** Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur J*
546 *Haematol* 78: 183–205, 2007. doi: 10.1111/j.1600-0609.2007.00818.x.
- 547 49. **Jin W, Kong J, Lu T, Wang H, Ni H, Wu J, Dai Y, Jiang J, Liang W.** Erythropoietin prevents
548 secondary brain injury induced by cortical lesion in mice: possible involvement of Nrf2 signaling
549 pathway. *Ann Clin Lab Sci* 41: 25–32, 2011.
- 550 50. **Jin W, Wu J, Wang H, Kong J, Ni H, Liang W.** Erythropoietin Administration Modulates
551 Pulmonary Nrf2 Signaling Pathway After Traumatic Brain Injury in Mice: *J Trauma Inj Infect Crit*
552 *Care* 71: 680–686, 2011. doi: 10.1097/TA.0b013e3181f6b984.
- 553 51. **Kakavas S, Demestiha T, Vasileiou P, Xanthos T.** Erythropoietin as a novel agent with
554 pleiotropic effects against acute lung injury. *Eur J Clin Pharmacol* 67: 1–9, 2011. doi:
555 10.1007/s00228-010-0938-7.
- 556 52. **Katavetin P, Tungsanga K, Eiam-Ong S, Nangaku M.** Antioxidative effects of
557 erythropoietin. *Kidney Int Suppl* : S10-5, 2007. doi: 10.1038/sj.ki.5002482.
- 558 53. **Khan AI, Coldewey SM, Patel NSA, Rogazzo M, Collino M, Yaqoob MM, Radermacher P,**
559 **Kapoor A, Thiernemann C.** Erythropoietin attenuates cardiac dysfunction in experimental
560 sepsis in mice via activation of the α -common receptor. *Dis Model Mech* 6: 1021–1030, 2013.
561 doi: 10.1242/dmm.011908.
- 562 54. **Khankin EV, Mutter WP, Tamez H, Yuan HT, Karumanchi SA, Thadhani R.** Soluble
563 erythropoietin receptor contributes to erythropoietin resistance in end-stage renal disease.
564 *PLoS One* 5: e9246, 2010. doi: 10.1371/journal.pone.0009246.
- 565 55. **King VR, Averill SA, Hewazy D, Priestley JV, Torup L, Michael-Titus AT.** Erythropoietin
566 and carbamylated erythropoietin are neuroprotective following spinal cord hemisection in the
567 rat. *Eur J Neurosci* 26: 90–100, 2007. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05635.x.
- 568 56. **Klingmuller U, Bergelson S, Hsiao JG, Lodish HF.** Multiple tyrosine residues in the
569 cytosolic domain of the erythropoietin receptor promote activation of STAT5. *Proc Natl Acad Sci*
570 *U A* 93: 8324–8, 1996. doi: 10.1073/pnas.93.16.8324.

- 571 57. **Komnig D, Gertz K, Habib P, Nolte KW, Meyer T, Brockmann MA, Endres M, Rathkolb**
 572 **B, Hrabě de Angelis M, German Mouse Clinic Consortium, Schulz JB, Falkenburger BH, Reich A.**
 573 Faim2 contributes to neuroprotection by erythropoietin in transient brain ischemia. *J*
 574 *Neurochem* 145: 258–270, 2018. doi: 10.1111/jnc.14296.
- 575 58. **Koutsoumparis A, Vassili A, Bakopoulou A, Ziouta A, Tsiftoglou AS.** Erythropoietin
 576 (rhEPOa) promotes endothelial transdifferentiation of stem cells of the apical papilla (SCAP).
 577 *Arch Oral Biol* 96: 96–103, 2018. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.09.001.
- 578 59. **Kumral A, Uysal N, Tugyan K, Sonmez A, Yilmaz O, Gokmen N, Kiray M, Genc S, Duman**
 579 **N, Koroglu TF, Ozkan H, Genc K.** Erythropoietin improves long-term spatial memory deficits and
 580 brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Behav Brain Res* 153: 77–86, 2004. doi:
 581 10.1016/j.bbr.2003.11.002.
- 582 60. **Lahteenvuo J, Rosenzweig A.** Effects of aging on angiogenesis. *Circ Res* 110: 1252–64,
 583 2012. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.246116.
- 584 61. **Leist M, Ghezzi P, Grasso G, Bianchi R, Villa P, Fratelli M, Savino C, Bianchi M, Nielsen J,**
 585 **Gerwien J, Kallunki P, Larsen AK, Helboe L, Christensen S, Pedersen LO, Nielsen M, Torup L,**
 586 **Sager T, Sfacteria A, Erbayraktar S, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Cerami-Hand C, Xie**
 587 **QW, Coleman T, Cerami A, Brines M.** Derivatives of erythropoietin that are tissue protective
 588 but not erythropoietic. *Science* 305: 239–42, 2004. doi: 10.1126/science.1098313.
- 589 62. **Li G-Q, Chen M.** Cardioprotective effect of erythropoietin in rats with acute myocardial
 590 infarction through JNK pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 23: 153–160, 2019. doi:
 591 10.26355/eurrev_201901_18642.
- 592 63. **Lin JH, Walter P, Yen TSB.** Endoplasmic Reticulum Stress in Disease Pathogenesis. *Annu*
 593 *Rev Pathol Mech Dis* 3: 399–425, 2008. doi: 10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151434.
- 594 64. **Liu Q-S, Cheng Z-W, Xiong J-G, Cheng S, He X-F, Li X-C.** Erythropoietin Pretreatment
 595 Exerts Anti-Inflammatory Effects in Hepatic Ischemia/Reperfusion-Injured Rats Via Suppression
 596 of the TLR2/NF- κ B Pathway. *Transplant Proc* 47: 283–289, 2015. doi:
 597 10.1016/j.transproceed.2014.10.045.
- 598 65. **Lu J, Dai QM, Ma GS, Zhu YH, Chen B, Li B, Yao YY.** Erythropoietin Attenuates Cardiac
 599 Dysfunction in Rats by Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Diabetic
 600 Cardiomyopathy. *Cardiovasc Drugs Ther* 31: 367–379, 2017. doi: 10.1007/s10557-017-6742-1.
- 601 66. **Lu J, Yao YY, Dai QM, Ma GS, Zhang SF, Cao L, Ren LQ, Liu NF.** Erythropoietin attenuates
 602 cardiac dysfunction by increasing myocardial angiogenesis and inhibiting interstitial fibrosis in
 603 diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol* 11: 105, 2012. doi: 10.1186/1475-2840-11-105.
- 604 67. **Lu MJ, Chen YS, Huang HS, Ma MC.** Erythropoietin alleviates post-ischemic injury of rat
 605 hearts by attenuating nitrosative stress. *Life Sci* 90: 776–84, 2012. doi:
 606 10.1016/j.lfs.2012.04.012.

Cytoprotective effects of Epo

- 607 68. **Luo W, Hu L, Li W, Xu G, Xu L, Zhang C, Wang F.** Epo inhibits the fibrosis and migration
608 of Muller glial cells induced by TGF-beta and high glucose. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*
609 254: 881–90, 2016. doi: 10.1007/s00417-016-3290-5.
- 610 69. **Ma B-X, Li J, Li H, Wu S-S.** Recombinant Human Erythropoietin Protects Myocardial Cells
611 from Apoptosis via the Janus-Activated Kinase 2/Signal Transducer and Activator of
612 Transcription 5 Pathway in Rats with Epilepsy. *Curr Ther Res* 77: 90–98, 2015. doi:
613 10.1016/j.curtheres.2015.07.001.
- 614 70. **Ma R, Hu J, Huang C, Wang M, Xiang J, Li G.** JAK2/STAT5/Bcl-xL signalling is essential for
615 erythropoietin-mediated protection against apoptosis induced in PC12 cells by the amyloid
616 β -peptide A β ₂₅₋₃₅: Erythropoietin protection. *Br J Pharmacol* 171: 3234–3245, 2014. doi:
617 10.1111/bph.12672.
- 618 71. **MacRedmond R, Singhera GK, Dorscheid DR.** Erythropoietin inhibits respiratory
619 epithelial cell apoptosis in a model of acute lung injury. *Eur Respir J* 33: 1403–1414, 2009. doi:
620 10.1183/09031936.00084608.
- 621 72. **Maltaneri RE, Schiappacasse A, Chamorro ME, Nesse AB, Vittori DC.** Participation of
622 membrane calcium channels in erythropoietin-induced endothelial cell migration. *Eur J Cell Biol*
623 97: 411–421, 2018. doi: 10.1016/j.ejcb.2018.06.002.
- 624 73. **McVicar CM, Hamilton R, Colhoun LM, Gardiner TA, Brines M, Cerami A, Stitt AW.**
625 Intervention with an erythropoietin-derived peptide protects against neuroglial and vascular
626 degeneration during diabetic retinopathy. *Diabetes* 60: 2995–3005, 2011. doi: 10.2337/db11-
627 0026.
- 628 74. **Miro-Murillo M, Elorza A, Soro-Arnaiz I, Albacete-Albacete L, Ordonez A, Balsa E, Vara-
629 Vega A, Vazquez S, Fuertes E, Fernandez-Criado C, Landazuri MO, Aragones J.** Acute Vhl gene
630 inactivation induces cardiac HIF-dependent erythropoietin gene expression. *PLoS One* 6:
631 e22589, 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0022589.
- 632 75. **Miura O, Nakamura N, Quelle FW, Witthuhn BA, Ihle JN, Aoki N.** Erythropoietin induces
633 association of the JAK2 protein tyrosine kinase with the erythropoietin receptor in vivo. *Blood*
634 84: 1501–7, 1994.
- 635 76. **Ohnishi S, Ichiba H, Saito M, Hamazaki T, Matsumura H, Shintaku H.** Glucocorticoids
636 and erythropoietin in chronic lung disease of prematurity: Proliferative potential in lung
637 fibroblast and epithelial cells exposed to tracheal aspirates. *Pediatr Int* 58: 1163–1170, 2016.
638 doi: 10.1111/ped.13009.
- 639 77. **Ostrowski D, Heinrich R.** Alternative Erythropoietin Receptors in the Nervous System. *J*
640 *Clin Med* 7, 2018. doi: 10.3390/jcm7020024.
- 641 78. **Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Walton GB, Thompson RB, Petrofski**
642 **JA, Annex BH, Stamler JS, Koch WJ.** A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted

- 643 heart. *J Clin Invest* 112: 999–1007, 2003. doi: 10.1172/JCI18200.
- 644 79. **Pichon A, Jeton F, El Hasnaoui-Saadani R, Hagstrom L, Launay T, Beaudry M, Marchant**
 645 **D, Quidu P, Macarlupu JL, Favret F, Richalet JP, Voituron N.** Erythropoietin and the use of a
 646 transgenic model of erythropoietin-deficient mice. *Hypoxia Auckl* 4: 29–39, 2016. doi:
 647 10.2147/HP.S83540.
- 648 80. **Pradeep S, Huang J, Mora EM, Nick AM, Cho MS, Wu SY, Noh K, Pecot CV, Rupaimoole**
 649 **R, Stein MA, Brock S, Wen Y, Xiong C, Gharpure K, Hansen JM, Nagaraja AS, Previs RA, Vivas-**
 650 **Mejia P, Han HD, Hu W, Mangala LS, Zand B, Stagg LJ, Ladbury JE, Ozpolat B, Alpay SN,**
 651 **Nishimura M, Stone RL, Matsuo K, Armaiz-Pena GN, Dalton HJ, Danes C, Goodman B,**
 652 **Rodriguez-Aguayo C, Kruger C, Schneider A, Haghpeykar S, Jaladurgam P, Hung MC, Coleman**
 653 **RL, Liu J, Li C, Urbauer D, Lopez-Berestein G, Jackson DB, Sood AK.** Erythropoietin Stimulates
 654 Tumor Growth via EphB4. *Cancer Cell* 28: 610–622, 2015. doi: 10.1016/j.ccell.2015.09.008.
- 655 81. **Qin C, Xiao Y, Zhong Q, Chen L, Wang X.** Anti-inflammatory effect of erythropoietin
 656 pretreatment on cardiomyocytes with hypoxia/reoxygenation injury and the possible
 657 mechanism. *Chin J Traumatol Engl Ed* 11: 352–358, 2008. doi: 10.1016/S1008-1275(08)60071-1.
- 658 82. **Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell’Era P, Nico B, Roncali L, Dammacco**
 659 **F.** Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and
 660 stimulates neovascularization in vivo. *Blood* 93: 2627–36, 1999.
- 661 83. **Shang Y, Jiang Y-X, Xu S-P, Wu Y, Wu Z-Y, Yuan S-Y, Yao S-L.** Reduction of pulmonary
 662 inflammatory response by erythropoietin in a rat model of endotoxaemia. *Chin Med J (Engl)*
 663 122: 834–838, 2009.
- 664 84. **Shang Y, Li X, Prasad PV, Xu S, Yao S, Liu D, Yuan S, Feng D.** Erythropoietin Attenuates
 665 Lung Injury in Lipopolysaccharide Treated Rats. *J Surg Res* 155: 104–110, 2009. doi:
 666 10.1016/j.jss.2008.10.003.
- 667 85. **Shen J, Wu Y, Xu J-Y, Zhang J, Sinclair SH, Yanoff M, Xu G, Li W, Xu G-T.** ERK- and Akt-
 668 Dependent Neuroprotection by Erythropoietin (EPO) against Glyoxal-AGEs via Modulation of
 669 Bcl-xL, Bax, and BAD. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 51: 35, 2010. doi: 10.1167/iops.09-3544.
- 670 86. **Si W, Wang J, Li M, Qu H, Gu R, Liu R, Wang L, Li S, Hu X.** Erythropoietin protects
 671 neurons from apoptosis via activating PI3K/AKT and inhibiting Erk1/2 signaling pathway. 3
 672 *Biotech* 9: 131, 2019. doi: 10.1007/s13205-019-1667-y.
- 673 87. **Sigounas G, Salleng KJ, Mehlhop PD, Sigounas DG.** Erythropoietin ameliorates
 674 chemotherapy-induced fibrosis of the lungs in a preclinical murine model. *Int J Cancer* 122:
 675 2851–2857, 2008. doi: 10.1002/ijc.23426.
- 676 88. **Silva M, Benito A, Sanz C, Prosper F, Ekhterae D, Nuñez G, Fernandez-Luna JL.**
 677 Erythropoietin Can Induce the Expression of Bcl-x_L through Stat5 in Erythropoietin-dependent
 678 Progenitor Cell Lines. *J Biol Chem* 274: 22165–22169, 1999. doi: 10.1074/jbc.274.32.22165.

Cytoprotective effects of Epo

- 679 89. **Siren A-L, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter**
680 **C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H, Ghezzi P.**
681 Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc*
682 *Natl Acad Sci* 98: 4044–4049, 2001. doi: 10.1073/pnas.051606598.
- 683 90. **Sola A, Rogido M, Lee BH, Genetta T, Wen TC.** Erythropoietin after focal cerebral
684 ischemia activates the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription signaling
685 pathway and improves brain injury in postnatal day 7 rats. *Pediatr Res* 57: 481–7, 2005. doi:
686 10.1203/01.PDR.0000155760.88664.06.
- 687 91. **Soliz J, Gassmann M, Joseph V.** Soluble erythropoietin receptor is present in the mouse
688 brain and is required for the ventilatory acclimatization to hypoxia. *J Physiol* 583: 329–36, 2007.
689 doi: 10.1113/jphysiol.2007.133454.
- 690 92. **Soliz J, Joseph V, Soulage C, Becskei C, Vogel J, Pequignot JM, Ogunshola O, Gassmann**
691 **M.** Erythropoietin regulates hypoxic ventilation in mice by interacting with brainstem and
692 carotid bodies. *J Physiol* 568: 559–71, 2005. doi: 10.1113/jphysiol.2005.093328.
- 693 93. **Srisawat N, Manotham K, Eiam-Ong S, Katavetin P, Praditpornsilpa K, Eiam-Ong S.**
694 Erythropoietin and its non-erythropoietic derivative: do they ameliorate renal tubulointerstitial
695 injury in ureteral obstruction? *Int J Urol* 15: 1011–7, 2008. doi: 10.1111/j.1442-
696 2042.2008.02149.x.
- 697 94. **Stoyanoff TR, Rodriguez JP, Todaro JS, Colavita JPM, Torres AM, Aguirre MV.**
698 Erythropoietin attenuates LPS-induced microvascular damage in a murine model of septic acute
699 kidney injury. *Biomed Pharmacother* 107: 1046–1055, 2018. doi: 10.1016/j.biopha.2018.08.087.
- 700 95. **Sun C, Zhang S, Wang J, Jiang W, Xin Q, Chen X, Zhang Z, Luan Y.** EPO enhances the
701 protective effects of MSCs in experimental hyperoxia-induced neonatal mice by promoting
702 angiogenesis. *Aging* 11: 2477–2487, 2019. doi: 10.18632/aging.101937.
- 703 96. **Takeyama T, Takemura G, Kanamori H, Kawaguchi T, Ogino A, Watanabe T, Morishita**
704 **K, Tsujimoto A, Goto K, Maruyama R, Ushikoshi H, Kawasaki M, Yamada K, Nikami H, Fujiwara**
705 **T, Fujiwara H, Minatoguchi S.** Asialoerythropoietin, a nonerythropoietic derivative of
706 erythropoietin, displays broad anti-heart failure activity. *Circ Heart Fail* 5: 274–85, 2012. doi:
707 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.111.965061.
- 708 97. **Tan CC, Eckardt KU, Firth JD, Ratcliffe PJ.** Feedback modulation of renal and hepatic
709 erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia. *Am J Physiol* 263: F474–81,
710 1992. doi: 10.1152/ajprenal.1992.263.3.F474.
- 711 98. **Tascilar O, Cakmak GK, Tekin IO, Emre AU, Ucan BH, Bahadir B, Acikgoz S, Irkorucu O,**
712 **Karakaya K, Balbaloglu H, Kertis G, Ankarali H, Comert M.** Protective effects of erythropoietin
713 against acute lung injury in a rat model of acute necrotizing pancreatitis. *World J Gastroenterol*
714 13: 6172–82, 2007. doi: 10.3748/wjg.v13.i46.6172.

Cytoprotective effects of Epo

- 715 99. **Tsai PT, Ohab JJ, Kertesz N, Groszer M, Matter C, Gao J, Liu X, Wu H, Carmichael ST.** A
716 critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery. *J Neurosci* 26:
717 1269–74, 2006. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4480-05.2006.
- 718 100. **Tsavalis D, Spandou E, Koliakos-Kouzi K, Koutsonikolas D, Tzoumaka A, Simeonidou C,**
719 **Angomachalelis I, Bountzioukas S.** THE EFFECT OF ERYTHROPOIETIN ON BLEOMYCIN-INDUCED
720 PULMONARY FIBROSIS IN RATS. *Chest* 132: 582A, 2007. doi:
721 10.1378/chest.132.4_MeetingAbstracts.582a.
- 722 101. **Tsavalis D, Tsirona S, Katsaros F, Tektonidou A, Tzoumaka A.** Erythropoietin Inhibits the
723 Immunohistochemical Expression of Lysyl Oxidase in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in
724 Rats. *Chest* 149: A211, 2016. doi: 10.1016/j.chest.2016.02.218.
- 725 102. **Um M, Lodish HF.** Antiapoptotic Effects of Erythropoietin in Differentiated
726 Neuroblastoma SH-SY5Y Cells Require Activation of Both the STAT5 and AKT Signaling
727 Pathways. *J Biol Chem* 281: 5648–5656, 2006. doi: 10.1074/jbc.M510943200.
- 728 103. **Vairano M, Russo CD, Pozzoli G, Battaglia A, Scambia G, Tringali G, Aloe-Spiriti MA,**
729 **Preziosi P, Navarra P.** Erythropoietin exerts anti-apoptotic effects on rat microglial cells *in vitro*:
730 Anti-apoptotic effect of EPO on rat microglial cells. *Eur J Neurosci* 16: 584–592, 2002. doi:
731 10.1046/j.1460-9568.2002.02125.x.
- 732 104. **Vazquez-Mellado MJ, Aguilar C, Rocha-Zavaleta L.** Erythropoietin protects
733 neuroblastoma cells against etoposide and vincristine by activating ERK and AKT pathways but
734 has no effect in kidney cells. *Life Sci* 137: 142–149, 2015. doi: 10.1016/j.lfs.2015.07.022.
- 735 105. **Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello D, Laragione T, Cagnotto A, Viviani B, Marinovich**
736 **M, Cerami A, Coleman TR, Brines M, Ghezzi P.** Erythropoietin selectively attenuates cytokine
737 production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med*
738 198: 971–5, 2003. doi: 10.1084/jem.20021067.
- 739 106. **Voituron N, Jeton F, Cholley Y, Hasnaoui-Saadani RE, Marchant D, Quidu P, Favret F,**
740 **Richalet J-P, Pichon A.** Catalyzing role of erythropoietin on the nitric oxide central pathway
741 during the ventilatory responses to hypoxia. *Physiol Rep* 2: e00223, 2014. doi:
742 10.1002/phy2.223.
- 743 107. **Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M.** Treatment of stroke with erythropoietin
744 enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke* 35:
745 1732–7, 2004. doi: 10.1161/01.STR.0000132196.49028.a4.
- 746 108. **Wang LP, Yang XH, Wang XJ, Li SM, Sun N, Zhang T.** Erythropoietin Decreases the
747 Occurrence of Myocardial Fibrosis by Inhibiting the NADPH-ERK-NF-x03BA;B Pathway.
748 *Cardiology* 133: 97–108, 2016. doi: 10.1159/000440995.
- 749 109. **Wang W, Kagaya Y, Asaumi Y, Fukui S, Takeda M, Shimokawa H.** Protective effects of
750 recombinant human erythropoietin against pressure overload-induced left ventricular

Cytoprotective effects of Epo

- 751 remodeling and premature death in mice. *Tohoku J Exp Med* 225: 131–43, 2011. doi:
752 10.1620/tjem.225.131.
- 753 110. **Wang XL, Xue XD.** [Anti-inflammatory effects of erythropoietin on hyperoxia-induced
754 bronchopulmonary dysplasia in newborn rats]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 47: 446–51, 2009.
- 755 111. **Wang Y, Zhang ZG, Rhodes K, Renzi M, Zhang RL, Kapke A, Lu M, Pool C, Heavner G,**
756 **Chopp M.** Post-ischemic treatment with erythropoietin or carbamylated erythropoietin reduces
757 infarction and improves neurological outcome in a rat model of focal cerebral ischemia. *Br J*
758 *Pharmacol* 151: 1377–84, 2007. doi: 10.1038/sj.bjp.0707285.
- 759 112. **Wang Z, Shen L, Tu L, Hu D, Liu G-Y, Zhou Z, Lin Y, Chen L-H, Qu J.** Erythropoietin
760 protects retinal pigment epithelial cells from oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 46: 1032–
761 1041, 2009. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.027.
- 762 113. **Weng S, Zhu X, Jin Y, Wang T, Huang H.** Protective effect of erythropoietin on
763 myocardial infarction in rats by inhibition of caspase-12 expression. *Exp Ther Med* 2: 833–836,
764 2011. doi: 10.3892/etm.2011.280.
- 765 114. **Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Yi T, Tang B, Miura O, Ihle JN.** JAK2
766 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated
767 following stimulation with erythropoietin. *Cell* 74: 227–36, 1993. doi: 10.1016/0092-
768 8674(93)90414-l.
- 769 115. **Wu H, Dong G, Liu H, Xu B, Li D, Jing H.** Erythropoietin attenuates ischemia–reperfusion
770 induced lung injury by inhibiting tumor necrosis factor- α and matrix metalloproteinase-9
771 expression. *Eur J Pharmacol* 602: 406–412, 2009. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.11.037.
- 772 116. **Wu Y, Shang Y, Sun S, Liang H, Liu R.** Erythropoietin prevents PC12 cells from 1-methyl-
773 4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis via the Akt/GSK-3 β /caspase-3 mediated signaling
774 pathway. *Apoptosis* 12: 1365–1375, 2007. doi: 10.1007/s10495-007-0065-9.
- 775 117. **Wu YW, Bauer LA, Ballard RA, Ferriero DM, Glidden DV, Mayock DE, Chang T, Durand**
776 **DJ, Song D, Bonifacio SL, Gonzalez FF, Glass HC, Juul SE.** Erythropoietin for neuroprotection in
777 neonatal encephalopathy: safety and pharmacokinetics. *Pediatrics* 130: 683–91, 2012. doi:
778 10.1542/peds.2012-0498.
- 779 118. **Yasuda Y, Hara S, Hirohata T, Koike E, Yamasaki H, Okumoto K, Hoshiai H.**
780 Erythropoietin-responsive sites in normal and malignant human lung tissues. *Anat Sci Int* 85:
781 204–13, 2010. doi: 10.1007/s12565-010-0081-7.
- 782 119. **Yoshimi M, Maeyama T, Yamada M, Hamada N, Fukumoto J, Kawaguchi T, Kuwano K,**
783 **Nakanishi Y.** Recombinant human erythropoietin reduces epithelial cell apoptosis and
784 attenuates bleomycin-induced pneumonitis in mice. *Respirology* 13: 639–45, 2008. doi:
785 10.1111/j.1440-1843.2008.01324.x.

- 786 120. **Zellinger C, Seeger N, Hadamitzky M, Fischborn S, Russmann V, Wendt H, Pankratova**
787 **S, Bock E, Berezin V, Potschka H.** Impact of the erythropoietin-derived peptide mimetic Epotris
788 on the histopathological consequences of status epilepticus. *Epilepsy Res* 96: 241–9, 2011. doi:
789 10.1016/j.eplepsyres.2011.06.009.
- 790 121. **Zhang H, Gao S, Yan L, Zhu G, Zhu Q, Gu Y, Shao F.** EPO Derivative ARA290 Attenuates
791 Early Renal Allograft Injury in Rats by Targeting NF-κB Pathway. *Transplant Proc* 50: 1575–1582,
792 2018. doi: 10.1016/j.transproceed.2018.03.015.
- 793 122. **Zhang J, Zhao D, Na N, Li H, Miao B, Hong L, Huang Z.** Renoprotective effect of
794 erythropoietin via modulation of the STAT6/MAPK/NF-kappaB pathway in ischemia/reperfusion
795 injury after renal transplantation. *Int J Mol Med* 41: 25–32, 2018. doi: 10.3892/ijmm.2017.3204.
- 796 123. **Zhang X, Dong S.** Protective Effects of Erythropoietin towards Acute Lung Injuries in Rats
797 with Sepsis and Its Related Mechanisms. *Ann Clin Lab Sci* 49: 257–264, 2019.
- 798 124. **Zhao H, Wang R, Wu X, Liang J, Qi Z, Liu X, Min L, Ji X, Luo Y.** Erythropoietin delivered
799 via intra-arterial infusion reduces endoplasmic reticulum stress in brain microvessels of rats
800 following cerebral ischemia and reperfusion. *J Neuroimmune Pharmacol* 10: 153–61, 2015. doi:
801 10.1007/s11481-014-9571-z.
- 802 125. **Zhu M, Wang L, Yang J, Xie K, Zhu M, Liu S, Xu C, Wang J, Gu L, Ni Z, Xu G, Che M.**
803 Erythropoietin Ameliorates Lung Injury by Accelerating Pulmonary Endothelium Cell
804 Proliferation via Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Pathway After
805 Kidney Ischemia and Reperfusion Injury. *Transplant Proc* 51: 972–978, 2019. doi:
806 10.1016/j.transproceed.2019.01.059.
- 807

Figure 1

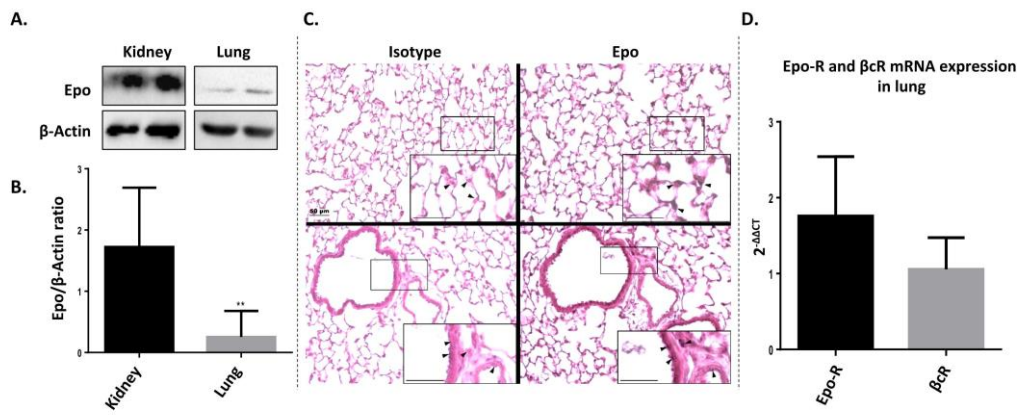


Figure 2

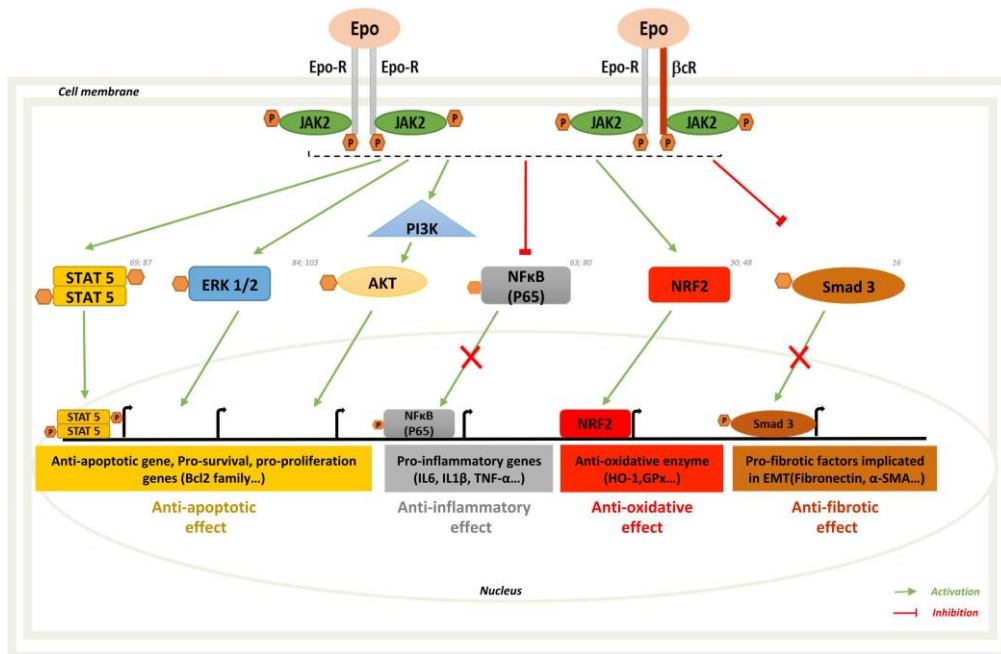
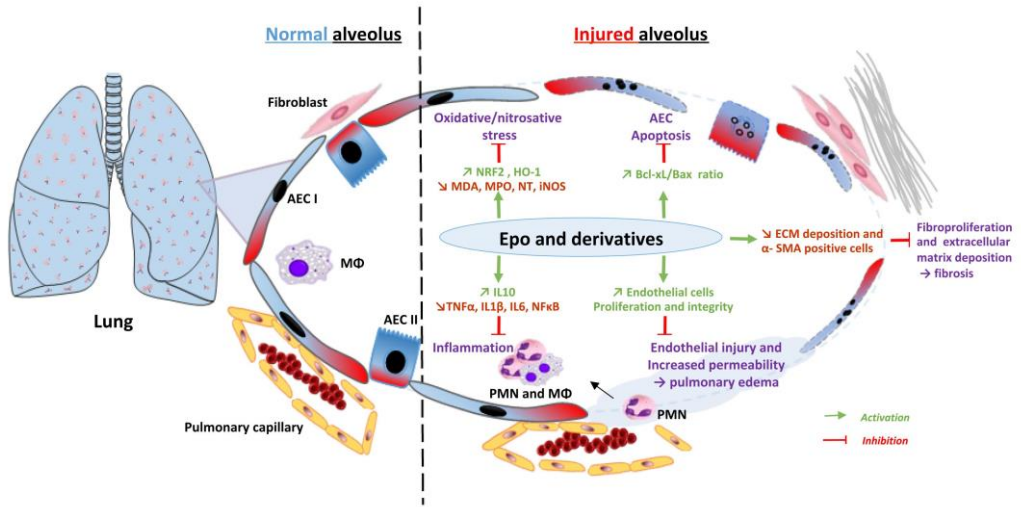


Figure 3



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akhter, Mohammad S., Mohammad A. Uddin, Khadeja-Tul Kubra, et Nektarios Barabutis. 2020. « Autophagy, Unfolded Protein Response and Lung Disease ». *Current Research in Cell Biology* 1 (janvier): 100003. <https://doi.org/10.1016/j.crcbio.2020.100003>.
- Almendros, Isaac, Yang Wang, et David Gozal. 2014. « The Polymorphic and Contradictory Aspects of Intermittent Hypoxia ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 307 (2): L129-140. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00089.2014>.
- Álvarez, Diana, Nayra Cárdenes, Jacobo Sellarés, Marta Bueno, Catherine Corey, Vidya Sagar Hanumanthu, Yating Peng, et al. 2017. « IPF Lung Fibroblasts Have a Senescent Phenotype ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 313 (6): L1164-73. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00220.2017>.
- « American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias ». 2002. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 165 (2): 277-304. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.165.2.ats01>.
- Andrade, David C., Liasmine Haine, Camilo Toledo, Hugo S. Diaz, Rodrigo A. Quintanilla, Noah J. Marcus, Rodrigo Iturriaga, Jean-Paul Richalet, Nicolas Voituren, et Rodrigo Del Rio. 2018. « Ventilatory and Autonomic Regulation in Sleep Apnea Syndrome: A Potential Protective Role for Erythropoietin? » *Frontiers in Physiology* 9: 1440. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01440>.
- Antoniades, H N, M A Bravo, R E Avila, T Galanopoulos, J Neville-Golden, M Maxwell, et M Selman. 1990. « Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis. » *Journal of Clinical Investigation* 86 (4): 1055-64.
- Araya, Jun, Jun Kojima, Naoki Takasaka, Saburo Ito, Satoko Fujii, Hiromichi Hara, Haruhiko Yanagisawa, et al. 2012. « Insufficient autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis ». *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 304 (1): L56-69. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00213.2012>.
- ARDS Definition Task Force, V. Marco Ranieri, Gordon D. Rubenfeld, B. Taylor Thompson, Niall D. Ferguson, Ellen Caldwell, Eddy Fan, Luigi Camporota, et Arthur S. Slutsky. 2012. « Acute Respiratory Distress Syndrome: The Berlin Definition ». *JAMA* 307 (23): 2526-33. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.5669>.
- Aurora, R. Nisha, Kenneth R. Casey, David Kristo, Sanford Auerbach, Sabin R. Bista, Susmita Chowdhuri, Anoop Karippot, et al. 2010. « Practice Parameters for the Surgical Modifications of the Upper Airway for Obstructive Sleep Apnea in Adults ». *Sleep* 33 (10): 1408-13. <https://doi.org/10.1093/sleep/33.10.1408>.
- Bachofen, Marianne, et Ewald R. Weibel. 1977. « Alterations of the Gas Exchange Apparatus in Adult Respiratory Insufficiency Associated with Septicemia ». *American Review of Respiratory Disease* 116 (4): 589-615. <https://doi.org/10.1164/arrd.1977.116.4.589>.
- Bailey, D. M., C. Lundby, R. M. G. Berg, S. Taudorf, H. Rahmouni, M. Gutowski, C. W. Mulholland, et al. 2014. « On the Antioxidant Properties of Erythropoietin and Its Association with the Oxidative-Nitrosative Stress Response to Hypoxia in Humans ». *Acta Physiologica (Oxford, England)* 212 (2): 175-87. <https://doi.org/10.1111/apha.12313>.
- Barceló, A., F. Barbé, M. de la Peña, M. Vila, G. Pérez, J. Piérola, J. Durán, et A. G. N. Agustí. 2006. « Antioxidant Status in Patients with Sleep Apnoea and Impact of Continuous Positive Airway Pressure Treatment ». *The European Respiratory Journal* 27 (4): 756-60. <https://doi.org/10.1183/09031936.06.00067605>.
- Barceló, A., C. Miralles, F. Barbé, M. Vila, S. Pons, et A. G. Agustí. 2000. « Abnormal Lipid Peroxidation in Patients with Sleep Apnoea ». *The European Respiratory Journal* 16 (4): 644-47. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.2000.16d13.x>.
- Barkauskas, Christina E., Michael J. Cronce, Craig R. Rackley, Emily J. Bowie, Douglas R. Keene, Barry R. Stripp, Scott H. Randell, Paul W. Noble, et Brigid L. M. Hogan. 2013. « Type 2 Alveolar Cells Are Stem Cells in Adult Lung ». *The Journal of Clinical Investigation* 123 (7): 3025-36. <https://doi.org/10.1172/JCI68782>.
- Barratt, Shaney L., Andrew Creamer, Conal Hayton, et Nazia Chaudhuri. 2018. « Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF): An Overview ». *Journal of Clinical Medicine* 7 (8). <https://doi.org/10.3390/jcm7080201>.
- Bartolome, Alberto, Carlos Guillen, et Manuel Benito. 2012. « Autophagy Plays a Protective Role in Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Pancreatic β Cell Death ». *Autophagy* 8 (12): 1757-68. <https://doi.org/10.4161/auto.21994>.
- Baumgartner, K B, J M Samet, C A Stidley, T V Colby, et J A Waldron. 1997. « Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. » *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 155 (1): 242-48. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.155.1.9001319>.

- Belaidi, Elise, Amandine Thomas, Guillaume Bourdier, Sophie Moulin, Emeline Lemarié, Patrick Levy, Jean-Louis Pépin, Irina Korichneva, Diane Godin-Ribuot, et Claire Arnaud. 2016. « 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 ». *International Journal of Cardiology* 210 (mai): 45-53. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.02.096>.
- Bellani, Giacomo, John G. Laffey, Tàì Pham, Eddy Fan, Laurent Brochard, Andres Esteban, Luciano Gattinoni, et al. 2016. « Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries ». *JAMA* 315 (8): 788-800. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0291>.
- Bernard, Olivier, Florence Jeny, Yurdagül Uzunhan, Elisabetta Dondi, Rahma Terfous, Rabab Label, Angela Sutton, et al. 2018. « 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): L360-71. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00153.2017>.
- Berridge, Michael J. 2002. « The Endoplasmic Reticulum: A Multifunctional Signaling Organelle ». *Cell Calcium* 32 (5-6): 235-49. <https://doi.org/10.1016/s0143416002001823>.
- Block, A. J., P. G. Boysen, J. W. Wynne, et L. A. Hunt. 1979. « Sleep Apnea, Hypopnea and Oxygen Desaturation in Normal Subjects. A Strong Male Predominance ». *The New England Journal of Medicine* 300 (10): 513-17. <https://doi.org/10.1056/NEJM197903083001001>.
- Bradley, T. Douglas, et John S. Floras. 2009. « Obstructive Sleep Apnoea and Its Cardiovascular Consequences ». *Lancet (London, England)* 373 (9657): 82-93. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61622-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61622-0).
- Braun, Rudolf K., Oleg Broytman, Felix M. Braun, Jacqueline A. Brinkman, Andrew Clithero, Dhruvankumar Modi, David F. Pegelow, Marlowe Eldridge, et Mihaela Teodorescu. 2018. « Chronic Intermittent Hypoxia Worsens Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in Rats ». *Respiratory Physiology & Neurobiology* 256: 97-108. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2017.04.010>.
- Brines, Michael, Giovanni Grasso, Fabio Fiordaliso, Alessandra Sfacteria, Pietro Ghezzi, Maddalena Fratelli, Roberto Latini, et al. 2004. « Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common β -subunit heteroreceptor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (41): 14907-12. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406491101>.
- Brostrom, Charles O., et Margaret A. Brostrom. 1997. « Regulation of Translational Initiation during Cellular Responses to Stress ». In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, édité par Kivie Moldave, 58:79-125. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)60034-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)60034-3).
- Bunn, H. Franklin. 2013. « Erythropoietin ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3 (3). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011619>.
- Burman, Ankita, Harikrishna Tanjore, et Timothy S. Blackwell. 2018. « Endoplasmic Reticulum Stress in Pulmonary Fibrosis ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 68-69: 355-65. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.03.015>.
- Cabrera, Sandra, Mariana Maciel, Iliana Herrera, Teresa Nava, Fabián Vergara, Miguel Gaxiola, Carlos López-Otín, Moisés Selman, et Annie Pardo. 2015. « Essential role for the ATG4B protease and autophagy in bleomycin-induced pulmonary fibrosis ». *Autophagy* 11 (4): 670-84. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1034409>.
- Calfon, Marcella, Huiqing Zeng, Fumihiko Urano, Jeffery H. Till, Stevan R. Hubbard, Heather P. Harding, Scott G. Clark, et David Ron. 2002. « IRE1 Couples Endoplasmic Reticulum Load to Secretory Capacity by Processing the XBP-1 mRNA ». *Nature* 415 (6867): 92-96. <https://doi.org/10.1038/415092a>.
- Cardinal-Fernández, Pablo, José A. Lorente, Aída Ballén-Barragán, et Gustavo Matute-Bello. 2017. « Acute Respiratory Distress Syndrome and Diffuse Alveolar Damage. New Insights on a Complex Relationship ». *Annals of the American Thoracic Society* 14 (6): 844-50. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201609-728PS>.
- Caro, L. G., et G. E. Palade. 1964. « PROTEIN SYNTHESIS, STORAGE, AND DISCHARGE IN THE PANCREATIC EXOCRINE CELL. AN AUTORADIOGRAPHIC STUDY ». *The Journal of Cell Biology* 20 (mars): 473-95. <https://doi.org/10.1083/jcb.20.3.473>.
- Chang, Jui-Chih, Wei-Fen Hu, Wen-Sen Lee, Jian-Hong Lin, Pei-Ching Ting, Huai-Ren Chang, Kun-Ruey Shieh, Tsung-I Chen, et Kun-Ta Yang. 2019. « Intermittent Hypoxia Induces Autophagy to Protect Cardiomyocytes From Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis ». *Frontiers in Physiology* 10 (août). <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00995>.
- Chateauvieux, S., C. Grigorakaki, F. Morceau, M. Dicato, et M. Diederich. 2011. « Erythropoietin, Erythropoiesis and Beyond ». *Biochemical Pharmacology, Cell Signalomics 2011: Integrated cellular pathology - Systems biology of human disease*, 82 (10): 1291-1303. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.06.045>.

- Chaudhry, Raheel, et Bruno Bordoni. 2020. « Anatomy, Thorax, Lungs ». In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470197/>.
- Chen, Ling, Elliot Einbinder, Qi Zhang, Jeffrey Hasday, C. William Balke, et Steven M. Scharf. 2005. « Oxidative Stress and Left Ventricular Function with Chronic Intermittent Hypoxia in Rats ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 172 (7): 915-20. <https://doi.org/10.1164/rccm.200504-560OC>.
- Chen, Xi, Jingshi Shen, et Ron Prywes. 2002. « The Luminal Domain of ATF6 Senses Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Causes Translocation of ATF6 from the ER to the Golgi ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (15): 13045-52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110636200>.
- Chopra, Swati, Vsevolod Y. Polotsky, et Jonathan C. Jun. 2016. « Sleep Apnea Research in Animals. Past, Present, and Future ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 54 (3): 299-305. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0218TR>.
- Christie, Jason D., Mark M. Wurfel, Rui Feng, Grant E. O'Keefe, Jonathan Bradfield, Lorraine B. Ware, David C. Christiani, et al. 2012. « Genome Wide Association Identifies PPF1A1 as a Candidate Gene for Acute Lung Injury Risk Following Major Trauma ». *PLoS ONE* 7 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028268>.
- Cooper, Geoffrey M. 2000. « The Endoplasmic Reticulum ». *The Cell: A Molecular Approach. 2nd Edition*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9889/>.
- Cottin, V., B. Crestani, J. Cadranet, J.-F. Cordier, S. Marchand-Adam, G. Prévot, B. Wallaert, et al. 2017. « French Practical Guidelines for the Diagnosis and Management of Idiopathic Pulmonary Fibrosis - 2017 Update. Full-Length Version ». *Revue Des Maladies Respiratoires* 34 (8): 900-968. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2017.07.017>.
- Covarrubias, Luis, David Hernández-García, Denhí Schnabel, Enrique Salas-Vidal, et Susana Castro-Obregón. 2008. « Function of Reactive Oxygen Species during Animal Development: Passive or Active? ». *Developmental Biology* 320 (1): 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.04.041>.
- Crapo, James, B Barry, Peter Gehr, M Bachofen, et Ewald Weibel. 1982. « Cell number and cell characteristics of the normal human lung ». *The American review of respiratory disease* 126 (septembre): 332-37. <https://doi.org/10.1164/arrd.1982.126.2.332>.
- Crossno, Peter F., Vasilij V. Polosukhin, Timothy S. Blackwell, Joyce E. Johnson, Cheryl Markin, Paul E. Moore, John A. Worrell, et al. 2010. « Identification of Early Interstitial Lung Disease in an Individual with Genetic Variations in ABCA3 and SFTPC ». *Chest* 137 (4): 969-73. <https://doi.org/10.1378/chest.09-0790>.
- Crotti, S., D. Mascheroni, P. Caironi, P. Pelosi, G. Ronzoni, M. Mondino, J. J. Marini, et L. Gattinoni. 2001. « Recruitment and Derecruitment during Acute Respiratory Failure: A Clinical Study ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 164 (1): 131-40. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.1.2007011>.
- Crouch, Erika C. 2000. « Surfactant protein-D and pulmonary host defense ». *Respiratory Research* 1. <https://doi.org/10.1186/rr19>.
- Dale, E. A., F. Ben Mabrouk, et G. S. Mitchell. 2014. « Unexpected Benefits of Intermittent Hypoxia: Enhanced Respiratory and Nonrespiratory Motor Function ». *Physiology (Bethesda, Md.)* 29 (1): 39-48. <https://doi.org/10.1152/physiol.00012.2013>.
- Davalli, Pierpaola, Tijana Mitic, Andrea Caporali, Angela Lauriola, et Domenico D'Arca. 2016. « ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases ». Review Article. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi. 10 mai 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3565127>.
- Davies, H. R., L. Richeldi, et E. H. Walters. 2003. « Immunomodulatory Agents for Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, n° 3: CD003134. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003134>.
- Degryse, Amber L., Harikrishna Tanjore, Xiaochuan C. Xu, Vasilij V. Polosukhin, Brittany R. Jones, Frank B. McMahon, Linda A. Gleaves, Timothy S. Blackwell, et William E. Lawson. 2010. « Repetitive Intratracheal Bleomycin Models Several Features of Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 299 (4): L442-452. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00026.2010>.
- Delbrel, Eva, Abdoulaye Soumare, Adnan Naguez, Rabab Label, Olivier Bernard, Alain Bruhat, Pierre Fafournoux, et al. 2018. « HIF-1 α triggers ER stress and CHOP-mediated apoptosis in alveolar epithelial cells, a key event in pulmonary fibrosis ». *Scientific Reports* 8 (décembre). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36063-2>.
- Delbrel, Eva, Yurdagül Uzunhan, Abdoulaye Soumare, Thomas Gille, Dominique Marchant, Carole Planès, et Emilie Boncoeur. 2019. « ER Stress Is Involved in Epithelial-To-Mesenchymal Transition of Alveolar

- Epithelial Cells Exposed to a Hypoxic Microenvironment ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (6). <https://doi.org/10.3390/ijms20061299>.
- Dempsey, Owen J. 2006. « Clinical Review: Idiopathic Pulmonary Fibrosis—Past, Present and Future ». *Respiratory Medicine* 100 (11): 1871-85. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2006.08.017>.
- Dewan, Naresh A., F. Javier Nieto, et Virend K. Somers. 2015a. « Intermittent Hypoxemia and OSA ». *Chest* 147 (1): 266-74. <https://doi.org/10.1378/chest.14-0500>.
- . 2015b. « Intermittent Hypoxemia and OSA: Implications for Comorbidities ». *Chest* 147 (1): 266-74. <https://doi.org/10.1378/chest.14-0500>.
- Ding, Wenxiao, Xilong Zhang, Qiang Zhang, Yanbin Dong, Wenjing Wang, et Ning Ding. 2020. « Adiponectin Ameliorates Lung Injury Induced by Intermittent Hypoxia through Inhibition of ROS-Associated Pulmonary Cell Apoptosis ». *Sleep and Breathing*, mai. <https://doi.org/10.1007/s11325-020-02103-3>.
- Disayabutr, Supparerk, Eun Kyung Kim, Seung-Ick Cha, Gary Green, Ram P. Naikawadi, Kirk D. Jones, Jeffrey A. Golden, et al. 2016. « MiR-34 MiRNAs Regulate Cellular Senescence in Type II Alveolar Epithelial Cells of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *PLOS ONE* 11 (6): e0158367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158367>.
- Dodig, Slavica, Ivana Čepelak, et Ivan Pavić. 2019. « Hallmarks of senescence and aging ». *Biochemia Medica* 29 (3). <https://doi.org/10.11613/BM.2019.030501>.
- Dong, Zewu, et Yufang Yuan. 2018. « Accelerated inflammation and oxidative stress induced by LPS in acute lung injury: Inhibition by ST1926 ». *International Journal of Molecular Medicine* 41 (6): 3405-21. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3574>.
- Dp, White. 1985. « Central Sleep Apnea. » *The Medical Clinics of North America* 69 (6): 1205-19. [https://doi.org/10.1016/s0025-7125\(16\)30983-x](https://doi.org/10.1016/s0025-7125(16)30983-x).
- Dyugovskaya, Larissa, Peretz Lavie, et Lena Lavie. 2002. « Increased Adhesion Molecules Expression and Production of Reactive Oxygen Species in Leukocytes of Sleep Apnea Patients ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 165 (7): 934-39. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.165.7.2104126>.
- Eckert, Danny J., et Atul Malhotra. 2008. « Pathophysiology of Adult Obstructive Sleep Apnea ». *Proceedings of the American Thoracic Society* 5 (2): 144-53. <https://doi.org/10.1513/pats.200707-114MG>.
- Evans, Michael J., Linda J. Cabral, Robert J. Stephens, et Gustave Freeman. 1975. « Transformation of Alveolar Type 2 Cells to Type 1 Cells Following Exposure to NO₂ ». *Experimental and Molecular Pathology* 22 (1): 142-50. [https://doi.org/10.1016/0014-4800\(75\)90059-3](https://doi.org/10.1016/0014-4800(75)90059-3).
- F, Huang, Li X, Zhao N, Duan L, et Chen Y. 2018. « Circulating GRP78 Acts as a Biomarker in the Early Diagnosis of Lung Cancer. » *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 11 (11): 5223-31.
- Fang, X., N. Fukuda, P. Barbry, C. Sartori, A. S. Verkman, et M. A. Matthay. 2002. « Novel Role for CFTR in Fluid Absorption from the Distal Airspaces of the Lung ». *Journal of General Physiology* 119 (2): 199-208. <https://doi.org/10.1085/jgp.119.2.199>.
- Farré, Ramon, Josep M. Montserrat, David Gozal, Isaac Almendros, et Daniel Navajas. 2018. « Intermittent Hypoxia Severity in Animal Models of Sleep Apnea ». *Frontiers in Physiology* 9 (novembre). <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01556>.
- Fehrenbach, Heinz. 2001. « Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited ». *Respiratory Research* 2 (1): 33-46. <https://doi.org/10.1186/rr36>.
- Franklin, Karl A., et Eva Lindberg. 2015. « Obstructive sleep apnea is a common disorder in the population—a review on the epidemiology of sleep apnea ». *Journal of Thoracic Disease* 7 (8): 1311-22. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2015.06.11>.
- Frat, Jean-Pierre, Arnaud W. Thille, Alain Mercat, Christophe Girault, Stéphanie Ragot, Sébastien Perbet, Gwénael Prat, et al. 2015. « High-Flow Oxygen through Nasal Cannula in Acute Hypoxemic Respiratory Failure ». *New England Journal of Medicine* 372 (23): 2185-96. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1503326>.
- Fronius, Martin, Wolfgang G. Clauss, et Mike Althaus. 2012. « Why Do We Have to Move Fluid to Be Able to Breathe? » *Frontiers in Physiology* 3. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00146>.
- Fung, Man Lung. 2014. « Pathogenic Roles of the Carotid Body Inflammation in Sleep Apnea ». *Mediators of Inflammation* 2014: 354279. <https://doi.org/10.1155/2014/354279>.
- FUSETTI, M., A.B. FIORETTI, M. VALENTI, F. MASEDU, M. LAURIELLO, et M. PAGLIARELLA. 2012. « Cardiovascular and metabolic comorbidities in patients with obstructive sleep apnoea syndrome ». *Acta Otorhinolaryngologica Italica* 32 (5): 320-25.
- Gao, Li, et Kathleen C. Barnes. 2009. « Recent Advances in Genetic Predisposition to Clinical Acute Lung Injury ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 296 (5): L713-725. <https://doi.org/10.1152/ajplung.90269.2008>.

- Gassmann, Max, Katja Heinicke, Jorge Soliz, et Omolara O. Ogunshola. 2003. « Non-Erythroid Functions of Erythropoietin ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 543: 323-30. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8997-0_22.
- Gattinoni, Luciano, Pietro Caironi, Massimo Cressoni, Davide Chiumello, V. Marco Ranieri, Michael Quintel, Sebastiano Russo, Nicolò Patroniti, Rodrigo Cornejo, et Guillermo Bugeo. 2006. « Lung Recruitment in Patients with the Acute Respiratory Distress Syndrome ». *The New England Journal of Medicine* 354 (17): 1775-86. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052052>.
- Gehr, Peter, Marianne Bachofen, et Ewald Weibel. 1978. « The normal human lung: Ultrastructure and morphometric estimation of diffusion capacity ». *Respiration Physiology* 32 (mars): 121-40. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(78\)90104-4](https://doi.org/10.1016/0034-5687(78)90104-4).
- Geng, Xu Chang, Zhou Pang Hu, et Guo Yong Lian. 2015. « Erythropoietin ameliorates renal interstitial fibrosis via the inhibition of fibrocyte accumulation ». *Molecular Medicine Reports* 11 (5): 3860-65. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3157>.
- Ghezzi, P., et M. Brines. 2004. « Erythropoietin as an Antiapoptotic, Tissue-Protective Cytokine ». *Cell Death and Differentiation* 11 Suppl 1 (juillet): S37-44. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401450>.
- Gil, J., et E. R. Weibel. 1969. « Improvements in Demonstration of Lining Layer of Lung Alveoli by Electron Microscopy ». *Respiration Physiology* 8 (1): 13-36. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(69\)90042-5](https://doi.org/10.1016/0034-5687(69)90042-5).
- Gille, Thomas, Morgane Didier, Marouane Boubaya, Loris Moya, Angela Sutton, Zohra Carton, Fanny Baran-Marszak, et al. 2017. « Obstructive Sleep Apnoea and Related Comorbidities in Incident Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *The European Respiratory Journal* 49 (6). <https://doi.org/10.1183/13993003.01934-2016>.
- Gille, Thomas, Morgane Didier, Cécile Rotenberg, Eva Delbrel, Dominique Marchant, Angela Sutton, Nicolas Dard, et al. 2018. « Intermittent Hypoxia Increases the Severity of Bleomycin-Induced Lung Injury in Mice ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018 (mars). <https://doi.org/10.1155/2018/1240192>.
- Gjevre, JA, RM Taylor-Gjevre, R Skomro, J Reid, M Fenton, et D Cotton. 2011. « Comparison of polysomnographic and portable home monitoring assessments of obstructive sleep apnea in Saskatchewan women ». *Canadian Respiratory Journal : Journal of the Canadian Thoracic Society* 18 (5): 271-74.
- Glassberg, Marilyn K. 2019. « Overview of Idiopathic Pulmonary Fibrosis, Evidence-Based Guidelines, and Recent Developments in the Treatment Landscape ». *The American Journal of Managed Care* 25 (11 Suppl): S195-203.
- Gottlieb, Daniel J., et Naresh M. Punjabi. 2020. « Diagnosis and Management of Obstructive Sleep Apnea: A Review ». *JAMA* 323 (14): 1389-1400. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3514>.
- Gould, G. A., K. F. Whyte, G. B. Rhind, M. A. Airlie, J. R. Catterall, C. M. Shapiro, et N. J. Douglas. 1988. « The Sleep Hypopnea Syndrome ». *The American Review of Respiratory Disease* 137 (4): 895-98. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/137.4.895>.
- Green, Bryan T., William A. Broughton, et J. Barry O'Connor. 2003. « Marked Improvement in Nocturnal Gastroesophageal Reflux in a Large Cohort of Patients with Obstructive Sleep Apnea Treated with Continuous Positive Airway Pressure ». *Archives of Internal Medicine* 163 (1): 41-45. <https://doi.org/10.1001/archinte.163.1.41>.
- Griese, M. 1999. « Pulmonary Surfactant in Health and Human Lung Diseases: State of the Art ». *The European Respiratory Journal* 13 (6): 1455-76. <https://doi.org/10.1183/09031936.99.13614779>.
- Guilleminault, C., R. Stoohs, A. Clerk, M. Cetel, et P. Maistros. 1993. « A Cause of Excessive Daytime Sleepiness. The Upper Airway Resistance Syndrome ». *Chest* 104 (3): 781-87. <https://doi.org/10.1378/chest.104.3.781>.
- Guilleminault, C, A Tilkian, et W C Dement. 1976. « The Sleep Apnea Syndromes ». *Annual Review of Medicine* 27 (1): 465-84. <https://doi.org/10.1146/annurev.me.27.020176.002341>.
- Guillot, Loïc, Nadia Nathan, Olivier Tabary, Guillaume Thouvenin, Philippe Le Rouzic, Harriet Corvol, Serge Amselem, et Annick Clement. 2013. « Alveolar Epithelial Cells: Master Regulators of Lung Homeostasis ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45 (11): 2568-73. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.08.009>.
- Gupta, Reshu, Chandramu Chetty, Praveen Bhoopathi, Sajani Lakka, Sanjeeva Mohanam, Jasti S. Rao, et Dzung Eta Dinh. 2011. « Downregulation of UPA/UPAR Inhibits Intermittent Hypoxia-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in DAOY and D283 Medulloblastoma Cells ». *International Journal of Oncology* 38 (3): 733-44. <https://doi.org/10.3892/ijo.2010.883>.
- Hagimoto, N., K. Kuwano, H. Miyazaki, R. Kunitake, M. Fujita, M. Kawasaki, Y. Kaneko, et N. Hara. 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): 272-78. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.17.3.2893>.

- HAMMAN, L. 1944. « Acute diffuse interstitial fibrosis of the lung ». *Bull Johns Hopkins Hosp* 74: 177-212.
- Harding, H. P., I. Novoa, Y. Zhang, H. Zeng, R. Wek, M. Schapira, et D. Ron. 2000. « Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells ». *Molecular Cell* 6 (5): 1099-1108. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00108-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00108-8).
- Harding, Heather P., Yuhong Zhang, et David Ron. 1999. « Protein Translation and Folding Are Coupled by an Endoplasmic-Reticulum-Resident Kinase ». *Nature* 397 (6716): 271-74. <https://doi.org/10.1038/16729>.
- Hasnain, Sumaira Z., Johannes B. Prins, et Michael A. McGuckin. 2016. « Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stress in β -Cell Dysfunction in Diabetes ». *Journal of Molecular Endocrinology* 56 (2): R33-54. <https://doi.org/10.1530/JME-15-0232>.
- Haze, K., H. Yoshida, H. Yanagi, T. Yura, et K. Mori. 1999. « Mammalian Transcription Factor ATF6 Is Synthesized as a Transmembrane Protein and Activated by Proteolysis in Response to Endoplasmic Reticulum Stress ». *Molecular Biology of the Cell* 10 (11): 3787-99. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.11.3787>.
- He, Junsheng, Ailiang Zhang, Zhiwen Song, Shiwu Guo, Yuwei Chen, Zhiyuan Liu, Jinlong Zhang, Xu Xu, Jinbo Liu, et Lei Chu. 2019. « The resistant effect of SIRT1 in oxidative stress-induced senescence of rat nucleus pulposus cell is regulated by Akt-FoxO1 pathway ». *Bioscience Reports* 39 (5). <https://doi.org/10.1042/BSR20190112>.
- He, Zhi-Yong, Wen-Yue Wang, Wei-Yan Hu, Lu Yang, Yan Li, Wei-Yuan Zhang, Ya-Shu Yang, et al. 2016. « Gamma-H2AX upregulation caused by Wip1 deficiency increases depression-related cellular senescence in hippocampus ». *Scientific Reports* 6 (septembre). <https://doi.org/10.1038/srep34558>.
- Heinzer, Raphael C., Michael L. Stanchina, Atul Malhotra, Robert B. Fogel, Sanjay R. Patel, Amy S. Jordan, Karen Schory, et David P. White. 2005. « Lung Volume and Continuous Positive Airway Pressure Requirements in Obstructive Sleep Apnea ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 172 (1): 114-17. <https://doi.org/10.1164/rccm.200404-552OC>.
- Herzog, Erica L., Arnold R. Brody, Thomas V. Colby, Robert Mason, et Mary C. Williams. 2008. « Knowns and Unknowns of the Alveolus ». *Proceedings of the American Thoracic Society* 5 (7): 778-82. <https://doi.org/10.1513/pats.200803-028HR>.
- Hilberg, Frank, Gerald J. Roth, Martin Krssak, Susanna Kautschitsch, Wolfgang Sommergruber, Ulrike Tontsch-Grunt, Pilar Garin-Chesa, et al. 2008. « BIBF 1120: Triple Angiokinase Inhibitor with Sustained Receptor Blockade and Good Antitumor Efficacy ». *Cancer Research* 68 (12): 4774-82. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6307>.
- Hill, Charlotte, Juanjuan Li, Dian Liu, Franco Conforti, Christopher J. Brereton, Liudi Yao, Yilu Zhou, et al. 2019. « Autophagy Inhibition-Mediated Epithelial–Mesenchymal Transition Augments Local Myofibroblast Differentiation in Pulmonary Fibrosis ». *Cell Death & Disease* 10 (8): 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1820-x>.
- Hopps, E., B. Canino, V. Calandrino, M. Montana, R. Lo Presti, et G. Caimi. 2014. « Lipid Peroxidation and Protein Oxidation Are Related to the Severity of OSAS ». *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 18 (24): 3773-78.
- Hou, Yanpeng, Huai'an Yang, Zeshi Cui, Xuhui Tai, Yanling Chu, et Xing Guo. 2017. « Tauroursodeoxycholic acid attenuates endoplasmic reticulum stress and protects the liver from chronic intermittent hypoxia induced injury ». *Experimental and Therapeutic Medicine* 14 (3): 2461-68. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4804>.
- Hsu, Han-Shui, Chen-Chi Liu, Jiun-Han Lin, Tien-Wei Hsu, Jyuan-Wei Hsu, Kelly Su, et Shih-Chieh Hung. 2017. « Involvement of ER Stress, PI3K/AKT Activation, and Lung Fibroblast Proliferation in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis ». *Scientific Reports* 7 (1): 14272. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14612-5>.
- Hu, Cheng-Jun, Li-Yi Wang, Lewis A. Chodosh, Brian Keith, et M. Celeste Simon. 2003. « Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in Hypoxic Gene Regulation ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (24): 9361-74. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.24.9361-9374.2003>.
- Hudgel, David W., Sanjay R. Patel, Amy M. Ahasic, Susan J. Bartlett, Daniel H. Bessesen, Melisa A. Coaker, P. Michelle Fiander, et al. 2018. « The Role of Weight Management in the Treatment of Adult Obstructive Sleep Apnea. An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 198 (6): e70-87. <https://doi.org/10.1164/rccm.201807-1326ST>.
- Hughes, J. M. B. 2007. « Assessing Gas Exchange ». *Chronic Respiratory Disease* 4 (4): 205-14. <https://doi.org/10.1177/1479972307084446>.
- Huppert, Laura A., et Michael A. Matthay. 2017. « Alveolar Fluid Clearance in Pathologically Relevant Conditions: In Vitro and In Vivo Models of Acute Respiratory Distress Syndrome ». *Frontiers in Immunology* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00371>.

- Huppert, Laura A., Michael A. Matthay, et Lorraine B. Ware. 2019. « Pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome ». *Seminars in respiratory and critical care medicine* 40 (1): 31-39. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1683996>.
- Hutchinson, John, Andrew Fogarty, Richard Hubbard, et Tricia McKeever. 2015. « Global Incidence and Mortality of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Systematic Review ». *European Respiratory Journal* 46 (3): 795-806. <https://doi.org/10.1183/09031936.00185114>.
- Iftikhar, Imran H., Lia Bittencourt, Shawn D. Youngstedt, Najib Ayas, Peter Cistulli, Richard Schwab, Martin W. Durkin, et Ulysses J. Magalang. 2017. « Comparative Efficacy of CPAP, MADs, Exercise-Training, and Dietary Weight Loss for Sleep Apnea: A Network Meta-Analysis ». *Sleep Medicine* 30: 7-14. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2016.06.001>.
- Izbicki, G, MJ Segel, TG Christensen, MW Conner, et R Breuer. 2002. « Time course of bleomycin-induced lung fibrosis ». *International Journal of Experimental Pathology* 83 (3): 111-19. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.2002.00220.x>.
- Jelkmann, Wolfgang. 2007. « Erythropoietin after a Century of Research: Younger than Ever ». *European Journal of Haematology* 78 (3): 183-205. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2007.00818.x>.
- Johnson, Meshell D., Jonathan H. Widdicombe, Lennell Allen, Pascal Barbry, et Leland G. Dobbs. 2002. « Alveolar Epithelial Type I Cells Contain Transport Proteins and Transport Sodium, Supporting an Active Role for Type I Cells in Regulation of Lung Liquid Homeostasis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (4): 1966-71. <https://doi.org/10.1073/pnas.042689399>.
- Jordan, W., S. Cohrs, D. Degner, A. Meier, A. Rodenbeck, G. Mayer, J. Pilz, E. R  ther, J. Kornhuber, et S. Bleich. 2006. « Evaluation of Oxidative Stress Measurements in Obstructive Sleep Apnea Syndrome ». *Journal of Neural Transmission* 113 (2): 239-54. <https://doi.org/10.1007/s00702-005-0316-2>.
- Jung, Seung-Nam, Woo Kyeom Yang, Joungmok Kim, Hak Su Kim, Eun Ju Kim, Hee Yun, Hyunsung Park, et al. 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): 713-21. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn032>.
- Jyothi, I., K. Renuka Prasad, R. Rajalakshmi, RC Satish Kumar, Talatam Ramphanindra, T. M. Vijayakumar, et Ilango Kaliappan. 2019. « Obstructive Sleep Apnea: A Pathophysiology and Pharmacotherapy Approach ». *Noninvasive Ventilation in Medicine - Recent Updates*, f  vrier. <https://doi.org/10.5772/intechopen.77981>.
- Kakavas, Sotirios, Theano Demestiha, Panagiotis Vasileiou, et Theodoros Xanthos. 2011. « Erythropoietin as a Novel Agent with Pleiotropic Effects against Acute Lung Injury ». *European Journal of Clinical Pharmacology* 67 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1007/s00228-010-0938-7>.
- Kalchiem-Dekel, Or, Jeffrey R. Galvin, Allen P. Burke, Sergei P. Atamas, et Nevins W. Todd. 2018. « Interstitial Lung Disease and Pulmonary Fibrosis: A Practical Approach for General Medicine Physicians with Focus on the Medical History ». *Journal of Clinical Medicine* 7 (12). <https://doi.org/10.3390/jcm7120476>.
- Kang, Hyeon Hui, In Kyoung Kim, Chang Dong Yeo, Sei Won Kim, Hea Yon Lee, Jeong Hyeon Im, Hee Young Kwon, et Sang Haak Lee. 2020. « The Effects of Chronic Intermittent Hypoxia in Bleomycin-Induced Lung Injury on Pulmonary Fibrosis via Regulating the NF-KB/Nrf2 Signaling Pathway ». *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, octobre. <https://doi.org/10.4046/trd.2020.0112>.
- Kaunisto, Jaana, Eija-Riitta Salomaa, Ulla Hodgson, Riitta Kaarteenaho, et Marjukka Myll  rniemi. 2013. « Idiopathic pulmonary fibrosis - a systematic review on methodology for the collection of epidemiological data ». *BMC Pulmonary Medicine* 13 (ao  t): 53. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-13-53>.
- Kaur, Amarpreet, Susan K. Mathai, et David A. Schwartz. 2017. « Genetics in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Pathogenesis, Prognosis, and Treatment ». *Frontiers in Medicine* 4 (septembre). <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00154>.
- Khalil, N., R. N. O'Connor, K. C. Flanders, et H. Unruh. 1996. « TGF-Beta 1, but Not TGF-Beta 2 or TGF-Beta 3, Is Differentially Present in Epithelial Cells of Advanced Pulmonary Fibrosis: An Immunohistochemical Study ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 14 (2): 131-38. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.14.2.8630262>.
- Kim, Hee Suk, Yongjin Kim, Min Jae Lim, Yun-Gyu Park, Serk In Park, et Jeongwon Sohn. 2019. « The P38-Activated ER Stress-ATF6   Axis Mediates Cellular Senescence ». *The FASEB Journal* 33 (2): 2422-34. <https://doi.org/10.1096/fj.201800836R>.
- Kim, John S., Anna J. Podolanczuk, Priya Borker, Steven M. Kawut, Ganesh Raghu, Joel D. Kaufman, Karen D. Hinckley Stukovsky, et al. 2017. « Obstructive Sleep Apnea and Subclinical Interstitial Lung Disease in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) ». *Annals of the American Thoracic Society* 14 (12): 1786-95. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201701-091OC>.

- Kim, Sei Won, In Kyoung Kim, Chang Dong Yeo, Hyeon Hui Kang, Woo Ho Ban, Hee Young Kwon, et Sang Haak Lee. 2020. « Effects of chronic intermittent hypoxia caused by obstructive sleep apnea on lipopolysaccharide-induced acute lung injury ». *Experimental Lung Research* 46 (9): 341-51. <https://doi.org/10.1080/01902148.2020.1804646>.
- Kim, Soo Nam, Jinsoo Lee, Hyo-Seon Yang, Jae-Woo Cho, Soonjin Kwon, Young-Beom Kim, Jeong-Doo Her, Kyu-Hyuk Cho, Chang-Woo Song, et Kyuhong Lee. 2010. « Dose-response Effects of Bleomycin on Inflammation and Pulmonary Fibrosis in Mice ». *Toxicological Research* 26 (3): 217-22. <https://doi.org/10.5487/TR.2010.26.3.217>.
- King, Talmadge E., Williamson Z. Bradford, Socorro Castro-Bernardini, Elizabeth A. Fagan, Ian Glaspole, Marilyn K. Glassberg, Eduard Gorina, et al. 2014. « A Phase 3 Trial of Pirfenidone in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *New England Journal of Medicine* 370 (22): 2083-92. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1402582>.
- King, Talmadge E., Annie Pardo, et Moisés Selman. 2011. « Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *Lancet (London, England)* 378 (9807): 1949-61. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60052-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60052-4).
- King, Talmadge E., Janet A. Tooze, Marvin I. Schwarz, Kevin R. Brown, et Reuben M. Cherniack. 2001. « Predicting Survival in Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 164 (7): 1171-81. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.7.2003140>.
- Knudsen, Lars, et Matthias Ochs. 2018. « The micromechanics of lung alveoli: structure and function of surfactant and tissue components ». *Histochemistry and Cell Biology* 150 (6): 661-76. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1747-9>.
- Knudsen, Lars, Clemens Ruppert, et Matthias Ochs. 2017. « Tissue Remodelling in Pulmonary Fibrosis ». *Cell and Tissue Research* 367 (3): 607-26. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2543-2>.
- Knüppel, Larissa, Yoshihiro Ishikawa, Michaela Aichler, Katharina Heinzelmänn, Rudolf Hatz, Jürgen Behr, Axel Walch, Hans Peter Bächinger, Oliver Eickelberg, et Claudia A. Staab-Weijnitz. 2017. « A Novel Antifibrotic Mechanism of Nintedanib and Pirfenidone. Inhibition of Collagen Fibril Assembly ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 57 (1): 77-90. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0217OC>.
- Korfei, Martina, Clemens Ruppert, Poornima Mahavadi, Ingrid Henneke, Philipp Markart, Miriam Koch, Gyoergy Lang, et al. 2008. « Epithelial Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Sporadic Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 178 (8): 838-46. <https://doi.org/10.1164/rccm.200802-313OC>.
- Kropski, Jonathan A., et Timothy S. Blackwell. 2018. « Endoplasmic Reticulum Stress in the Pathogenesis of Fibrotic Disease ». *The Journal of Clinical Investigation* 128 (1): 64-73. <https://doi.org/10.1172/JCI93560>.
- Kuhn, C., et J. A. McDonald. 1991. « The Roles of the Myofibroblast in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Ultrastructural and Immunohistochemical Features of Sites of Active Extracellular Matrix Synthesis ». *The American Journal of Pathology* 138 (5): 1257-65.
- Lambrecht, Bart N. 2006. « Alveolar Macrophage in the Driver's Seat ». *Immunity* 24 (4): 366-68. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.03.008>.
- Lancaster, Lisa H., Wendi R. Mason, James A. Parnell, Todd W. Rice, James E. Loyd, Aaron P. Milstone, Harold R. Collard, et Beth A. Malow. 2009. « Obstructive Sleep Apnea Is Common in Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *Chest* 136 (3): 772-78. <https://doi.org/10.1378/chest.08-2776>.
- Laporta Hernandez, Rosalía, Myriam Aguilar Perez, María Teresa Lázaro Carrasco, et Piedad Ussetti Gil. 2018. « Lung Transplantation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *Medical Sciences* 6 (3). <https://doi.org/10.3390/medsci6030068>.
- Lavie, Lena. 2003. « Obstructive Sleep Apnoea Syndrome--an Oxidative Stress Disorder ». *Sleep Medicine Reviews* 7 (1): 35-51. <https://doi.org/10.1053/smr.2002.0261>.
- . 2008. « Intermittent Hypoxia: The Culprit of Oxidative Stress, Vascular Inflammation and Dyslipidemia in Obstructive Sleep Apnea ». *Expert Review of Respiratory Medicine* 2 (1): 75-84. <https://doi.org/10.1586/17476348.2.1.75>.
- . 2015. « Oxidative Stress in Obstructive Sleep Apnea and Intermittent Hypoxia--Revisited--the Bad Ugly and Good: Implications to the Heart and Brain ». *Sleep Medicine Reviews* 20 (avril): 27-45. <https://doi.org/10.1016/j.smr.2014.07.003>.
- Lavie, Lena, Alona Vishnevsky, et Peretz Lavie. 2004. « Evidence for Lipid Peroxidation in Obstructive Sleep Apnea ». *Sleep* 27 (1): 123-28.
- Lawson, William E., Dong-Sheng Cheng, Amber L. Degryse, Harikrishna Tanjore, Vasiliy V. Polosukhin, Xiaochuan C. Xu, Dawn C. Newcomb, et al. 2011. « Endoplasmic reticulum stress enhances fibrotic remodeling in the lungs ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (26): 10562-67. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107559108>.

- Lederer, D. J., S. Jelic, R. C. Basner, A. Ishizaka, et J. Bhattacharya. 2009. « Circulating KL-6, a Biomarker of Lung Injury, in Obstructive Sleep Apnoea ». *The European Respiratory Journal* 33 (4): 793-96. <https://doi.org/10.1183/09031936.00150708>.
- Lee, Ann-Hwee, Neal N. Iwakoshi, et Laurie H. Glimcher. 2003. « XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (21): 7448-59. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.21.7448-7459.2003>.
- Lee, Bo Yun, Jung A. Han, Jun Sub Im, Amelia Morrone, Kimberly Johung, Edward C. Goodwin, Wim J. Kleijer, Daniel DiMaio, et Eun Seong Hwang. 2006. « Senescence-Associated Beta-Galactosidase Is Lysosomal Beta-Galactosidase ». *Aging Cell* 5 (2): 187-95. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x>.
- Leist, Marcel, Pietro Ghezzi, Giovanni Grasso, Roberto Bianchi, Pia Villa, Maddalena Fratelli, Costanza Savino, et al. 2004. « Derivatives of Erythropoietin That Are Tissue Protective but Not Erythropoietic ». *Science (New York, N.Y.)* 305 (5681): 239-42. <https://doi.org/10.1126/science.1098313>.
- Leslie, Kevin O. 2012. « Idiopathic Pulmonary Fibrosis May Be a Disease of Recurrent, Tractional Injury to the Periphery of the Aging Lung: A Unifying Hypothesis Regarding Etiology and Pathogenesis ». *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 136 (6): 591-600. <https://doi.org/10.5858/arpa.2011-0511-OA>.
- Ley, Brett, Harold R. Collard, et Talmadge E. King. 2011. « Clinical Course and Prediction of Survival in Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 183 (4): 431-40. <https://doi.org/10.1164/rccm.201006-0894CI>.
- Li, Bin, et James H-C. Wang. 2011. « Fibroblasts and Myofibroblasts in Wound Healing: Force Generation and Measurement ». *Journal of tissue viability* 20 (4): 108-20. <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2009.11.004>.
- Lim, Diane C., Daniel C. Brady, Rajath Soans, Emily Y. Kim, Laise Valverde, Brendan T. Keenan, Xiaofeng Guo, et al. 2016. « Different cyclical intermittent hypoxia severities have different effects on hippocampal microvasculature ». *Journal of Applied Physiology* 121 (1): 78-88. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01040.2015>.
- Liu, Guanghui, Catherine Betts, Danen M. Cunoosamy, Per M. Åberg, Jorrit J. Hornberg, Kinga Balogh Sivars, et Taylor S. Cohen. 2019. « Use of precision cut lung slices as a translational model for the study of lung biology ». *Respiratory Research* 20 (1): 162. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1131-x>.
- Liu, Rui-Ming, et Gang Liu. 2020. « Cell Senescence and Fibrotic Lung Diseases ». *Experimental Gerontology* 132 (avril): 110836. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.110836>.
- Liu, Zhao-ji, Gregg L. Semenza, et Hua-feng Zhang. 2015. « Hypoxia-Inducible Factor 1 and Breast Cancer Metastasis ». *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B* 16 (1): 32-43. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1400221>.
- Losa, Davide, et Marc Chanson. 2015. « The Lung Communication Network ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 72 (15): 2793-2808. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1960-9>.
- Lu, Jing, Yu-yu Yao, Qi-ming Dai, Gen-shan Ma, Shu-feng Zhang, Lei Cao, Li-qun Ren, et Nai-feng Liu. 2012. « Erythropoietin attenuates cardiac dysfunction by increasing myocardial angiogenesis and inhibiting interstitial fibrosis in diabetic rats ». *Cardiovascular Diabetology* 11 (1): 105. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-11-105>.
- Luce, J. M., A. B. Montgomery, J. D. Marks, J. Turner, C. A. Metz, et J. F. Murray. 1988. « Ineffectiveness of High-Dose Methylprednisolone in Preventing Parenchymal Lung Injury and Improving Mortality in Patients with Septic Shock ». *The American Review of Respiratory Disease* 138 (1): 62-68. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/138.1.62>.
- Maeyama, T., K. Kuwano, M. Kawasaki, R. Kunitake, N. Hagimoto, T. Matsuba, M. Yoshimi, I. Inoshima, K. Yoshida, et N. Hara. 2001. « Upregulation of Fas-Signalling Molecules in Lung Epithelial Cells from Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *European Respiratory Journal* 17 (2): 180-89.
- Maharaj, Shyam, Chiko Shimbori, et Martin Kolb. 2013. « Fibrocytes in Pulmonary Fibrosis: A Brief Synopsis ». *European Respiratory Review* 22 (130): 552-57. <https://doi.org/10.1183/09059180.00007713>.
- Marshall Nathaniel S., Wong Keith K.H., Cullen Stewart R.J., Knuiman Matthew W., et Grunstein Ronald R. s. d. « Sleep Apnea and 20-Year Follow-Up for All-Cause Mortality, Stroke, and Cancer Incidence and Mortality in the Busselton Health Study Cohort ». *Journal of Clinical Sleep Medicine* 10 (04): 355-62. <https://doi.org/10.5664/jcsm.3600>.
- Martin, S. E., R. Mathur, I. Marshall, et N. J. Douglas. 1997. « The Effect of Age, Sex, Obesity and Posture on Upper Airway Size ». *The European Respiratory Journal* 10 (9): 2087-90. <https://doi.org/10.1183/09031936.97.10092087>.
- Matalon, Sadis, et Hugh O'Brodovich. 1999. « SODIUM CHANNELS IN ALVEOLAR EPITHELIAL CELLS: Molecular Characterization, Biophysical Properties, and Physiological Significance ». *Annual Review of Physiology* 61 (1): 627-61. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.61.1.627>.

- Mathur, R., et N. J. Douglas. 1995. « Family Studies in Patients with the Sleep Apnea-Hypopnea Syndrome ». *Annals of Internal Medicine* 122 (3): 174-78. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-122-3-19950210-00003>.
- Matthay, Michael A. 2015. « Saving Lives with High-Flow Nasal Oxygen ». Editorial. [Http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJMe1504852](http://dx.doi.org/10.1056/NEJMe1504852). Massachusetts Medical Society. World. 3 juin 2015. <https://doi.org/10.1056/NEJMe1504852>.
- Matthay, Michael A., Lorraine B. Ware, et Guy A. Zimmerman. 2012. « The acute respiratory distress syndrome ». *The Journal of Clinical Investigation* 122 (8): 2731-40. <https://doi.org/10.1172/JCI60331>.
- Matthay, Michael A., et Rachel L. Zemans. 2011. « The Acute Respiratory Distress Syndrome: Pathogenesis and Treatment ». *Annual Review of Pathology* 6 (février): 147. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130158>.
- Matthay, Michael A., Rachel L. Zemans, Guy A. Zimmerman, Yaseen M. Arabi, Jeremy R. Beitler, Alain Mercat, Margaret Herridge, Adrienne G. Randolph, et Carolyn S. Calfee. 2019. « Acute respiratory distress syndrome ». *Nature Reviews. Disease Primers* 5 (1). <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0069-0>.
- Mermigkis, Charalampos, Izolde Bouloukaki, Katerina Antoniou, Georgios Papadogiannis, Ioannis Giannarakis, Georgios Varouchakis, Nikolaos Siafakas, et Sophia E. Schiza. 2015. « Obstructive Sleep Apnea Should Be Treated in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *Sleep & Breathing = Schlaf & Atmung* 19 (1): 385-91. <https://doi.org/10.1007/s11325-014-1033-6>.
- Mezzanotte, W S, D J Tangel, et D P White. 1992. « Waking genioglossal electromyogram in sleep apnea patients versus normal controls (a neuromuscular compensatory mechanism). » *Journal of Clinical Investigation* 89 (5): 1571-79.
- Minoves, Mélanie, Jessica Morand, Frédéric Perriot, Morgane Chatard, Brigitte Gonthier, Emeline Lemarié, Jean-Baptiste Menut, et al. 2017. « An Innovative Intermittent Hypoxia Model for Cell Cultures Allowing Fast Po2 Oscillations with Minimal Gas Consumption ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 313 (4): C460-68. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00098.2017>.
- Miyamoto, Naoya, Hiroto Izumi, Rie Miyamoto, Han Bin, Hiroyuki Kondo, Akihiko Tawara, Yasuyuki Sasaguri, et Kimitoshi Kohno. 2011. « Transcriptional Regulation of Activating Transcription Factor 4 under Oxidative Stress in Retinal Pigment Epithelial ARPE-19/HPV-16 Cells ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52 (3): 1226-34. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5775>.
- Moore, Bethany B., et Cory M. Hogaboam. 2008. « Murine models of pulmonary fibrosis ». *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 294 (2): L152-60. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00313.2007>.
- Moore, Bethany B., et Thomas A. Moore. 2015. « Viruses in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Etiology and Exacerbation ». *Annals of the American Thoracic Society* 12 (Suppl 2): S186-92. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201502-088AW>.
- Moore, Bethany B., Lynne Murray, Anuk Das, Carol A. Wilke, Amy B. Herrygers, et Galen B. Toews. 2006. « The Role of CCL12 in the Recruitment of Fibrocytes and Lung Fibrosis ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 35 (2): 175-81. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2005-0239OC>.
- Moulin, Sophie, Marion Pauly, Amandine Thomas, Maximin Detrait, Guillaume Vial, Frederic Lamarche, Herve Dubouchaud, Claire Arnaud, Diane Godin-Ribuot, et Elise Belaidi-Corsat. 2018. « Intermittent Hypoxia, the Hallmark of Sleep Apnea, Induces HIF-1-Dependent Mitochondrial Dysfunction ». *European Respiratory Journal* 52 (suppl 62). <https://doi.org/10.1183/13993003.congress-2018.OA3285>.
- Münzel, Thomas, Giovanni G. Camici, Christoph Maack, Nicole R. Bonetti, Valentin Fuster, et Jason C. Kovacic. 2017. « Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature: Part 2 of a 3-Part Series ». *Journal of the American College of Cardiology* 70 (2): 212-29. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.05.035>.
- Myers, Jeffrey L., et Anna-Luise A. Katzenstein. 1988. « Epithelial Necrosis and Alveolar Collapse in the Pathogenesis of Usual Interstitial Pneumonia ». *Chest* 94 (6): 1309-11. <https://doi.org/10.1378/chest.94.6.1309>.
- Nakamura, Yutaro, et Takafumi Suda. 2015. « Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Diagnosis and Clinical Manifestations ». *Clinical Medicine Insights. Circulatory, Respiratory and Pulmonary Medicine* 9 (Suppl 1): 163. <https://doi.org/10.4137/CCRP.M.S39897>.
- Nanduri, Jayasri, Ning Wang, Guoxiang Yuan, Shakil A. Khan, Dangjai Souvannakitti, Ying-Jie Peng, Ganesh K. Kumar, Joseph A. Garcia, et Nanduri R. Prabhakar. 2009. « Intermittent Hypoxia Degrades HIF-2 α via Calpains Resulting in Oxidative Stress: Implications for Recurrent Apnea-Induced Morbidities ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (4): 1199-1204. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811018106>.

- Nathan, Nadia, Violaine Giraud, Clément Picard, Hilario Nunes, Florence Dastot-Le Moal, Bruno Copin, Laurie Galeron, et al. 2016. « Germline SFTPA1 Mutation in Familial Idiopathic Interstitial Pneumonia and Lung Cancer ». *Human Molecular Genetics* 25 (8): 1457-67. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw014>.
- Navaratnam, V., K. M. Fleming, J. West, C. J. P. Smith, R. G. Jenkins, A. Fogarty, et R. B. Hubbard. 2011. « The Rising Incidence of Idiopathic Pulmonary Fibrosis in the U.K ». *Thorax* 66 (6): 462-67. <https://doi.org/10.1136/thx.2010.148031>.
- Navarrete-Opazo, Angela, et Gordon S. Mitchell. 2014. « Therapeutic potential of intermittent hypoxia: a matter of dose ». *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 307 (10): R1181-97. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00208.2014>.
- Nguyen, Truyen, Philip J. Sherratt, et Cecil B. Pickett. 2003. « Regulatory Mechanisms Controlling Gene Expression Mediated by the Antioxidant Response Element ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 43 (1): 233-60. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140229>.
- Ni, Haibo, Qin Rui, Di Li, Rong Gao, et Gang Chen. 2018. « The Role of IRE1 Signaling in the Central Nervous System Diseases ». *Current Neuropharmacology* 16 (9): 1340-47. <https://doi.org/10.2174/1570159X16666180416094646>.
- Noble, Paul W., et Robert J. Homer. 2005. « Back to the Future: Historical Perspective on the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 33 (2): 113-20. <https://doi.org/10.1165/rcmb.F301>.
- Nogee, L. M., A. E. Dunbar, S. E. Wert, F. Askin, A. Hamvas, et J. A. Whitsett. 2001. « A Mutation in the Surfactant Protein C Gene Associated with Familial Interstitial Lung Disease ». *The New England Journal of Medicine* 344 (8): 573-79. <https://doi.org/10.1056/NEJM200102234440805>.
- Nova, Zuzana, Henrieta Skovierova, et Andrea Calkovska. 2019. « Alveolar-Capillary Membrane-Related Pulmonary Cells as a Target in Endotoxin-Induced Acute Lung Injury ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (4). <https://doi.org/10.3390/ijms20040831>.
- Ochs, Matthias, Jan Hegermann, Elena Lopez-Rodriguez, Sara Timm, Geraldine Nouailles, Jasmin Matuszak, Szandor Simmons, Martin Witzentrath, et Wolfgang M. Kuebler. 2020. « On Top of the Alveolar Epithelium: Surfactant and the Glycocalyx ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (9). <https://doi.org/10.3390/ijms21093075>.
- Ochs, Matthias, Jens R. Nyengaard, Anja Jung, Lars Knudsen, Marion Voigt, Thorsten Wahlers, Joachim Richter, et Hans Jørgen G. Gundersen. 2004. « The Number of Alveoli in the Human Lung ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 169 (1): 120-24. <https://doi.org/10.1164/rccm.200308-1107OC>.
- Ogata, Maiko, Shin-ichiro Hino, Atsushi Saito, Keisuke Morikawa, Shinichi Kondo, Soshi Kanemoto, Tomohiko Murakami, et al. 2006. « Autophagy Is Activated for Cell Survival after Endoplasmic Reticulum Stress ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (24): 9220-31. <https://doi.org/10.1128/MCB.01453-06>.
- Okada, Tetsuya, Hiderou Yoshida, Rieko Akazawa, Manabu Negishi, et Kazutoshi Mori. 2002. « Distinct Roles of Activating Transcription Factor 6 (ATF6) and Double-Stranded RNA-Activated Protein Kinase-like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK) in Transcription during the Mammalian Unfolded Protein Response ». *The Biochemical Journal* 366 (Pt 2): 585-94. <https://doi.org/10.1042/BJ20020391>.
- Ornatowski, Wojciech, Qing Lu, Manivannan Yegambaram, Alejandro E. Garcia, Evgeny A. Zemskov, Emin Maltepe, Jeffrey R. Fineman, Ting Wang, et Stephen M. Black. 2020. « Complex Interplay between Autophagy and Oxidative Stress in the Development of Pulmonary Disease ». *Redox Biology* 36 (septembre): 101679. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101679>.
- Otoupalova, Eva, Sam Smith, Guangjie Cheng, et Victor J. Thannickal. 2020. « Oxidative Stress in Pulmonary Fibrosis ». In *Comprehensive Physiology*, 509-47. American Cancer Society. <https://doi.org/10.1002/cphy.c190017>.
- Ozben, Serkan, Nergiz Huseyinoglu, Ferhat Hanikoglu, Tolga Sinan Guvenc, Binnaz Zeynep Yildirim, Aysegul Cort, Sebahat Ozdem, et Tomris Ozben. 2014. « Advanced Oxidation Protein Products and Ischaemia-Modified Albumin in Obstructive Sleep Apnea ». *European Journal of Clinical Investigation* 44 (11): 1045-52. <https://doi.org/10.1111/eci.12338>.
- Palade, G. 1975. « Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis ». *Science (New York, N.Y.)* 189 (4200): 347-58. <https://doi.org/10.1126/science.1096303>.
- Palade, G. E., et K. R. Porter. 1954. « Studies on the Endoplasmic Reticulum. I. Its Identification in Cells in Situ ». *The Journal of Experimental Medicine* 100 (6): 641-56. <https://doi.org/10.1084/jem.100.6.641>.
- Pardo, Annie, et Moisés Selman. 2002. « Idiopathic Pulmonary Fibrosis: New Insights in Its Pathogenesis ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34 (12): 1534-38. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00091-2](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00091-2).

- Parsa, Cyrus J., Akio Matsumoto, Jihee Kim, Ryan U. Riel, Laura S. Pascal, G. Brant Walton, Richard B. Thompson, et al. 2003. « A Novel Protective Effect of Erythropoietin in the Infarcted Heart ». *The Journal of Clinical Investigation* 112 (7): 999-1007. <https://doi.org/10.1172/JCI18200>.
- Patel, Avignat S., Ling Lin, Alexander Geyer, Jeffrey A. Haspel, Chang Hyeok An, Jiaofei Cao, Ivan O. Rosas, et Danielle Morse. 2012. « Autophagy in Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *PLoS ONE* 7 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041394>.
- Patil, Susheel P., Indu A. Ayappa, Sean M. Caples, R. John Kimoff, Sanjay R. Patel, et Christopher G. Harrod. 2019. « Treatment of Adult Obstructive Sleep Apnea With Positive Airway Pressure: An American Academy of Sleep Medicine Systematic Review, Meta-Analysis, and GRADE Assessment ». *Journal of Clinical Sleep Medicine : JCSM : Official Publication of the American Academy of Sleep Medicine* 15 (2): 301-34. <https://doi.org/10.5664/jcsm.7638>.
- Patton, Kevin T., Gary A. Thibodeau, et Andrew Hutton Msc BSC. 2020. *Anatomy and Physiology E-Book: Adapted International Edition*. Elsevier Health Sciences.
- Peljto, Anna L., Yingze Zhang, Tasha E. Fingerlin, Shwu-Fan Ma, Joe G. N. Garcia, Thomas J. Richards, Lori J. Silveira, et al. 2013. « Association between the MUC5B Promoter Polymorphism and Survival in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *JAMA* 309 (21): 2232-39. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.5827>.
- Peppard, P. E., T. Young, M. Palta, J. Dempsey, et J. Skatrud. 2000. « Longitudinal Study of Moderate Weight Change and Sleep-Disordered Breathing ». *JAMA* 284 (23): 3015-21. <https://doi.org/10.1001/jama.284.23.3015>.
- Peppard, Paul E., et Terry Young. 2004. « Exercise and Sleep-Disordered Breathing: An Association Independent of Body Habitus ». *Sleep* 27 (3): 480-84. <https://doi.org/10.1093/sleep/27.3.480>.
- Peyssonnaud, Carole, Pilar Cejudo-Martin, Andrew Doedens, Annelies S. Zinkernagel, Randall S. Johnson, et Victor Nizet. 2007. « Cutting Edge: Essential Role of Hypoxia Inducible Factor-1alpha in Development of Lipopolysaccharide-Induced Sepsis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178 (12): 7516-19. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.7516>.
- Phillips, Roderick J., Marie D. Burdick, Kurt Hong, Marin A. Lutz, Lynne A. Murray, Ying Ying Xue, John A. Belperio, Michael P. Keane, et Robert M. Strieter. 2004. « Circulating Fibrocytes Traffic to the Lungs in Response to CXCL12 and Mediate Fibrosis ». *The Journal of Clinical Investigation* 114 (3): 438-46. <https://doi.org/10.1172/JCI20997>.
- Pialoux, Vincent, Patrick J. Hanly, Glen E. Foster, Julien V. Brugniaux, Andrew E. Beaudin, Sara E. Hartmann, Matiram Pun, Cailean T. Duggan, et Marc J. Poulin. 2009. « Effects of Exposure to Intermittent Hypoxia on Oxidative Stress and Acute Hypoxic Ventilatory Response in Humans ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 180 (10): 1002-9. <https://doi.org/10.1164/rccm.200905-0671OC>.
- Pihtili, Aylin, Zuleyha Bingol, Esen Kiyan, Caglar Cuhadaroglu, Halim Issever, et Ziya Gulbaran. 2013. « Obstructive Sleep Apnea Is Common in Patients with Interstitial Lung Disease ». *Sleep & Breathing = Schlaf & Atmung* 17 (4): 1281-88. <https://doi.org/10.1007/s11325-013-0834-3>.
- Pison, U., M. Max, A. Neuendank, S. Weissbach, et S. Pietschmann. 1994. « Host Defence Capacities of Pulmonary Surfactant: Evidence for “non-Surfactant” Functions of the Surfactant System ». *European Journal of Clinical Investigation* 24 (9): 586-99. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.1994.tb01110.x>.
- Plataki, Maria, Anastassios V. Koutsopoulos, Katherine Darivianaki, George Delides, Nikolaos M. Siafakas, et Demosthenes Bouros. 2005. « Expression of Apoptotic and Antiapoptotic Markers in Epithelial Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *Chest* 127 (1): 266-74. <https://doi.org/10.1378/chest.127.1.266>.
- Polonis, Katarzyna, Christiane Becari, C. Anwar A. Chahal, Yuebo Zhang, Alina M. Allen, Todd A. Kellogg, Virend K. Somers, et Prachi Singh. 2020. « Chronic Intermittent Hypoxia Triggers a Senescence-like Phenotype in Human White Preadipocytes ». *Scientific Reports* 10 (avril). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63761-7>.
- Porter, K. R., A. Claude, et E. F. Fullam. 1945. « A STUDY OF TISSUE CULTURE CELLS BY ELECTRON MICROSCOPY : METHODS AND PRELIMINARY OBSERVATIONS ». *The Journal of Experimental Medicine* 81 (3): 233-46. <https://doi.org/10.1084/jem.81.3.233>.
- Prabhakar, Nanduri R., Ganesh K. Kumar, et Jayasri Nanduri. 2009. « Intermittent Hypoxia-Mediated Plasticity of Acute O2 Sensing Requires Altered Red-Ox Regulation by HIF-1 and HIF-2 ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1177 (1): 162-68. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05034.x>.
- . 2010. « Intermittent Hypoxia Augments Acute Hypoxic Sensing via HIF-Mediated ROS ». *Respiratory Physiology & Neurobiology* 174 (3): 230-34. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2010.08.022>.
- Prostko, C. R., M. A. Brostrom, et C. O. Brostrom. 1993. « Reversible Phosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor 2 Alpha in Response to Endoplasmic Reticular Signaling ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 127-128 (novembre): 255-65. <https://doi.org/10.1007/BF01076776>.

- Qaseem, Amir, Jon-Erik C. Holty, Douglas K. Owens, Paul Dallas, Melissa Starkey, Paul Shekelle, et Clinical Guidelines Committee of the American College of Physicians. 2013. « Management of Obstructive Sleep Apnea in Adults: A Clinical Practice Guideline from the American College of Physicians ». *Annals of Internal Medicine* 159 (7): 471-83. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-159-7-201310010-00704>.
- Qureshi, Asher, Robert D. Ballard, et Harold S. Nelson. 2003. « Obstructive Sleep Apnea ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 112 (4): 643-51. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2003.08.031>.
- Raghu, G., T. D. Freudenberger, S. Yang, J. R. Curtis, C. Spada, J. Hayes, J. K. Sillery, C. E. Pope, et C. A. Pellegrini. 2006. « High Prevalence of Abnormal Acid Gastro-Oesophageal Reflux in Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *The European Respiratory Journal* 27 (1): 136-42. <https://doi.org/10.1183/09031936.06.00037005>.
- Raghu, Ganesh. 2003. « The Role of Gastroesophageal Reflux in Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *The American Journal of Medicine* 115 Suppl 3A (août): 60S-64S. [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(03\)00195-5](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(03)00195-5).
- Raghu, Ganesh, Shih-Yin Chen, Qiang Hou, Wei-Shi Yeh, et Harold R. Collard. 2016. « Incidence and Prevalence of Idiopathic Pulmonary Fibrosis in US Adults 18-64 Years Old ». *The European Respiratory Journal* 48 (1): 179-86. <https://doi.org/10.1183/13993003.01653-2015>.
- Raghu, Ganesh, Shih-Yin Chen, Wei-Shi Yeh, Brad Maroni, Qian Li, Yuan-Chi Lee, et Harold R. Collard. 2014. « Idiopathic Pulmonary Fibrosis in US Medicare Beneficiaries Aged 65 Years and Older: Incidence, Prevalence, and Survival, 2001-11 ». *The Lancet. Respiratory Medicine* 2 (7): 566-72. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70101-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70101-8).
- Raghu, Ganesh, Harold R. Collard, Jim J. Egan, Fernando J. Martinez, Juergen Behr, Kevin K. Brown, Thomas V. Colby, et al. 2011. « An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Evidence-based Guidelines for Diagnosis and Management ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 183 (6): 788-824. <https://doi.org/10.1164/rccm.2009-040GL>.
- Raghu, Ganesh, W. Craig Johnson, Diane Lockhart, et Yolanda Mageto. 1999. « Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis with a New Antifibrotic Agent, Pirfenidone ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 159 (4): 1061-69. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.159.4.9805017>.
- Ratcliffe, Peter J. 2007. « HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia? ». *Journal of Clinical Investigation* 117 (4): 862-65. <https://doi.org/10.1172/JCI31750>.
- Redline, S., P. V. Tishler, T. D. Tosteson, J. Williamson, K. Kump, I. Browner, V. Ferrette, et P. Krejci. 1995. « The Familial Aggregation of Obstructive Sleep Apnea ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 151 (3 Pt 1): 682-87. https://doi.org/10.1164/ajrccm/151.3_Pt_1.682.
- Redza-Dutordoir, Maureen, et Diana A. Averill-Bates. 2016. « Activation of Apoptosis Signalling Pathways by Reactive Oxygen Species ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1863 (12): 2977-92. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>.
- Reilly, John P., Zhiguo Zhao, Michael G. S. Shashaty, Tatsuki Koyama, Jason D. Christie, Paul N. Lanken, Chunxue Wang, et al. 2019. « Low to Moderate Air Pollutant Exposure and Acute Respiratory Distress Syndrome after Severe Trauma ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 199 (1): 62-70. <https://doi.org/10.1164/rccm.201803-0435OC>.
- Rey, Federica, Alice Balsari, Toniella Giallongo, Sara Ottolenghi, Anna M. Di Giulio, Michele Samaja, et Stephana Carelli. 2019. « Erythropoietin as a Neuroprotective Molecule: An Overview of Its Therapeutic Potential in Neurodegenerative Diseases ». *ASN NEURO* 11 (août). <https://doi.org/10.1177/1759091419871420>.
- Rezoagli, Emanuele, Roberto Fumagalli, et Giacomo Bellani. 2017. « Definition and epidemiology of acute respiratory distress syndrome ». *Annals of Translational Medicine* 5 (14). <https://doi.org/10.21037/atm.2017.06.62>.
- Ribeiro, Carla, et Bob Lubamba. 2017. « Role of IRE1 α /XBP-1 in cystic fibrosis airway inflammation ». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (janvier): 118. <https://doi.org/10.3390/ijms18010118>.
- Richeldi, L., H. R. Davies, G. Ferrara, et F. Franco. 2003. « Corticosteroids for Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, n° 3: CD002880. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002880>.
- Richeldi, Luca, Roland M. du Bois, Ganesh Raghu, Arata Azuma, Kevin K. Brown, Ulrich Costabel, Vincent Cottin, et al. 2014. « Efficacy and Safety of Nintedanib in Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *The New England Journal of Medicine* 370 (22): 2071-82. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1402584>.
- Row, Barry W., Rugao Liu, Wei Xu, Leila Kheirandish, et David Gozal. 2003. « Intermittent Hypoxia Is Associated with Oxidative Stress and Spatial Learning Deficits in the Rat ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 167 (11): 1548-53. <https://doi.org/10.1164/rccm.200209-1050OC>.
- Schiza, Sophia, Charalampos Mermigkis, George A. Margaritopoulos, Zoi Daniil, Sergio Harari, Venerino Poletti, Elisabetta A. Renzoni, et al. 2015. « Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Sleep Disorders: No

- Longer Strangers in the Night ». *European Respiratory Review* 24 (136): 327-39.
<https://doi.org/10.1183/16000617.00009114>.
- Schröder, Martin, et Randal J. Kaufman. 2005. « The Mammalian Unfolded Protein Response ». *Annual Review of Biochemistry* 74: 739-89. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134>.
- Schulz, Richard, Siamak Mahmoudi, Katja Hattar, Ulf Sibelius, Horst Olschewski, Konstantin Mayer, Werner Seeger, et Friedrich Grimminger. 2000. « Enhanced Release of Superoxide from Polymorphonuclear Neutrophils in Obstructive Sleep Apnea ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 162 (2): 566-70. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.2.9908091>.
- Schwab, R. J., K. B. Gupta, W. B. Geffer, L. J. Metzger, E. A. Hoffman, et A. I. Pack. 1995. « Upper Airway and Soft Tissue Anatomy in Normal Subjects and Patients with Sleep-Disordered Breathing. Significance of the Lateral Pharyngeal Walls ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 152 (5 Pt 1): 1673-89. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.152.5.7582313>.
- Schwab, Richard J, Michael Pasirstein, Robert Pierson, Adonna Mackley, Robert Hachadoorian, Raanan Arens, Greg Maislin, et Allan I Pack. 2003. « Identification of upper airway anatomic risk factors for obstructive sleep apnea with volumetric magnetic resonance imaging ». *American journal of respiratory and critical care medicine* 168 (5): 522-30.
- Schwarz, Dianne S., et Michael D. Blower. 2016. « The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 73: 79-94. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2052-6>.
- Seibold, Max A., Anastasia L. Wise, Marcy C. Speer, Mark P. Steele, Kevin K. Brown, James E. Loyd, Tasha E. Fingerlin, et al. 2011. « A Common MUC5B Promoter Polymorphism and Pulmonary Fibrosis ». *The New England Journal of Medicine* 364 (16): 1503-12. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1013660>.
- 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): 364-72.
<https://doi.org/10.1513/pats.200601-003TK>.
- Selman, M., T. E. King, A. Pardo, American Thoracic Society, European Respiratory Society, et American College of Chest Physicians. 2001. « Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Prevailing and Evolving Hypotheses about Its Pathogenesis and Implications for Therapy ». *Annals of Internal Medicine* 134 (2): 136-51. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-134-2-200101160-00015>.
- Selman, Moisés, et Annie Pardo. 2014. « Revealing the Pathogenic and Aging-related Mechanisms of the Enigmatic Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Integral Model ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 189 (10): 1161-72. <https://doi.org/10.1164/rccm.201312-2221PP>.
- Semenza, Gregg L. 2011. « Oxygen Sensing, Homeostasis, and Disease ». *New England Journal of Medicine* 365 (6): 537-47. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1011165>.
- Senaratna, Chamara V., Jennifer L. Perret, Caroline J. Lodge, Adrian J. Lowe, Brittany E. Campbell, Melanie C. Matheson, Garun S. Hamilton, et Shyamali C. Dharmage. 2017. « Prevalence of Obstructive Sleep Apnea in the General Population: A Systematic Review ». *Sleep Medicine Reviews* 34: 70-81.
<https://doi.org/10.1016/j.smrv.2016.07.002>.
- Sgalla, Giacomo, Mariachiara Flore, Matteo Siciliano, et Luca Richeldi. 2020. « Antibody-based therapies for idiopathic pulmonary fibrosis ». *Expert Opinion on Biological Therapy* 20 (7): 779-86.
<https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1735346>.
- Shi, Zhihui, Linhao Xu, Hui Xie, Ruoyun Ouyang, Ya Ke, Rui Zhou, et Wing-Ho Yung. 2020. « Attenuation of Intermittent Hypoxia-Induced Apoptosis and Fibrosis in Pulmonary Tissues via Suppression of ER Stress Activation ». *BMC Pulmonary Medicine* 20 (1): 92. <https://doi.org/10.1186/s12890-020-1123-0>.
- Sirén, Anna-Leena, Theresa Fasshauer, Claudia Bartels, et Hannelore Ehrenreich. 2009. « Therapeutic Potential of Erythropoietin and Its Structural or Functional Variants in the Nervous System ». *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 6 (1): 108-27.
<https://doi.org/10.1016/j.nurt.2008.10.041>.
- Sisson, Thomas H., Michael Mendez, Karen Choi, Natalya Subbotina, Anthony Courey, Andrew Cunningham, Aditi Dave, et al. 2010. « Targeted Injury of Type II Alveolar Epithelial Cells Induces Pulmonary Fibrosis ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 181 (3): 254-63.
<https://doi.org/10.1164/rccm.200810-1615OC>.
- « Sleep-Related Breathing Disorders in Adults: Recommendations for Syndrome Definition and Measurement Techniques in Clinical Research ». 1999. *Sleep* 22 (5): 667-89. <https://doi.org/10.1093/sleep/22.5.667>.
- Soliz, Jorge, Vincent Joseph, Christophe Soulage, Csilla Becskei, Johannes Vogel, Jean Marc Pequignot, Omolara Ogunshola, et Max Gassmann. 2005. « Erythropoietin Regulates Hypoxic Ventilation in Mice by Interacting with Brainstem and Carotid Bodies ». *The Journal of Physiology* 568 (Pt 2): 559-71.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.093328>.
- Song, Shuling, Jin Tan, Yuyang Miao, Zuoming Sun, et Qiang Zhang. 2018. « Intermittent-Hypoxia-Induced Autophagy Activation Through the ER-Stress-Related PERK/EIF2 α /ATF4 Pathway Is a Protective

- Response to Pancreatic β -Cell Apoptosis ». *Cellular Physiology and Biochemistry* 51 (6): 2955-71. <https://doi.org/10.1159/000496047>.
- Srijithesh, P R, Rajeswari Aghoram, Amit Goel, et Jayaraj Dhanya. 2019. « Positional therapy for obstructive sleep apnoea ». *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2019 (5). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010990.pub2>.
- Strongman, Helen, Imran Kausar, et Toby M. Maher. 2018. « Incidence, Prevalence, and Survival of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis in the UK ». *Advances in Therapy* 35 (5): 724-36. <https://doi.org/10.1007/s12325-018-0693-1>.
- Sweeney, Rob Mac, et Daniel F. McAuley. 2016. « Acute Respiratory Distress Syndrome ». *The Lancet* 388 (10058): 2416-30. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00578-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00578-X).
- Szegezdi, Eva, Susan E Logue, Adrienne M Gorman, et Afshin Samali. 2006. « Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis ». *EMBO Reports* 7 (9): 880-85. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400779>.
- Tashiro, Jun, Gustavo A. Rubio, Andrew H. Limper, Kurt Williams, Sharon J. Elliot, Ioanna Ninou, Vassilis Aidinis, Argyrios Tzouvelekis, et Marilyn K. Glassberg. 2017. « Exploring Animal Models That Resemble Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *Frontiers in Medicine* 4 (juillet). <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00118>.
- Taveira, Karinna Veríssimo Meira, Morgane Marion Kuntze, Fernanda Berretta, Beatriz Dulcinea Mendes de Souza, Luiz Roberto Godolfim, Thiago Demathe, Graziela De Luca Canto, et André Luís Porporatti. 2018. « Association between Obstructive Sleep Apnea and Alcohol, Caffeine and Tobacco: A Meta-Analysis ». *Journal of Oral Rehabilitation* 45 (11): 890-902. <https://doi.org/10.1111/joor.12686>.
- Thille, Arnaud W., Andrés Esteban, Pilar Fernández-Segoviano, José-María Rodríguez, José-Antonio Aramburu, Patricio Vargas-Errázuriz, Ana Martín-Pellicer, José A. Lorente, et Fernando Frutos-Vivar. 2013. « Chronology of Histological Lesions in Acute Respiratory Distress Syndrome with Diffuse Alveolar Damage: A Prospective Cohort Study of Clinical Autopsies ». *The Lancet. Respiratory Medicine* 1 (5): 395-401. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(13\)70053-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(13)70053-5).
- Thomson, Carey C., Abhijit Duggal, Thomas Bice, David J. Lederer, Kevin C. Wilson, et Ganesh Raghu. 2019. « 2018 Clinical Practice Guideline Summary for Clinicians: Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *Annals of the American Thoracic Society* 16 (3): 285-90. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201809-604CME>.
- Tian, Yaqiong, Hui Li, Ting Qiu, Jinghong Dai, Yingwei Zhang, Jingyu Chen, et Hourong Cai. 2019. « Loss of PTEN Induces Lung Fibrosis via Alveolar Epithelial Cell Senescence Depending on NF-KB Activation ». *Aging Cell* 18 (1): e12858. <https://doi.org/10.1111/acel.12858>.
- Tietjens Jeremy R., Claman David, Kezirian Eric J., De Marco Teresa, Mirzayan Armen, Sadroonri Bijan, Goldberg Andrew N., Long Carlin, Gerstenfeld Edward P., et Yeghiazarians Yerem. 2019. « Obstructive Sleep Apnea in Cardiovascular Disease: A Review of the Literature and Proposed Multidisciplinary Clinical Management Strategy ». *Journal of the American Heart Association* 8 (1): e010440. <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.010440>.
- Trethewey, Samuel P., et Gareth I. Walters. 2018. « The Role of Occupational and Environmental Exposures in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Narrative Literature Review ». *Medicina* 54 (6). <https://doi.org/10.3390/medicina54060108>.
- Troy, Lauren K, et Tamera J Corte. 2014. « Sleep disordered breathing in interstitial lung disease: A review ». *World Journal of Clinical Cases: WJCC* 2 (12): 828-34. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v2.i12.828>.
- Tuleta, Izabela, Carmen Pizarro, Georg Nickenig, Uwe Juergens, et Dirk Skowasch. 2016. « Deleterious Effects of Intermittent Hypoxia on Lung Tissue ». *European Respiratory Journal* 48 (suppl 60). <https://doi.org/10.1183/13993003.congress-2016.PA2070>.
- Tzouvelekis, Argyris, Vaggelis Harokopos, Triantafillos Papatountas, Nikos Oikonomou, Aristotelis Chatziioannou, George Vilaras, Evangelos Tsiambas, Andreas Karameris, Demosthenes Bouros, et Vassilis Aidinis. 2007. « Comparative Expression Profiling in Pulmonary Fibrosis Suggests a Role of Hypoxia-Inducible Factor-1alpha in Disease Pathogenesis ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 176 (11): 1108-19. <https://doi.org/10.1164/rccm.200705-683OC>.
- Uhal, B. D. 2008. « The Role of Apoptosis in Pulmonary Fibrosis ». *European Respiratory Review* 17 (109): 138-44. <https://doi.org/10.1183/09059180.00010906>.
- Uhal, B. D., I. Joshi, A. L. True, S. Mundle, A. Raza, A. Pardo, et M. Selman. 1995. « Fibroblasts Isolated after Fibrotic Lung Injury Induce Apoptosis of Alveolar Epithelial Cells in Vitro ». *The American Journal of Physiology* 269 (6 Pt 1): L819-828. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1995.269.6.L819>.
- Uhal, Bruce D., Iravati Joshi, W. Frank Hughes, Carlos Ramos, Annie Pardo, et Moises Selman. 1998. « Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung ». *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 275 (6): L1192-99. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1998.275.6.L1192>.

- Unnikrishnan, Dileep, Jonathan Jun, et Vsevolod Polotsky. 2015. « Inflammation in Sleep Apnea: An Update ». *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 16 (1): 25-34. <https://doi.org/10.1007/s11154-014-9304-x>.
- Uzunhan, Yurdagül, Olivier Bernard, Dominique Marchant, Nicolas Dard, Valérie Vanneaux, Jérôme Larghero, Thomas Gille, et al. 2015. « Mesenchymal stem cells protect from hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition ». *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 310 (5): L439-51. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00117.2015>.
- Verfaillie, Tom, Maria Salazar, Guillermo Velasco, et Patrizia Agostinis. 2010. « Linking ER Stress to Autophagy: Potential Implications for Cancer Therapy ». *International Journal of Cell Biology* 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/930509>.
- Verkman, A. S., Michael A. Matthay, et Yuanlin Song. 2000. « Aquaporin water channels and lung physiology ». *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 278 (5): L867-79. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.278.5.L867>.
- Voituron, Nicolas, Florine Jeton, Yannick Cholley, Raja El Hasnaoui-Saadani, Dominique Marchant, Patricia Quidu, Fabrice Favret, Jean-Paul Richalet, et Aurélien Pichon. 2014. « Catalyzing role of erythropoietin on the nitric oxide central pathway during the ventilatory responses to hypoxia ». *Physiological Reports* 2 (2). <https://doi.org/10.1002/phy2.223>.
- Wang, Pan, Meijing Long, Shijie Zhang, Zhenyun Cheng, Xin Zhao, Fucheng He, Hongchun Liu, et Liang Ming. 2017. « Hypoxia inducible factor-1 α regulates autophagy via the p27-E2F1 signaling pathway ». *Molecular Medicine Reports* 16 (2): 2107-12. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6794>.
- Wang, Yongyu, Phillip J. Kuan, Chao Xing, Jennifer T. Cronkhite, Fernando Torres, Randall L. Rosenblatt, J. Michael DiMaio, Lisa N. Kinch, Nick V. Grishin, et Christine Kim Garcia. 2009. « Genetic Defects in Surfactant Protein A2 Are Associated with Pulmonary Fibrosis and Lung Cancer ». *American Journal of Human Genetics* 84 (1): 52-59. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.11.010>.
- Ware, Lorraine B., Zhiguo Zhao, Tatsuki Koyama, Addison K. May, Michael A. Matthay, Fred W. Lurmann, John R. Balmes, et Carolyn S. Calfee. 2016. « Long-Term Ozone Exposure Increases the Risk of Developing the Acute Respiratory Distress Syndrome ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 193 (10): 1143-50. <https://doi.org/10.1164/rccm.201507-1418OC>.
- Watts, Emily R., et Sarah R. Walmsley. 2019. « Inflammation and Hypoxia: HIF and PHD Isoform Selectivity ». *Trends in Molecular Medicine* 25 (1): 33-46. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.10.006>.
- Weibel, E. R., et J. Gil. 1968. « Electron Microscopic Demonstration of an Extracellular Duplex Lining Layer of Alveoli ». *Respiration Physiology* 4 (1): 42-57. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(68\)90006-6](https://doi.org/10.1016/0034-5687(68)90006-6).
- Weigelt, J. A., J. F. Norcross, K. R. Borman, et W. H. Snyder. 1985. « Early Steroid Therapy for Respiratory Failure ». *Archives of Surgery (Chicago, Ill.: 1960)* 120 (5): 536-40. <https://doi.org/10.1001/archsurg.1985.01390290018003>.
- Wert, Susan E., Jeffrey A. Whitsett, et Lawrence M. Noguee. 2009. « Genetic Disorders of Surfactant Dysfunction ». *Pediatric and developmental pathology : the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society* 12 (4): 253-74. <https://doi.org/10.2350/09-01-0586.1>.
- Whyte, Andy, et Daren Gibson. 2018. « Imaging of Adult Obstructive Sleep Apnoea ». *European Journal of Radiology* 102 (mai): 176-87. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2018.03.010>.
- Williamson, James D., Laura R. Sadofsky, et Simon P. Hart. 2015. « The pathogenesis of bleomycin-induced lung injury in animals and its applicability to human idiopathic pulmonary fibrosis ». *Experimental Lung Research* 41 (2): 57-73. <https://doi.org/10.3109/01902148.2014.979516>.
- Willis, Brigham C., Janice M. Liebler, Katherine Luby-Phelps, Andrew G. Nicholson, Edward D. Crandall, Roland M. du Bois, et Zea Borok. 2005. « Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition in Alveolar Epithelial Cells by Transforming Growth Factor-Beta1: Potential Role in Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *The American Journal of Pathology* 166 (5): 1321-32. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)62351-6](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)62351-6).
- Wollin, Lutz, Isabelle Mailliet, Valérie Quesniaux, Alexander Holweg, et Bernhard Ryffel. 2014. « Antifibrotic and Anti-Inflammatory Activity of the Tyrosine Kinase Inhibitor Nintedanib in Experimental Models of Lung Fibrosis ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 349 (2): 209-20. <https://doi.org/10.1124/jpet.113.208223>.
- Wollin, Lutz, Eva Wex, Alexander Pautsch, Gisela Schnapp, Katrin E. Hostettler, Susanne Stowasser, et Martin Kolb. 2015. « Mode of Action of Nintedanib in the Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *The European Respiratory Journal* 45 (5): 1434-45. <https://doi.org/10.1183/09031936.00174914>.
- Wysocka, E., S. Cofta, M. Cymerys, J. Gozdzik, L. Torlinski, et H. Batura-Gabryel. 2008. « The Impact of the Sleep Apnea Syndrome on Oxidant-Antioxidant Balance in the Blood of Overweight and Obese Patients ». *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society* 59 Suppl 6 (décembre): 761-69.

- Xie, Jing, Jianzhong Jiang, Keyun Shi, Tingting Zhang, Taofeng Zhu, Hong Chen, Ruhua Chen, et al. 2014. « DNA Damage in Peripheral Blood Lymphocytes from Patients with OSAHS ». *Sleep & Breathing = Schlaf & Atmung* 18 (4): 775-80. <https://doi.org/10.1007/s11325-014-0942-8>.
- Xie, Zhi-Zhong, Yang Liu, et Jin-Song Bian. 2016. « Hydrogen Sulfide and Cellular Redox Homeostasis ». Review Article. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi. 5 janvier 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6043038>.
- Xu, Lin-Hao, Hui Xie, Zhi-Hui Shi, Li-Da Du, Yun-Kwok Wing, Albert M. Li, Ya Ke, et Wing-Ho Yung. 2015. « Critical Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Chronic Intermittent Hypoxia-Induced Deficits in Synaptic Plasticity and Long-Term Memory ». *Antioxidants & Redox Signaling* 23 (9): 695-710. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6122>.
- Xu, W., L. Chi, B. W. Row, R. Xu, Y. Ke, B. Xu, C. Luo, L. Kheirandish, D. Gozal, et R. Liu. 2004. « Increased Oxidative Stress Is Associated with Chronic Intermittent Hypoxia-Mediated Brain Cortical Neuronal Cell Apoptosis in a Mouse Model of Sleep Apnea ». *Neuroscience* 126 (2): 313-23. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.03.055>.
- Yamauchi, Motoo, Hiroshi Nakano, Junko Maekawa, Yukinori Okamoto, Yoshinobu Ohnishi, Takahiro Suzuki, et Hiroshi Kimura. 2005. « Oxidative Stress in Obstructive Sleep Apnea ». *Chest* 127 (5): 1674-79. <https://doi.org/10.1378/chest.127.5.1674>.
- Ye, J., R. B. Rawson, R. Komuro, X. Chen, U. P. Davé, R. Prywes, M. S. Brown, et J. L. Goldstein. 2000. « ER Stress Induces Cleavage of Membrane-Bound ATF6 by the Same Proteases That Process SREBPs ». *Molecular Cell* 6 (6): 1355-64. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00133-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00133-7).
- Yoshida, H., T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada, et K. Mori. 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): 881-91. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00611-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00611-0).
- Yoshida, Hiderou, Toshie Matsui, Nobuko Hosokawa, Randal J. Kaufman, Kazuhiro Nagata, et Kazutoshi Mori. 2003. « A Time-Dependent Phase Shift in the Mammalian Unfolded Protein Response ». *Developmental Cell* 4 (2): 265-71. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00022-4](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00022-4).
- Yoshimi, Michihiro, Takashige Maeyama, Mizuho Yamada, Naoki Hamada, Jyutaro Fukumoto, Tomonobu Kawaguchi, Kazuyoshi Kuwano, et Yoichi Nakanishi. 2008. « Recombinant Human Erythropoietin Reduces Epithelial Cell Apoptosis and Attenuates Bleomycin-Induced Pneumonitis in Mice ». *Respirology (Carlton, Vic.)* 13 (5): 639-45. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2008.01324.x>.
- Young, T., M. Palta, J. Dempsey, J. Skatrud, S. Weber, et S. Badr. 1993. « The Occurrence of Sleep-Disordered Breathing among Middle-Aged Adults ». *The New England Journal of Medicine* 328 (17): 1230-35. <https://doi.org/10.1056/NEJM199304293281704>.
- Young, Terry, Paul E. Peppard, et Daniel J. Gottlieb. 2002. « Epidemiology of Obstructive Sleep Apnea: A Population Health Perspective ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 165 (9): 1217-39. <https://doi.org/10.1164/rccm.2109080>.
- Yuan, Guoxiang, Jayasri Nanduri, Shakil Khan, Gregg L. Semenza, et Nanduri R. Prabhakar. 2008. « Induction of HIF-1 α Expression by Intermittent Hypoxia: Involvement of NADPH Oxidase, Ca²⁺ Signaling, Prolyl Hydroxylases, and mTOR ». *Journal of cellular physiology* 217 (3): 674-85. <https://doi.org/10.1002/jcp.21537>.
- Zhang, Jinhua, Daqiang Zhao, Ning Na, Heng Li, Bin Miao, Liangqing Hong, et Zhengyu Huang. 2018. « Renoprotective Effect of Erythropoietin via Modulation of the STAT6/MAPK/NF-KB Pathway in Ischemia/Reperfusion Injury after Renal Transplantation ». *International Journal of Molecular Medicine* 41 (1): 25-32. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3204>.
- Zhang, Lei, Yi Wang, Guorao Wu, Weining Xiong, Weikuan Gu, et Cong-Yi Wang. 2018. « Macrophages: friend or foe in idiopathic pulmonary fibrosis? ». *Respiratory Research* 19 (1): 170. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0864-2>.
- Zhang, Tingting, Ningning Li, Chaoyang Sun, Yang Jin, et Xia Sheng. 2020. « MYC and the unfolded protein response in cancer: synthetic lethal partners in crime? ». *EMBO Molecular Medicine* 12 (5): e11845. <https://doi.org/10.15252/emmm.201911845>.
- Zhang, Xiang, Qin-Ying Li, et Bao-Guo Xiao. 2012. « Anti-Inflammatory Effect of Erythropoietin Therapy on Experimental Autoimmune Encephalomyelitis ». *The International Journal of Neuroscience* 122 (5): 255-62. <https://doi.org/10.3109/00207454.2011.648761>.
- Zhang, Xiaohuan, Yanwen Mao, Wei Peng, Huiming Liu, Luqun Liang, Dan Wang, Lingling Liu, et al. 2020. « Autophagy-Related Protein EI24 Delays the Development of Pulmonary Fibrosis by Promoting Autophagy ». *Life Sciences*, octobre, 118664. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118664>.