



UNIVERSITÉ PARIS XIII - SORBONNE PARIS NORD

École Doctorale Galilée

Développement d'un nouveau modèle murin de fibrose pulmonaire pour l'étude de l'impact des apnées du sommeil et des exacerbations sur la fonction respiratoire. Répercussions sur le fonctionnement du réseau neuronal respiratoire.

THÈSE DE DOCTORAT DE BIOLOGIE

Présentée par

Céline-Hivda YEGEN

INSERM U1272-Laboratoire Hypoxie et Poumon

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR

Soutenue devant le jury d'examen composé de :

Dr. LANONE Sophie,..... Présidente du jury/Examinatrice

Dr. BURGY Olivier,..... Examinateur

Pr. BODINEAU Laurence,..... Rapporteur

Pr. PLANTIER Laurent,..... Rapporteur

Pr. BONCOEUR Émilie, Co-Directrice de thèse

Pr. VOITURON Nicolas,..... Co-Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'expertiser mon travail de thèse, au professeur **Sophie LANONE** d'examiner ma thèse et présider ce jury, au professeur **Laurence BODINEAU** et au professeur **Laurent PLANTIER**, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse, au docteur **Olivier BURG** d'être examinateur de mon travail.

Mes remerciements s'adressent tout d'abord au professeur **Carole PLANÈS**, directrice du laboratoire « Hypoxie et Poumon » U1272 au sein duquel elle m'a accueilli. Je vous remercie pour votre gentillesse, votre disponibilité, pour tous les conseils que vous m'avez donnés.

Maintenant, place à mes mentors, mes chefs ; je tiens à remercier mes directeurs de thèse le professeur **Nicolas VOITURON** et la professeur **Émilie BONCOEUR** d'avoir accepté de diriger ma thèse. Il n'y a aucun doute, sans vous cette thèse n'aurait pas été ce qu'elle est... En effet, être co-encadré par deux directeurs peut paraître compliqué mais pas du tout... être managé par un duo formé de deux experts scientifiques et humainement brillantissime procure une chance infaillible au bon déroulement de la thèse. Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de votre équipe dès mon arrivée au laboratoire. Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir guidé et épaulé pendant toute la durée de mon doctorat tout en me laissant beaucoup de liberté mais jamais toute seule, je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez fait pour moi au cours de toutes ces années. Votre expertise, votre patience, votre sens de l'écoute et vos esprits critiques m'ont poussé à avancer toujours plus loin. Merci pour les toutes les pauses café qui ont toujours été très enrichissantes (:D) de m'avoir supporté mais également supporté tous mes « gifs ». Je vous remercie énormément pour les conseils apportés dans la rédaction et les corrections de mon manuscrit de thèse.

Je remercie **Dominique MARCHAND** pour votre générosité, votre gentillesse et votre bonne humeur. Dominique merci d'avoir été disponible à tout moment et d'avoir été présent dans les moments les plus compliqués.

Je remercie tous les étudiants rencontrés durant ces années passés au laboratoire. Tout d'abord, **Liasmine**, merci de m'avoir soutenue tout au long de mon parcours dans ce laboratoire. Je ne te remercierai jamais assez pour tous ces moments que nous avons passé ensemble, merci pour ton soutien et ton aide qui m'ont été toujours très importants. Merci pour ta gentillesse et ton

soutient sans faille. **Abdallah**, merci de m'avoir toujours soutenu tout au long de ma thèse, je te remercie pour ta disponibilité, ton sens de l'écoute, ta gentillesse et ton encouragement. **Eva**, je te remercie pour l'ambiance chaleureuse que tu instaurais au laboratoire, merci pour tout tes conseils et ta générosité. Nesrine, ablacim, merci pour ta gentillesse et ta personnalité, je te remercie pour ton soutien dans les bons moments comme les plus compliqué. Je tiens également à remercier toutes les personnes que j'ai rencontré au cours de cette thèse, **Florence Jenny, Thomas Gille, Juliette, Thomas Charrier, Raphael, Nathan, Simon, Thinhinane, Mariem, Issia, Hatice, Sevda, Nour, Célia, Olivier, Nadjib, Adil, Ténin, Samia, Kévin, Rose, Christian, Stacy, Nihad**, pour la bonne ambiance que vous avez instauré au laboratoire.

Je tiens à remercier **Valérie BESNARD**, merci pour votre gentillesse et votre disponibilité. Mes remerciements ne seront pas assez pour tous les échanges que nous avons eu en histologie. Je vous remercie pour votre disponibilité et votre écoute.

Je remercie **Nicolas DARD**, je vous remercie pour tous les conseils que vous m'avez donnés et pour votre gentillesse.

Je remercie le professeur **Jean-François BERNAUDIN** pour sa gentillesse, sa disponibilité sans faille et ses précieux conseils. Je vous remercie pour tout ce que vous m'avez appris en histologie, les séances d'analyses des biopsies pulmonaires ont été la clé de voute dans l'avancé de ma thèse.

Je tiens également à remercier **Patricia Quidu, Jean-Paul Richalet, François Lhuissier, Alexandre Guimard, Eric Hermand, Hilaria Onorati, Dana Radu, Maria-Luisa Pérez Lozano, Annie Sadoun** pour vos encouragements, vos disponibilités et votre soutien.

Je tiens également à remercier **Roxane** pour la formation microscopie.

Je remercie les techniciennes de la plateforme d'histologie **Naima & Odile** pour leur aide et leur disponibilité.

Je remercie également aux techniciens animaliers : **Sonia, Samira et Mor**.

Je remercie ma famille pour avoir toujours été là et pour votre confiance, je n'aurai jamais pu avancer sans vous...Je ne remercierai jamais assez ma maman qui m'a toujours soutenu sans douter, merci pour m'avoir toujours guidé, conseillé, épaulé et suivi. Je remercie mes frères

pour leur gentillesse, leur bienveillance et leur soutien infailible durant toute cette thèse.
Merci pour m'avoir écouté et conseillé...

Je remercie mon mari de m'avoir soutenue durant toute cette thèse, merci de m'avoir soutenu au quotidien et dans les moments difficiles. Je te remercie pour tous les conseils que tu m'as apporté dans la rédaction et la relecture de ce manuscrit.

Table de matière

Remerciements	- 2 -
Table de matière	- 5 -
Liste des abréviations	- 10 -
Liste des figures	- 13 -
Listes des tables	- 15 -
Autres publications	- 16 -
Préambule	- 19 -
Introduction	- 21 -
Partie I : La ventilation pulmonaire et son contrôle par le réseau neuronal respiratoire	- 21 -
Chapitre I : La ventilation pulmonaire	- 21 -
I. La mécanique ventilatoire.....	- 21 -
1) L'inspiration, Phase I.....	- 21 -
2) La post-inspiration ou expiration précoce, Phase E1.....	- 23 -
3) L'expiration tardive, Phase E2	- 24 -
II. Les capacités ventilatoires pulmonaire et la respiration.....	- 24 -
1) Les volumes et capacités pulmonaires	- 24 -
2) Compliance et élastance thoraco-pulmonaire	- 25 -
a. Généralités.....	- 25 -
b. Altération de la compliance et l'élastance thoraco-pulmonaire	- 25 -
3) De la zone de conduction... ..	- 26 -
4) ... à la zone respiratoire : L'épithélium alvéolaire.....	- 29 -
a. Composition cellulaire de l'épithélium alvéolaire	- 29 -
b. Le surfactant	- 31 -
c. Les échanges gazeux à travers la barrière alvéolo-capillaire	- 32 -
Chapitre II : La commande centrale respiratoire	- 32 -
I. Organisation anatomique et fonctionnelle du réseau neuronal respiratoire bulbo-pontique	- 34 -
1) Les structures bulbaires.....	- 35 -
a. Le Noyau du tractus solitaire (NTS)	- 36 -
b. Le Groupe respiratoire ventral (VRG)	- 37 -
c. Le complexe de Bötzing (BötC).....	- 37 -
d. Le complexe de pré-Bötzing (préBötC).....	- 38 -

e.	La surface ventrale du bulbe rachidien (noyau rétrotrapézoïde (RTN) / groupe respiratoire parafacial (pFRG)).....	- 39 -
f.	Les Raphés bulbaires	- 40 -
g.	Le complexe post-inspiratoire (PiCo).....	- 41 -
2)	Les structures pontiques	- 42 -
II.	Origine du rythme respiratoire	- 43 -
1)	Hypothèse réseau.....	- 44 -
2)	Hypothèse pacemaker.....	- 45 -
3)	Hypothèse hybride	- 45 -
	Chapitre III : Modulation et régulation de la ventilation	- 47 -
I.	Réponses ventilatoires à l'hypoxie et l'hypercapnie	- 47 -
1)	Les chémorécepteurs	- 47 -
a.	Les chémorécepteurs périphériques	- 47 -
b.	Les chémorécepteurs centraux.....	- 50 -
2)	Régulation ventilatoire suite à un stimulus chimique	- 51 -
a.	Adaptation de la commande centrale respiratoire à l'hypoxie	- 51 -
i.	Réponse ventilatoire à l'hypoxie : HVR	- 52 -
ii.	Mécanismes responsables de la réponse ventilatoire à l'hypoxie	- 52 -
b.	Adaptation de la commande centrale respiratoire à l'hypercapnie	- 53 -
i.	Réponse ventilatoire à l'hypercapnie : HcVR	- 53 -
ii.	Mécanismes responsables de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie.....	- 54 -
3)	Les mécanorécepteurs	- 56 -
a.	Les mécanorécepteurs pharyngés	- 57 -
b.	Les récepteurs d'étirement pulmonaire	- 58 -
c.	Les récepteurs bronchiques.....	- 60 -
d.	Les récepteurs proprioceptifs de la paroi thoracique.....	- 60 -
e.	Les récepteurs alvéolaires Juxtapillaires.....	- 60 -
II.	La ventilation : un acte moteur plastique	- 63 -
1)	Plasticité respiratoire en réponse à l'hypoxie intermittente chronique	- 63 -
2)	Les protéines FosB/ Δ FosB, marqueurs d'activité neuronale à long terme.....	- 64 -
	Partie II : La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI)	- 67 -
	Chapitre I : Généralités et Classification	- 67 -
I.	Description et épidémiologie de la fibrose pulmonaire idiopathique.....	- 67 -
1)	Généralités	- 67 -
2)	Classification des Pneumopathies Interstitielles Diffuses (PID).....	- 67 -
3)	Diagnostic de la Fibrose Pulmonaire Idiopathique : un diagnostic multidisciplinaire	- 68 -
a.	L'examen clinique	- 68 -
b.	L'examen radiologique	- 69 -

c.	L'examen anatomo-pathologique.....	- 70 -
d.	Examens complémentaires.....	- 72 -
e.	Les exacerbations aiguës rencontrées dans la fibrose pulmonaire idiopathique.....	- 73 -
i.	Généralités.....	- 73 -
ii.	Potentielles étiologies des exacerbations aiguës.....	- 75 -
iii.	Diagnostic clinique des exacerbations aiguës.....	- 75 -
iv.	Histologie/ moléculaire.....	- 75 -
	Chapitre II : Mécanismes physiopathologiques rencontrés dans la FPI.....	- 77 -
I.	Physiopathologie de la fibrose pulmonaire idiopathique.....	- 77 -
1)	Mécanisme de lésion réparation : Agression/réparation physiologique.....	- 77 -
2)	Mécanisme de lésion puis réparation dans le cas de la Fibrose Pulmonaire Idiopathique.....	- 80 -
a.	Dérégulation de la réponse inflammatoire.....	- 82 -
b.	Perte du phénotype épithélial.....	- 83 -
c.	L'apoptose.....	- 83 -
d.	La Transition Épithélio-Mésenchymateuse.....	- 86 -
e.	La sénescence.....	- 89 -
v.	Hyperactivation des fibroblastes.....	- 91 -
3)	Stress oxydant, Stress du réticulum endoplasmique et hypoxie : un rôle crucial dans la fibrogénèse.....	- 92 -
a.	Le stress oxydatif dans la FPI.....	- 92 -
b.	Le stress du RE dans la FPI.....	- 94 -
c.	Hypoxie dans la FPI.....	- 97 -
4)	Traitement de la FPI.....	- 101 -
5)	Les syndromes d'apnées du sommeil chez les patients atteints de FPI.....	- 102 -
	Partie III : L'hypoxie Intermittente Chronique, un facteur de risque de la FPI ?	- 103 -
	Chapitre I : le syndrome d'apnées-hypopnées obstructive du sommeil.....	- 103 -
I.	Les troubles du sommeil de l'adulte : définition et généralités.....	- 103 -
II.	Le Syndrome d'Apnées Hypopnées Obstructive du Sommeil (SAHOS).....	- 106 -
1)	Description du syndrome d'apnées hypopnées obstructive du sommeil.....	- 106 -
a.	Définition.....	- 106 -
b.	Sévérité du SAHOS.....	- 106 -
c.	Hypoxémie et micro-éveils.....	- 107 -
d.	Facteurs de risques.....	- 109 -
e.	Comorbidités, complications et mortalité du SAHOS.....	- 110 -
f.	Syndrome d'apnées du sommeil et fibrose pulmonaire idiopathique.....	- 111 -
g.	Traitements des SAHOS.....	- 111 -
	Chapitre II : L'hypoxie intermittente chronique (HIC).....	- 113 -
I.	Effets de l'hypoxie intermittente chronique sur la commande centrale respiratoire.....	- 113 -

1)	Effet sur les chémorécepteurs.....	- 113 -
2)	Effet sur la réponse à l'hypoxie et à l'hypercapnie.....	- 113 -
3)	Effet sur la plasticité du réseau neuronal respiratoire	- 114 -
III.	Les effets de l'hypoxie intermittente chronique sur l'organisme	- 115 -
1)	Effets bénéfiques de l'hypoxie intermittente chronique.....	- 115 -
2)	Effets délétères de l'hypoxie intermittente chronique	- 115 -
IV.	Les effets moléculaires de l'HIC et l'impact dans la fibrogénèse	- 116 -
1)	Les effets moléculaires dans un contexte d'IHC.....	- 116 -
a.	Le stress oxydant en réponse à l'HIC	- 116 -
b.	L'inflammation en réponse à l'HIC.....	- 117 -
c.	Les stress du RE en réponse à l'HIC	- 117 -
d.	Induction du facteur HIF	- 118 -
i.	HIF et stress oxydant	- 118 -
ii.	HIF et inflammation.....	- 119 -
iii.	HIF et stress du RE.....	- 120 -

Hypothèses & objectifs.....- 121 -

Résultats.....- 122 -

Partie I : Développement d'un modèle murin de fibrose pulmonaire évolutive et persistante- 123

-

Chapitre I- Évolution et persistance de la fibrose pulmonaire après une courte exposition à la bléomycine-
124 -

- a. Évaluation de la persistance de la fibrose pulmonaire- 125 -
- b. La population cellulaire rencontrée au sein des poumons évolue au cours du temps.....- 127 -

Chapitre II- Utilisation du modèle de fibrose chronique et stable pour l'étude des exacerbations aiguës....-
130 -

Partie II : Impact d'une fibrose pulmonaire sur la commande centrale respiratoire- 166 -

Partie III : Impact du syndrome d'apnée obstructive du sommeil sur la fibrose pulmonaire

idiopathique.....- 194 -

Chapitre I- Étude moléculaire de l'impact de l'hypoxie intermittente chronique sur la sévérité de la
fibrose pulmonaire

Chapitre II- Impact d'une exposition prolongée à de l'hypoxie intermittente chronique au niveau
pulmonaire et sur l'élaboration de la commande centrale respiratoire.- 211 -

- a. Analyse des marqueurs pro-fibrosants.....- 211 -
- b. Analyse des variables ventilatoires.....- 213 -
- c. Analyse des structures respiratoires ponto-bulbaires.....- 214 -
- d. Analyse des cytokines pro-inflammatoires.....- 215 -

e.	Analyse du 8-OHdG.....	- 216 -
f.	Réponses ventilatoires à l'hypoxie (HVR)	- 217 -
g.	Réponses ventilatoires à l'hypercapnie (HcVR)	- 218 -
Chapitre III- Impact d'une exposition à de l'hypoxie intermittente chronique sur la commande centrale respiratoire dans un contexte de fibrose pulmonaire.		
		- 220 -
a.	Analyse des marqueurs pro-fibrosants et de la compliance pulmonaire	- 221 -
b.	Analyse des cytokines pro-inflammatoires.....	- 223 -
c.	Analyse de la fonction pulmonaire	- 223 -
d.	Analyse des structures respiratoires ponto-bulbaires	- 224 -
e.	Réponses ventilatoires à l'hypoxie (HVR)	- 225 -
f.	Réponses ventilatoires à l'hypercapnie (HcVR)	- 226 -
Discussion générale		- 228 -
Comparaison du modèle murin de fibrose pulmonaire obtenu par instillation unique de bléomycine à celle obtenue par instillations répétées		
		- 229 -
I.	Les modèles murins de fibrose pulmonaire	- 229 -
II.	Modèle murin de fibrose pulmonaire obtenu par instillation de bléomycine	- 230 -
1)	Rappels sur le modèle murin de fibrose pulmonaire le plus utilisé.....	- 230 -
2)	Caractéristiques du nouveau modèle murin de fibrose pulmonaire.....	- 232 -
III.	Caractérisation des évènements cellulaires et moléculaires observés dans ce modèle murin de fibrose pulmonaire	- 234 -
1)	Mise en évidence d'une apoptose des cellules pulmonaire.....	- 234 -
2)	Mise en évidence d'un stress oxydant et de l'expression des marqueurs de senescence	- 234 -
3)	La place de l'inflammation dans les exacerbations aiguës	- 235 -
Impact d'une fibrose pulmonaire sur le réseau de neurones respiratoires		- 237 -
I.	Conséquence d'une activation du réseau de neurone respiratoire en réponse à une fibrose pulmonaire.....	- 237 -
II.	Altération de la réponse ventilatoire à l'hypoxie et à l'hypercapnie dans la fibrose pulmonaire.....	- 238 -
Limite du modèle d'hypoxie intermittente chronique dans les phénomènes d'aggravation de la FPI liés au SAHOS		
		- 239 -
Conclusion et Perspectives		- 241 -
Références bibliographiques		- 245 -
Annexes.....		- 291 -

Liste des abréviations

ΔP	Variation de pression
ΔV	Variation de volume
ACCP	American College of Chest Physicians
AP-1	Protéine activatrice AP-1
ATS	American Thoracic Society
BötC	Complexe de Bötzinger
CCR	Commande Centrale Respiratoire
CEA	Cellules Épithéliales Alvéolaires
cNTS	Sous division commissurale du noyau du NTS
CO ₂	Dioxyde de Carbone
CPG	Générateur du Patron Respiratoire (Central Pattern Generator)
DLCO	Capacité de transfert du monoxyde de carbone
DRG	Groupe Respiratoire Dorsal (Dorsal Respiratory Group)
E	Épaisseur
EA	Exacerbation Aiguë
EFR	Exploration Fonctionnelle Respiratoire
ERS	European Respiratory Society
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes (Fibroblast growth factor)
FPI	Fibrose Pulmonaire Idiopathique
H ⁺	Proton
H ₂ CO ₃	Acide Carbonique
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HCO ₃ ⁻	Bicarbonate
HcVR	Réponse Ventilatoire à l'Hypercapnie (Hypercapnia Ventilatory Response)
HIC	Hypoxie intermittente chronique
HIF	Facteur inductible par l'hypoxie (Hypoxia Inducible Factor)
HVR	Réponse Ventilatoire à l'Hypoxie (Hypoxia Ventilatory Response)
IAH	Index d'apnées obstructives/hypopnées
IIPs	Pneumonies Interstitielles Idiopathiques
IL-1	Interleukine 1
IL-6	Interleukine 6
LBA	Lavage Broncho-Alvéolaire
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
MAC	Membrane Alvéolo-Capillaire
MEC	Matrice Extracellulaire
mNTS	Sous division médiane du NTS
NAC	N-acétylcystéine
Nerf IX	Nerf Glossopharyngien
Nerf X	Nerf Vague
Nerf XII	Nerf Hypoglosse

Neurones 5-HT	Neurones Sérotoninergiques
NF κ B	Facteur nucléaire kappa B
NK1R	Récepteur de la Neurokinine 1
NRP	Neurones Respiratoires Pacemaker
NTS	Noyau du Tractus Solitaire
O ₂	Dioxygène
O ₂ ⁻	Anion superoxyde
PaCO ₂	Pression Partielle artérielle en CO ₂
PaO ₂	Pression Partielle artérielle en O ₂
PCO ₂	Pression Partielle en CO ₂
PDGF	Platelet-derived growth factor
pFL	Noyau Latéral Parafacial
pFRG	Groupe Respiratoire Parafacial
pFV	Noyau Parafacial
pH	Potentiel Hydrogène
Phase E1	Phase post-inspiratoire
Phase E2	Expiration tardive
Phase I	Phase Inspiratoire
PI	Pneumocytes de type I
PIC	Pneumopathies Interstitielles Communes
PiCo	Complexe Post-Inspiratoire
PID	Pneumopathies Interstitielles Diffuses
PII	Pneumocytes de type II
PINS	Pneumonie Interstitielle Non Spécifique
PO ₂	Pression Partielle en O ₂
PréBötC	Complexe de préBötzing
RARs	Récepteurs d'étirement pulmonaire à adaptation rapide (Rapidly adapting pulmonary stretch receptors)
<i>Rf</i>	Fréquence respiratoire
RMg	Raphé Magnus
ROb	Raphé Obscurus
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RPa	Raphé Pallidus
RRG	Générateur du Rythme Respiratoire (Respiratory Rhythm Generator)
RTN	Noyau Rétrotrapézoïde
RTN/pFRG	Noyau rétrotrapézoïde/groupe respiratoire parafacial
S	Surface
SAHCS	Syndrome d'apnée-hypopnée central du sommeil
SAHOS	Syndromes d'apnée-hypopnée obstructives du sommeil
SAOS	Syndrome d'apnée obstructif du sommeil
SARs	Récepteurs d'étirement pulmonaires à adaptation lent (Slowly adapting pulmonary stretch receptors)
SAS	Syndrome d'apnée du sommeil
SNC	Système Nerveux Central

SOD	Superoxyde Dismutase
SST	Peptide de la Somatostatine
TDM-HR	Tomodensitométrie à Haute Résolution
TGF- β	Facteur de croissance transformant bêta
TLR	Récepteurs Toll-Like (Toll-Like Receptors)
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale
UIP	Usual Interstitial Pneumonia
VAS	Voies Aériennes Supérieures
Ve	Débit Ventilatoire
vINTS	Région Ventrolatérale du NTS
VMS	Surface Ventrale du bulbe rachidien (Ventral Medullary Surface)
VRG	Groupe Respiratoire Ventral (Ventral Respiratory Group)
V _T	Volume Courant

Liste des figures

FIGURE 1: SCHEMA REPRESENTANT LES MUSCLES RECRUTES PENDANT L'INSPIRATION ET L'EXPIRATION CHEZ L'HOMME.....	- 22 -
FIGURE 2: VOLUMES ET CAPACITES PULMONAIRES.	- 25 -
FIGURE 3 : SCHEMA REPRESENTANT LES VOIES AERIENNES SUPERIEURES ET INFERIEURS DE L'APPAREIL RESPIRATOIRE.	- 26 -
FIGURE 4: SCHEMA REPRESENTANT LES VOIES AERIENNES SUPERIEURES.	- 27 -
FIGURE 5: SCHEMA REPRESENTANT L'ARBRE BRONCHIQUE.	- 29 -
FIGURE 6: L'EPITHELIUM ALVEOLAIRE.	- 30 -
FIGURE 7: SCHEMA D'UN ECHANGE GAZEUX AU NIVEAU D'UNE ALVEOLE.	- 31 -
FIGURE 8 : LES 5 ELEMENTS MAJEURS DU SYSTEME RESPIRATOIRE.	- 33 -
FIGURE 9: DISTRIBUTION BILATERALE DES NEURONES RESPIRATOIRES DANS LE PONT ET LE BULBE RACHIDIEN.	- 35 -
FIGURE 10: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU RESEAU NEURONAL RESPIRATOIRE IMPLIQUE DANS L'ELABORATION DE LA COMMANDE CENTRALE RESPIRATOIRE.	- 36 -
FIGURE 11: SCHEMA RECAPITULATIF DES PRINCIPALES INTERACTIONS DU RESEAU NEURONAL RESPIRATOIRE.	- 39 -
FIGURE 12: LOCALISATION ANATOMIQUE DES DIFFERENTS CENTRES RESPIRATOIRE AU NIVEAU DU GROUPE RESPIRATOIRE VENTRAL.	- 42 -
FIGURE 13: LES STRUCTURES RESPIRATOIRES PONTIQUES.	- 43 -
FIGURE 14: LES HYPOTHESES SUR L'ORIGINE DE L'AUTOMATISME RESPIRATOIRE.	- 44 -
FIGURE 15: HYPOTHESE DES TRIPLES OSCILLATEURS.	- 46 -
FIGURE 16: CHEMORECEPTEURS SITUES AUX NIVEAUX DE LA BIFURCATION CAROTIDIENNE :.....	- 49 -
FIGURE 17: LOCALISATION DES CHEMORECEPTEURS CENTRAUX.....	- 51 -
FIGURE 18: COURBE REPRESENTANT LA VENTILATION BI-PHASIQUE EN REPOSE A L'HYPOXIE CHEZ LE RAT ADULTE.	- 52 -
FIGURE 19: VENTILATION ALVEOLAIRE EN REPOSE A L'HYPERCAPNIE.	- 54 -
FIGURE 20: SCHEMA RECAPITULATIF DE LA BOUCLE DE RETROCONTROLE SUITE A DES MODIFICATIONS DE PAO_2 ET $PACO_2$	- 56 -
FIGURE 21: INTERVENTION DES MECANORECEPTEURS PHARYNGES DANS LE MAINTIEN DE L'OUVERTURE DES VOIES AERIENNES SUPERIEURES.....	- 58 -
FIGURE 22: MECANORECEPTEURS CONTROLANT L'EXPANSION DE L'APPAREIL THORACO-PULMONAIRE.....	- 59 -
FIGURE 23: VOIES IMPLIQUEES DANS LA FACILITATION A LONG TERME PHRENIQUE (pLTF) INDUITE PAR L'HYPOXIE INTERMITTENTE CHRONIQUE...	- 64 -
FIGURE 24: LES ISOFORMES DE LA PROTEINE FosB.	- 65 -
FIGURE 25: ACCUMULATION DE $\Delta FosB$ AU COURS DU TEMPS.....	- 66 -
FIGURE 26: TOMODENSITOMETRIE PULMONAIRE.....	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
FIGURE 27: HISTOLOGIE DE LA PNEUMOPATHIE INTERSTITIELLE.....	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
FIGURE 28: PROFIL D'EVOLUTION DES PATIENTS ATTEINTS DE FIBROSE PULMONAIRE IDIOPATHIQUE :	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
FIGURE 29: BIOPSIE PULMONAIRE D'UN POUMON DE PATIENT FPI SUITE A UNE EXACERBATION AIGÛE :	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
FIGURE 30: MECANISMES DE REPARATION DE L'EPITHELIUM ALVEOLAIRE EN CONDITION PHYSIOLOGIQUE.....	- 78 -
FIGURE 31: MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIES RENCONTRES DANS LA FPI.....	- 81 -
FIGURE 32: SCHEMA REPRESENTANTS LES VOIES INTRINSEQUE ET EXTRINSEQUE DE L'APOPTOSE.	- 85 -
FIGURE 33: REPRESENTATION DE L'EXPRESSIONS DES MARQUEURS EPITHELIAUX ET MESENCHYMATEUSES DES CELLULES AU COURS D'UNE TRANSITION ÉPITHELIO MESENCHYMATEUSE (TEM) :	- 86 -
FIGURE 34: REGULATIONS DES FACTEURS MAJEURS IMPLIQUES DANS LA TRANSITION ÉPITHELIO-MESENCHYMATEUSE.....	- 87 -
FIGURE 35: IMPLICATION DE LA VOIE DU $TGF-\beta$ DANS LA TEM.....	- 88 -
FIGURE 36: LES MARQUEURS ASSOCIES A LA SENESCENCE.....	- 90 -
FIGURE 37: BALANCE PRO-OXYDANTS ET ANTI-OXYDANTS.....	- 93 -

FIGURE 38: VOIES DE SIGNALISATIONS ACTIVEES EN REPONSE A DES PROTEINES MAL REPLIEES AYANT CONDUIT A UN STRESS DU RE.	- 96 -
FIGURE 39: MECANISME DE STABILISATION DE HIF-1 α	- 99 -
FIGURE 40: GENES CIBLES DE HIF-1.	- 100 -
FIGURE 41: TRACE DE POLYGRAPHIE ILLUSTRANT DES FRAGMENTATIONS DU SOMMEIL.	- 104 -
FIGURE 42: IMAGE PAR RESONANCE MAGNETIQUE (IRM) SAGITTALE MEDIANE CHEZ UN SUJET NORMAL (A GAUCHE) ET CHEZ UN PATIENT SOUFFRANT DE SAHOS SEVERE (A DROITE).	- 105 -
FIGURE 43: CALCUL DE L'INDEX D'APNEE HYPOPNEES ET DEGRE DE SEVERITE DU SYNDROME D'APNEE OBSTRUCTIF DU SOMMEIL.	- 106 -
FIGURE 44: TRACES POLYSOMNOGRAPHIQUES ILLUSTRANT LES MICRO-EVEILS.	- 108 -
FIGURE 45: PROTOCOLE EXPERIMENTAL.	- 124 -
FIGURE 49: ARCHITECTURE PULMONAIRE.	- 127 -
FIGURE 50: EXPRESSION DES GENES CODANT POUR DES PROTEINES PRO-FIBROSANTS.	- 127 -
FIGURE 51: IDENTIFICATION DES POPULATIONS CELLULAIRES.	- 129 -
FIGURE 52: DESIGN EXPERIMENTAL.	- 211 -
FIGURE 53: ARCHITECTURE PULMONAIRE.	- 212 -
FIGURE 54 : EXPRESSION DES GENES CODANT POUR DES PROTEINES PRO-FIBROSANTES.	- 213 -
FIGURE 55: TABLEAU REPRESENTANT LE NOMBRE MOYEN DE CELLULE FOSB/ Δ FOSB POSITIFS PAR STRUCTURE ET PAR COUPE.	- 215 -
FIGURE 56: EXPRESSION DES CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES.	- 216 -
FIGURE 57: DOSAGE DE LA CYTOKINE PRO-OXYDANTE 8-OHdG.	- 216 -
FIGURE 58: REPONSE VENTILATOIRE A L'HYPOXIE (HVR).	- 217 -
FIGURE 59: REPONSE VENTILATOIRE A L'HYPERCAPNIE (HcVR).	- 218 -
FIGURE 60: PROTOCOLE EXPERIMENTAL.	- 221 -
FIGURE 61: ARCHITECTURE PULMONAIRE.	- 222 -
FIGURE 62: EXPRESSION DES GENES CODANT POUR DES PROTEINES PRO-FIBROSANTS.	- 222 -
FIGURE 63: EXPRESSION DES CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES.	- 223 -
FIGURE 64: TABLEAU REPRESENTANT LE NOMBRE MOYEN DE CELLULE FOSB/ Δ FOSB POSITIFS PAR STRUCTURE ET PAR COUPE.	- 225 -
FIGURE 65: REPONSE VENTILATOIRE A L'HYPOXIE (HVR).	- 226 -
FIGURE 66: REPONSE VENTILATOIRE A L'HYPERCAPNIE (HcVR).	- 227 -
FIGURE 67: INSTALLATION D'UNE FIBROSE PULMONAIRE INDUIT PAR LA BLEOMYCINE AU COURS DU TEMPS.	- 231 -
FIGURE 68: FIBROSE PULMONAIRE HETEROGENE OBSERVE SUITE A UNE INSTILLATION UNIQUE DE BLEOMYCINE.	- 232 -

Listes des tables

TABLEAU 1: TABLEAU RECAPITULATIFS DES DIFFERENTS RECEPTEURS INTERVENANT DANS LA REGULATION DE LA VENTILATION. .	- 62 -
TABLEAU 2 : TABLEAU RECAPITULATIF DES PARAMETRES CLASSIQUEMENT OBSERVES CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE PFI..	ERREUR !
SIGNET NON DEFINI.	
TABLEAU 3: MECANISMES ET CAUSES DE DE LA FERMETURE DU PHARYNX.	- 109 -
TABLEAU 4 : FONCTION VENTILATOIRE, COMPLIANCE PULMONAIRE ET SATURATION EN O₂.	- 214 -
TABLEAU 5: FONCTION VENTILATOIRE ET SATURATION EN O₂.	- 224 -

Autres publications

Publications

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].

Yegen, C. H., Haine, L., Marchant, D., Boncoeur, E., & Voituron, N. (2020).

Revue des maladies respiratoires, 37(3), 193–196. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2020.02.005>

Cytoprotective effects of erythropoietin: What about the lung?

Haine, L. *, Yegen*, C. H., Marchant, D., Richalet, J. P., Boncoeur, E., & Voituron, N. (2021).

* co-premiers auteurs

Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie, 139, 111547.

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111547>

Sleep Apnea in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Molecular Investigation in an Experimental Model of Fibrosis and Intermittent Hypoxia

Haine, L. ; Bravais, J.; Yegen, C.-H.; Bernaudin, J.-F.; Marchant, D.; Planès, C.; Voituron, N.; Boncoeur, E.

Sleep Apnea in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Molecular Investigation in an Experimental Model of Fibrosis and Intermittent Hypoxia. *Life* 2021, 11, 973. <https://doi.org/10.3390/life11090973>

Articles à soumettre

Erythropoietin-deficient transgenic mice display changes in the CO₂/H⁺-activated cells of the medulla oblongata with an increase in respiratory response to hypercapnia

Jeton F*, Perrin-Terrin AS*, YEGEN C-H, Soliz J, Del Rio R, Marchant D, Richalet JP, Pichon A§, Bodineau L §, Voituron N§

* co-premiers auteurs et § co-derniers auteurs

Histological and molecular characterisation of a new mice model designed Nto study chronic lung fibrosis and acute exacerbation

Yegen C-H, Haine L, Da costa Ferreira K, Marchant D, Bernaudin JF, Planes C, Voituron N, Boncoeur E

Bleomycine-induced Pulmonary fibrosis alters the functioning of the respiratory neural network and abolished the ventilatory adaptation to hypoxia and hypercapnia in mice.

Céline-Hivda Yegen, Dominique Marchant, Emilie Boncoeur#, Nicolas Voituron#

co-derniers auteurs

Articles en cours d'écriture

Erythropoïétin prevents lung apoptosis

Céline-Hivda Yegen*, Liasmine Haine*, Dominique Marchant, Emilie Boncoeur#, Nicolas Voituron#

* co-premiers auteurs et #co-derniers auteurs

Kcnk3 dysfunction modify the chemosensory regulation of breathing in rat.

Céline-Hivda Yegen*, Mélanie Lambert*, David Montani, Marc Humbert, Carole Planes, Nicolas Voiturons§, Fabrice Antigny§.

* co-premiers auteurs et § co-derniers auteurs

Participations aux congrès scientifiques

C-H Yegen, D Marchant, E Boncoeur* et N Voituron*.

Communication orale : **Impact d'une fibrose pulmonaire sur le réseau neuronal élaborant la commande centrale respiratoire.**

Les Journées de Recherche Respiratoire – Brest- 15 et 16 Octobre 2021.

C-H Yegen, L Haine, D Marchant, JF Bernaudin, C Planès, E Boncoeur, N Voituron.

Poster : **Développement d'un nouveau modèle murin expérimental de fibrose pulmonaire.**

Les Journées de Recherche Respiratoire – Brest- 16 et 17 Octobre 2020.

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

Poster: **Low expression of EPO: Impact on the lung and consequence in response to acute injury.**

Les Journées de Recherche Respiratoire – Bruxelles- 18 et 19 Octobre 2019. (Prix du meilleur poster)

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

Poster: **Impact on systemic Erthropoietin deficiency in mice model of acute lung injury.**

Congrès de la société de physiologie et de biologie intégrative SPBI - Montpellier, 12-14 Juin 2019.

L. Haine, J. Bravais, **C-Y. Yegen**, C. Planès, N. Voituron* and E. Boncoeur*.

Poster : **Effet aggravant de l'hypoxie intermittente sur l'évolution de la fibrose pulmonaire idiopathique : implication du stress du réticulum endoplasmique.**

Journée de l'école doctorale Galilée - Bobigny- 7 Juin 2019.

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

Poster : **Evaluation de l'impact de la déficience systémique en érythropoïétine au niveau pulmonaire chez des souris exposées à l'hypoxie.**

Les Journées de Recherche Respiratoire- Marseille- 12-13 Octobre 2018.

Haine Liasmine, **Céline-Hivda Yegen**, Dominique Marchant, Carole Planès, Nicolas Voituron*, Emilie Boncoeur*.

Poster: **Impact of systemic erythropoietin deficiency on the lung of mice exposed to hypoxia.**

European Respiratory Journal 2018 52 : PA4300 : DOI : 10.1183/13993003.congress-2018.PA4300.
Congrès de l'ERS (European Respiratory Society) – Paris - 15-19 Septembre 2018.

Préambule

La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) appartient au cadre vaste et complexe des pneumopathies interstitielles diffuses. Cette famille d'affection pulmonaire se traduit cliniquement par des symptômes non spécifiques, dominés par une dyspnée et une toux. Elle est caractérisée radiologiquement par un infiltrat interstitiel diffus et une rigidification du parenchyme pulmonaire (FUMEAUX et al. 2003; Cottin et al. 2017). Selon les hypothèses actuelles, la détérioration de l'architecture pulmonaire mais également sa rigidification par une accumulation excessive de matrice extracellulaire, résulterait d'un défaut de réparation de l'épithélium pulmonaire après des microtraumatismes répétés tels que l'exposition à des particules de silices, des virus, bactéries et bien d'autres (Richeldi et al. 2017). De façon intéressante, on observe chez certains patients présentant une FPI, une altération des variables ventilatoires (Olukogbon et al. 2016), caractérisée par une faible valeur de capacité vitale forcée associée à une augmentation de la fréquence respiratoire et une diminution du volume courant (Javaheri and Sicilian 1992). Il est également rapporté chez certains patients une altération des réponses ventilatoires l'hypoxie et à l'hypercapnie (Rhoads and Brody 1969; Roncoroni et al. 1975) et notamment une diminution de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie (Launois et al. 1991).

De nombreuses études montrent une très forte prévalence d'apnées-hypopnées obstructives du sommeil chez les patients atteints de FPI (Lancaster et al. 2009a; Gille et al. 2017). Le syndrome d'apnées hypopnées obstructive du sommeil (SAHOS) est défini par l'obstruction itérative des voies aériennes supérieures, due au moins en partie au relâchement des muscles dilatateurs du pharynx (Young et al. 2002b) conduisant à des micro-réveils durant le sommeil. Cette succession de micro-réveils au cours de la nuit génère de brefs épisodes d'hypoxie-réoxygénation de façon répétée et cyclique (King et al. 2011; Gille et al. 2018). De récentes études montrent que ces épisodes d'hypoxie-réoxygénation à l'origine d'une hypoxie intermittente exacerberait la fibrose pulmonaire dans des modèles *in vivo* (Gille et al. 2018; Shi et al. 2020).

L'origine des anomalies respiratoires chez les patients FPI n'est pas clairement identifiée. Ces anomalies pourraient être liées à l'augmentation de la rigidité pulmonaire qui à leur tour pourrait avoir des conséquences sur le fonctionnement du réseau neuronal générant la commande centrale respiratoire. De plus, l'hypoxie intermittente chronique peut exacerber la fibrose pulmonaire et de ce fait, avoir également des conséquences sur le fonctionnement des neurones respiratoires.

L'objectif de ma thèse est de mettre en évidence/identifier les conséquences d'une atteinte pulmonaire sur la commande centrale respiratoire et l'impact de l'association avec un SAHOS dans ce contexte. Pour cela, nous avons cherché à comprendre quels étaient les impacts d'une fibrose pulmonaire sur les variables ventilatoires et comment ces modifications de rigidité du poumon pourraient influencer le fonctionnement du réseau neuronal respiratoire.

Ainsi, nous proposons dans un premier temps de mettre en place et de caractériser un modèle murin de fibrose pulmonaire obtenu par instillations répétées de bléomycine. Par la suite, nous avons utilisé ce modèle afin de mimer des exacerbations aiguës de la fibrose pulmonaire telles que retrouvées chez certains patients atteints de FPI. Ensuite, nous tenterons dans un second temps de déterminer les relations entre la sévérité de l'atteinte pulmonaire et l'impact de ces atteintes sur le réseau neuronal respiratoire. Pour finir, nous étudierons l'influence des épisodes d'hypoxie-réoxygénation associés au SAHOS dans ce contexte.

Introduction

Partie I : La ventilation pulmonaire et son contrôle par le réseau neuronal respiratoire

Chapitre I : La ventilation pulmonaire

I. La mécanique ventilatoire

Les échanges gazeux entre l'environnement et l'intérieur de l'organisme sont assurés par un mécanisme de ventilation. La ventilation pulmonaire concerne notre capacité à renouveler l'air dans nos poumons, afin d'assurer l'apport constant d'un air riche en dioxygène (O_2) tout en rejetant le dioxyde de carbone (CO_2) en excès dans l'organisme dans le but d'assurer l'hématose sanguine. En 1983, Richter et Ballantyne mettent en avant l'existence d'une coordination cyclique de la ventilation en trois phases successives initiée par une phase inspiratoire (I), suivie d'une phase post-inspiration (ou expiration précoce, E1) et terminée par une expiration tardive (E2) (Richter and Ballantyne 1983; Richter et al. 1992; Richter 2001; Richter and Spyer 2001). Ce travail mécanique de la ventilation est assuré par la contraction rythmique des muscles striés squelettiques de l'appareil thoraco-respiratoire (pompe respiratoire), les flux d'air entrant et sortant du poumon étant régulés par les voies aériennes supérieures (VAS).

1) L'inspiration, Phase I

Au cours de l'inspiration, interviennent les muscles inspiratoires dont le diaphragme, les muscles intercostaux externes et les muscles inspiratoires accessoires regroupant les Sterno-Cléido-Occipito-Mastoïdien (SCOM) et les scalènes (Figure 1).

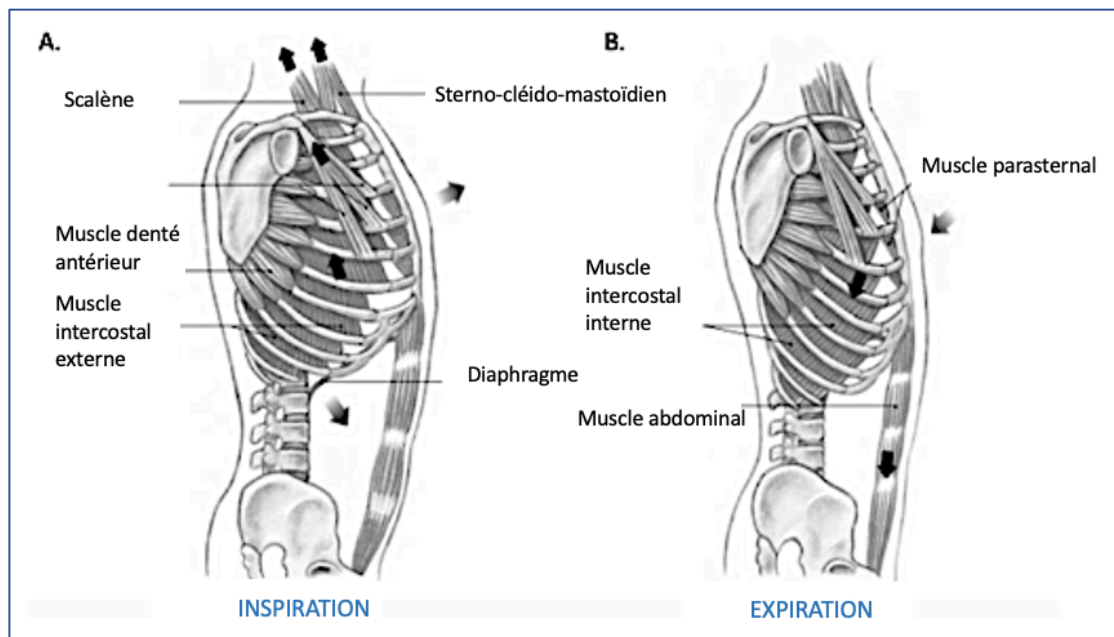


Figure 1: Schéma représentant les muscles recrutés pendant l'inspiration et l'expiration chez l'Homme. Muscles respiratoires innervés par les motoneurones spinaux recrutés au cours de l'inspiration et l'expiration active. Les flux d'air entrant et sortant des poumons sont régulés par les mouvements de la cage thoracique. A. L'inspiration est une phase active due à la contraction des muscles inspiratoires (diaphragme, scalène, intercostaux externe). Des muscles accessoires sont également recrutés lors de l'inspiration forcée (SCOM, dentelé antérieur, trapèze...). B. L'expiration est une phase passive. Au cours de l'expiration forcée, les mouvements thoraciques sont contrôlés par la contraction des muscles abdominaux et intercostaux internes. Adaptée d'après (Greer and Funk 2013).

Lors de la ventilation au repos, la contraction des muscles intercostaux externes projette les côtes vers le haut et vers l'avant conduisant à une augmentation des diamètres transversaux et antéro-postérieurs du thorax. La contraction du diaphragme conduit à son abaissement et son aplatissement. Tout ceci, génère une expansion du volume de la cage thoracique mais également des poumons, en effet, ces derniers étant intimement liés à la cage thoracique par l'intermédiaire de la plèvre, ils vont suivre leur mouvement. La plèvre est composée de deux feuillets, un feuillet viscéral à la surface du poumon et un feuillet pariétal situé contre la cavité thoracique. Ces deux feuillets sont séparés par un film liquidien permettant ainsi de créer une pression négative nécessaire au maintien des poumons contre la cage thoracique où ils sont logés mais également de réduire les forces de frottements rencontrées durant la ventilation. En effet, les mouvements de la cage thoracique ont pour conséquences une augmentation du volume intra-pulmonaire et une diminution de la pression intra-pulmonaire (elle avoisinera alors -1mmHg).

La relation entre le volume et la pression d'un gaz est régie par la loi de Boyle-Mariotte, cette loi stipule qu'à température constante et pour une quantité de gaz donnée, le volume qu'il

occupe est inversement proportionnel à sa pression. De ce fait, une entrée d'air dans les poumons est observée jusqu'à égaliser cette pression avec la pression atmosphérique, on parle alors de ventilation en pression négative (Figure 1).

Lors d'une inspiration à l'effort ou en cas de détresse respiratoire, les muscles inspiratoires accessoires tels que les SCOM et les scalènes interviennent et permettent une augmentation supplémentaire du volume de la cage thoracique ainsi que sa stabilisation. Il est important de noter qu'au cours de l'inspiration, les muscles des voies aériennes supérieures (VAS) se dilatent afin que la lumière pharyngolaryngée soit à son diamètre maximum pour faciliter l'écoulement de l'air. Le maintien des VAS ouvertes se fait par la protrusion de la langue, l'abduction du pharynx et l'ouverture de la glotte. Cette commande d'ouverture des VAS est cruciale, son altération peut-être nuisible et conduire à des syndromes d'apnée hypopnée obstructive du sommeil (Chan et al. 2010).

2) La post-inspiration ou expiration précoce, Phase E1

La post-inspiration est la principale phase d'expression des comportements moteurs nécessitant un ajustement respiratoire comme la vocalisation, la déglutition, la toux ou encore le vomissement (Aybar et al. 2020). Cette phase E1 prend place entre la phase I et la phase E2 dans le but de contrôler la transition entre l'inspiration et l'expiration en diminuant le débit expiratoire. Cette phase est caractérisée par un relâchement des muscles inspiratoires. En effet, il a été montré une diminution de l'activité des muscles inspiratoires au cours de cette phase. Cependant, il est observé une activité résiduelle post-inspiratoire sur le nerf phrénique conduisant à une contraction du diaphragme, ceci permet d'éviter un retour brutal à l'état de repos du diaphragme (Del Negro et al. 2018). De plus, au cours de cette phase, un contrôle de la fermeture des voies aériennes respiratoires est assuré. On observe une adduction du larynx ainsi qu'une adduction partielle des cordes vocales afin d'éviter un collapsus alvéolaire tout en maximisant le temps d'échange gazeux entre l'air inspiré et le sang mais également un relâchement des muscles abducteurs du pharynx (Del Negro et al. 2018). Cette étape de post-inspiration est une phase importante du cycle respiratoire au repos. Cette phase disparaît lorsque la demande respiratoire augmente rapidement conduisant à une expiration plus rapide (Petit et al. 1960). Une étude réalisée en 2018 par l'équipe de Park, montre une diminution de l'expansion pulmonaire lors de l'inspiration chez les patients présentant une pneumopathie interstitielle diffuse (Park et al. 2018).

3) L'expiration tardive, Phase E2

Au cours d'une ventilation au repos, l'expiration tardive est une phase passive, le relâchement du diaphragme et des muscles intercostaux externes entraînent un retour à leur position initiale. Cette action diminue le volume de la cage thoracique et comprime les poumons. La pression intra-pulmonaire augmente jusqu'à devenir positive et expulser l'air contenu dans les poumons (Figure 1). Au cours de cette phase, il est observé un relâchement des muscles adducteurs du pharynx, ceci participe à la réduction du diamètre interne des voies aériennes supérieures (Figure 1). Néanmoins, à l'effort, en cas de forte demande métabolique il y a une nécessité d'augmenter les échanges gazeux. Ainsi, les muscles abdominaux et les muscles intercostaux internes interviennent et permettent une expiration active. La contraction des muscles abdominaux repousse le diaphragme vers le haut. Alors que la contraction des muscles intercostaux internes abaisse les côtes conduisant à la diminution du diamètre latéral du thorax. L'ensemble renforce ainsi la surpression pulmonaire afin de faciliter l'expulsion de l'air emmagasiné dans les poumons. Il est à noter que l'expiration au repos est active chez le rongeur tout en nécessitant une contraction des muscles expiratoires.

II. Les capacités ventilatoires pulmonaire et la respiration

1) Les volumes et capacités pulmonaires

La fonction pulmonaire est évaluée par la spirométrie, un test qui est fréquemment réalisé lors d'explorations fonctionnelles respiratoires (EFR). Ce test permet de mesurer les volumes d'air et les débits ventilatoires mobilisés lors de l'inspiration et de l'expiration et permettent de diagnostiquer certaines pathologies respiratoires obstructives (bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), asthme, emphysème,...) ou restrictives (fibrose pulmonaire idiopathique (FPI), silicose, ...) et d'en suivre l'évolution. Les résultats sont visualisés sous forme de spirogramme représentant les variations de volume en fonction du temps (courbe volume/temps ; Figure 2) ou représentant le débit d'air en fonction du volume (boucle débit/volume). Au cours de ce test, on obtient donc le volume courant (volume d'air immobilisé dans les poumons au cours d'un cycle respiratoire, V_T ou Tidal volume en anglais (T_V)), les volumes de réserve inspiratoire (VRI) et expiratoire (VRE), la capacité vitale forcée (CVF) ainsi que la fréquence respiratoire (R_f). La capacité vitale totale est obtenue par la somme de la capacité vitale (CVF) et du volume résiduel (VR), ($CPT=CVF+VR$). Le volume d'air mobilisé dans le poumon durant une minute correspond à la ventilation minute (également appelé débit

ventilatoire, noté \dot{V}_E), ceci est obtenu par le produit du volume courant et de la fréquence respiratoire (nombre de cycle réalisé par minute, Rf). Lors des troubles ventilatoires restrictifs tels que rencontrés dans la FPI (voir la *Partie II de l'introduction du manuscrit*), on observe une baisse de la capacité pulmonaire totale en dessous des valeurs normales.

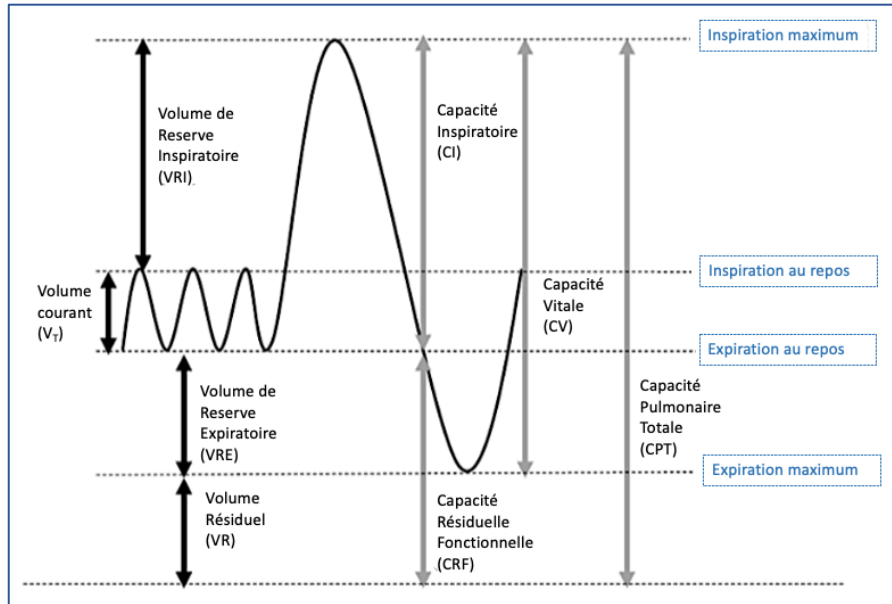


Figure 2: Volumes et capacités pulmonaires. Visualisation des volumes et des débits respiratoires sous formes de graphiques. Les débits et volumes respiratoires peuvent être mesurés par la technique de spirométrie. On obtient une courbe temps volume exprimée en ml. Adaptée d'après (Lutfi 2017).

2) Compliance et élastance thoraco-pulmonaire

a. Généralités

La distensibilité du poumon se traduit par la compliance pulmonaire, elle reflète la capacité du poumon à se distendre. La compliance pulmonaire résulte du rapport de la variation de volume d'air (ΔV) et de sa variation de pression (ΔP), et est exprimée en $\text{ml}/\text{cmH}_2\text{O}^{-1}$ (ou $\text{L}/\text{cmH}_2\text{O}^{-1}$). Ainsi, une diminution de la compliance pulmonaire reflète la nécessité d'un grand changement de pression pour mobiliser un petit volume d'air. L'élastance reflète la capacité thoraco-pulmonaire à revenir à sa position initiale après une déformation. L'élastance est l'inverse de la compliance, soit, $1/C$ et s'exprime en $\text{ml}.\text{cmH}_2\text{O}$ (ou $\text{L}/\text{cmH}_2\text{O}$).

b. Altération de la compliance et l'élastance thoraco-pulmonaire

Une diminution de la compliance pulmonaire peut être observée dans certaines pathologies affectant le poumon. Les patients présentant une rigidité pulmonaire comme celle

rencontrée dans la fibrose pulmonaire idiopathique peut conduire à une diminution de la compliance pulmonaire (*Partie III de l'introduction*). En effet, ces patients présentent un épaissement de leur matrice extracellulaire suite à une accumulation excessive de collagène mais également une altération de la composition du surfactant (Günther et al. 1999; Schmidt et al. 2002). Ces altérations conduisent à une rigidité pulmonaire ayant un impact sur la compliance pulmonaire (Plantier et al. 2018). Ainsi, il est observé une diminution de la compliance pulmonaire et une augmentation de l'élastance pulmonaire (Raghu 2011).

3) De la zone de conduction...

L'air provenant du milieu extérieur est filtré, humidifié, réchauffé, puis acheminé jusqu'aux sacs alvéolaires. L'air est d'abord emmené depuis le milieu extérieur vers l'intérieur de l'organisme en suivant une première zone qui va assurer sa conduction. Ceci est assurée par les voies aériennes supérieures (VAS) (Figure 3), composées du nez, du pharynx et du larynx, de la trachée et des premières générations de bronches (Strohl et al. 2012; Patwa and Shah 2015) (Figure 3).

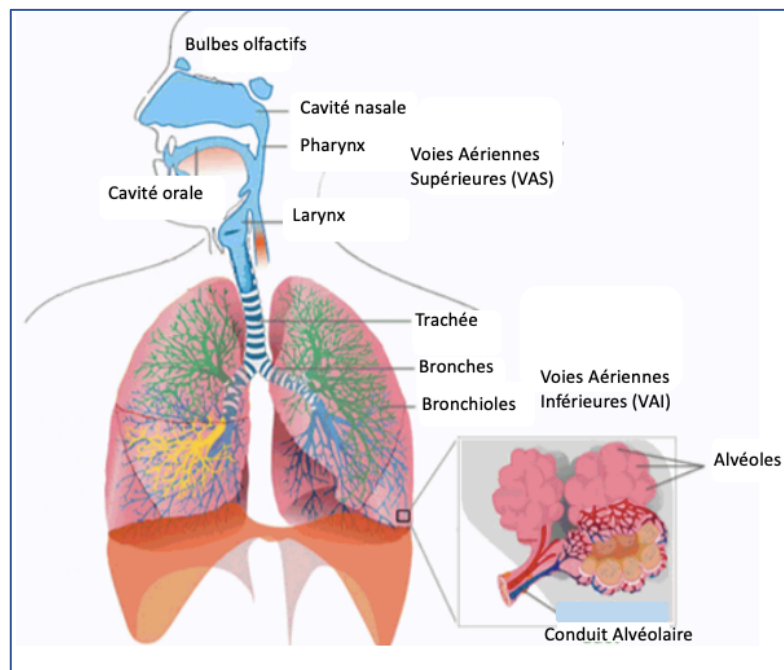


Figure 3 : Schéma représentant les voies aériennes supérieures et inférieures de l'appareil respiratoire. Les voies aériennes supérieures (VAS) sont composées de la cavité orale, la cavité nasale, le pharynx, le larynx, de la trachée, des bronches et des premières générations d'alvéoles. Les voies aériennes inférieures (VAI) sont composées des bronchioles et des alvéoles. Adaptée d'après (Ionescu 2013).

Les cavités nasales sont des chambres situées au niveau du nez interne. L'air tourbillonne dans les cornets nasaux (paires de lames osseuses enroulées) afin d'être humidifié, réchauffé et filtré avant de pénétrer dans les poumons. Les grosses particules en suspension dans l'air sont filtrées par les cils de l'épithélium (également appelés poils ou vibrisses) d'une part et, par du mucus (contenant des lysozymes et des anti-protéases) produit par les glandes séro-muqueuses d'autre part (Baraniuk and Merck 2009). Par la suite, l'air passe de l'arrière des cavités nasales vers la partie supérieure du pharynx (Figure 3).

Le pharynx est un conduit musculo-membraneux comprenant trois segments : le nasopharynx (à l'arrière de la cavité nasale, il poursuit la propulsion du mucus), l'oropharynx (en arrière de la cavité buccale) et le laryngopharynx, ces deux derniers amènent le mucus vers l'œsophage (Bruss and Sajjad 2021). Le pharynx est un carrefour aéro-digestif, richement innervé par les nerfs sensori-moteurs trijumeau (V), glossopharyngien (IX), vague (X) et hypoglosse (XII). Lorsque nous respirons, l'épiglotte demeure relevée et l'air passe librement entre le laryngopharynx (Figure 4) et le larynx.

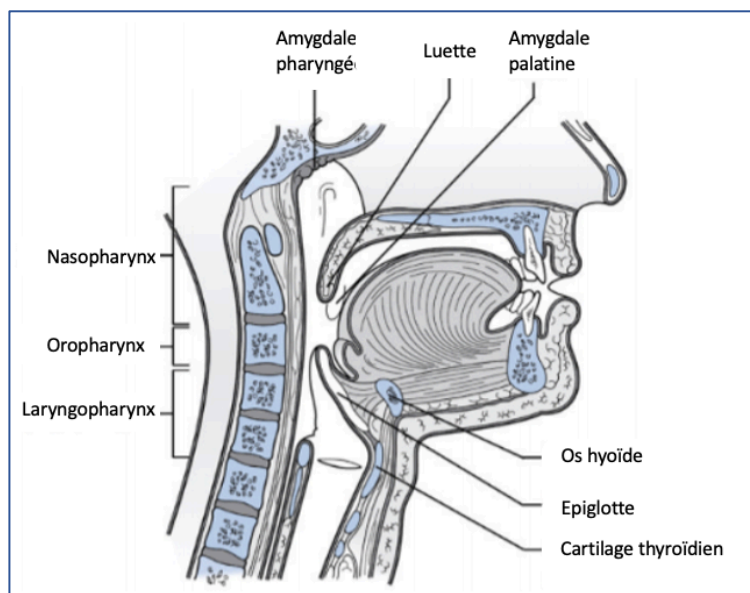


Figure 4: Schéma représentant les voies aériennes supérieures. Vue latérale de la cavité orale et du pharynx composé du nasopharynx, de l'oropharynx et du laryngopharynx. Adaptée d'après (Matsuo et al., 2008).

Le larynx, est un conduit ostéo-cartilagineux rigide comprenant l'os hyoïde et les cartilages thyroïde, cricoïde, aryénoïdes et l'épiglotte. L'ensemble est relié entre eux par des ligaments et des muscles. Ce conduit fournit un passage à l'air en l'aiguillant vers les voies aériennes inférieures (VAI).

En plus du rôle de conduction, les voies aériennes supérieures (VAS) assurent également le conditionnement de l'air. Ce conditionnement est principalement sous la responsabilité de l'épithélium bronchique et des glandes séro-muqueuses. Elles permettent ainsi de réchauffer l'air jusqu'à la température de 37°C (température corporelle) et d'en assurer la saturation en eau. De plus l'air est filtré, en effet, tout le long des voies respiratoires sont disposées des cellules sécrétant du mucus, des glandes et des cellules ciliées. Ceci permet de créer une couche de mucus tapissant les voies, et ainsi de fixer les particules (poussières, bactéries, ...) traversant lesdites voies. Le mouvement des cils (des cellules ciliées) déplace ce mucus en direction du pharynx permettant son élimination dans le tube digestif (on parle d'escalateur mucociliaire). Ceci constitue un mécanisme important de défense des poumons contre les agressions extérieures. De plus, on retrouve des macrophages, qui, par leur action de phagocytose, complètent ce système de défense (Baraniuk and Merck 2009). Les voies aériennes inférieures (VAI) comprennent respectivement, la trachée (22 à 15 mm de diamètre), les bronches souches (15 à 10 mm de diamètre), les bronches lobaires (7 mm de diamètre), les bronchioles (1 à 0,6 mm de diamètre) et des bronchioles terminales (0,6 mm de diamètre) jusqu'aux alvéoles pulmonaire, seul lieu d'échange gazeux (Weibel 2009) (Figure 5). La trachée est un conduit qui se divise en 2 bronches souches aériennes, elle est formée d'une armature cartilagineuse l'empêchant de s'affaisser sur elle-même pour prévenir tout collapsus en réponse aux différentes variations de pressions rencontrées durant la ventilation. Ce conduit élastique fibro-cartilagineux permet le passage de l'air depuis le larynx jusqu'aux alvéoles (Weibel et al. 2005; Patwa and Shah 2015). Les alvéoles pulmonaires sont en contact avec les capillaires sanguins et assurent les échanges gazeux (Knudsen and Ochs 2018).

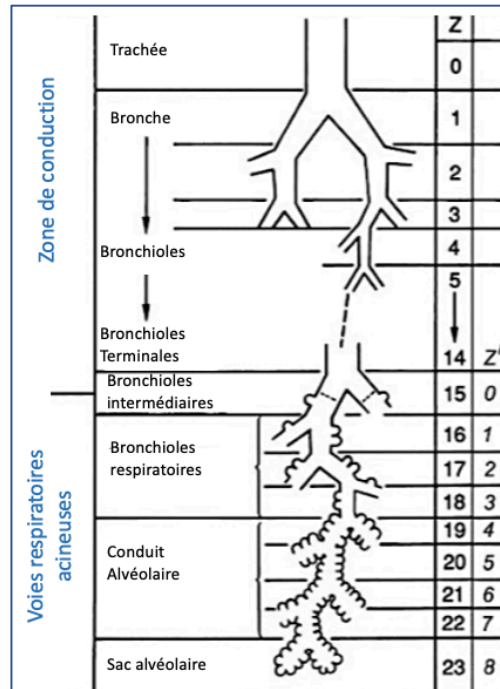


Figure 5: Schéma représentant l'arbre bronchique. Les voies aériennes inférieures (VAI) sont séparées en une zone de conduction initiée depuis les voies aériennes supérieures (VAS) jusqu'aux bronchioles terminales puis la zone d'échanges composée des bronchioles respiratoires jusqu'aux sacs alvéolaires. Adaptée d'après (Weibel 2009).

La structure de la zone de conduction évolue au fur et à mesure que l'on se rapproche de la zone respiratoire. Progressivement, les anneaux cartilagineux disparaissent, l'épithélium s'amincit et la portion de muscle lisse dans la paroi augmente, ceci afin de faciliter l'écoulement de l'air jusqu'à la zone respiratoire. En effet, les voies aériennes inférieures s'ouvrent sur les alvéoles pulmonaires qui sont en contact avec les capillaires sanguins et assurent les échanges gazeux.

4) ... à la zone respiratoire : L'épithélium alvéolaire

a. Composition cellulaire de l'épithélium alvéolaire

L'épithélium alvéolaire est une muqueuse composée de multiples types cellulaires. Cet épithélium compose la surface d'échange gazeux, il est principalement composé de deux types de cellules épithéliales alvéolaires (CEA), les pneumocytes de type I (PI ou CEA I) et les pneumocytes de types II (PII ou CEA II) (Schneider et al. 2019) (Figure 6).

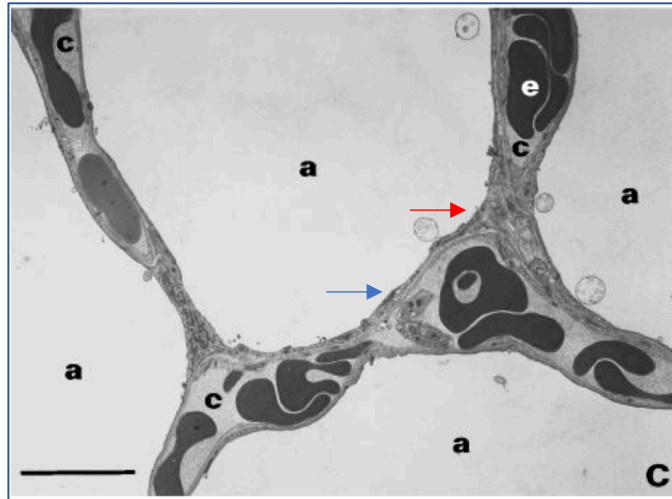


Figure 6: L'épithélium alvéolaire. Dans chaque alvéole on distingue la lumière alvéolaire bordée par un épithélium alvéolaire et le "mur" ou cloison inter alvéolaire (interstitium) où circule un réseau capillaire abondant. L'épithélium alvéolaire se compose de 2 types cellulaires : les pneumocytes de type I (flèche bleu) et les pneumocytes de type II (flèche rouge). Disposition des capillaires simples dans le poumon avec c, capillaires sanguins ; e, érythrocytes ; a, alvéoles. (Barre d'échelle, 10 μ m). D'après (Maina 2002).

Les pneumocytes de type I (PI) représentent un-tiers des cellules épithéliales alvéolaires (CEA) et couvrent 90% de la surface de l'épithélium alvéolaire en raison de leur phénotype aplati et dont la fonction principale est l'échange de gaz. Les pneumocytes de type II (PII) sont en quantité plus abondante (deux-tiers des CEA), et leur fonction est de maintenir l'espace alvéolaire par la sécrétion de constituants du surfactant et d'autres composants de la matrice extracellulaire (Camelo et al. 2014; Hsia et al. 2016). Dans la suite de ce manuscrit, nous utiliserons uniquement les termes de CEA I et CEA II. La production de surfactant prévient le collapsus alvéolaire pouvant survenir à la fin de l'expiration en réduisant la tension superficielle dans les alvéoles (Buckingham and Avery 1962). Les CEA II sont responsables de la régénération de l'épithélium alvéolaire, en tant que précurseurs des CEA I (Renzoni et al. 2014) (Figure 7). Ces cellules multipotentes ayant la capacité de se diviser, de s'auto-renouveler et de se transdifférencier en CEA I jouent rôle crucial dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium (Guillot et al. 2013).

Nota Bene : Nous reviendrons sur le mécanisme de réparation de l'épithélium alvéolaire dans le second chapitre de la Partie I de l'introduction.

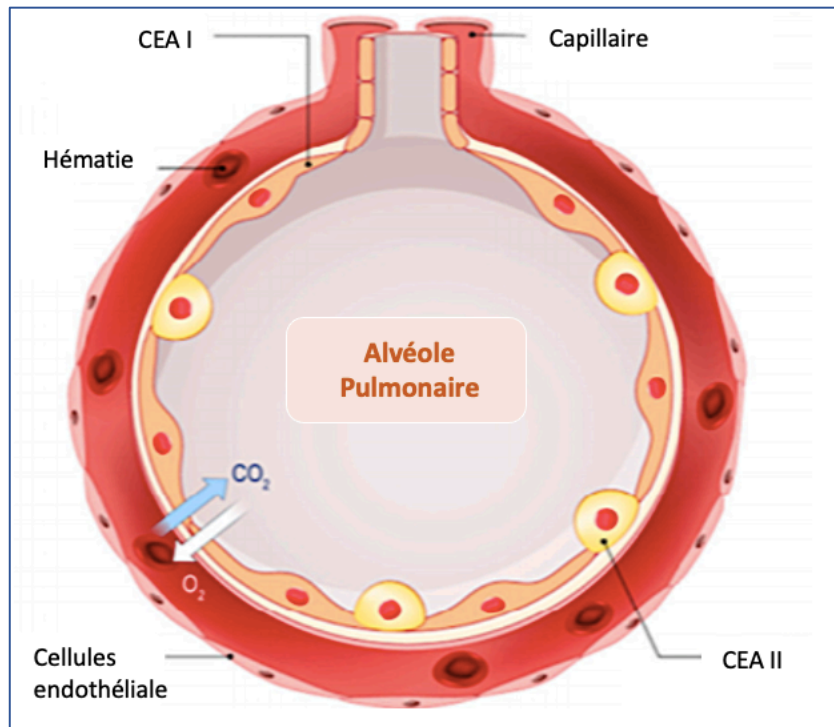


Figure 7: Schéma d'un échange gazeux au niveau d'une alvéole. Schéma représentant une alvéole pulmonaire bordée d'un épithélium alvéolaire composé de cellule épithéliale alvéolaire de type I (CEA I) et de type II (CEA II). L'alvéole est entourée d'un capillaire sanguin composé de cellules endothéliales. Il permet la circulation des globules rouges afin d'assurer la respiration cellulaire. Adaptée d'après (Dimbath et al. 2021).

En plus des CEA, d'autres cellules sont également retrouvées dans l'espace alvéolaire comme les macrophages alvéolaires résidents, qui sont présents de manière constitutive dans le poumon, et qui vont assurer un mécanisme de défense de l'immunité innée afin d'éliminer les corps étrangers par un processus de phagocytose (Zhang et al. 2000; Bhattacharya and Westphalen 2017). Les cellules mésenchymateuses localisées au niveau de l'interstitium pulmonaire ou près d'un capillaire sont en communication avec le microenvironnement alvéolaire et jouent un rôle crucial dans l'homéostasie pulmonaire. Elles assurent le maintien de l'intégrité de la structure alvéolaire en proliférant et en réparant les zones lésées. En effet, ces cellules activées, sécrètent des facteurs de croissances et des modulateurs nécessaires au remodelage de la matrice extracellulaire (Burns et al. 2003; Mueller et al. 2007).

b. Le surfactant

L'épithélium alvéolaire est recouvert d'un film liquidien appelé le surfactant. Le rôle premier de celui-ci est la réduction de la tension superficielle air-liquide dans le but d'éviter tout collapsus alvéolaire lors de l'expiration. Il consiste en un ensemble de protéines (10%) et

de phospholipides (90%) principalement composé de di-palmitoylphosphatidylcholine (DPPC) et de phosphatidylcholine, agissant comme agents tensioactifs permettant une tension de surface quasi nulle (Veldhuizen et al. 1998). Les principales protéines du surfactant sont SP-A, -B, -C et -D. Le surfactant a également un rôle dans la défense immunitaire contre les infections microbiennes en assurant des fonctions d'opsonisation et d'inhibition de l'entrée d'agents pathogènes. Le surfactant est synthétisé par les cellules épithéliales alvéolaires de type II (CEA II). Son élimination est assurée par les macrophages alvéolaires et les CEA II (Garbi and Lambrecht 2017).

c. Les échanges gazeux à travers la barrière alvéolo-capillaire

Les échanges gazeux dans le poumon s'effectuent à travers la barrière alvéolo-capillaire dans les parois septales des alvéoles. La paroi séparant les alvéoles entre-elles contient trois compartiments tissulaires qui constituent cette barrière : l'épithélium alvéolaire et l'endothélium capillaire séparés par l'interstitium pulmonaire (Ochs et al. 2020). Cette barrière est perméable aux gaz, ainsi, l'oxygène qui est amené dans la lumière alvéolaire lors de l'inspiration passe à travers la barrière dans la circulation capillaire et sera transporté dans tout l'organisme par la circulation vasculaire. A l'inverse, le CO₂, ramené aux poumons par la circulation capillaire, passe à travers la barrière alvéolo-capillaire et est éliminé lors de l'expiration. La diffusion des gaz se fait selon un gradient de pression de part et d'autre de cette membrane. La loi de Fick stipule que la diffusion d'un gaz se fait toujours d'une zone de pression partielle élevée vers une zone de pression partielle plus basse jusqu'à atteindre un équilibre. Lors d'un mélange gazeux comme retrouvé dans l'air, chaque gaz diffuse indépendamment les uns des autres jusqu'à atteindre cet équilibre. Dans le poumon, l'apport et la consommation étant en continu, cet équilibre n'est jamais atteint, ainsi, la diffusion a lieu en permanence (Niederschlags 1851; Jaynes and Rogowski 1983; Agusti et al. 1991).

Chapitre II : La commande centrale respiratoire

Le renouvellement de l'air alvéolaire est assuré par la contraction rythmique des muscles striés squelettiques de l'appareil thoraco-abdominal. L'ouverture et la fermeture des VAS permettant la régulation des flux d'air entrant et sortant des poumons sont régulés par les muscles des voies aériennes supérieures. La ventilation pulmonaire est un acte moteur qui se fait selon un cycle en trois temps nécessitant une coordination parfaite entre les muscles de l'appareil thoraco-abdominal et les muscles des voies aériennes supérieures.

Cette coordination est assurée par une innervation complexe à la fois spinale et crânienne et est sous l'influence d'un réseau de neurones localisé dans le tronc cérébral (Richter and Ballantyne 1983) élaborant la Commande Centrale Respiratoire (CCR). Cette CCR est ensuite transmise aux muscles respiratoires par l'intermédiaire des motoneurones respiratoires dont les corps cellulaires sont localisés au niveau de la moelle épinière et du tronc cérébral (motoneurones crâniens). Ainsi, selon les hypothèses actuelles, cet ensemble peut être divisé en cinq constituants majeurs (Funk and Greer 2013) (Figure 8).

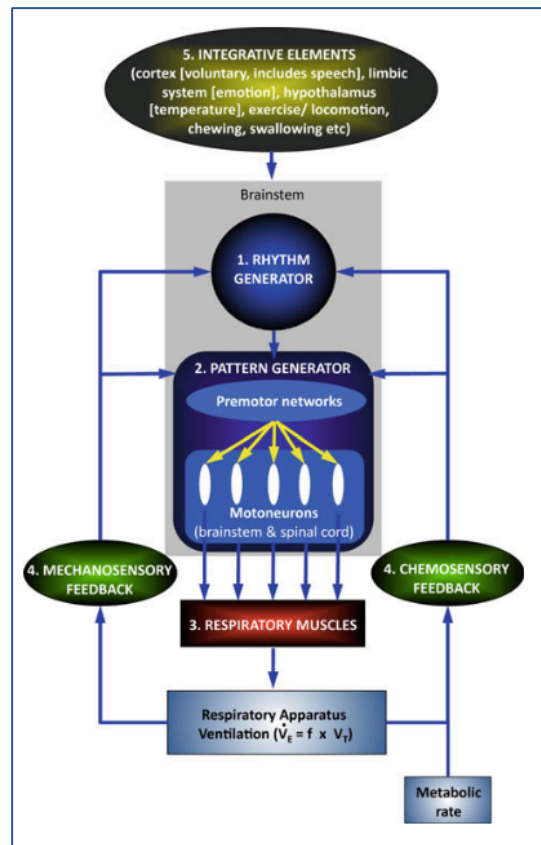


Figure 8 : Les 5 éléments majeurs du système respiratoire. 1. le générateur du rythme respiratoire ; 2. le générateur du patron respiratoire ; 3. les muscles respiratoires ; 4. les mécanismes chémosensibles et mécanosensibles et 5. les composants d'intégration. D'après (Funk and Greer 2013).

1. **Le générateur du Rythme respiratoire ou RRG** (Respiratory Rhythm Generator). Souvent décrit comme un « métronome » ventilatoire, il produit une activité oscillante et périodique de base de la ventilation.

2. **Le générateur du patron respiratoire ou CPG** (Central Pattern Generator), habituellement décrit comme provenant d'une colonne bilatérale ponto-bulbaire majoritairement ventrale, il traduit l'oscillation de base produite par le RRG en un motif

coordonné d'activité qu'il transmet vers les différents groupes de motoneurones innervant les muscles respiratoires. Ce CPG reçoit en permanence un grand nombre d'afférences périphériques et centrales modulant son activité afin d'ajuster le rythme ventilatoire à la demande métabolique (gaz du sang, pH, ...), à la demande mécanique (posture, ...) ainsi qu'aux comportements non-ventilatoires (parler, déglutir, ...).

3. **Les muscles respiratoires**, qui comprennent les muscles de la pompe respiratoire (muscles striés de l'appareil thoraco-abdominal, essentiellement les muscles du diaphragme, abdominaux et intercostaux internes et externes) et des muscles des voies aériennes supérieures contribuant à la régulation des flux d'air entrant et sortant des poumons.

4. **Les éléments chémosensibles et mécanosensibles** d'origine centrale ou périphériques qui régulent l'activité du générateur du patron respiratoire (CPG).

5. **Les composants intégratifs** qui coordonnent les mouvements respiratoires avec d'autres mouvements tels que la locomotion, la parole, la mastication et la déglutition.

I. Organisation anatomique et fonctionnelle du réseau neuronal respiratoire bulbo-pontique

De nombreuses expériences initiées depuis les observations de Galien décrivent une origine supra-spinale de l'activité respiratoire. Ces observations ont conduit à de nombreuses expériences durant plus de deux siècles notamment par Lorry (en 1750), Legallois (en 1812), Flourens (en 1851) Lumsden (en 1923) ou encore Stella (en 1938) afin d'élucider l'origine exacte de ce rythme respiratoire. Au cours des 50 dernières années, des études menées chez le chat et le rongeur ont permis d'identifier les principaux composants du réseau neuronal respiratoire. Le réseau de neurones du tronc cérébral qui génère et contrôle l'activité motrice respiratoire lors d'une respiration eupnéique normale *in vivo* sont distribués bilatéralement dans le bulbe rachidien et le pont (Smith et al. 2013) (Figure 9).

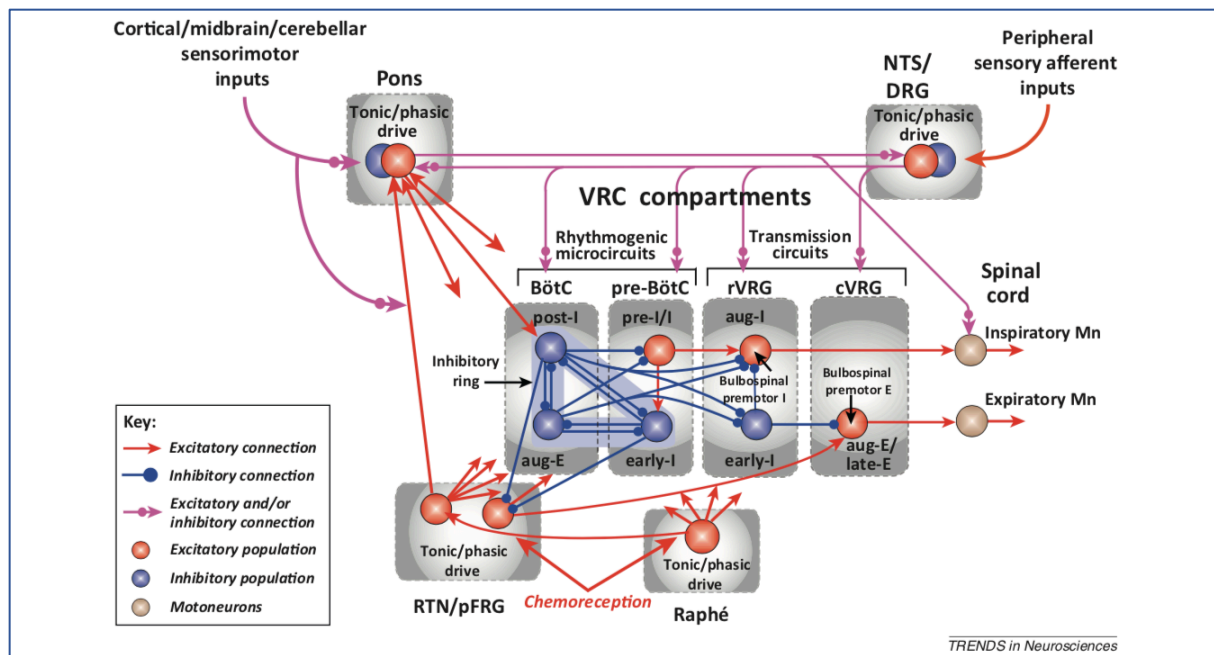


Figure 10: Représentation schématique du réseau neuronal respiratoire impliqué dans l'élaboration de la commande centrale respiratoire. Le complexe préBötzing (préBötC) et le complexe de Bötzing (BötC) sont les principaux composants du groupe respiratoire ventral (VRG). Ces circuits, présentés sous une forme très simplifiée, intègrent la population glutamatergique excitatrice (rouge) pré-inspiratoire (pré-I/I) dans le préBötC et trois populations GABAergiques ou glycinergiques inhibitrices (bleues) dans le pré-BötC-BötC qui s'inhibent mutuellement. Les neurones expiratoires du BötC sont une source majeure d'inhibition synaptique des neurones inspiratoires pendant l'expiration. Les neurones excitateurs pré-I/I du préBötC, qui constituent le noyau excitateur du réseau respiratoire, se projettent via des circuits pré moteurs vers les motoneurons crâniens du groupe respiratoire ventral rostral (rVRG) avec des projections vers les motoneurons inspiratoires (phréniques) de la moelle épinière (marron). Les neurones expiratoires bulbosпинаux excitateurs du groupe respiratoire ventral caudal (cVRG) se projettent vers les motoneurons expiratoires spinaux thoraciques et abdominaux. Ces neurones reçoivent une commande excitatrice tonique, phasique ou rythmique des compartiments pontiques, du groupe respiratoire dorsal (DRG), du noyau rétrotrapézoïdal/groupe respiratoire para-facial (RTN/pFRG) et du raphé. L'ensemble peut être régulé par le taux de CO₂ sanguins ou cérébraux (chémorecéption). D'après (Smith et al., 2013).

a. Le Noyau du tractus solitaire (NTS)

Le noyau du tractus solitaire (NTS) est une structure localisée dans la partie dorsomédiane du bulbe rachidien (Smith et al. 2013) et est formée de groupes hétérogènes de neurones. Cette structure s'étend de la partie caudale du noyau facial à la partie caudale de la décussation pyramidale (Duffin 2004). De nombreuses équipes ont essayé de déterminer une architecture régionale précise du NTS. Cependant, du fait des différentes caractéristiques cellulaires rencontrées, un modèle unique de nomenclature n'a pas pu être mis en place (Loewy and Burton 1978; Kalia and Mesulam 1980a; Kalia and Sullivan 1982; Whitehead 1988; Altschuler et al. 1989; Jean 1991). Malgré tout, la nomenclature la plus simple est celle décrite par certains auteurs comme

Norgren et son équipe (Norgren 1978; Contreras et al. 1982; Hamilton and Norgren 1984). Cette première présente le NTS comme un noyau étant subdivisé en trois régions, la partie commissurale (c-NTS), une région médiane (m-NTS) et une région ventrolatérale (vl-NTS) (Jean 1991). Le c-NTS et m-NTS sont considérés comme le point d'entrée des afférences périphériques provenant des mécanorécepteurs pulmonaires (Kalia and Mesulam 1980a, b), des chémorécepteurs périphériques (Torrealba and Claps 1988; Finley and Katz 1992) ou d'autres afférences sensorielles viscérales (Smith et al. 2013). Cet aspect sera détaillé plus loin dans *la Partie I. Chapitre II.1 de l'introduction*. La région ventrolatérale du NTS (vl-NTS) correspond quant à elle au groupe respiratoire dorsal (Dorsal respiratory group, DRG, selon la terminologie anglo-saxonne). Initialement décrite chez le chat, cette structure contient majoritairement des neurones bulbo-spinaux inspiratoires projetant sur les motoneurones phréniques (Grélot et al. 1988; de Castro et al. 1994). Le DRG distribue également des projections vers les structures pontiques et la colonne respiratoire ventrale (Alheid et al. 2011; Smith et al. 2013).

b. Le Groupe respiratoire ventral (VRG)

Le groupe respiratoire ventral a été décrit pour la première fois par Bianchi en 1971 chez le chat (Bianchi 1971). Ce groupe bilatéral s'étend longitudinalement dans la région ventrolatérale du bulbe rachidien (Lindsey et al. 2013). Ce groupe est divisé en deux régions, caudale (c-VRG) et rostrale (r-VRG) (Alheid et al. 2002; McCrimmon et al. 2004; Feldman and Del Negro 2006; Smith et al. 2013). Le c-VRG contient essentiellement des neurones expiratoires bulbo-spinaux excitateurs (Smith et al. 2013). Ces neurones reçoivent des afférences en provenance du RTN/pFRG et du complexe de Bötzing (BötC), ce qui met en forme l'activité des motoneurones expiratoires thoraciques et lombaires spinaux (Bystrzycka 1980). Le r-VRG contient le principal groupe de neurones inspiratoires pré-moteurs bulbo-spinaux projetant vers les motoneurones phréniques (Alheid and McCrimmon 2008; Smith et al. 2013). Ces neurones reçoivent des afférences excitatrices en provenance du complexe de pré-Bötzing (préBötC) et inhibitrices en provenance des neurones expiratoires du BötC.

c. Le complexe de Bötzing (BötC)

Le complexe de Bötzing est une structure bilatérale localisée dans la région ventrale du bulbe rachidien. Cette structure contient principalement des neurones expiratoires (Smith et al. 2007, 2013; Alheid and McCrimmon 2008). Il a été suggéré que les neurones expiratoires de ce complexe soient une source d'inhibition des neurones bulbospiniaux (Bianchi and Barillot 1982) et des motoneurones inspiratoires (Merrill et al. 1983). En effet, les neurones GABAergiques et

glycinergiques du BötC (Ezure et al. 2003) inhiberaient les neurones inspiratoires et participeraient ainsi à la phase de transition entre la phase d'inspiration et la phase d'expiration durant l'eupnée.

d. Le complexe de pré-Bötzinger (préBötC)

Dès 1991, Smith et ses collaborateurs mettent en avant une petite région bilatérale, en position ventro-latérale essentielle dans l'élaboration du rythme respiratoire, nommée le complexe de pré-Bötzinger (Figure 11) (Smith et al. 1991). Cette structure a une composition cellulaire hétérogène et inclus une population glutamatergiques exprimant les récepteurs à la neurokinine-1 (NK1-R, récepteur à la neurokinine 1 ayant pour principal ligand la substance P), la somatostatine (SST) (hormone inhibitrice des hormones de croissance) et le facteur de transcription Dbx1 (developing brain homeobox 1 protein, facteur de transcription impliqué dans la différenciation des interneurons) (Bouvier et al. 2010; Gray et al. 2010). Elle contient également des sous-populations de neurones inspiratoires glycinergiques et GABAergiques assurant l'inhibition des neurones expiratoires pendant l'inspiration (Kuwana et al. 2006; Winter et al. 2009; Morgado-Valle et al. 2010; Smith et al. 2013). Des neurones autorythmiques générant leur propre rythme ont été identifiés au sein du préBötC (Johnson et al. 1994; Koshiya and Smith 1999; Thoby-Brisson and Ramirez 2001). Il a été montré qu'environ 20% des neurones du préBötC peuvent être classés comme des pacemakers, définis par leur capacité à émettre des signaux en l'absence d'entrée synaptique à une période et une durée de signaux similaires au cycle du rythme respiratoire *in vitro* (Peña et al. 2004; Del Negro et al. 2005; Feldman et al. 2013). Différentes études ont montrées que cette structure était essentielle dans l'élaboration de la commande centrale respiratoire (Rekling and Feldman 1998; Lieske et al. 2000; Gray et al. 2001; McKay et al. 2005; Bouvier et al. 2010) et qu'elle pouvait être considérée comme étant le générateur du rythme respiratoire. Les neurones glutamatergiques du préBötC projettent vers de multiples structures du tronc cérébral impliquées dans le contrôle de la respiration incluant le préBötC controlatéral, le complexe de Bötzinger; la colonne respiratoire ventrale, caudale au préBötC, le RTN/pFRG, le NTS ainsi que d'autres structures pontiques (noyaux parabrachial/Kölliker-Fuse) et mésencéphaliques (substance grise périaqueducal) (Tan et al. 2010). En outre, il a également été suggéré des projections sur les neurones pré-moteurs et moteurs qui commandent les muscles inspiratoires et les muscles des voies aériennes supérieures. Ainsi, il existe un rôle du préBötC dans la coordination des différentes phases de la respiration afin de contrôler l'activation spontanée des muscles intervenant dans les différentes phases respiratoires (Feldman and Del

Negro 2006), suggérant que ce complexe serait nécessaire à la transition de phase entre inspiration tardive et expiration (Dobbins and Feldman 1994; Sun et al. 1998; Guyenet and Wang 2001; Gaytán et al. 2002). Il est à noter que la localisation du préBötC a été permise chez l'Homme sur la base des caractéristiques phénotypiques identifiées chez l'animal et mentionnées ci-dessus (Schwarzacher et al. 2011).

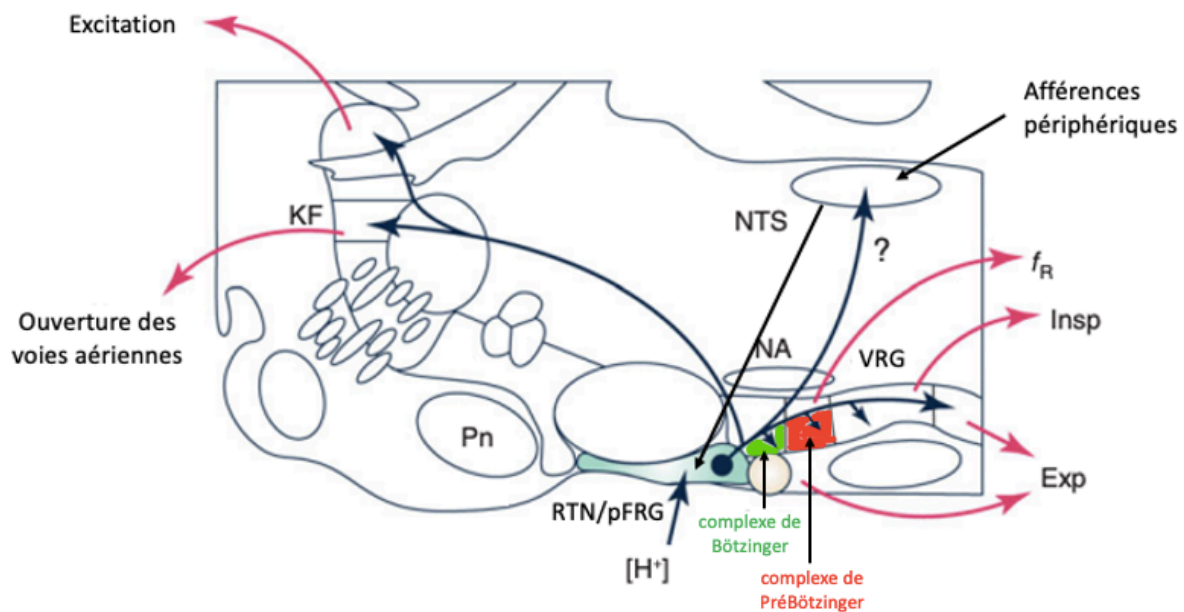


Figure 11: Schéma récapitulatif des principales interactions du réseau neuronal respiratoire. Les afférences périphériques provenant des mécanorécepteurs et des chémorécepteurs parviennent au noyau du tractus solitaire (NTS), Le noyau rétrotrapézoïde / groupe respiratoire parafacial (RTN/pFRG) reçoit également des afférences périphériques des chémorécepteurs sensibles au CO₂/pH. Par la suite le NTS projette des neurones vers le RTN/pFRG. Ce dernier va venir innover par des neurones excitateurs les neurones du groupe respiratoire ventral (VRG). *In fine* et dans un but d'établir une réponse ventilatoire adaptée le VRG après avoir reçu ces différentes afférences vont projeter vers des motoneurones innervant les muscles respiratoires adaptée expiratoires (exp) et inspiratoires (insp), afin d'apporter une réponse respiratoire. Abréviations : KF : Kölliker-Fuse, NA : Noyau Ambigu, f_R : Fréquence respiratoire, Pn : Pont. Adapté d'après (Guyenet et al. 2016).

e. La surface ventrale du bulbe rachidien (noyau rétrotrapézoïde (RTN) / groupe respiratoire parafacial (pFRG))

Bien que le RTN/pFRG joue un rôle important dans l'élaboration du rythme respiratoire, il existe de nombreuses controverses au sujet de cette région. Cette région contient des neurones glutamatergiques exprimant le facteur de transcription Phox2B (Stornetta et al. 2006; Abbott et al. 2009; Dubreuil et al. 2009; Thoby-Brisson et al. 2009), le transporteur vésiculaire du glutamate de type 2 (Vglut2) (Weston et al. 2004) et NK1-R (Gray et al. 2001).

Le RTN et le pFRG sont deux structures souvent décrites comme étant deux groupes de neurones distincts fonctionnellement, mais se chevauchant, et même co-localisés anatomiquement (Smith et al. 2009). Il est suggéré que le RTN et le pFRG soit une seule et même structure mais à deux étapes de développement différentes. Ainsi, des études réalisées chez les rongeurs nouveau-nés décrivent le pFRG comme étant une structure bilatérale située en position ventrale par rapport au noyau facial (Voituron et al. 2006) au niveau duquel on trouve de nombreux neurones présentant une activité rythmique intrinsèque pré-inspiratoire (Onimaru et al. 1989, 1995; Onimaru and Homma 2003; Thoby-Brisson et al. 2009). Le pFRG, identifié à partir d'études réalisées en période périnatale correspondrait chez l'adulte au RTN (Nattie and Li 2002; Stornetta et al. 2006; Thoby-Brisson et al. 2009). En effet, chez la souris, une activité rythmique est présente dès le stade embryonnaire E14,5 au niveau de la forme embryonnaire du RTN/pFRG (epF) (Thoby-Brisson et al. 2009). Ces neurones expriment le NK1-R, Vglut2 et Phox2b, ce qui rappelle la description du RTN chez l'adulte (Nattie and Li 2002; Stornetta et al. 2006) et du pFRG chez le nouveau-né (Onimaru et al. 2008). L'ensemble de ces données reflète une transformation de cette structure au cours du développement (Guyenet and Mulkey 2010). Chez l'adulte, ces neurones sont toniquement actifs (Mulkey et al. 2004; Abbott et al. 2009) ou modulés par la respiration (DePuy et al. 2011). La face latérale du pFRG (pFL) est considéré comme le générateur de l'expiration active (Onimaru and Homma 2003). Le RTN serait essentiellement impliqué dans la chémosensibilité à l'O₂, au CO₂ et/ou au pH (Mulkey et al. 2004; Voituron et al. 2006; Guyenet et al. 2010) et est considéré aujourd'hui comme étant le principal chémorécepteur central (Guyenet et al. 2008, 2010). Les neurones du RTN reçoivent en permanence des afférences en provenance du NTS mais également des neurones sérotoninergiques bulbaires et pontiques (Otake et al. 1993; Bodineau et al. 2000b; Takakura et al. 2006; Mulkey et al. 2007) et projettent vers la plupart des noyaux respiratoires de la Colonne Ventrale Respiratoire (Figure 11). Il est suggéré que les neurones localisés dans la partie ventro-latérale du RTN/pFRG contient des neurones rythmogènes qui sont à l'origine de la contraction des muscles abdominaux pendant l'expiration active (Feldman and Del Negro 2006; Shi et al. 2019). Des études réalisées chez le rat adulte montrent qu'un sous-ensemble de neurones du RTN/pFRG est rythmiquement actif en fin d'expiration pendant l'hypercapnie (Guyenet and Mulkey 2010) ou lorsqu'il est désinhibé (Molkov et al. 2010; Pagliardini et al. 2011).

f. Les Raphés bulbaires

Les noyaux du raphé bulbaire contiennent essentiellement des neurones sérotoninergiques impliqués dans le contrôle moteur somatique et autonome et projetant vers

la colonne respiratoire ventrale et les motoneurones respiratoires (Dobbins and Feldman 1994; Gaytán and Pásaro 1998; Yu et al. 2011; Smith et al. 2013). On distingue le *Raphé Obscurus (ROb)*, le *Raphé Pallidus (RPa)* et *Raphé Magnus (RMg)*. Les neurones excitateurs des raphés libèrent de la sérotonine, de la substance P et de la TRH (Thyrotropin-releasing hormone) (Richerson 2004; DePuy et al. 2011; Smith et al. 2013). Il a été suggéré que ces neurones aient des propriétés chémosensibles au CO₂ (Richerson 2004; Corcoran et al. 2009; Da Silva et al. 2011; Ray et al. 2011) mais également un rôle prépondérant dans la respiration eupnéique en stabilisant la respiration et en diminuant les apnées (Richter et al. 2003; Hodges et al. 2009; Ptak et al. 2009). D'autre part, la stimulation des neurones du *ROb* et du *RMg* conduit à une diminution de la fréquence de décharge des motoneurones phréniques (Lalley 1986) suggérant un effet inhibiteur sur la commande centrale respiratoire, témoignant de son rôle crucial dans la modulation de l'activité respiratoire (Bennett and St. John 1985; Holtman et al. 1986; Lalley 1986). En revanche des études récentes tendent à contredire ces résultats en montrant un effet facilitateur des neurones du *ROb* sur la commande centrale respiratoire (Cao et al. 2006; Ptak et al. 2009).

g. Le complexe post-inspiratoire (PiCo)

Historiquement, les neurones en phase avec la post-inspiration ont été identifiés comme faisant partie du préBötC (Smith et al. 2007, 2009). De récentes études ont identifiés les neurones du complexe post-inspiratoire (PiCo) comme étant une population spécifiquement active pendant la post-inspiration située en position rostrale par rapport au préBötC, dorsal par rapport au BötC et caudal au noyau facial (Figure 12). Pour rappel, la phase post-inspiratoire est le lieu principal d'expression de comportements moteurs nécessitant un ajustement respiratoire (vocalisation, déglutition, toux, vomissement, ...). Ainsi, il est suggéré que ces neurones pourraient jouer un rôle important dans cette phase et contribuerait à l'adaptation de ces comportements respiratoires et des activités associées (Anderson et al. 2016).

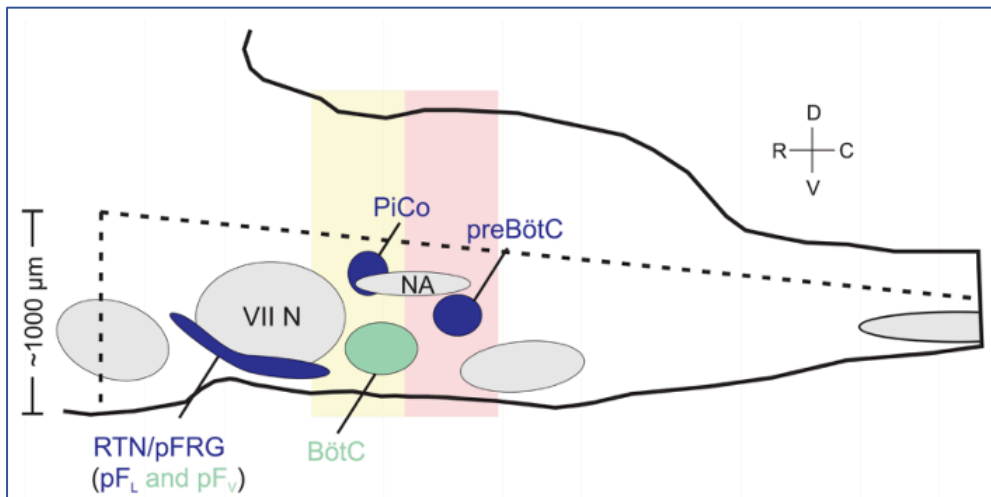


Figure 12: Localisation anatomique des différents centres respiratoire au niveau du groupe respiratoire ventral. Schéma représentant un tronc cérébral d'une vue sagittale représentant la distribution des centres respiratoires au sein du groupe respiratoire ventrale. En bleu sont représentés les trois générateurs du rythme respiratoire, le complexe de pré-Bötzinger (préBötC), le complexe post-inspiratoire (PiCo) et le noyau/rétrotrapézoïde/groupe respiratoire parafacial (RTN/pFRG). Le RTN/pFRG peut être divisé en deux parties : le noyau ventrolatéral (pFL), qui présente une activité rythmogène, et le noyau ventro-médian (pFV), qui est plus médial. En gris sont représentés les noyaux moteurs, le VII N = noyau facial et le NA = noyau ambigu. En vert sont représentées les populations neuronales qui contribuent au rythme respiratoire mais qui ne sont pas considérées comme des générateurs de rythme indépendant. D'après (Ramirez and Anderson 2017).

2) Les structures pontiques

Une section ponto-bulbaire entraîne la disparition de l'activité respiratoire en trois temps et l'apparition d'une activité respiratoire en deux temps (inspiration et expiration), avec une phase inspiratoire apneustique (Smith et al. 2007), confirmant que la rythmogénèse respiratoire serait assurée au niveau bulbaire. Cependant, les noyaux respiratoires pontiques joueraient un rôle essentiel dans le contrôle de la phase de transition respiratoire lors de la post-inspiration, impliquant les voies aériennes supérieures et serviraient également de relais pour la coordination de la respiration avec des activités telles que la vocalisation ou la déglutition. En effet, les structures pontiques comprennent notamment le noyau Kölliker-Fuse et le noyau parabrachial constituant le groupe respiratoire pontique (PRG, pontine respiratory group). Cette structure, localisée dans la région latéro-dorsale du pont semble jouer un rôle important dans la phase de transition entre l'inspiration et l'expiration (Dutschmann and Herbert 2006) et dans la fonction de relais entre centres respiratoires bulbaire et structures respiratoires pontiques (Bianchi et al. 1995). Le noyau Kölliker-Fuse contient des neurones pré-moteurs laryngés contrôlant notamment la résistance des voies aériennes supérieures et des neurones bulbospinaux projetant sur les motoneurones phréniques. Parmi les structures pontiques, on

trouve également les groupes noradrénergiques A5 et A6. Ces deux structures sont impliquées dans la modulation de l'activité du réseau respiratoire *via* des effets opposés (Hilaire et al. 2004). Le groupe A5, localisé dans la zone ventro-latérale du pont caudale, est interconnecté avec le réseau respiratoire bulbaire (Byrum et al. 1984; Guyenet 1984; Woodruff et al. 1986; Byrum and Guyenet 1987) et exerce une inhibition permanente sur la commande centrale respiratoire (CCR), *via* les récepteurs adrénergiques α_2 bulbaires (Hilaire et al. 1989; Errchidi et al. 1991; Viemari et al. 2003; Hilaire 2006). À l'inverse, le groupe A6 (locus Coeruleus) qui se répartit le long du pont en position dorso médiane exerce un effet facilitateur sur la CCR, *via* les récepteurs adrénergiques α_1 bulbaires (Oyamada et al. 1998, 1999; Viemari et al. 2004). En outre, les groupes A5 et A6 ont été décrit comme présentant une sensibilité aux CO_2/H^+ (Nattie and Li 2012) (Figure 13).

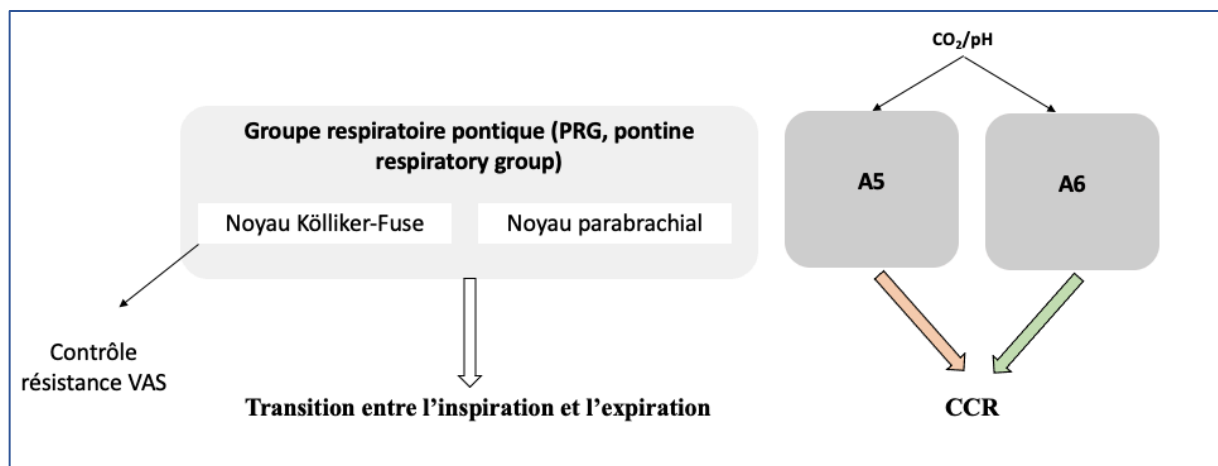


Figure 13: Les structures respiratoires pontiques. Le groupe respiratoire pontique (PRG), impliqué dans la transition entre l'inspiration et l'expiration est composé du noyau parabrachial et du noyau Kölliker-Fuse. Ce dernier effectue un contrôle dans la résistance des VAS. Le noyau A5 a un rôle facilitateur sur la commande centrale respiratoire (CCR) tandis que le noyau A6 à un rôle inhibiteur de la CCR. Les noyaux A5 et A6 sont sensibles aux CO_2/pH .

II. Origine du rythme respiratoire

Nous savons aujourd'hui que la rythmogénèse respiratoire est générée au niveau des structures ponto-bulbaires présentées en amont. Cependant, les mécanismes à l'origine de l'élaboration de la commande centrale respiratoire sont encore largement débattus et les recherches sur l'origine de la rythmogénèse respiratoire ont donné lieu à l'émergence de trois grandes hypothèses (Figure 14).

1) Hypothèse réseau

Selon cette hypothèse, la rythmogénèse respiratoire résulterait des propriétés synaptiques excitatrices et inhibitrices au sein des neurones actifs du réseau respiratoire (Figure 14) (Feldman and Smith 1989; Shao and Feldman 1997; Brockhaus and Ballanyi 1998; Haji et al. 2000; Richter 2001; Richter and Spyer 2001). Cependant, les résultats obtenus essentiellement sur des études menées *in vivo* chez des animaux adultes montrent la persistance d'un rythme respiratoire après une inhibition post-synaptique (Janczewski et al. 2013; Marchenko et al. 2016) suggérant que l'inhibition réciproque entre neurones ne serait pas à l'origine de la rythmogénèse respiratoire (Feldman and Smith 1989; Onimaru et al. 1989; Shao and Feldman 1997; Brockhaus and Ballanyi 1998; Gray et al. 1999).

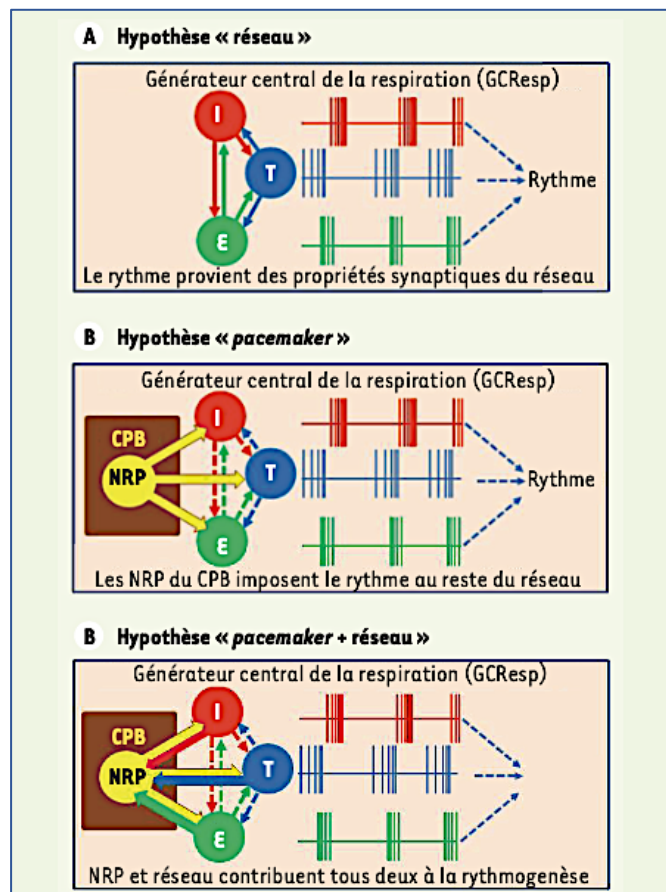


Figure 14: Les hypothèses sur l'origine de l'automatisme respiratoire. A. Hypothèse réseau, le rythme respiratoire est produit de manière spontanée suite à des propriétés synaptiques du réseau. B. Hypothèse pacemaker, l'activité rythmique prend son origine à partir de neurones respiratoires pacemaker (NRP) situé dans le complexe de pré-Bötzinger et l'imposent au reste du réseau. C. Hypothèse mixte « Réseau + Pacemaker », les neurones respiratoires pacemaker (NRP) et le réseau contribuent ensemble à la rythmogénèse respiratoire. D'après (Viemari et al. 2013).

2) Hypothèse pacemaker

Ces résultats obtenus sur le premier modèle montrant la persistance de la rythmogénèse respiratoire donnent naissance à l'émergence d'une seconde hypothèse. Selon celle-ci, la rythmogénèse respiratoire reposerait sur les propriétés autorythmiques des neurones respiratoires pacemakers. En effet, des expériences réalisées sur des préparations en blocs de tronc cérébral ou de moelle épinière isolée (Suzue 1984) mais également sur des sections de tronc cérébral (Smith et al. 1991) montrent la persistance d'un profil de décharge rythmique indépendamment d'afférences excitatrices ou inhibitrices des neurones respiratoires (Figure 14) (Onimaru et al. 1989). Ceci met en avant l'existence au sein de ce réseau de neurone respiratoire, d'une famille de neurone ayant des propriétés « pacemaker », appelés neurones respiratoires pacemaker (NRP) (Butera et al. 1999). Ainsi, selon cette hypothèse, les NRP seraient à l'origine de l'activité rythmique du générateur du rythme respiratoire (Feldman and Del Negro 2006). Comme présenté en amont, on trouve ces neurones pacemaker au niveau du préBötC (Smith et al. 1990; Johnson et al. 1994; Thoby-Brisson and Ramirez 2001), du RTN/pFRG (Onimaru et al. 2003) et du PiCo (Viemari et al. 2013; Ramirez and Anderson 2017). Les mécanismes sous-jacents à la rythmogénèse de chaque oscillateur font encore l'objet d'un débat (hypothèse d'un pacemaker ou d'un pacemaker dépendant du réseau) (Feldman and Del Negro 2006).

3) Hypothèse hybride

Cette dernière est l'hypothèse fédératrice actuelle, selon laquelle les neurones pacemaker du préBötC imposent leur rythme au reste du réseau qui peut en retour modifier l'activité de ces neurones (Figure 14) (Ballanyi et al. 1999; Viemari et al. 2013). Selon cette hypothèse, les différentes phases du cycle ventilatoire résulteraient donc d'un mécanisme hybride issu d'une interaction entre des propriétés de réseau et l'activité pacemaker du générateur du rythme respiratoire (Viemari et al. 2013). Chez le rongeur nouveau-né, il semblerait que le RRG soit composé de deux structures en interaction : le pFRG (Onimaru and Homma 2003) et le préBötC (Smith et al. 1991; Mellen et al. 2003; Fortin and Thoby-Brisson 2009). Les neurones pacemakers présents dans le complexe de préBötC et du RTN/pFRG n'agissent pas comme simple « pacemaker » générant le rythme respiratoire. Ces neurones sont bien intégrés dans le réseau respiratoire, en effet, des mécanismes synaptiques et autres mécanismes ioniques contribuent à leur synchronisation et à leurs propriétés de décharge (Purvis et al. 2007; Ramirez et al. 2011, 2012; Carroll and Ramirez 2013). Il existe plusieurs connexions inhibitrices entre le préBötC inspiratoire et le pFRG expiratoire empêchant ainsi l'activation concomitante des groupes de

muscles inspiratoires et expiratoires (Del Negro et al. 2018). Ainsi, l'hypothèse proposée de nos jours tend à dire que chez le nouveau-né, le rythme respiratoire serait généré par ces deux oscillateurs couplés tandis que, chez l'adulte, il s'agirait d'un mécanisme hybride résultant d'une interaction entre des propriétés de réseau et l'activité pacemaker du générateur du rythme respiratoire (Viemari et al. 2013). Plus récemment, un modèle de triple oscillateurs a été proposé où les trois phases de la respiration : l'inspiration, la post inspiration et l'expiration active sont générées par trois structures distinctes génératrices de rythmes : Le préBötC pour la phase inspiratoire, le complexe post-inspiratoire (PiCo) pour la phase post inspiratoire et le noyau parafacial latéral (pFL) pour la phase d'expiration active (Figure 15) (Anderson et al. 2016).

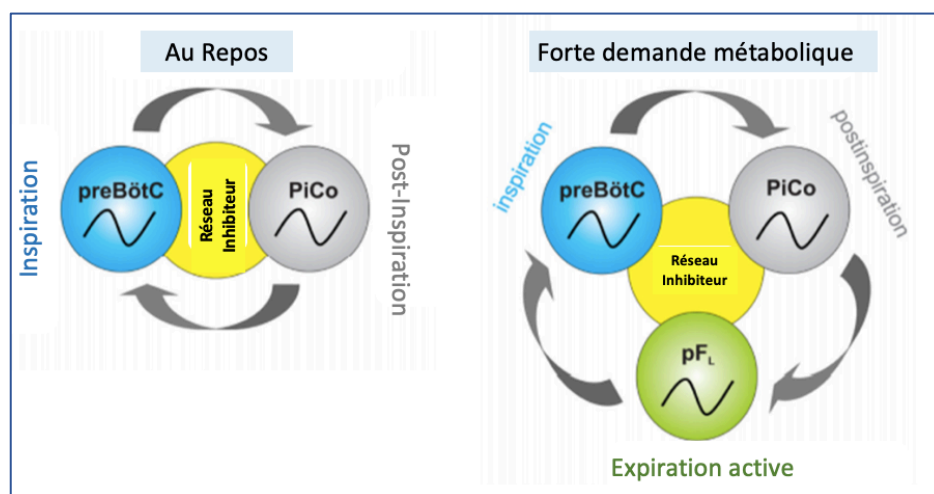


Figure 15: Hypothèse des triples oscillateurs. A gauche sont représentés les générateurs intervenant au repos. Le complexe de pré-Bötzinger (préBötC) génère la phase d'inspiration du cycle respiratoire et le complexe post-inspiratoire (PiCo) génère la phase post-inspiratoire durant le cycle respiratoire. A droite sont représentés les générateurs intervenant pendant une forte demande métabolique. Le complexe de pré-Bötzinger (préBötC) génère la phase d'inspiration du cycle respiratoire, le complexe post-inspiratoire (PiCo) génère la phase post-inspiratoire durant le cycle respiratoire et le Noyau parafacial latéral (pFL) qui génère la phase d'expiration active du cycle respiratoire. Tous ces générateurs sont en connexion avec les autres centres respiratoires bulbaires afin d'ordonner les trois phases du cycle ventilatoire. Adaptée d'après (Ramirez and Anderson 2017).

Chapitre III : Modulation et régulation de la ventilation

Comme présenté dans le chapitre précédent, l'activité du réseau respiratoire est modulée en permanence par des informations afférentes d'origine centrale et/ou périphérique. Les régulations de la respiration sont essentielles dans le maintien de la rythmogénèse respiratoire mais également dans son adaptation face aux différentes demandes métaboliques (variations de la pression partielle en dioxygène (PO_2), en dioxyde de carbone (PCO_2) et/ou de pH) et aux comportements non-ventilatoires (posture, déglutition...). Ces variations chimiques ou mécaniques sont perçues respectivement par des chémo- ou mécanorécepteurs qui modifieront l'activité du générateur du patron respiratoire.

I. Réponses ventilatoires à l'hypoxie et l'hypercapnie

Les chemoréflexes respiratoires permettent d'adapter la ventilation en réponse à des modifications des pressions partielles artérielles et tissulaires en O_2 (P_aO_2 et P_tO_2), en CO_2 (P_aCO_2 et P_tCO_2) ainsi que de pH. Ainsi, une diminution de la quantité d' O_2 dans l'air inspiré, un frein à l'inspiration ou une anomalie cardio-vasculaire, peut être à l'origine d'une diminution de la P_aO_2 et P_tO_2 . De même, une augmentation de la fraction de CO_2 dans l'air inspiré ou un frein à l'expiration provoque une augmentation de P_aCO_2 et P_tCO_2 et une diminution du pH. Ces modifications seront détectées par des chémorécepteurs sensibles aux variations de PO_2 , PCO_2/H^+ (Gonzalez et al. 1994). Il existe deux catégories de chémorécepteurs régulant le rythme de la respiration, ceux situés en périphérie, on parlera dans ce cas de chémorécepteurs périphériques et ceux situés au niveau central, on parlera alors de chémorécepteurs centraux. La mise en jeu de ces chémorécepteurs modulera en retour l'activité du réseau neuronal respiratoire dans l'objectif de maintenir l'homéostasie.

1) Les chémorécepteurs

a. Les chémorécepteurs périphériques

Les chémorécepteurs périphériques se situent au niveau des corps aortiques et dans les corpuscules carotidiens au niveau de la bifurcation carotidienne et sont sensibles aux modifications de PaO_2 , la $PaCO_2$ et la concentration en H^+ (Figure 16.a et 16.b) (Jonkman et al. 2020). Cette localisation stratégique leur permet de détecter ces variations et de transmettre les informations aux centres respiratoires (Greer and Funk 2013). Ainsi, la voie afférente est le nerf dépresseur aortique dit de Ludwig-Cyon qui augmentent leur fréquence de décharge lors d'une

diminution de PaO_2 , d'une augmentation de la PaCO_2 ou une baisse du pH (Dejours 1962; Biscoe et al. 1970; Fitzgerald and Dehghani 1982; Andrade et al. 2018) et projettent dans la région rostral du bulbe ventro-latéral (r-VLM) par l'intermédiaire du nerf vague (X) (Secourgeon 2012).

Les corps carotidiens contiennent deux principaux types de cellules, les cellules glomiques de type neuronales (type I) et les cellules de type gliales (type II) participant au traitement du signal (Figure 16.c). Les cellules de type I détectant principalement les changements de PO_2 et PCO_2/pH et vont exciter les terminaisons afférentes du nerf sinusal carotidien (une branche du nerf glossopharyngien), qui projette au niveau des sous-divisions commissurale et médiane du noyau du tractus solitaire (NTS) (centre intégrateur situé dans le bulbe rachidien) (Figure 16) (Secourgeon 2012; Funk and Greer 2013). Depuis le noyau du tractus solitaire (NTS) on observe des projections vers l'ensemble du réseau respiratoire tel que le noyau rétrotrapézoïde (RTN) (chémo-récepteur central) et les groupes respiratoires pontiques (PRG), qui se projettent à leur tour dans le groupe respiratoire ventral (VRG) pour permettre une adaptation ventilatoire (Smith et al. 2013) (Figure 16).

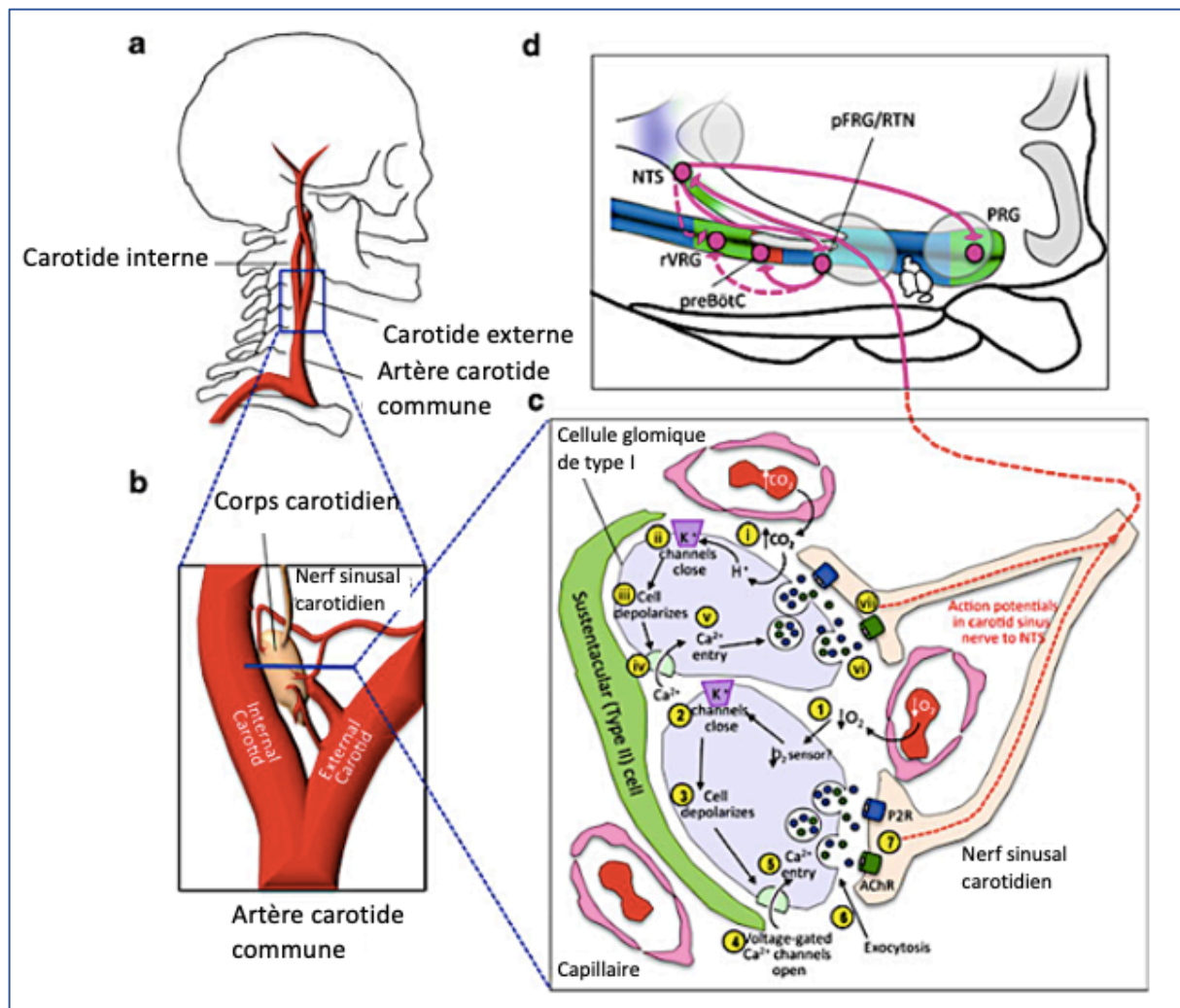


Figure 16: Chémorécepteurs situés aux niveaux de la bifurcation carotidienne. Les corps carotidiens sont situés bilatéralement dans le cou (a) à la bifurcation de l'artère carotide commune en artères carotides interne et externe. (b) Illustration du corps carotidien et son innervation afférente par le nerf sinusal carotidien. (c) Coupe transversale du corps carotidien (au niveau de la ligne bleue en b) montrant la disposition des cellules de type I et II, des capillaires et des terminaisons du nerf sinusal carotidien. Les voies de transduction du signal suite à une augmentation de CO_2 et d'une diminution d' O_2 aboutissant à la libération d'un neurotransmetteur dans le nerf sinusal carotidien sont représentées (d) Projections centrales des nerfs afférents du nerf sinusal carotidien dans la moelle. La synapse excitatrice de premier ordre se trouve dans le noyau du tractus solitaire (NTS). Ces neurones se projettent vers le groupe respiratoire pontique (PRG) et les neurones chémosensibles du noyau/rétrotrapézoïde/groupe respiratoire parafacial (RTN/pFRG) qui, à leur tour, envoient des projections excitatrices vers le préBötC et/ou régions de la colonne respiratoire ventrale. Adaptée d'après (Greer and Funk 2013).

b. Les chémorécepteurs centraux

En 1953, Leusen réalisa des expériences *in vivo* sur le chien lui permettant de mettre en évidence qu'une injection de solution acide dans les ventricules cérébraux conduit à une augmentation de la ventilation. Il en a été déduit qu'il existait donc des chémorécepteurs centraux sensibles aux variations de CO₂ et/ou pH conduisant à une adaptation ventilatoire (Leusen 1953; Mitchell et al. 1963; Severinghaus 1998; Lazarenko et al. 2009). L'existence de structures sensibles aux variations de CO₂ et/ou de pH a été montré dès 1953 par Leusen (Leusen 1953). Dès le début des années 1960, le noyau/rétrotrapézoïde/groupe respiratoire parafacial (RTN/pFRG) a été identifié comme sensible au CO₂ et/ou aux ions H⁺ (Mitchell et al. 1963; Schlaefke et al. 1970). Cette région est considérée aujourd'hui comme étant le principal chémorécepteur central (Figure 17). Par la suite, de nombreuses études ont identifiés différents groupes de neurones chémosensibles au CO₂ et/ou au ions H⁺ au sein du système nerveux central (SNC) (Nattie and Li 2012) tels que le noyau du tractus solitaire (NTS), les raphés bulbaires ou le Locus Coeruleus (A6) (Figure 17). Au sein de ces structures sont localisés des amas de neurones sensibles aux variations de CO₂ et/ou de H⁺ en contact direct avec le liquide céphalo-rachidien (LCR) mais également au contact du sang artériel situé dans les capillaires sous-jacents au LCR (Coates et al. 1993).

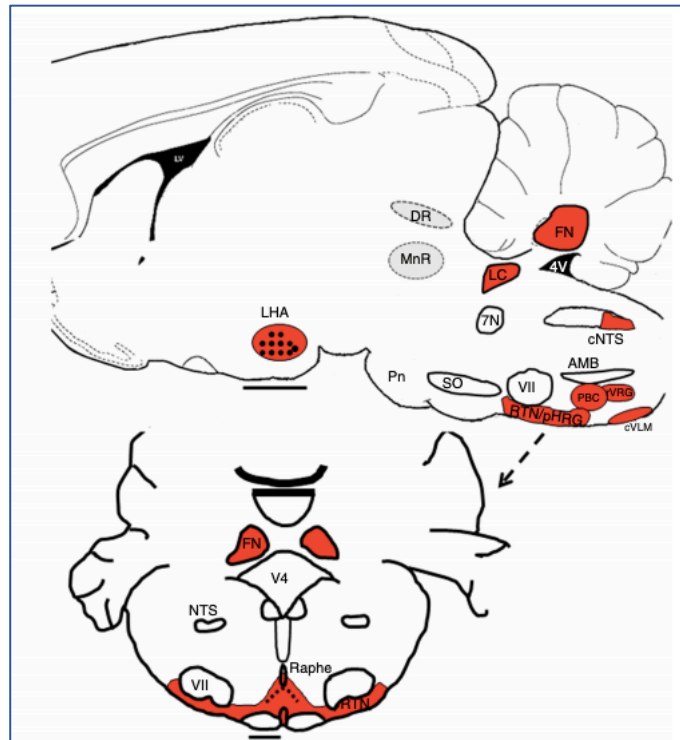


Figure 17: Localisation des chémorécepteurs centraux. Distribution des chémorécepteurs centraux dans le cerveau postérieur. Abréviations : R, rostral ; M, moyen ; C, caudal ; LHA, hypothalamus latéral ; DR, raphé dorsal ; FN, noyau fastigial ; 4v, quatrième ventricule ; LC, locus ceruleus ; 7N, nerf facial ; c-NTS, caudal nucleus tractus solitarius ; AMB, ambigu ; VII, noyau facial ; SO, olive supérieure ; PBC, préBötC ; r-VRG, groupe respiratoire ventral rostral ; c-VLM, médullaire ventrolatérale caudale ; RTN/pFRG, noyau rétrotrapézoïde/groupe respiratoire parafacial. Adaptée de (Nattie and Li 2012).

2) Régulation ventilatoire suite à un stimulus chimique

a. Adaptation de la commande centrale respiratoire à l'hypoxie

Lorsque la demande en O_2 dépasse les apports, la cellule devient hypoxique. Celle-ci peut avoir pour origine une diminution de P_1O_2 (tel que rencontrée en haute altitude) mais elle peut également être consécutive à un dysfonctionnement des apports en O_2 tels que rencontré lors de certaines pathologies. On distingue différents types d'hypoxie en fonction du type et de la durée de l'exposition. Ainsi, l'exposition à l'hypoxie peut être intermittente (comme ce qui est rencontré dans les apnées obstructives du sommeil ; voir *Partie III. Chapitre I de l'introduction*) ou continue (Haute altitude, insuffisance cardio-respiratoire) et elle peut être aiguë (quelques secondes / minutes) ou chronique (quelques heures à plusieurs mois). Pour faire face à cette situation, différents mécanismes physiologiques sont mis en place afin d'assurer l'homéostasie et restaurer l'apport en O_2 aux cellules consommatrices (Semenza 2010).

i. Réponse ventilatoire à l'hypoxie : HVR

Chez les mammifères, la valeur physiologique de la PaO_2 est comprise entre 80 et 100 mmHg (Feldman 1986; Gonzalez et al. 1994). En 2001, l'équipe de Maxova & Vizek montrent que l'exposition à l'hypoxie aiguë entraîne une réponse ventilatoire biphasique caractérisée par une augmentation immédiate et brève de la ventilation (augmentation de la ventilation) suivie de son déclin, souvent appelé "roll-off" (Figure 18) (Maxová and Vizek 2001). La première phase d'augmentation de la ventilation est observée lors d'une réponse ventilatoire à l'hypoxie (HVR) est supportée par une augmentation du volume courant mais également de la fréquence respiratoire (Maxová and Vizek 2001). Lors du « roll-off », la ventilation diminue mais reste tout de même supérieure aux valeurs pré-hypoxiques chez l'adulte (Teppema and Dahan 2010).

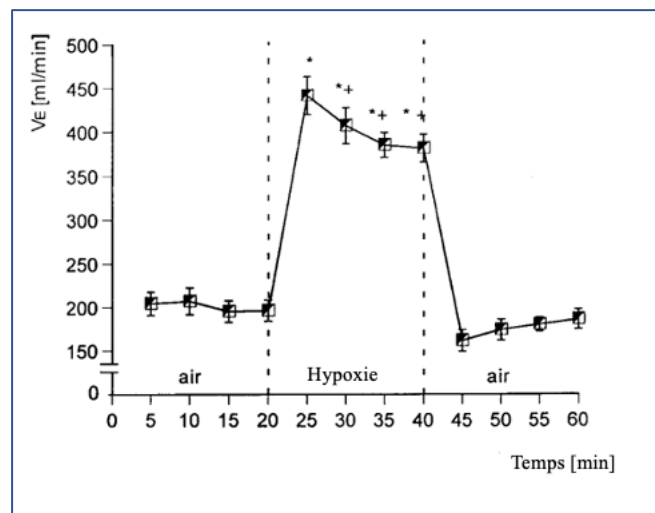


Figure 18: Courbe représentant la ventilation bi-phasique en réponse à l'hypoxie chez le rat adulte. Courbe représentant l'évolution du débit ventilatoire (V_e) au cours du temps. La ventilation a été mesurée 20 minutes en normoxie (0 à 20 minutes) puis les rats ont été exposés à un mélange d'air hypoxique (10% O_2 dans de l'azote (N_2)) durant 20 minutes, enfin, les rats ont été placés en normoxie afin d'évaluer leur capacité à récupérer leur ventilation. D'après (Maxová and Vizek 2001).

ii. Mécanismes responsables de la réponse ventilatoire à l'hypoxie

En réponse à une diminution de PaO_2 , les corps carotidiens augmentent leur fréquence de décharge. Les cellules chémoréceptrices vont alors stimuler le nerf sinusal carotidien (Hall et al. 1996) puis le nerf glossopharyngien dont les nerfs sensitifs vont projeter sur les sous divisions commissural et médiane du noyau du tractus solitaire (c-NTS et m-NTS) (Claps et Torrealba, 1988; Finley et Katz, 1992). En effet, la stimulation du nerf sinusal carotidien par l'hypoxie entraîne une augmentation de l'expression de c-Fos, un marqueur d'activité neuronale, dans ces structures (Berquin et al. 2000; Perrin-Terrin et al. 2016). Il a été montré que l'augmentation de la

ventilation hypoxique était concomitante avec l'augmentation de la fréquence de décharge enregistrée au niveau du nerf sinusal carotidien (Vizek et al. 1987). En parallèle, l'hypoxie entraîne également une diminution de la PtO_2 responsable de l'activation des mécanismes centraux. Parmi lesquels, il a été mis en évidence l'existence de neurones intrinsèquement sensibles à l' O_2 impliqués dans l'augmentation de la ventilation tel que l'hypothalamus caudal (Tenney and Ou 1977). Suite à ce pic d'augmentation de la ventilation, se met en place chez l'adulte une phase de dépression respiratoire relative pouvant être expliquée par l'hypocapnie consécutive à l'augmentation de la ventilation, l'hypométabolisme accompagnant l'hypoxie (Gautier and Bonora 1992, 1994; Mortola 2005) certains mécanismes cellulaires (Canaux TASK) et certains systèmes de neurotransmission (Systèmes gabaergiques, serotoninergiques, opioïdiques) peuvent être impliqués (Grunstein et al. 1981; Koos et al. 1994; Richter et al. 1999; Hayashi and Fukuda 2000). Suite à l'augmentation de la ventilation, un contrôle modérateur par les structures du tronc cérébral semble également possible notamment la surface ventrale du bulbe rachidien (Bodineau et al. 2000c; Voituron et al. 2006).

b. Adaptation de la commande centrale respiratoire à l'hypercapnie

Une augmentation de la quantité de CO_2 dans l'air inspiré, un frein à l'expiration (apnée) ou une activité insuffisante du réseau neuronal à l'origine de la commande centrale respiratoire peuvent conduire à une augmentation de la $PaCO_2$ et une baisse du pH, l'organisme se trouve alors en hypercapnie.

i. Réponse ventilatoire à l'hypercapnie : HcVR

Chez les mammifères, la $PaCO_2$ normale avoisine 40 mmHg (Nattie 1999). Au-delà de ce seuil, on observe une augmentation linéaire de la ventilation (Figure 19) (Nattie and Li 2012). En 2000, Nattie et ses collaborateurs ont rapporté qu'une augmentation de l'ordre de 2mmHg de la $PaCO_2$ était suffisante pour doubler la ventilation. Ainsi, l'hypercapnie entraîne une augmentation de la ventilation (Figure 19) (Nattie 2000; Nattie and Li 2012) liée essentiellement à une augmentation de volume courant (V_T) (Duffin et al. 2000; Ohashi et al. 2013).

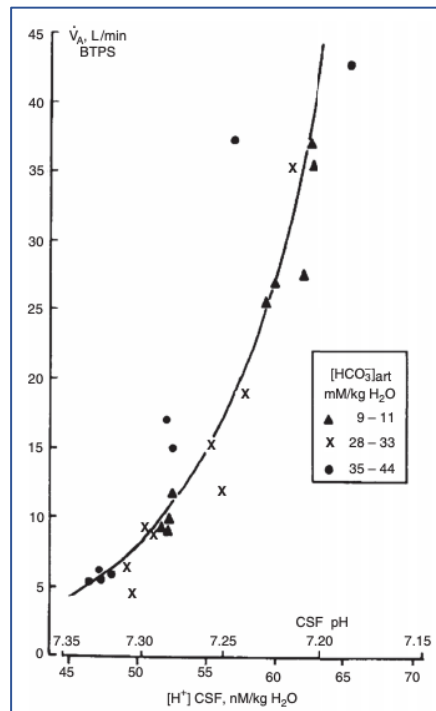


Figure 19: Ventilation alvéolaire en réponse à l'hypercapnie. Réponse ventilatoire à l'inhalation de CO_2 dans des conditions normales d'équilibre acide-base (X) ainsi que dans des conditions d'acidose (triangles pleins) et d'alkalose (cercles pleins). D'après (Nattie and Li 2012).

ii. Mécanismes responsables de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie

Des études électrophysiologiques et anatomiques ont montré que le chemoréflexe respiratoire à l'hypercapnie (HcVR) trouve son origine dans les chémorécepteurs périphériques et centraux (Smith et al. 2010) se traduisant par une augmentation de l'activité des muscles respiratoires. En 1975, Lahiri et DeLaney ont suggéré que les corps carotidiens et en particulier les cellules glomiques de type I étaient activés lors d'une augmentation de $PaCO_2$ (Lahiri and DeLaney 1975) (Gonzalez et al. 2003; Lahiri and Forster 2003). De nombreuses études ont quantifié les neurones c-Fos positifs en réponse à une stimulation hypercapnique. En 2002, Wickström et son équipe ont montré que la stimulation hypercapnique chez le nouveau-né conduit à une augmentation du nombre de neurones positifs pour c-Fos au niveau des sous-divisions commissural et médiane du noyau du tractus solitaire (c-NTS et m-NTS) (Wickström et al. 2002) confirmant l'implication des corps carotidiens dans l'arc chemoréflexe hypercapnique. Cependant, les chémorécepteurs centraux, décrits plus en amont, contribuent en grande partie à l'HcVR (Stornetta et al. 2006; Takakura et al. 2006).

A l'heure actuelle, cette chémoréception centrale au CO₂ semble portée essentiellement par deux principales structures :

- Les neurones chémosensibles exprimant le gène *Phox2b* positif du RTN/pFRG (Mulkey et al. 2004; Stornetta et al. 2006).
- Les neurones sérotoninergiques des noyaux des Raphés bulbaires *RPa* et *ROb* (Larnicol et al. 1994; Haxhiu et al. 1996; Okada et al. 2002; Hodges and Richerson 2010).

Il est à noter que d'autres structures neuronales chémosensibles ont également été décrites comme la sous-division commissural du noyau du tractus solitaire (c-NTS) (Berquin et al. 2000), le complexe de pré-Bötzinger (Solomon et al. 2000), le Locus Coeruleus (Oyamada et al. 1999; de Carvalho et al. 2017), la substance grise périaqueducule (Kramer et al. 1998) et l'hypothalamus caudal (Waldrop 1991; Nattie and Li 2009). L'ensemble de ces structures appartient au réseau neuronal respiratoire, leur activation engendre une modulation de l'activité du réseau conduisant à une réponse respiratoire. Cependant, des différences sont observées selon l'état de vigilance : durant les phases d'éveils, les neurones du noyau rétrotrapézoïde/groupe respiratoire parafacial (RTN/pFRG) seraient préférentiellement activés, et iraient activer les pré-motoneurones de la colonne ventrale respiratoire ce qui stimulerait les motoneurones inspiratoires spinaux. En revanche, durant les phases de sommeil, ce serait préférentiellement le noyau du raphé bulbaire qui serait stimulé (Mitchell 2004). De manière intéressante, une étude publiée en 2015 montre l'interaction entre les chémorécepteurs périphériques et centraux, conduisant à une modification du seuil de sensibilité des chémorécepteurs centraux (Smith et al. 2015). Pour conclure, suite à une exposition à de l'hypercapnie (\uparrow PaCO₂) ou à de l'hypoxémie (\downarrow PaO₂), la ventilation est régulée suite à l'activation des chémorécepteurs centraux et périphériques (Figure 20).

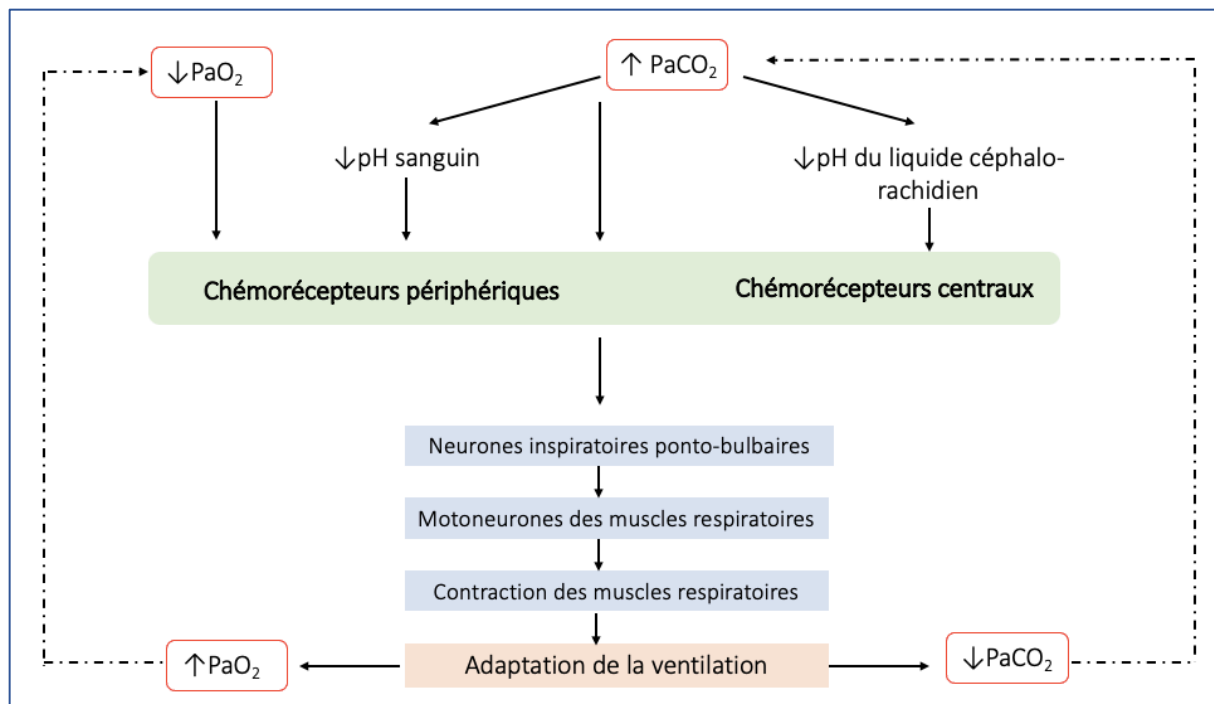


Figure 20: Schéma récapitulatif de la boucle de rétrocontrôle suite à des modifications de PaO_2 et PaCO_2 . Les variations de la PaO_2 , PaCO_2/H^+ sont détectées par des chémorécepteurs périphériques ou centraux qui activent par la suite les neurones inspiratoires ponto-bulbaires dans le but de réguler la ventilation.

3) Les mécanorécepteurs

En plus d'une sensibilité à l' O_2 et au CO_2 , il existe également des récepteurs mécaniques, appelés mécanorécepteurs. Ces récepteurs jouent un rôle important dans le contrôle de la fréquence et de la profondeur de la respiration et donnent une information sur le niveau d'inflation pulmonaire, la pression dans la trachée, l'expansion thoracique etc... La principale source de rétroaction réceptive provient des poumons, des muscles situés dans la paroi thoracique et des voies respiratoires qui fournissent un retour sensoriel aux centres respiratoires sur les conditions mécaniques et chimiques. Les récepteurs broncho-thoraco-pulmonaires communiquent avec le système nerveux central par l'intermédiaire des nerfs afférents vagues afin de moduler la ventilation pulmonaire en réponse aux différents stimuli rencontrés (Carr and Udem 2003). Les nerfs innervant les voies respiratoires peuvent être classés en divers groupes. Il existe différents critères de classification, ceux utilisés actuellement sont basés sur la vitesse de conduction de l'influx nerveux, la taille des neurones, l'origine ganglionnaire du corps cellulaire ou selon la nature du stimulus auquel ils répondent et leur neurochimie. Cependant, il n'existe aucun schéma de classification qui prenne en compte toutes les caractéristiques. Ainsi, les nerfs afférents broncho-pulmonaires sont typiquement considérés comme appartenant à

l'une des trois catégories générales, à savoir les fibres de type C, les récepteurs à l'étirement à adaptation rapide (RAR) et les récepteurs d'étirement à adaptation lente (SAR) (Carr and Undem 2003).

a. Les mécanorécepteurs pharyngés

Lors de la ventilation, il est important que les voies aériennes supérieures soient maintenues ouvertes afin de contrecarrer les pressions d'effondrement subatmosphériques générées au cours des différentes phases de la ventilation que ce soit au cours du sommeil ou à l'éveil (Mathew and Ghosh 1995). Une diminution du calibre pharyngé est détectée par les mécanorécepteurs situés dans la paroi du pharynx (Figure 21). Ces derniers stimulent les mécanorécepteurs situés dans la paroi pharyngé, un influx transite par une branche du nerf vague (X) jusqu'au centre respiratoire notamment les sous divisions commissural et médiane du noyau du tractus solitaire (c-NTS et m-NTS) (Horner et al. 1991) (Figure 21). Par la suite, les motoneurons du muscle pharyngé sont stimulés par le nerf hypoglosse (XII) afin de réguler le calibre du pharynx et le dilater par l'intermédiaire ceci empêche le collapsus pharyngé et prévient l'étouffement (Figure 21). La suppression de l'activation des muscles des voies aériennes supérieures pendant le sommeil peut entraîner des épisodes de diminution du tonus musculaire qui rendent l'espace aérien supérieur vulnérable au collapsus conduisant à l'apparition d'apnées obstructives du sommeil (Widdicombe 1981; Horner et al. 1991).

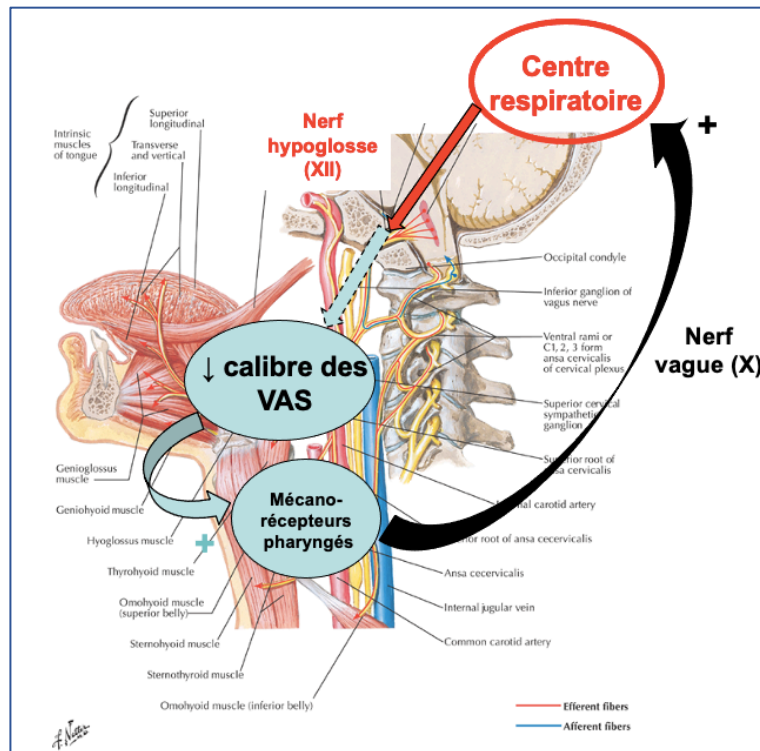


Figure 21: Intervention des mécanorécepteurs pharyngés dans le maintien de l'ouverture des voies aériennes supérieures. Une diminution du calibre des voies aériennes supérieures stimule les mécanorécepteurs pharyngés. Par la suite, un influx nerveux transite jusqu'aux centres respiratoires ponto-bulbaires, ces derniers, activeront les motoneurones phréniques par l'intermédiaire du nerf hypoglosse (XII) Adapté d'après (Benson 2006).

b. Les récepteurs d'étirement pulmonaire

Ces mécanorécepteurs sensibles au niveau d'étirement et au volume de l'appareil respiratoire sont situés au niveau du parenchyme pulmonaire (la plèvre et au niveau des alvéoles pulmonaires), des muscles respiratoires, des voies aériennes et des bronchioles terminales (Pack 1981). Il existe deux catégories de récepteurs à l'étirement, les récepteurs d'étirement pulmonaire à adaptation rapide (Rapidly adapting pulmonary stretch receptors, RARs) et les récepteurs d'étirement pulmonaires à adaptation lente (Slowly adapting pulmonary stretch receptor afferents, SARs). L'inflation pulmonaire rencontrée durant la ventilation est en permanence contrôlée. En effet, lors de l'inspiration, l'inflation pulmonaire active les mécanorécepteurs, et un influx sensoriel est envoyé depuis le nerf vague (X) vers le centre bulbaire afin de diminuer le volume pulmonaire (Carr and Undem 2003; Del Negro et al. 2018). Les récepteurs d'étirement pulmonaire à adaptation rapide (Rapidly adapting pulmonary stretch receptors, RARs) sont stimulés suite à une expansion ou compression importante et rapide des poumons mais également lors d'une hyperpnée ou d'un pneumothorax (Pack 1981). Suite à leur activation, un influx nerveux est envoyé à travers les fibres vagues jusqu'aux centres

respiratoires (Del Negro et al. 2018). Les récepteurs d'étirement pulmonaire à adaptation lente sont activés par l'inflation des poumons et transmettent des informations suite à un changement du volume pulmonaire aux neurones du tronc cérébral qui contrôlent les durées d'inspiration et d'expiration (Paintal 1973; Bartoli 1975). Leur dénervation conduit au prolongement de la phase inspiratoire, l'augmentation du volume courant et la réduction de la fréquence respiratoire (Clifford et al. 1983; Flynn et al. 1985; Forster et al. 1990). Des études montrent les sites de projections centrales des récepteurs d'étirement pulmonaire à adaptation rapide au niveau du noyau du tractus solitaire (NTS) et particulièrement dans les sous divisions commissural et médiane du noyau du tractus solitaire (c-NTS et le vl-NTS) afin de réguler le niveau d'expansion de la cage thoracique (Figure 22) (Davies and Kubin 1986; Bonham et al. 1993; Widdicombe 2003). Ainsi, durant l'inspiration, l'inflation pulmonaire va activer ces récepteurs conduisant à un arrêt de la décharge des neurones inspiratoires (Cross and Jones 1980; Cohen and Feldman 1984) (Figure 22).

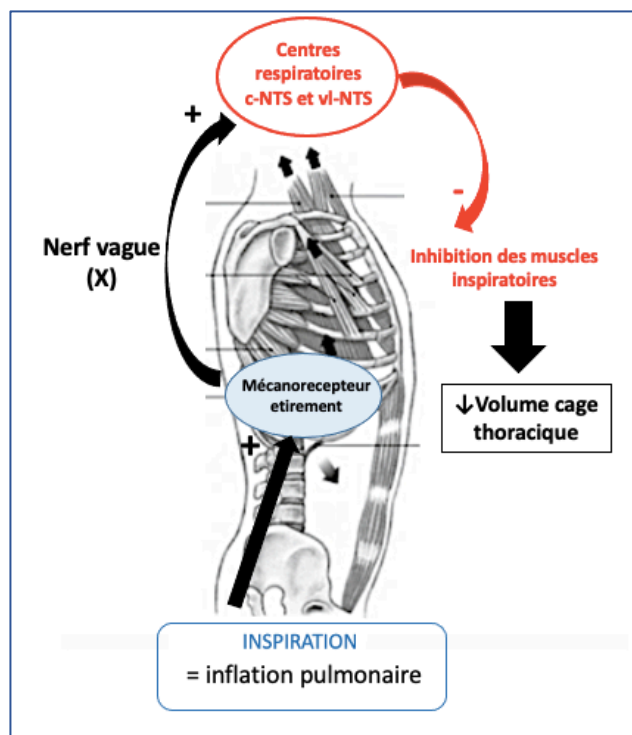


Figure 22: Mécanorécepteurs contrôlant l'expansion de l'appareil thoraco-pulmonaire. L'expansion ou la compression de l'appareil thoraco-pulmonaire sont contrôlées en permanence par les mécanorécepteurs thoraco-pulmonaires. Lors de l'inspiration, l'expansion de la cage thoracique stimule les mécanorécepteurs à l'étirement, s'ensuit une activation des sous-divisions commissural et médiane du noyau du tractus solitaire (c-NTS et m-NTS) qui inhiberont les motoneurones inspiratoires afin de favoriser le relâchement de la cage thoracique pour initier la phase d'expiration. Adaptée d'après (Greer and Funk 2013).

Durant l'expiration, la compression pulmonaire active ces récepteurs conduisant à un prolongement de la phase expiratoire (Clark and Euler 1972; Cross and Jones 1980; Bonham 1991). L'expansion de l'appareil thoraco-pulmonaire durant l'inspiration, active ces récepteurs ceci facilite la transition entre la phase inspiratoire et la phase d'expiration, ceci rappelle la notion de Hering-Breuer (Bonham 1991).

Nota bene : A l'opposé de ce réflexe, un réflexe favorisant l'inspiration se met en place à la fin de l'expiration lors d'une diminution de volume pulmonaire en dessous de la capacité résiduelle fonctionnelle, c'est le réflexe excito-inspiratoire d'Hering-Breuer.

c. Les récepteurs bronchiques

Ces récepteurs tapissent l'épithélium des voies respiratoires proximales, et sont sensibles aux gaz irritants mais également à l'inflammation locale. L'activation de ces récepteurs va conduire à une sécrétion de mucus, la toux et la phase d'expiration (Clifford et al. 1983; Flynn et al. 1985; Forster et al. 1990). Il existe deux catégories de récepteurs bronchiques, les récepteurs épithéliaux, situés dans l'épithélium bronchiques et les récepteurs musculaires situés au niveau des muscles lisses bronchiques (Widdicombe 1981). Les récepteurs épithéliaux présentent une sensibilité à l'irritation par des gaz, et leur activation conduit à une hyperpnée (augmentation de l'amplitude des mouvements respiratoires) (Widdicombe 1981). Les récepteurs musculaires présentent une sensibilité à l'étirement des voies aériennes et à la distension pulmonaire, et leur activation depuis le nerf vague (Carr and Undem 2003) jusqu'aux centres bulbaires conduit à un allongement de la phase inspiratoire et une inhibition de la phase d'expiration (Widdicombe 1981).

d. Les récepteurs proprioceptifs de la paroi thoracique

Ces récepteurs se situent dans la paroi thoracique, les tendons et le fuseau neuromusculaire. Ils présentent une sensibilité à l'étirement des muscles respiratoires, leur activation conduit à une modulation de la ventilation *via* le nerf phrénique (Mathew and Ghosh 1995).

e. Les récepteurs alvéolaires Juxtapillaires

Les récepteurs alvéolaires Juxtapillaires également appelé les récepteurs J ou les fibres C pulmonaires sont localisés dans le tissu pulmonaire particulièrement dans la paroi alvéolaire adjacente aux capillaires. Ces récepteurs sont sensibles à la dilatation des capillaires

pulmonaires ou la présence d'un liquide interstitiel dans l'espace intra-alvéolaire comme ce qui est rencontré durant un œdème pulmonaire. Suite à l'activation de ces récepteurs, l'influx nerveux transite par le nerf vague jusqu'au noyau du tractus solitaire (NTS) conduisant ainsi à une polypnée (augmentation de la fréquences respiratoire) (Widdicombe 1981; Mathew and Ghosh 1995). Ces récepteurs peuvent également être activées par une congestion locale provoquant une dyspnée, une augmentation de la ventilation et une toux (Coleridge and Coleridge 1984).

En conclusion, l'ensemble de ces récepteurs retrouvés dans le système respiratoire intervient dans la régulation du rythme respiratoire chez des sujets sains afin de réguler la ventilation suite aux différents stimuli chimiques ou mécaniques (Tableau 1). Ces récepteurs peuvent jouer un rôle crucial chez des patients présentant des atteintes touchant l'appareil respiratoire. La rétroaction de ces récepteurs peut également expliquer les réponses ventilatoires observées chez les patients présentant une atteinte pulmonaire (Jonkman et al. 2020).

	Récepteurs	Localisations	Rôles	Projections	Références
Chémorécepteurs	Chémorécepteurs périphériques	Bifurcation carotidienne ou aortique	Sensibilité aux variations d'O ₂ , CO ₂ /H ⁺	c-NTS m-NTS r-VLM	(Secourgeon, 2012) (Biscoe et al., 1970) (Dejours, 1962) (Fitzgerald et al., 1982) (Andrade et al., 2018)
	Chémorécepteurs centraux	RTN/pFRG ou les Raphés	Sensibilité au variation de CO ₂ /H ⁺	c-NTS vl-NTS	(Lazarenko et al., 2009) (Mitchell et al., 1963) (Severinghaus, 1998)
Mécanorécepteurs	Mécanorécepteurs pharyngés	Paroi pharyngés	Maintien les VAS ouvertes	c-NTS vl-NTS	(Widdicombe, 1981) (Carr et al., 2003)
	Récepteurs à l'étirement pulmonaire (RARs ou SARs)	Parenchyme pulmonaire Muscles respiratoires Voies aériennes Bronchioles terminales	Maintien le niveau d'étirement de l'appareil thoraco-pulmonaire	c-NTS vl-NTS	(Davies et al., 198) (Bonham et al., 1993) (Widdicombe, 2003)
	Récepteurs bronchiques	Epithélium bronchique	Sensibilité à l'irritation et l'inflammation locale	NTS	(Forster et al., 1990) (Flynn et al., 1985) (Clifford et al., 1983)
	Récepteurs musculaires	Muscle lisse bronchique	Sensibilité à l'étirement	NTS	(Carr et al., 2003) (Widdicombe, 1981)
	Récepteurs paroi thoracique	Paroi thoracique	Sensibilité à l'étirement	NTS	(Mathew et al., 1995)
	Récepteurs alvéolaire juxta-capillaire (récepteurs J/ Fibres C)	Paroi alvéolaires adjacent au capillaire	Sensible à la dilatation des capillaires pulmonaires ou à la présences de liquide interstitiel	NTS	(Coleridge et al., 1984) (Mathew et al., 1995) (Jonkman et al., 2020)

Tableau 1: Tableau récapitulatifs des différents récepteurs intervenant dans la régulation de la ventilation. Différents récepteurs peuvent intervenir dans la régulation de la ventilation. Ces récepteurs peuvent-être sensibles à des variations chimiques, on parlera alors de chémorécepteurs ou mécaniques pour des mécanorécepteurs. Les chémorécepteurs peuvent être situés en périphérie (au niveau des carotides ou de l'aorte) ou alors au niveau centrale (comme le noyau rétrotapézoïde/groupe respiratoire parafacial (RTN/pFRG)). Les mécanorécepteurs sont distribués tout au long du système respiratoire.

II. La ventilation : un acte moteur plastique

La ventilation est un phénomène qui s'adapte de façon appropriée à diverses situations comme celles observées suite à des changements métaboliques (comme l'effort, le changement de taux d'O₂ (hypoxique) ou de CO₂ (hypercapnique), des variations mécaniques (étirement des poumons) mais également à des comportements non ventilatoires (déglutition, vomissement, la prise de parole, ...). Des stimuli de forte intensité, fréquents et/ou chroniques peuvent induire des changements fonctionnels durables dans le temps sur la commande centrale respiratoire. Ces changements persistants du système de contrôle neuronal en réponse à une altération structurelle et/ou fonctionnelle définissent la plasticité respiratoire (Mitchell and Stephen 2003).

1) Plasticité respiratoire en réponse à l'hypoxie intermittente chronique

La plasticité respiratoire peut être induite par l'hypoxie, l'hypercapnie, l'exercice ou alors au cours du développement par exemple. Suite à l'exposition à de l'hypoxie intermittente chronique (HIC), il est observé chez le rat anesthésié une augmentation progressive de l'activité du nerf phrénique, qualifiée de facilitation phrénique à long terme (pFLT) (Mitchell et al. 2018). L'hypoxie intermittente chronique est l'un des modèles les plus étudiés de la facilitation à long terme (Mitchell and Stephen 2003; Pamerter and Powell 2016). Suite à l'exposition à l'HIC, l'activation des récepteurs 5-HT₂ au niveau des motoneurones phréniques stimule la synthèse du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (en anglais, brain derived neurotrophic factor, BDNF) (Pamerter and Powell 2016). Par la suite, ce facteur active le récepteur kinase B à la tropomyosine (en anglais, tropomyosine receptor kinase B, TrkB) (Figure 23). L'activation de ce récepteur kinase conduit à la phosphorylation des kinases ERK1 et ERK2 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) qui augmentent par la suite l'excitabilité du récepteur au glutamate. Parallèlement à cette voie, l'exposition à de l'HIC peut activer les récepteurs 5-HT₇ et à l'adénosine (Hoffman and Mitchell 2011) couplé à une protéine G_s et stimuler l'accumulation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Cette dernière se fixe sur le récepteur TrkB afin de stimuler la kinase AKT qui augmentera l'excitabilité du récepteur au glutamate (Golder et al. 2008; Gonzalez-Rothi et al. 2015) (Figure 23).

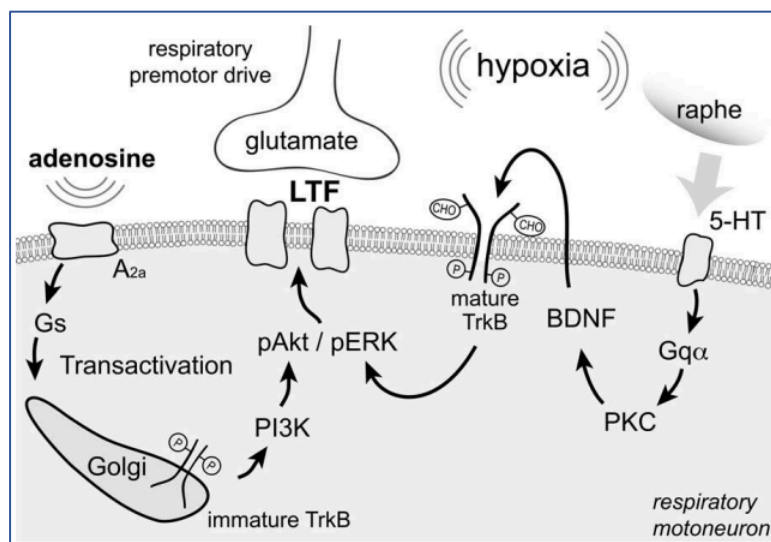


Figure 23: Voies impliquées dans la facilitation à long terme phrénique (pLTF) induite par l'hypoxie intermittente chronique. Les voies Q et S sont impliquées dans la facilitation à long terme en réponse à de l'hypoxie intermittente chronique. D'après (Golder et al. 2008).

Il a été montré que les espèces réactives à l'oxygène (ROS) induisent la facilitation à long terme phrénique (pFLT) (Macfarlane et al. 2014) alors que l'inflammation l'inhibe (Vinit et al. 2011). Une étude *in vivo* réalisée sur des rats exposés pendant une semaine à de l'HIC, a montré que les afférences des corps carotidiens déchargent à des PO_2 plus élevées que les contrôles laissés en normoxie (Moya et al. 2016). Cette modification du seuil de sensibilité des chémorécepteurs témoigne de la plasticité des chémorécepteurs périphériques carotidiens en réponse à de l'HIC (Bisgard and Neubauer 1995). Ainsi, la plasticité respiratoire peut être la résultante de changements rencontrés dans les sites neuroanatomiques centraux associés au contrôle respiratoire ou aux changements au niveau des récepteurs sensoriels périphériques (Mitchell and Stephen 2003). Suite à une chemodénervation du corps carotidien, le chemoréflexe périphérique est atténué ou éliminé, par la suite, une récupération du réflexe au cours du temps est ré-observé (Berger et al. 1973; Bianchi et al. 1995; Forster et al. 2000; Rodman et al. 2021). La restauration d'une fonction suite à une dénervation manifeste l'installation d'une plasticité (Forster 2003).

2) Les protéines FosB/ Δ FosB, marqueurs d'activité neuronale à long terme

En 2005, l'équipe de Malik a montré que l'exposition des souris à de l'hypoxie intermittente pendant trois jours, induisait une augmentation de la fréquence respiratoire mesurée en normoxie et une augmentation de la réponse ventilatoire (fréquence respiratoire et amplitude des mouvements) à l'hypoxie aiguë. Ces modifications des paramètres ventilatoires n'ont pas

été retrouvés chez des souris mutantes pour le facteur FosB, suggérant l'implication de ce facteur FosB dans la plasticité des neurones respiratoire (Malik et al. 2005). La famille de protéines Fos intervient dans la régulation de la prolifération, de la différenciation et de la transformation cellulaire (Wagner and Eferl 2005). Les protéines Fos forment un hétérodimère avec des protéines de la famille Jun (par exemple, c-Jun, JunD), afin de former le complexe de facteurs de transcription AP-1. L'épissage de l'ARN pré-messager codant pour la protéine Fos permet d'obtenir différents variant tel que le c-Fos, le FosB, Δ FosB et le $\Delta\Delta$ FosB (Figure 24).

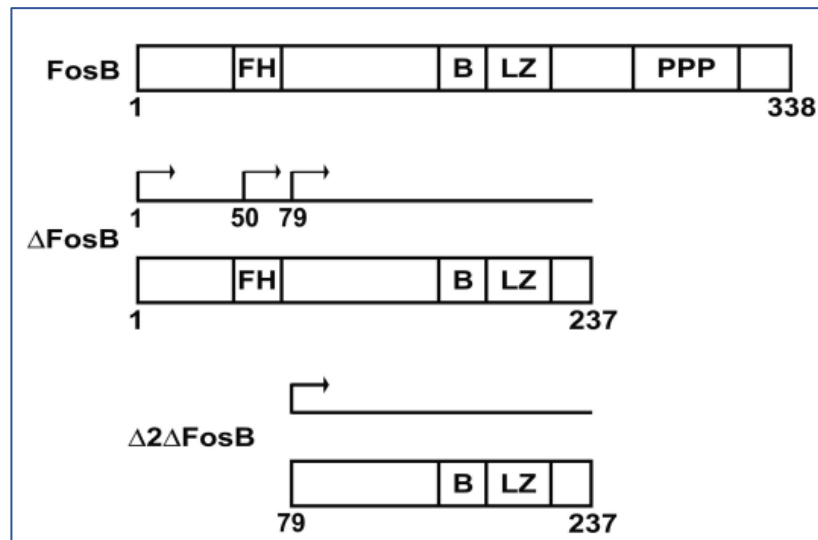


Figure 24: Les isoformes de la protéine FosB. Des épissages alternatifs de cet ARNm permettent d'obtenir des isoformes plus stable que FosB tel que le Δ FosB ou l'isoforme $\Delta\Delta$ FosB. D'après (Sabatakos et al. 2008).

La demi-vie de la protéine c-Fos est très courte dans la cellule, quelques heures après son induction (Figure 25.A). En revanche, des stimulations répétées conduisent une accumulation de FosB/ Δ FosB dans la cellule du fait de l'absence d'une répression de la transcription de son ARNm mais également par l'arrêt de la dégradation de l'ARNm (Blanchard et al.; Müller 1986; Nestler 2008) (Figure 25.B).

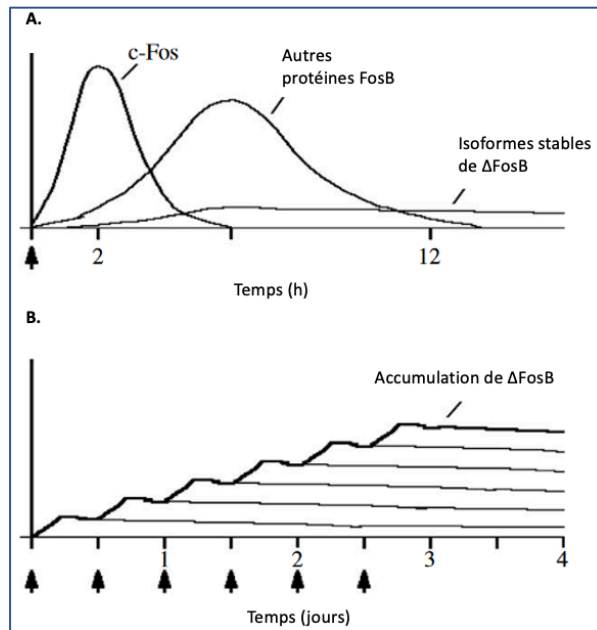


Figure 25: Accumulation de Δ FosB au cours du temps. A. Suite à une stimulation, la protéine c-Fos est rapidement produite jusqu'à atteindre un maximum après 2h, par la suite, cette protéine est rapidement dégradée. B. Suite à des stimulations répétée, c-Fos va s'accumuler puis transloquer dans e noyau où il va former un hétérodimère avec la protéine Jun, ce facteur de transcription induit l'expression de facteurs cibles tel que le Δ FosB par épissage alternatif. Ainsi, des stimulations répétées conduisent à une accumulation de la protéine Δ FosB. D'après (Nestler 2008).

Par la suite, le facteur FosB/ Δ FosB a été utilisé comme marqueur histologique d'activité à long terme afin d'étudier le remodelage des neurones respiratoire (Wickström et al. 2002; Cunningham et al. 2012; Bathina et al. 2013).

Pour conclure cette première partie, la ventilation est une activité motrice continue, robuste, adaptable et plastique. Comme nous l'avons vu, la rythmogénèse respiratoire assure la contraction des muscles respiratoires. Cet acte normalement inconscient, peut le devenir dans certains cas comme lors d'un arrêt volontaire de la ventilation ou lors de certaines pathologies.

Partie II : La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI)

Chapitre I : Généralités et Classification

La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) a été décrite pour la première fois en 1868 par Flint qui a observé chez un patient une atteinte pulmonaire qu'il a qualifiée de "pneumonie chronique" accompagnée d'un aspect bulbeux au bout des doigts (hippocratisme digital) (Flint 1868).

I. Description et épidémiologie de la fibrose pulmonaire idiopathique

1) Généralités

La fibrose pulmonaire idiopathique est une pathologie rare touchant le poumon distal. Elle se définit comme étant une forme spécifique de pneumonie interstitielle diffuse (PID) fibrosante chronique et progressive de cause inconnue limitée aux poumons. (International and Consensus 2002). Elle a une incidence annuelle estimée à 5/100 000 habitants et est très souvent diagnostiquée chez les personnes âgées de plus de 50 ans (Kohansal et al. 2009; Miravittles et al. 2009; Petitpierre et al. 2014) par l'apparition d'une dyspnée d'effort progressive. La médiane de survie des patients est de 2,5 à 4,5 ans après son diagnostic avec un profil évolutif variable (Bjoraker et al. 1998; King et al. 2001). En effet, alors que la majorité des patients présente un déclin lent de leur fonction respiratoire, certains restent stables ou, au contraire, s'aggravent rapidement aboutissant à une insuffisance respiratoire fatale. Environ 10 % à 20 % des patients avec une fibrose pulmonaire idiopathique développent des épisodes de détérioration brutale et inexpliqués de la maladie, ou exacerbations aiguës (EA), souvent mortelles (Collard et al. 2016).

2) Classification des Pneumopathies Interstitielles Diffuses (PID)

Les pneumopathies Interstitielles diffuses (PID) sont divisées en quatre grands groupes :

- Les pneumopathies d'origine connue (ou suite à une exposition à un facteur de risque identifié)
- Les pneumopathies interstitielles idiopathiques
- Les pneumopathies granulomateuses : Sarcoïdose
- Les autres (lymphangioliomyomatose, histiocytose à cellules de Langerhans/histiocytose x, etc...

Les pneumopathies interstitielles idiopathiques sont caractérisées par une infiltration de cellules inflammatoires au niveau du compartiment interstitiel avec une fibrose associée dans de nombreux cas. À ce jour, la classification retenue est celle élaborée en 2018 par l’American Thoracic Society et l’European Respiratory Society (ATS/ERS), qui ont classées les pneumopathies interstitielles idiopathiques en sept formes selon leur des critères cliniques ou radiologiques (ATS and ERS 2002) :

- La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI)
- La pneumonie interstitielle non spécifique (PINS)
- La pneumopathie interstitielle respiratoire bronchiolite
- La pneumonie interstitielle desquamative
- La pneumonie interstitielle aiguë
- La pneumonie organisatrice cryptogénique
- La pneumonie interstitielle lymphoïde

Au sein des pneumopathies interstitielles diffuses, la FPI est la forme la plus grave et la plus courante (Directors and Committie 2000; Mullier et al. 2013). Elle occupe une place très importante de par sa complexité physiopathologique, sa gravité, l’absence de traitement efficace et fait l’objet d’un grand nombre de recherches (Crestani 2010; Nalysnyk et al. 2012).

3) Diagnostic de la Fibrose Pulmonaire Idiopathique : un diagnostic multidisciplinaire

L’American Thoracic Society (ATS) et l’European Respiratory Society (ERS), en collaboration avec l’American College of Chest Physicians (ACCP), ont publié en 2000 une déclaration de consensus international sur le diagnostic de la maladie ainsi que sur sa prise en charge (Directors and Committie 2000). Le diagnostic de la FPI se fait après trois types d’examen, un examen clinique, un examen radiologique puis un examen anatomo-pathologique.

a. L’examen clinique

Les patients atteints de FPI ne présentent aucun symptôme durant de nombreuses années jusqu’à développer des symptômes spécifiques à toutes les pneumopathies interstitielles diffuses, ce qui retarde le diagnostic. Les patients se présentent en ayant une toux persistante accompagnée d’un essoufflement à l’effort. À l’auscultation, des râles crépitants secs bilatéraux

semblables au bruit du « velcro » sont entendus (Douglas et al. 2000; Raghu et al. 2011; Cottin et al. 2014). Il est également observé un hippocratisme digital chez 40% des patients (King et al. 2001). Après avoir exclu les causes connues des atteintes pulmonaires interstitielles, et lorsque l'origine/la cause de la maladie reste indéterminée, le diagnostic de FPI peut être envisagé et un certain nombre d'examen complémentaires orientés sont alors proposés aux patients (Raghu et al. 2011).

b. L'examen radiologique

La radiologie pulmonaire des patients atteints de FPI présente des anomalies, notamment une opacité bilatérale diffuse, cependant, elle reste insuffisante pour poser le diagnostic. De ce fait, une tomodensitométrie à haute résolution (TDM-HR) sans injection est réalisée. Dans une grande majorité des cas, la TDM-HR montre un aspect pulmonaire caractéristique aux pneumopathies interstitielles communes (PIC). Le schéma de l'Usual Interstitial Pneumonia (UIP), utilisé pour classifier la FPI comprend quatre caractéristiques primordiales (Raghu et al. 2011) : une prédominance sous-pleurale et basale d'opacités réticulées, une perte du volume lobaire, des bronchectasies de traction et des structures en rayon de miel (Figure 26) (Raghu et al. 2011; Mullier et al. 2013). Lorsque l'on observe sur tomodensitométrie des opacités présentant des structures caractéristiques en rayon de miel (Figure 26.B) mais également des bronchectasies par traction, le diagnostic de FPI peut être posé (Cottin et al. 2014, 2017). Cependant, si la FPI est précoce, les rayons de miel ne seront pas observés au scanner. De même si l'aspect tomodensitométrique présente la possibilité d'une pneumopathie interstitielle commune (PIC) sans pouvoir poser le diagnostic de la FPI avec certitude, un examen anatomopathologique par biopsie pulmonaire est envisagé.

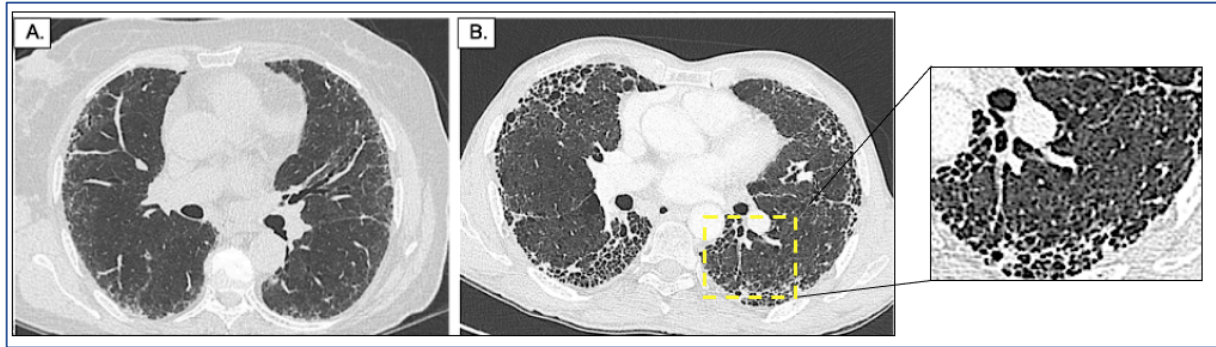


Figure 26: Tomodensitométrie pulmonaire. A. Image d'une tomodensitométrie d'un patient ne présentant une pneumopathie interstitielle commune (PIC) possible avec une opacité réticulaire de prédominance basale et sous-pleurale, des bronchectasies par traction sans présenter de rayon de miel. B. Image d'une tomodensitométrie d'un patient atteint de FPI, présentant des opacités réticulaires de prédominance basale et sous-pleurale et un aspect en rayon de miel (flèches), des bronchectasies par traction. D'après (Cottin et al. 2014).

c. L'examen anatomo-pathologique

Le poumon d'un patient atteint de FPI présente une disposition hétérogène des zones de lésions alternant des zones cicatrisées et des zones saines (Figure 27.A). Cette hétérogénéité spatiale est la conséquence d'une juxtaposition d'un tissu cicatrisé fréquemment retrouvé dans des régions sous-pleurales et d'un tissu non cicatriciel (Myers and Katzenstein 1988; Cavazza et al. 2010) (Figure 27.B).

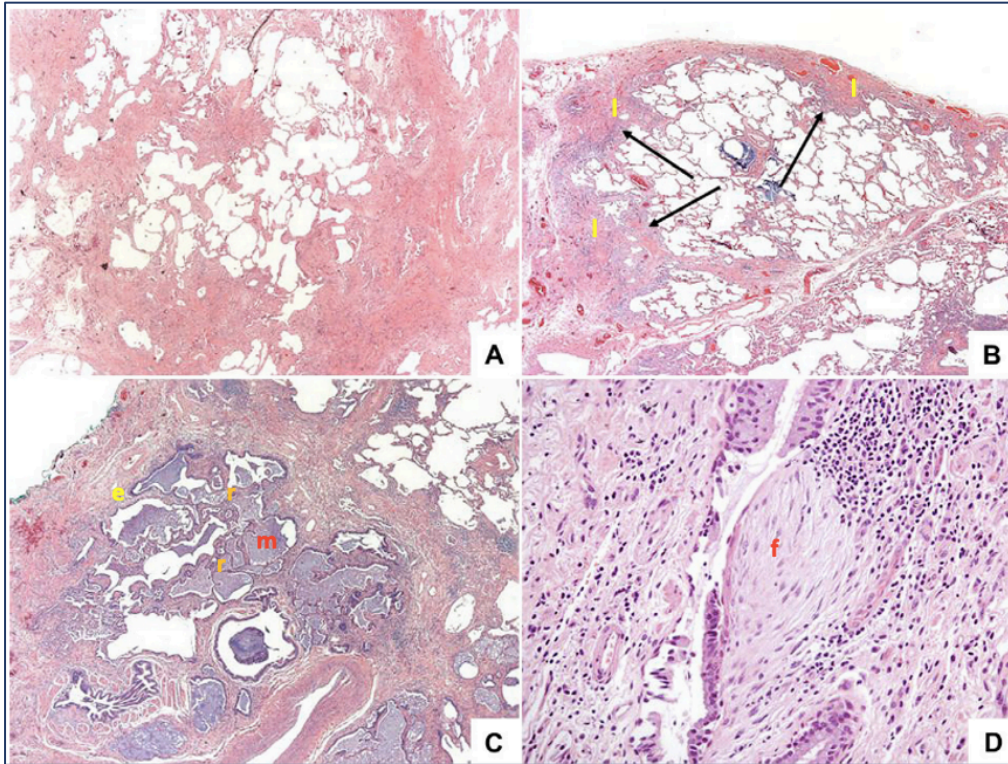


Figure 27: Histologie de la pneumopathie interstitielle. A. Photographie d'un poumon de patient atteint de FPI coloré à l'hématoxyline-éosine. La photographie montre une alternance de zone cicatrisée et de zone saine. B. Photographie d'un poumon de patient atteint de FPI coloré au trichrome de Masson. La photographie montre la présence de lobule en périphérie dans la région sous-pleurale (l) (flèches). C. Photographie d'un poumon de patient atteint de FPI coloré au trichrome de Masson. La photographie montre des rayons de miel (r) formés par des espaces aériens élargis bordés d'épithélium bronchiolaire (e) souvent remplis de mucus (m) délimité par des zones cicatrisées denses. D. Photographie d'un poumon de patient atteint de FPI coloré à l'hématoxyline-éosine. La photographie montre des foyers fibroblastiques (f) regroupant une prolifération de myofibroblastes immergés dans une matrice myxoïde. D'après (Cavazza et al. 2010).

Au niveau histologique, l'inflammation est également observable avec la présence de macrophages, de neutrophiles, d'éosinophiles, de mastocytes et de lymphocytes (Gross and Gary 2001). Il a également été rapporté la présence d'une distorsion architecturale au niveau des espaces aériens élargis bordés de bronchioles ressemblant à des rayons de miel remplis de cellules muqueuses et inflammatoires (majoritairement des neutrophiles et des macrophages) (Figure 27.C). De plus, on observe des foyers fibroblastiques (Figure 27.D) souvent localisés à l'interface entre zones non-cicatrisées et zones cicatrisées. Il est à noter que certaines études montrent que la présence de foyers fibroblastiques étendus peut-être associée à un mauvais pronostic (Hanak et al. 2008).

d. Examens complémentaires

Après avoir posé le diagnostic de la FPI, il est important d'évaluer le niveau d'atteinte de la fonction respiratoire (Paramètre décrit dans la *Partie I de l'introduction*). L'analyse de la capacité respiratoire est réalisée par une exploration fonctionnelle respiratoire (EFR). Par spirométrie, on observe chez les patients atteints de FPI une diminution de la capacité vitale forcée (CVF) et du volume expiratoire maximal seconde (VEMS). Ensuite, une pléthysmographie est réalisée afin de mesurer l'ensemble des volumes pulmonaires, y compris le volume résiduel (VR). Cette approche permet de diagnostiquer un syndrome restrictif (cas de la FPI) ou une distension thoracique (emphysème). Puis la mesure de la qualité des échanges gazeux, par mesure de la capacité de transfert du monoxyde de carbone inspiré, cette capacité de diffusion pulmonaire du monoxyde de carbone (DLCO, méthode d'évaluation de la diffusion alvéolo capillaire des gaz) est une mesure indispensable pour évaluer la sévérité du ralentissement fonctionnel pulmonaire (Tableau 2). Dans la FPI, la DLCO est diminuée suite au remaniement de l'épithélium alvéolaire, témoignant de la diminution de la diffusion de l'oxygène des alvéoles pulmonaires aux capillaires sanguins (Agusti et al. 1991). Parallèlement à ces examens, le taux d'oxygène dans le sang est également mesuré, les patients atteints de FPI présentent une désaturation en O₂ (Arizono et al. 2020). Le médecin peut également proposer un « test de marche de 6 minutes » durant lequel la distance parcourue par le patient est retenue afin d'évaluer sa capacité fonctionnelle avec mesure de la saturation en oxygène afin d'évaluer l'oxygénation sanguine (Tableau 2). Ce test permet d'évaluer la capacité à l'effort, cette distance est inversement proportionnelle au stade d'évolution de la fibrose (Raghu 2011) (Tableau 2).

Examens	Observations	Références
Clinique	Toux persistante Dyspnée à l'effort Râles crépitants	(Cottin <i>et al.</i> , 2014; Raghu <i>et al.</i> , 2011; Douglas <i>et al.</i> , 2000).
Radiologie pulmonaire	Opacité bilatérale diffuse	(Cottin <i>et al.</i> 2014)
TDM-HR	Opacités réticulées Perte du volume lobaire Bronchectasies de traction Rayon de miel	(Raghu <i>et al.</i> , 2011; Mullier <i>et al.</i> , 2013).
Anatomopathologie	Alternance de zone saine/cicatrice Espaces aériens élargis Rayon de miel Foyers fibroblastiques Cellules inflammatoires	(Myers <i>et al.</i> , 1988; Cavazza <i>et al.</i> , 2010) (Hanak <i>et al.</i> 2008) (Gross and Gary 2001)
Explorations fonctionnelles de repos	↓ Capacité vitale forcée ↓ VEMS ↓ Compliance pulmonaire ↓ DLCO ↓ PaO ₂	(Matsuzawa <i>et al.</i> , 2015; Daniil <i>et al.</i> , 2008; Raghu, 2011) (Raghu 2011) (Raghu 2011)
Test de marche de six minutes	↓ Distance parcourue ↓ SpO ₂ à l'exercice	(Raghu 2011)

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des paramètres classiquement observés chez les patients atteints de PFI. Tableau représentant les différents examens réalisés au cours des explorations fonctionnelle respiratoires ainsi que les données observées chez les patients atteints de FPI. Abréviations : TDM-HR : Tomodensitométrie à haute résolution ; VEMS : Volume expiratoire maximal seconde ; DLCO : Capacité diffusion du monoxyde de carbone ; PaO₂ : Pression artérielle en O₂.

e. Les exacerbations aiguës rencontrées dans la fibrose pulmonaire idiopathique

i. Généralités

Après le diagnostic de la FPI, la plupart des patients présentent un déclin de leur fonction pulmonaire relativement lent (lentement progressif), cependant, certains patients peuvent présenter une détérioration rapide de leur état clinique (Figure 28).

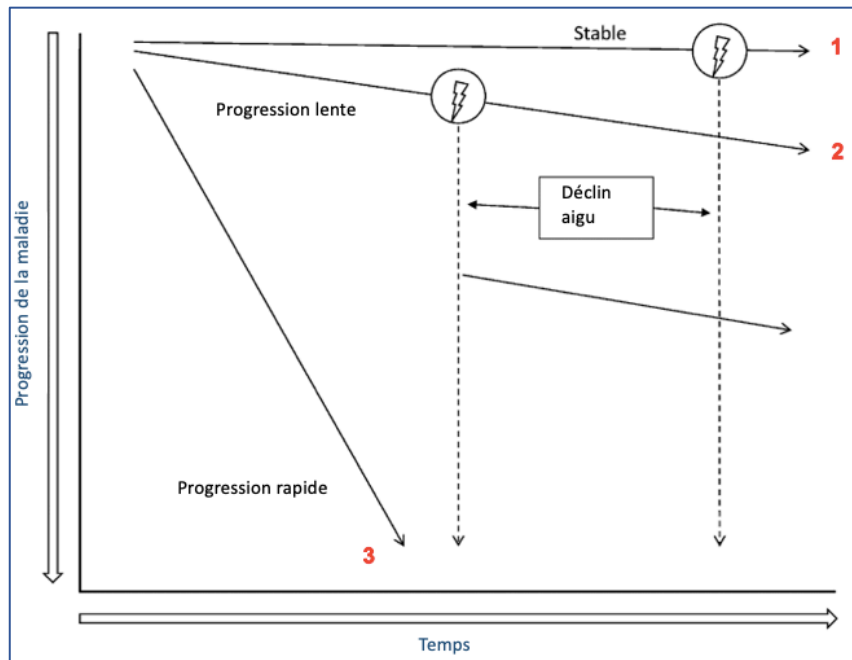


Figure 28: Profil d'évolution des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique. Courbe 1 : Profil évolutif stable de la fonction respiratoire. Courbe 2 : Détérioration lente de la fonction respiratoire. Courbe 3 : Détérioration rapide de la fonction respiratoire. Les profils évolutifs peuvent rapidement être impactés suite à une exacerbation aiguë (éclair sur la figure) conduisant souvent au décès. Adapté d'après (Raghu et al. 2011).

La dégradation de la fonction pulmonaire des patients atteints de FPI est en général progressive. Cependant, certains patients vont présenter un profil évolutif stable, d'autres vont présenter un déclin lent et graduel de leur maladie et 10% rencontreront des épisodes de détériorations clinique aiguë accélérés, qualifiées d'exacerbation aiguë, EA (Figure 28) (Crestani 2010; Raghu et al. 2011). Ces EA sont définies sur le plan clinique comme étant des altérations aiguës de la fonction respiratoire de cause non identifiables et significativement importantes. Elles semblent être indépendantes de l'avancée de la fibrose pulmonaire (Kim et al. 2006) et touchent chaque année 5% à 10% des patients atteints de FPI (Azuma et al. 2005; King et al. 2008; Guiot et al. 2014) et pourraient être influencées par différents facteurs géographiques, ethniques, culturels, raciaux ou autre (Kim et al. 2006; Schwartz 2006).

ii. Potentielles étiologies des exacerbations aiguës

A ce jour, l'origine exacte de ces EA n'est pas clairement élucidée (Swigris and Brown 2006; Bonetti and Nicod 2010). En 2007, l'équipe de Collard propose différentes hypothèses pour expliquer l'étiologie des exacerbations aiguës de la FPI (Collard et al. 2007) qui surviendraient suite à :

- Une pathologie rencontrée chez les patients, souvent associée à la survenue d'une la pneumonie, d'une embolie pulmonaire, d'un pneumothorax ou d'une insuffisance cardiaque (Panos et al. 1990; Martinez et al. 2005).
- Une infection virale, en particulier le virus de l'Herpès (Tang et al. 2003; Raghu et al. 2011).
- Une aspiration du contenu gastrique en cas de reflux gastro-œsophagien (Lorraine 2000; Raghu et al. 2006).
- Une variabilité génétique pouvant altérer de la fonction des cellules épithéliales alvéolaires, qui expliquerait la survenue des exacerbations chez une partie des patients (Schwartz 2006).

iii. Diagnostic clinique des exacerbations aiguës

Une exacerbation aiguë est caractérisée par une détérioration nette de la fonction respiratoire avec une aggravation de la dyspnée depuis plus de 30 jours, accompagnée de toux, d'une augmentation des expectorations et/ou d'une fièvre persistante et de symptômes grippaux (Akira 1967; Ambrosini et al. 2003; Rice et al. 2003; Parambil et al. 2005; Kim et al. 2006).

iv. Histologie/ moléculaire

Au scanner, les patients ayant eu une exacerbation aiguë (EA) présentent de nouvelles opacités bilatérales thoracique surajoutées à celles préalablement observées (Kondoh et al. 1993; Avdeev 2018). Les analyses de biopsie pulmonaire chirurgicale montrent la présence de lésions alvéolaires diffuses ainsi que des foyers fibroblastiques étendus (Figure 29) (Akira 1967; Kondoh et al. 1993; Churg et al. 2007).

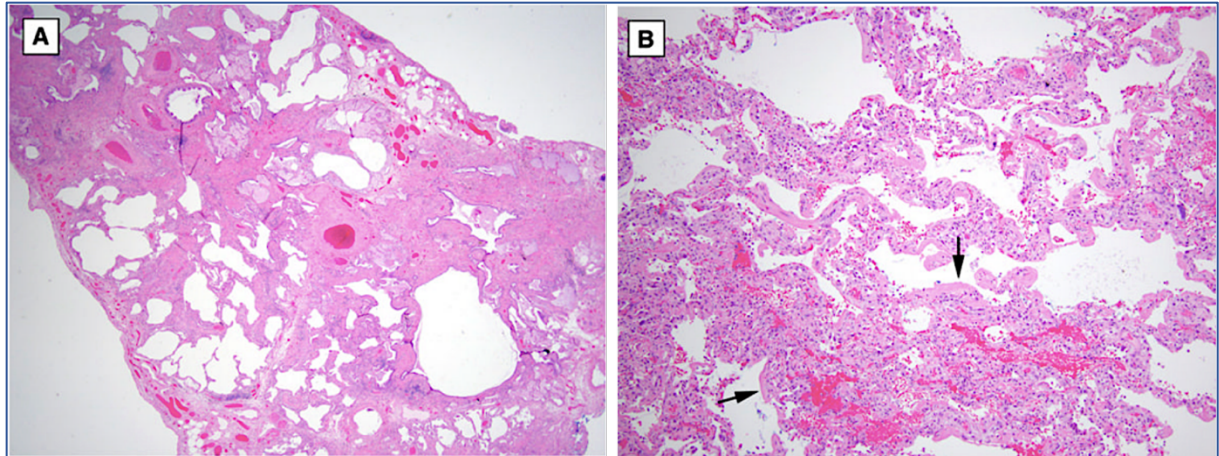


Figure 29: Biopsie pulmonaire d'un poumon de patient FPI suite à une exacerbation aiguë. A. Coupe pulmonaire d'un patient atteint de FPI colorée à l'hématoxyline et à l'éosine (grossissement x20). B. Photographie de la même coupe pulmonaire montrant une autre zone présentant des lésions alvéolaires diffuses caractérisée par des membranes hyalines éosinophiles (flèches), caractéristiques de la conséquence d'une EA (grossissement x40). D'après (Avdeev 2018).

De plus, on observe au cours d'une exacerbation aiguë une infiltration pulmonaire importante par des lymphocytes T, B et des cellules dendritiques (Marchal-Sommé et al. 2007). Au niveau moléculaire, l'analyse du lavage broncho-alvéolaire (LBA) de ces patients montre la présence d'une inflammation importante mise en évidence par la forte présence de cytokines inflammatoires (comme la ST2, de l'interleukine-8 et de l' α -défensine) (Mukae et al. 2002; Collard et al. 2007) mais également d'une quantité importante de lymphocytes T activés et de neutrophiles (Ambrosini et al. 2003; Kim et al. 2006).

Chapitre II : Mécanismes physiopathologiques rencontrés dans la FPI

I. Physiopathologie de la fibrose pulmonaire idiopathique

De nombreuses recherches ont été réalisées afin de comprendre l'origine et le développement de la FPI. Durant plusieurs années, l'hypothèse d'une agression inflammatoire chronique, de cause inconnue était considérée comme facteur majeur dans le processus de fibrogénèse (Hamman and Rich 1944; Keogh and Crystal 1982; Noble and Homer 2005). Plusieurs études cliniques ont alors proposé l'utilisation d'anti-inflammatoires comme traitement de la FPI. Cependant, devant l'inefficacité du traitement (Dempsey 2006) cette hypothèse a été rapidement écartée. L'observation de marqueurs de mort cellulaire à un stade précoce de la maladie (Corrin et al. 1985; Myers and Katzenstein 1988) a permis de voir émerger une autre théorie, prenant en considération les lésions épithéliales chroniques et un processus de réparation alvéolaire inefficace. Ainsi, la FPI serait considérée non pas comme la résultante d'une inflammation mais plutôt comme une cicatrisation aberrante de l'épithélium alvéolaire (Crestani 2010; Petitpierre et al. 2014). De fait, l'hypothèse pathogénique qui fait aujourd'hui consensus pour expliquer le développement de cette pneumonie est que la FPI résulterait d'une réparation aberrante de l'épithélium alvéolaire suite à des épisodes d'agressions répétées des cellules épithéliales qui la compose par des stimuli exogènes et endogènes d'origine inconnue (Selman 2004).

1) Mécanisme de lésion réparation : Agression/réparation physiologique

L'épithélium alvéolaire est constamment soumis à diverses agressions environnementales comme l'exposition à la pollution, aux bactéries/virus inhalés, à la fumée de cigarette ou au reflux gastro-œsophagien (dans le cas des patients présentant des RGO). Ces agressions vont conduire à une perte de l'intégrité de la barrière épithéliale, pouvant entraîner une altération des échanges gazeux entre l'espace alvéolaire et les capillaires sanguins sous-jacents (Wang et al. 2006; King et al. 2011). Afin de limiter la fragilisation de la barrière épithéliale, un mécanisme de réparation coordonnée entre les différents types cellulaires de l'espace intra-alvéolaire se met en place. Un rôle est alors attribué pour les CEA II, les fibroblastes sous-jacents et les cellules immunitaires de l'espace intra-alvéolaire (Zeng et al. 2016) (Figure 30).

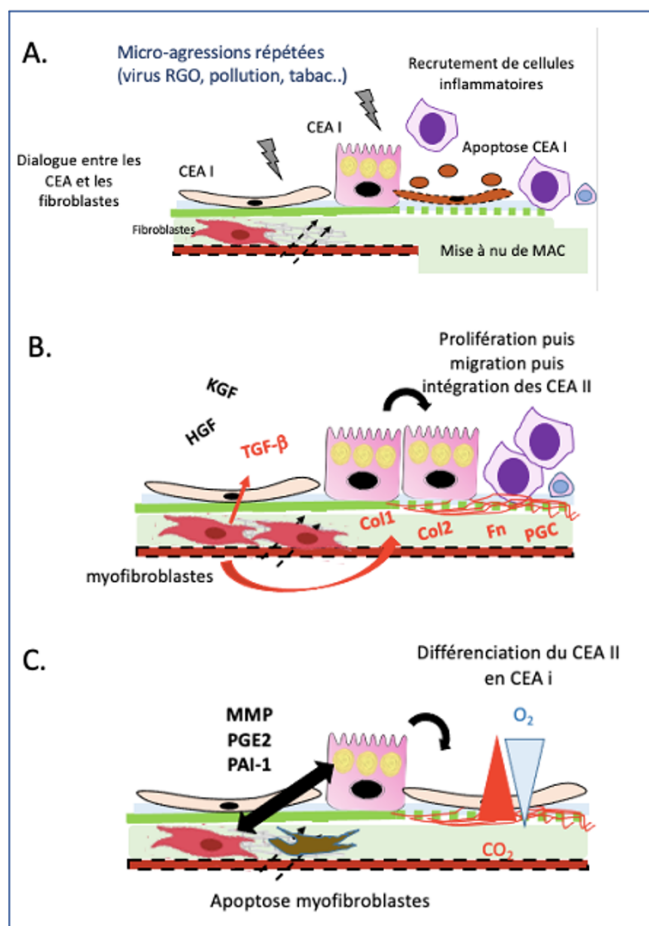


Figure 30: Mécanismes de réparation de l'épithélium alvéolaire en condition physiologique. A. Suite à des micro agressions de l'épithélium alvéolaire, les cellules épithéliales alvéolaires de type I (CEA I) sont rapidement dégradées mettant à nu la lame basale. La réparation de cette dernière est favorisée par le dialogue entre les CEA et les fibroblastes résidant dans le poumon, par l'intermédiaire de diverses cytokines et facteurs de croissance. Parallèlement, les cellules inflammatoires sont recrutées afin d'assurer la clairance alvéolaire. B. Par la suite, les cellules mésenchymateuses qui sont les fibroblastes se différencient en myofibroblastes. Ces dernières sont des cellules contractiles partageant des caractéristiques de cellules mésenchymateuses et musculaires lisses. Elles sécrètent des protéines de la matrice extracellulaire qui forment une matrice provisoire, nécessaire à la réparation. C. Les CEA II se différencie en CEA I. La sécrétion de collagène stabilise la matrice contractée entourant les myofibroblastes. Une fois l'épithélium alvéolaire restauré, les myofibroblastes disparaissent progressivement probablement par un phénomène d'apoptose et la MEC provisoire est dégradée

Lors de l'agression, les cellules les plus fragiles, les CEA I, vont être détruites par apoptose ou desquamer entraînant une mise à nue de la matrice alvéolo-capillaire. Cette mise à nue va conduire à l'activation de différents types cellulaires qui vont s'accorder pour stimuler la prolifération des CEA II et favoriser leur différenciation en CEA I afin de régénérer l'épithélium alvéolaire (Paris et al. 2016). Les CEA II vont alors jouer un rôle primordial dans le processus de réparation (Evans et al. 1975; Barkauskas et al. 2013) ce qui leur confère un rôle de cellules progénitrices de l'épithélium alvéolaire (Figure 30).

Dans un premier temps, les cellules inflammatoires, principalement des macrophages ou des neutrophiles vont arriver sur le site lésé afin d'assurer la clairance alvéolaire et contribuer au dialogue entre les cellules de l'espace alvéolaire pour régénérer l'épithélium lésé. Les macrophages vont avoir pour fonction primaire d'éliminer les corps étrangers par un processus de phagocytose (Zhang et al. 2000) et les polynucléaires neutrophiles par l'intermédiaires de diverses cytokines (Futosi et al. 2013; Mayadas et al. 2014) vont contribuer à la stimulation de la prolifération des CEA II (Paris et al. 2016) (Figure 30.A). La mise à nue de la membrane basale va stimuler l'activation des cellules mésenchymateuses sous-jacentes, qui vont sécréter de nombreux facteurs de croissances tels que le facteur de croissance des kératinocytes (KGF) et le facteur de croissance hépatocyte (HGF) (Panos et al. 1993; King et al. 2011) nécessaires à la prolifération des CEA II. Les fibroblastes vont également sécréter du TGF- β et du collagène de type I et II, des protéoglycanes et de la fibronectine (Bradley et al.; Rannels et al. 1987) afin de générer une matrice provisoire pour la migration des CEA II et la ré-épithélialisation (Epa et al. 2015) (Figure 30.B). Les CEA II vont s'associer à ce support matriciel par l'intermédiaire d'intégrines situées au niveau basolatéral. En parallèle, les fibroblastes sont recrutés sur le lieu de lésion pour recouvrir la membrane basale jusqu'à la régénération de cette dernière (Blirando 2021). Les CEA II ainsi activées vont à leur tour sécréter différents facteurs favorisant le recrutement local d'un nombre plus important de cellules inflammatoires (majoritairement les polynucléaires neutrophiles et les macrophages) (Thorley et al. 2007; Glasser et al. 2009) mais également de fibroblastes (Figure 30.C). Le recrutement des neutrophiles et des fibroblastes va permettre la digestion de la MEC *via* la sécrétion des métalloprotéines matricielle (MMP). Cette digestion de la MEC, combinée à une polymérisation active de la fibronectine (Hérard et al. 1996) vont faciliter la migration des CEA II et permettre le remodelage de la matrice nouvellement synthétisée. Par la suite, les CEA II perdent leur inclusion lamellaire, puis prennent une forme aplatie et allongée afin d'acquérir les caractéristiques des CEA I (Evans et al. 1975; Barkauskas et al. 2013; Confalonieri et al. 2017) et régénérer un épithélium alvéolaire fonctionnel (Coraux et al. 2005). Enfin, les CEA II et les fibroblastes activés vont sécrétés diverses molécules telles que les protéines du surfactant, des MMP, la prostaglandine E2 (PGE2) ou le plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1/serpin 1) afin de limiter la prolifération des fibroblastes mais également leur différenciation en myofibroblastes (Adamson and Prieditis 1998; Moore et al. 2003). Une fois le processus de réparation achevé, les myofibroblastes disparaissent progressivement probablement par un phénomène d'apoptose (Selman and Pardo 2002) (Figure 30.C).

2) Mécanisme de lésion puis réparation dans le cas de la Fibrose Pulmonaire Idiopathique

La fibrogénèse résulte d'un déséquilibre entre les facteurs qui favorisent la biosynthèse et l'accumulation des composants de la MEC, et ceux qui désactivent ou éliminent les cellules effectrices et l'excès de MEC. Au niveau pulmonaire, ce déséquilibre conduit à une mauvaise cicatrisation favorisant une altération de l'architecture tissulaire. L'hypothèse retenue concernant la physiopathologie de la FPI est centrée sur un dérèglement du dialogue entre les CEA (CEA II) et les cellules de l'espace alvéolaire suite à des agressions répétées de l'épithélium alvéolaire (Figure 31.A) avec dénudation régulière de celle-ci et l'hyperactivation des mécanismes de défense (Faner et al. 2012; Tanjore et al. 2012) (Figure 31.B).

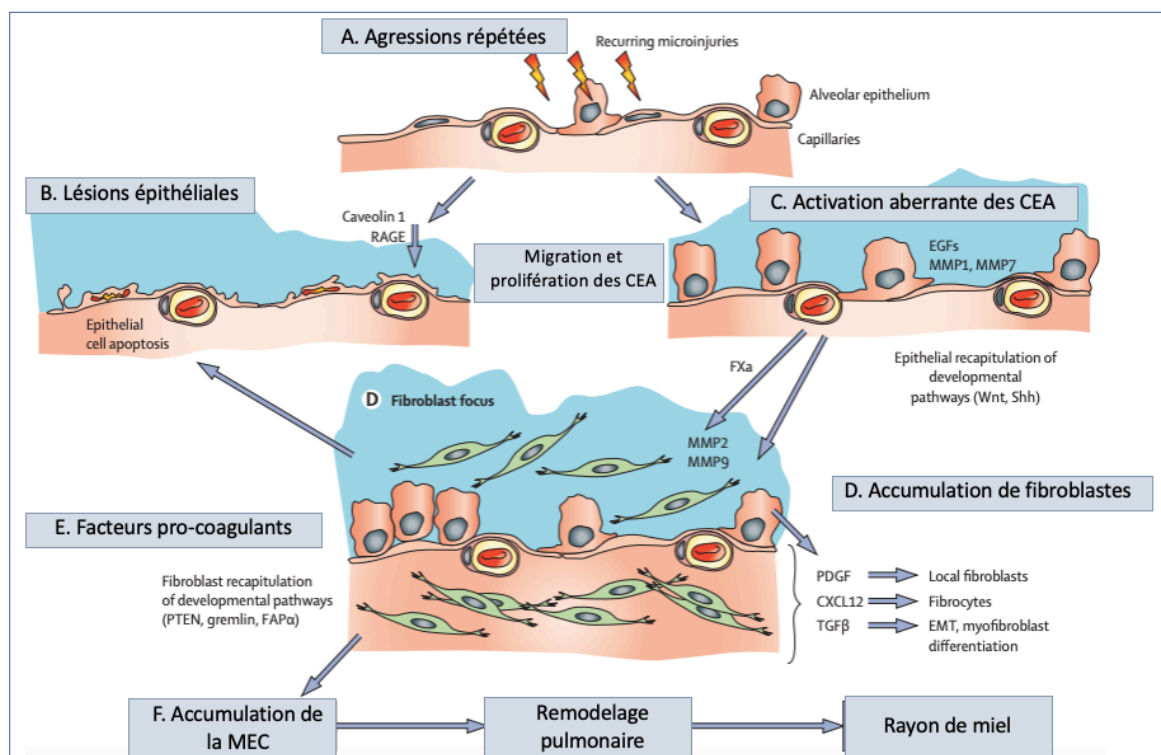


Figure 31: Mécanismes physiopathologiques rencontrés dans la FPI. A. Des agressions répétées au niveau de l'épithélium alvéolaire tel que les virus, l'exposition à de la fumée de cigarette, RGO, etc...sont rencontrées. B. Ces agressions conduisent à la mort des CEA I et II. Cette mise à nue de la membrane basale génère une perméabilité vasculaire aux protéines (comme le fibrinogène, la fibronectine) favorisant la formation d'une nouvelle matrice provisoire. C. Dans la FPI, il est observé une activation aberrante des CEA II, plusieurs facteurs participent à la réponse proliférative. Parallèlement, des enzymes, telles que les MMP1 et MMP7 contribuent à la migration des cellules épithéliales. Au sein de ce microenvironnement, les cellules épithéliales sont anormalement activées et produisent divers facteurs de croissance et chimiokines, induisant la migration des fibroblastes résidents et des progéniteurs dérivés de la moelle osseuse des fibroblastes (fibrocytes) vers le site de lésion. D. De plus, les fibroblastes sécrètent et activent le TGF- β 1 latent, ce qui favorise la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. Conduisant à la persistance des fibroblastes. E et F. Il en suit une production accrue de MEC par accumulation de collagène synthétisé par les fibroblastes activés et les PII ayant subi une TEM conduisant à un remodelage pulmonaire. Adaptée d'après (King et al. 2011).

Les cellules inflammatoires, telles que les macrophages, recrutés pour éliminer les débris cellulaires après agression vont progressivement changer de phénotype associé à la phase de réparation, de cicatrisation des lésions et sécréter des médiateurs pro-fibrotiques. De même, les neutrophiles vont sécréter la neutrophile élastase (NE), favorisant la prolifération des fibroblastes ainsi que leur différenciation en fibroblastes activés (Gregory et al. 2015). Les cellules épithéliales alvéolaires perdent leurs caractéristiques, une partie peut mourir par apoptose (Uhal et al. 1998; Maeyama et al. 2001; Platakis et al. 2005) une autre partie acquérir un phénotype mésenchymateux (Willis et al. 2005) par le biais de la Transition Épithélio-

Mésenchymateuse (TEM), et enfin une dernière partie peut entrer dans un processus de sénescence (Minagawa et al. 2011). Ces cellules sénescents vont présenter un sécrétome particulier, mêlant cytokines pro-inflammatoires, facteurs de croissance et de prolifération tels que le facteur de croissance dérivé des plaquettes (Platelet-Derived Growth Factor, PDGF) et le facteur de croissance transformant beta (Transforming Growth Factor, TGF- β), métalloprotéinases matricielles (MMP), et collagène ou autres constituants de la matrice extracellulaire (Figure 31.C) (Willis et al. 2005). Cette hypersécrétion de médiateurs pro-fibrosants va limiter l'apoptose (Uhal 2008) ou l'autophagie des fibroblastes (Patel et al. 2012) et au contraire stimuler leur différenciation en myofibroblastes sécrétant à leur tour de la matrice extracellulaire (Kuhn et al. 1989; Selman and Pardo 2002) et amplifiant le phénomène pro-fibrosant (Figure 31.D). On observe alors une perte globale du phénotype épithélial, au profit d'un phénotype mésenchymateux avec une accumulation excessive de matrice extracellulaire et son épaissement pouvant conduire à l'insuffisance respiratoire chronique (Crestani 2010) d'évolution fatale (Jordana et al. 1994; FUMEAUX et al. 2003) (Figure 31.F).

Comme nous l'avons évoqué précédemment, divers événements cellulaires ont été identifiés dans le processus de fibrogénèse, tels qu'une inflammation dérégulée, une perte du phénotype épithélial, et une activation chronique des fibroblastes.

a. Dérégulation de la réponse inflammatoire

L'analyse histologique du tissu pulmonaire mais également les dosages réalisés dans le lavage broncho-alvéolaire (LBA) des patients atteints de fibrose pulmonaire montrent la présence d'un nombre élevé de cellules inflammatoires dans l'espace alvéolaire (Reynolds et al. 1977; Adamson and Bowden 1984; Bowden et al. 1989). La présence de neutrophiles au niveau des sites lésionnels est initialement corrélée au mécanisme de réparation (Hunninghake et al. 1981) et au besoin de digestion de la matrice extracellulaire néoformée pour permettre la migration des cellules épithéliales alvéolaires de type II (CEA II) *via* la sécrétion de l'élastase neutrophile (NE) (Takemasa et al. 2012). Cependant la présence accrue de neutrophiles, la sécrétion de l'élastase et d'oxydants pourrait avoir un rôle pro-fibrosant, favorisant les lésions de l'épithélium alvéolaire (Brody et al. 1981) et la prolifération des fibroblastes ainsi que leur différenciation en myofibroblastes et l'activation du TGF- β (Gregory et al. 2015). Par ailleurs, une corrélation entre le nombre de neutrophiles et la capacité vitale forcée (CVF) des patients a été mise en évidence (Korthagen et al. 2010). Tout comme les neutrophiles, les macrophages jouent un rôle central dans la réparation des tissus et dans le maintien de l'immunité. Les

macrophages ont la capacité de répondre à différents médiateurs afin de se différencier et présenter un phénotype M1 ou M2 (Gordon and Martinez 2010). Le phénotype M1 est acquis en réponse à des médiateurs comme le lipopolysaccharide (LPS) et l'interféron gamma (IFN- γ) et produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que le tumor necrosis factor alpha (TNF- α), l'interleukine 1 (IL-1) et l'IL-6, maintenant ainsi l'inflammation tissulaire. Les macrophages M2 sont activés "alternativement" après une exposition à IL-4, IL-10 et IL-13 et possèdent des propriétés anti-inflammatoires et pro-fibrotiques (Mills 2012). Dans une situation présentant une inflammation chronique, les macrophages M1 se transforment lentement en un phénotype M2, sécrétant des médiateurs tels que le TGF- β , le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), le facteur de croissance dérivé des plaquettes- α (PDGF- α), le facteur de croissance analogue à l'insuline 1 (IGF1) et le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) (Duru et al. 2016) qui favorisent la cicatrisation des lésions. Dans les poumons de patients atteints de FPI, on observe une population de macrophages présentant un phénotype M2 contribuant à la synthèse du collagène en augmentant le métabolisme de la L-arginine (Mills 2012) et à la fibrogénèse (Gordon and Martinez 2010; Wynn et al. 2013). Enfin, une quantité importante de cytokines IL-8 et granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) (Ashitani et al. 1999; Guiot et al. 2017) ont été retrouvés dans les lavages broncho-alvéolaires des patients. Ces cytokines secrétées par les cellules inflammatoires au niveau des sites lésionnels vont contribuer à l'altération des cellules alvéolaires (Adamson and Prieditis 1998), au dépôt de collagène (Vuorio et al. 1989; Mariani et al. 1996) et seraient en lien direct avec la survenue des exacerbations aiguës. En effet, l'analyse du lavage broncho-alvéolaire des patients atteints de FPI ayant eu une exacerbation aiguë montre une augmentation significative de la concentration en CCL18 (Schupp et al. 2015).

b. Perte du phénotype épithélial

Comme indiqué en amont, la perte du phénotype épithélial est globalement retrouvée dans les biopsies des patients atteints de FPI et serait la résultante d'une apoptose massive, d'une transition épithélio-mésenchymateuse, et d'une senescence accélérée, ayant pour conséquence de bloquer la cellule épithéliale en phase G1 du cycle cellulaire.

c. L'apoptose

Dès 1997, Hagimoto et son équipe ont mis en avant l'hypothèse qu'une apoptose excessive des cellules épithéliales alvéolaires est antérieure à l'apparition de la fibrose (Hagimoto et al. 1997). L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée orchestré selon deux voies

distinctes, la voie intrinsèque et la voie extrinsèque, en réponse à des signaux intra ou extracellulaires déclencheurs de mort, ou à l'absence de signaux de survie dans l'environnement de la cellule. Son rôle est de dégrader de façon coordonnée selon trois étapes d'initiation, de dégradation et d'exécution les différentes structures cellulaires (Figure 32). On observe alors la formation de corps apoptotiques permettant une élimination des débris cellulaires, qui seront ensuite éliminés par les macrophages. La voie intrinsèque, ou voie mitochondriale, est déclenchée lorsque la mitochondrie est endommagée, et va libérer divers facteurs stimulant l'activation des caspases. La libération des facteurs mitochondriaux est sous la dépendance d'une famille de protéine contenant des régions d'homologie de séquences appelées « Bcl2 homology ». Lors d'une apoptose induite par la voie mitochondriale, on observera une répression des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et une augmentation des protéines pro-apoptotiques telles que Bax, Bak et Bid et l'activation des caspases effectrices 3 et 7 (Figure 32). La voie extrinsèque quant à elle, provoque l'activation directe de la cascade des caspases *via* un récepteur membranaire appartenant à la famille des récepteurs du TNF- α , tels que Fas. Le ligand va se fixer sur son récepteur, activant les caspases intracellulaires et l'activation finale des caspases effectrices 3 et 7 (Figure 32).

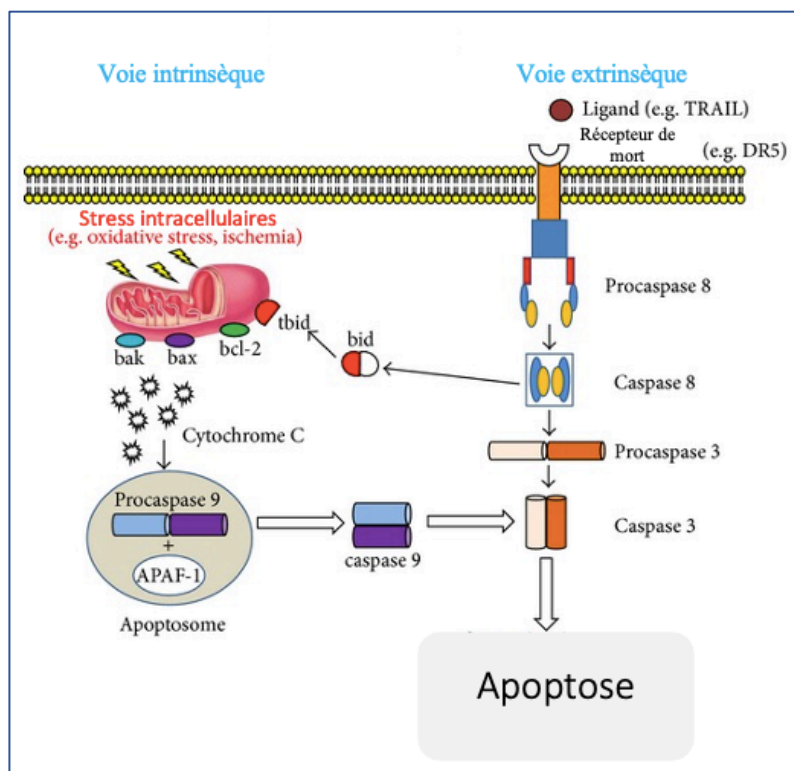


Figure 32: Schéma représentant les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose. La voie extrinsèque (à droite) implique la liaison de ligands extracellulaires à des récepteurs membranaires spécifiques, entraînant la formation d'un complexe conduisant au clivage et à l'activation de la procaspase-8. La voie intrinsèque (à gauche) est initiée par une la libération de composés par la mitochondrie et favorisant la mort cellulaire. Les membres pro et anti-apoptotiques de la famille BCL-2 à la surface des mitochondries contrôle la libération du cytochrome-c. Une fois libéré, le cytochrome-c s'associe à Apaf-1 et à la procaspase-9 pour former l'apoptosome, qui active alors la caspase-9. Les voies extrinsèques et intrinsèques partagent un point final commun au niveau de l'activation de la caspase-3. D'après (Loreto et al. 2014).

Les biopsies pulmonaires des patients atteints de FPI montrent une apoptose dans les cellules épithéliales alvéolaires de type II (CEA II) (Barbas-Filho et al. 2001; Yoshida et al. 2002), principalement dans l'épithélium couvrant les foyers de fibroblastes (Uhal et al. 1998) mais aussi dans des régions du poumon présentant des structures alvéolaires d'apparence « saine » (Barbas-Filho et al. 2001). L'activation des deux voies intrinsèque et extrinsèque ont été rapportés dans le poumon de patients atteint de FPI. Ainsi, une augmentation de l'expression des protéines pro-apoptotiques comme la protéine Bax, la caspase 3, la p53 et la p21^{Waf1} et une diminution des protéines anti-apoptotiques comme la Bcl-2 a été également rapportée dans les CEA proches des zones de fibrose (Plataki et al. 2005). Enfin, l'implication de l'apoptose dans la fibrogénèse a été mise en exergue dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine. En effet, l'inhibition de l'apoptose des CEA atténue l'étendue de la fibrose (Wang et al. 2000).

d. La Transition Épithélio-Mésenchymateuse

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) se définit comme le processus au cours duquel les cellules épithéliales perdent leur phénotype pour acquérir des propriétés propres aux cellules mésenchymateuses. Les cellules épithéliales vont alors perdre leur polarité, le cytosquelette va être réorganisé pour permettre la mobilité et l'invasion de la matrice extracellulaire. Ce phénomène peut être complet ou hybride pour lequel les cellules expriment à la fois les marqueurs épithéliaux et mésenchymateux (Figure 33).

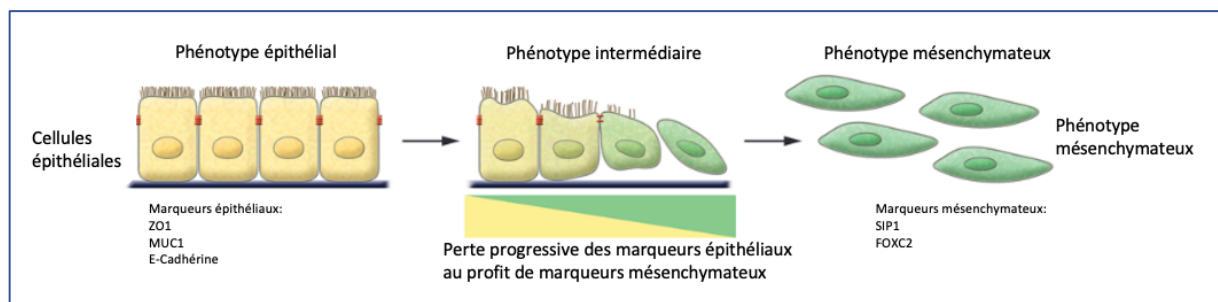


Figure 33: Représentation de l'expressions des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux des cellules au cours d'une Transition Épithélio Mésenchymateuse (TEM). La TEM implique une transition des cellules épithéliales polarisée vers un phénotype mésenchymateux. Au cours de cette transition, les cellules épithéliales perdent progressivement leur phénotype épithélial et acquérir un phénotype mésenchymateux. Au cours de cette étape de transition, les cellules co-expriment des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux. ZO-1: Zona Occludens 1; MUC1: Mucin 1; SIP1: Survival of motor neuron protein Interacting Protein 1; FOXC2: Forkhead box C2. D'après (Koen and Collier 2010).

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est observée lors du processus de réparation suite à une lésion. Elle prend donc fin lorsque la réparation tissulaire est effective, lorsque l'on observe la cicatrisation et la régénération de l'épithélium (Raghu Kalluri 2010). L'acquisition des propriétés de mobilité pour les cellules épithéliales dépend de l'activation de facteurs de transcription bien décrits (Figure 34). Parmi ceux-ci, on retrouve les facteurs SNAIL1, SNAIL2, ZEB1 et Twist impliqués dans l'inhibition du marqueur épithélial E-cadhérine (Mittal 2018) et des marqueurs de jonction ZO-1 (Ikenouchi et al. 2003) et Cx43 (Lim et al. 2009). Cette inhibition va permettre de déclencher le processus de migration. Les facteurs Twist1 et ZEB1 vont plutôt être impliqués dans l'acquisition des fonctions de motricité en induisant l'expression de la vimentine et de l' α -SMA (Kim et al. 1997).

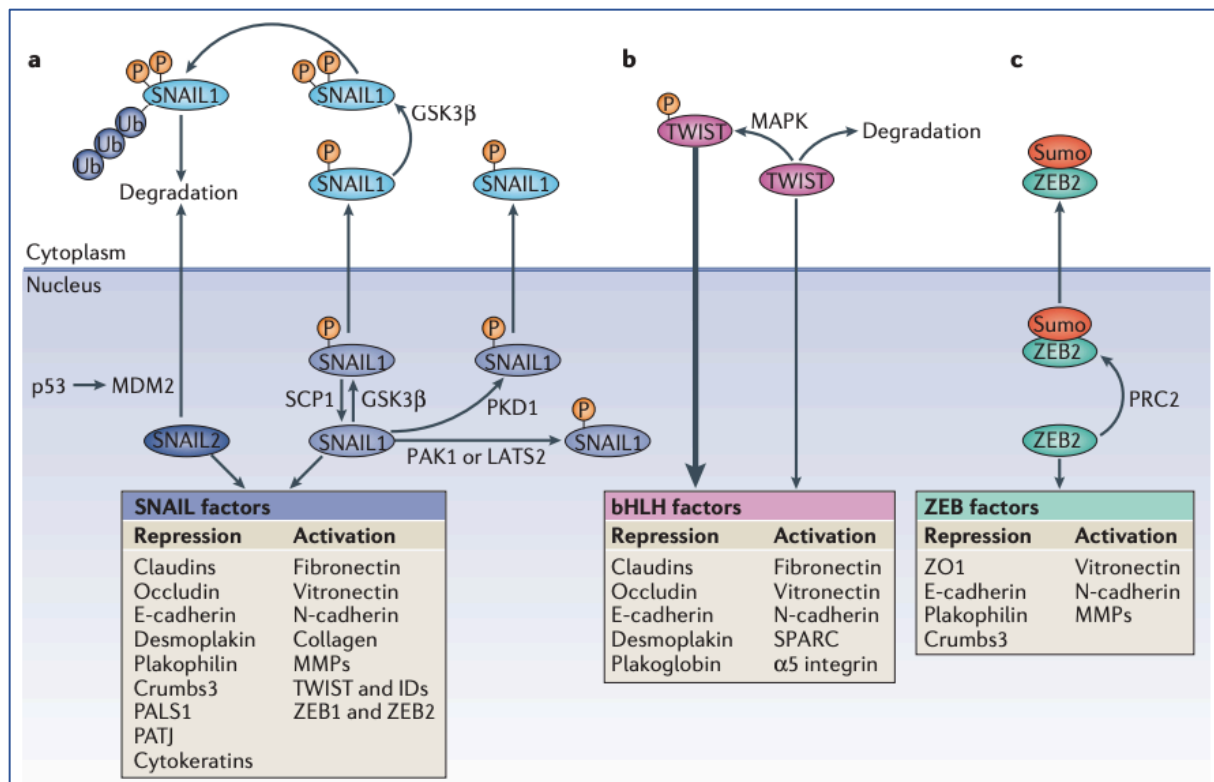


Figure 34: Régulations des facteurs majeurs impliqués dans la Transition Épithélio-Mésenchymateuse. La TEM est ordonnée par les facteurs SNAIL, zinc-finger E-box-binding (ZEB) et basic helix-loop-helix (bHLH) qui répriment les gènes marqueurs épithéliaux et activent les gènes associés au phénotype mésenchymateux. A. La glycogène synthase kinase-3 β (GSK3 β) ou par la p21 (PAK1) phosphoryle (P) SNAIL1 au niveau de deux motifs. B. TWIST est phosphorylé par la MAPK p38, la JUN N-terminal kinase (JNK) et l'ERK, ce qui le protège de la dégradation, par la suite, il est transloqué dans le noyau pour induire ses gènes cibles. C. ZEB2 est sumoylé (Sumo) par le complexe répressif Polycomb 2 (PRC2) et ensuite exporté du noyau, ce qui réduit son activité en tant que facteur de transcription. D'après (Lamouille et al. 2014).

L'induction de la TEM fait intervenir deux grandes voies de signalisation. La voie Wnt et la voie TGF β -1. La voie Wnt conduit à la stabilisation de la β -caténine, ayant pour fonction d'activer les facteurs de transcription SNAIL, Twist et ZEB, et induire les modifications phénotypiques de transition mésenchymateuse. La voie du TGF- β est sollicitée pour induire les propriétés migratoires des cellules épithéliales et participer à la production de collagène (Wendt et al. 2009). Deux voies du TGF- β sont décrites dans le processus de TEM : la voie canonique dépendante de la fixation du TGF- β à son récepteur T β R-I et T β R-II, et conduisant à l'activation de la voie de signalisation impliquant les SMADS et la voie non canonique ne faisant pas intervenir les SMADS (Figure 35). Ces voies ont pour conséquence, l'induction de la transcription des facteurs pro-fibrosants tels que la fibronectine et le collagène de type 1.

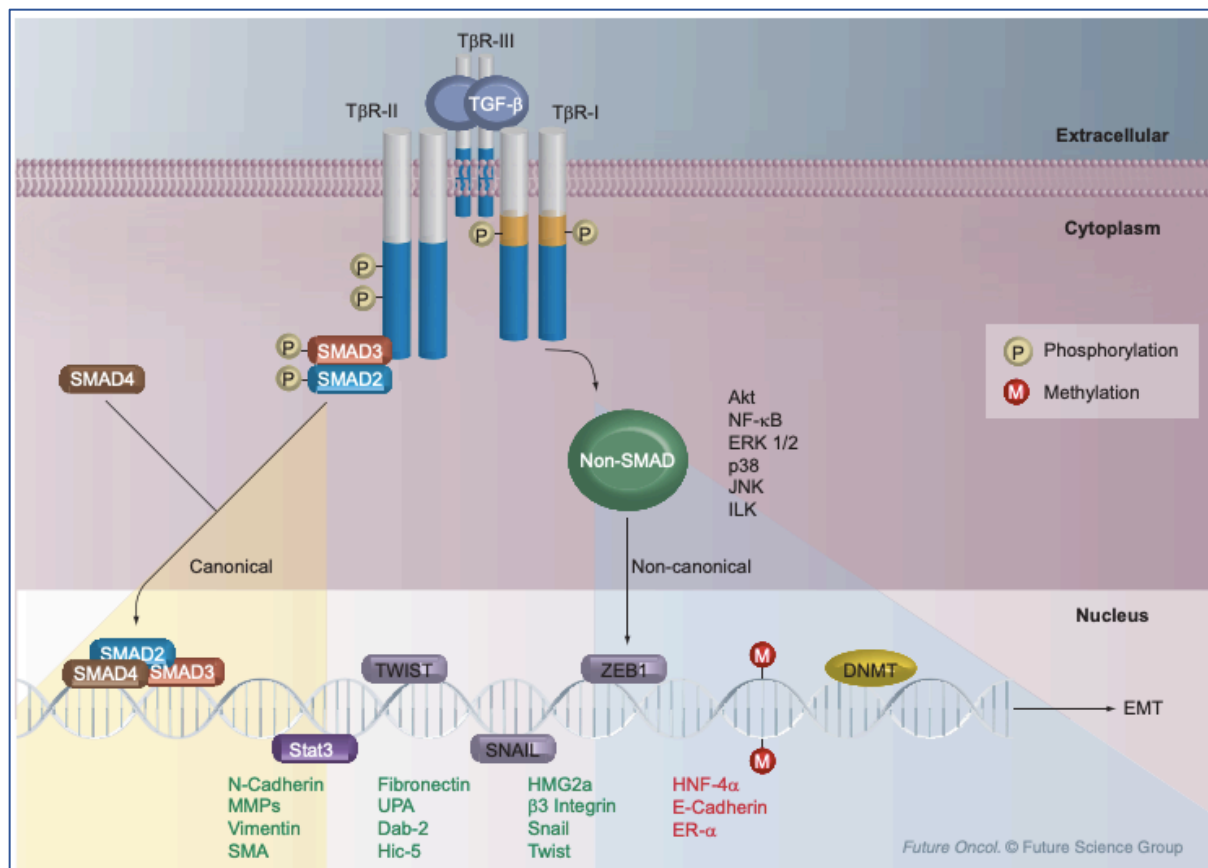


Figure 35: implication de la voie du TGF- β dans la TEM. La TEM peut être initiée par la voie du TGF- β . La fixation du TGF- β sur son récepteur membranaire T β R-II aboutit au recrutement du T β R-I dans le domaine de GS. Les phosphorylates activés de T β R-I signalent les transducteurs SMAD2 et SMAD3, et forment un complexe avec le SMAD4. Ce complexe transloque dans le noyau afin de réguler l'expression de ses gènes cibles. D'après (Wendt et al. 2009).

Il existe un pool de progéniteurs des CEA II « souches » résidant au sein des foyers de fibroblastes. Lors d'une lésion de l'épithélium alvéolaire, il est observé une sécrétion de la protéine Wnt permettant la prolifération et l'expansion de ce pool de progéniteurs (Leach and Morrissey 2018; Nabhan et al. 2018).

Des études *in vitro* montrent que la TEM dans les CEA II humaines peut être initiée par le TGF- β (Kasai et al. 2005). Il a été montré que l'exposition des CEA de rat à du TGF- β 1 entraîne une transition de leur phénotype épithélial vers un phénotype de type myofibroblastique. En effet, l'expression des marqueurs mésenchymateux (α -SMA, le collagène de type I, la desmine et la vimentine) a significativement augmenté dans les monocouches de CEA II traitées au TGF- β 1, avec une réduction de l'expression des marqueurs épithéliaux (cytokératines, Zonula occludens-1 (ZO-1) et Aquaporine (AQP5)) et l'acquisition d'un aspect de type myofibroblastique (Willis et al. 2005). Lorsque les CEA sont exposés de

façon chronique au TGF- β 1, elles expriment des marqueurs mésenchymateux et des facteurs de transcriptions pro-TEM suggérant leur contribution au pool de cellules mésenchymateuse retrouvés dans la FPI (Willis et al. 2005), bien que ce concept soit très discuté. En effet, alors que des cellules co-exprimant des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux ont été retrouvés chez les patients (Marmai et al. 2011; Rock et al. 2011), des expériences de « lineage tracing » montrent que seulement une faible proportion de cellules épithéliales expriment des marqueurs mésenchymateux chez la souris (Marmai et al. 2011; Rock et al. 2011).

e. La sénescence

Le vieillissement cellulaire ou sénescence correspond à un état d'arrêt irréversible ou réversible de la croissance des cellules et représente un programme de protection de l'organisme contre la prolifération anormale des cellules. En inhibant la prolifération des cellules qui ont des lésions sur l'ADN, la sénescence joue un rôle essentiel dans la réparation tissulaire et la suppression des tumeurs. La cellule sénescente reste métaboliquement active et est entièrement reprogrammée. On note ainsi de profondes modifications cytomorphologiques comme une augmentation de la taille, un étalement de la cellule, un aplatissement cellulaire, une vacuolisation du cytoplasme, et une augmentation du volume nucléaire ainsi que des altérations de l'architecture chromatinienne. Son métabolisme énergétique se modifie, on observe un stress du réticulum endoplasmique (RE) et une augmentation de son activité autophagique. La cellule sénescente devient résistante à l'apoptose et présente des modifications épigénétiques complexes. Au niveau moléculaire, l'activation du programme de sénescence se traduit par une augmentation de l'expression des protéines p53, p27^{KIP1}, p16^{Ink4a}, p21^{WAF1}, p- γ H2AX (Noren Hooten and Evans 2017; Dodig et al. 2019) et de l'arrêt du cycle cellulaire (Figure 36).

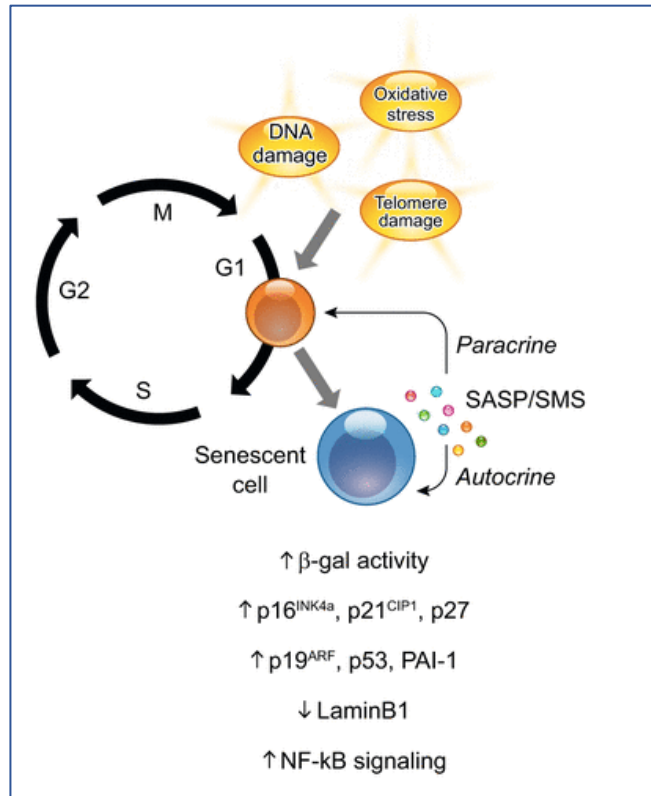


Figure 36: Les marqueurs associés à la sénescence. La sénescence cellulaire peut-être initiée par de nombreux facteurs comme un stress oxydatif, une altération génétique, un stress à l'ADN ou les dommages aux télomères. Les cellules sénescents expriment les marqueurs du cycle cellulaire p16^{INK4A}, la p21^{CIP1}, la p27^{KIP1} ou la p53 associés à l'arrêt de prolifération. D'après (Calcinotto et al. 2019).

On observe également une augmentation de l'expression de l'activité β-galactosidase lysosomiale (SA-β-Gal). De plus, les cellules sénescents expriment un transcriptome, un protéome et surtout un sécrétome particulier appelé SASP (phénotype sécrétoire associé à la sénescence) (Campisi and D'Adda Di Fagagna 2007) favorisant le recrutement des cellules immunitaires pour éliminer les cellules sénescents et permettre aux cellules progénitrices de régénérer les tissus endommagés. La composition de ce SASP est dynamique et dépend du facteur inducteur de sénescence et de l'origine cellulaire. Il est constitué de molécules biologiquement actives et va modifier le microenvironnement des cellules sénescents (Álvarez et al. 2017; Schafer et al. 2017). Dans le cas d'un dérèglement de la réparation, les cellules sénescents ne sont pas éliminées, et continuent de sécréter le SASP afin de favoriser un retour à l'homéostasie tissulaire (Muñoz-Espín and Serrano 2014). Le SASP pourrait ainsi propager et amplifier les signaux de sénescence (Figure 36) contribuant ainsi à l'inflammation persistante et l'induction des modifications phénotypiques pro-fibrosantes des fibroblastes et des macrophages (Liu and Liu 2020). De manière intéressante, des anomalies de la longueur des télomères ont été décrites chez les patients atteints de FPI. Le rétrécissement de la longueur des

télomères n'est possible que jusqu'à atteindre un certain seuil, au-delà, un mécanisme de réponse aux dommages à l'ADN est initié en arrêtant le cycle cellulaire, soit la mise en sénescence puis l'apoptose de la cellule. Une étude publiée en 2009 montre que les CEA des patients atteints de FPI présentent des télomères plus courts que les CEA des patients contrôles (Borie and Crestani 2009; Armanios 2012). Une origine génétique présentant une mutation de l'enzyme clé intervenant dans l'allongement des télomères (la télomérase) a été retrouvée chez 10% des patients FPI (Armanios et al. 2007). Surajouté à ces études, il a montré que 20% des patients atteints de dyskératose congénitale qui est une maladie due à des mutations de la télomérase développent une fibrose pulmonaire (Sato et al. 1994). De plus, les marqueurs de sénescence ont été retrouvés exprimés dans les CEA des patients FPI (Disayabutr et al. 2016) comme la p16^{INK4}, p21^{WAF1}, p53, et l'activité β -galactosidase (SA- β gal) (Minagawa et al. 2011; Disayabutr et al. 2016; Schafer et al. 2017). Le SASP des CEA II sénescents rencontré dans la FPI peut induire la différenciation des fibroblastes pulmonaires en myofibroblastes conduisant à des dépôts excessives de collagènes (Minagawa et al. 2011; Waters 2018). Il a été montré que l'inhibition de la sénescence des CEA II par des médicaments sénolytiques tels que le dasatinib et le quercétin conduit à une diminution de l'expression des marqueurs pro-fibrotiques et atténue la sécrétion des médiateurs contenus dans le SASP (Lehmann et al. 2017).

v. Hyperactivation des fibroblastes

Le rôle des fibroblastes dans la physiopathologie de la FPI a été largement documenté, notamment *via* l'observation de foyer fibroblastiques qui est une des caractéristiques histologiques majeure de cette pathologie. La présence de ces foyers est la conséquence d'une hyperactivation et une dérégulation de leur prolifération (Chilosi et al. 2006). La dérégulation de leur prolifération résulterait d'un dérèglement de balance prolifération/mort cellulaire avec une résistance à l'apoptose et une autophagie limitée (Hanson et al. 2019). En effet, la présence de fortes concentrations de TGF β (Patel et al. 2012), ou la suppression de la protéine régulatrice PTEN favoriserait l'activation de la prolifération par l'activation constante de la voie de signalisation PI3K-Akt (Xia et al. 2010; Nho et al. 2011) . Un des facteurs pouvant favoriser l'hyperactivation des fibroblastes serait leur état de sénescence chronique, et le sécrétome (SASP) qu'ils produisent également de façon dérégulée. De nombreuses études ont rapportés une augmentation de la p21^{WAF1} et de SA- β gal dans les fibroblastes de patients FPI (Minagawa et al. 2011; Álvarez et al. 2017), ce processus serait nécessaire pour permettre une réparation harmonieuse de l'épithélium lésé (Waters 2018). En effet, la sénescence des fibroblastes interviendrait pour limiter l'accumulation de tissu fibrotique et faciliter la résorption de la fibrose (Krizhanovsky et al. 2008).

Cependant, d'autres études montrent un effet néfaste des fibroblastes sénescents. Ces cellules sénescents secrètent dans leur SASP de nombreux médiateurs telles que des cytokines pro-inflammatoires, des facteurs de croissance (Campisi 2013) et des ROS (Passos et al. 2010) favorisant l'hyperactivation des CEA (Leigh 2000; Krtolica et al. 2001), mais également des enzymes telles que la collagénase ou l'élastase limitant la réparation d'une blessure (Mendez et al. 1998) dégradant ainsi en continue la MEC, et empêchant migration d'autres cellules vers le site lésé (Harding et al. 2005). Surajouté à ceci, le SASP, secrété pour favoriser le recrutement des cellules inflammatoires au site de lésion et éliminer les cellules lésées pourrait d'une part contribuer à l'emballage de la réponse inflammatoire et l'orientation des macrophages vers un phénotype fibrosant et d'autre part favoriser la transformation des CEA et fibrocytes avoisinants en cellules mésenchymateuses (Crystal et al. 2002).

3) Stress oxydant, Stress du réticulum endoplasmique et hypoxie : un rôle crucial dans la fibrogénèse

a. Le stress oxydatif dans la FPI

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS), dont l'anion superoxyde (O_2^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), jouent un rôle central dans la défense de l'hôte en éliminant les micro-organismes dans les cellules phagocytaires (Van Der Goes et al. 1998; Nanduri et al. 2008). De plus, ces ROS jouent un rôle physiologique important, ils peuvent intervenir dans les signalisations nécessaires à la prolifération, la migration ou la différenciation cellulaire (Kliment and Oury 2010; Cheresch et al. 2013). Cependant, les quantités excessives de ROS sont toxiques pour les cellules qui les produisent (Kliment and Oury 2010). C'est pourquoi la production non régulée de ROS va conduire à un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants, entraînant un stress oxydatif (Kliment and Oury 2010) (Figure 37).

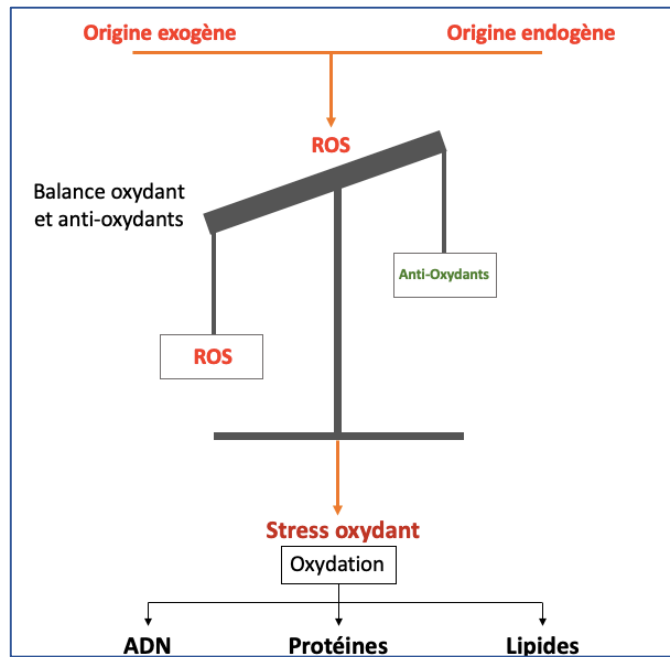


Figure 37: Balance pro-oxydants et anti-oxydants. Les espèces réactives de l’oxygène peuvent avoir différentes origines, endogène ou exogène. Un équilibre entre oxydants et anti-oxydants doit-être maintenu. En cas de déséquilibre, une accumulation de ROS conduit à un stress oxydatif pouvant avoir des répercussions sur l’ADN (cassures des brins), des protéines (protéines carbonylées, oxydées), et des lipides (peroxydation).

De nombreuses études démontrent l’implication d’un dérèglement de la balance oxydant/anti-oxydants dans le processus de vieillissement cellulaire (Orr and Sohal 1994; Giorgi et al. 2018) suite à une accumulation des dommages oxydatifs au niveau des lipides, de l’ADN et des protéines oxydées par les ROS (Beckman and Ames 1998). Des études réalisées *in vivo* dans des modèles murins délétés en superoxyde dismutase SOD, ont montré une inflammation majeure et une exacerbation de la fibrose pulmonaire induite par instillation intranasale de bléomycine (Adamson and Bowden 1984; Bowden et al. 1989; Chihiro Yamazaki, Jiro Hoshino, Yusuke Hori, Tomoko Sekiguchi, Satoshi Miyauchi and Tokyo 1997; Fattman et al. 2003; Manoury et al. 2005). En effet, les ROS peuvent réguler la réponse inflammatoire *via* l’activation de NF κ B et de la protéine activatrice 1 (AP-1) (MacNee and Rahman 1995; Shukla et al. 2003). Il a été montré que parmi les gènes cibles de ces facteurs, sont présents les gènes codants pour les cytokines pro-inflammatoires, les facteurs de croissances et les signaux apoptotiques (MacNee and Rahman 1995) mais également dans l’activation des gènes responsables de la synthèse de collagène et autres composants de la matrice extracellulaire (Bitzer et al. 2000; Arany et al. 2006; Kliment and Oury 2010).

Un étude réalisée *in vitro* sur des fibroblastes humains montre que l’H $_2$ O $_2$ peut stimuler leur prolifération (Murrell et al. 1990). D’autres expériences réalisées sur des CEA en culture

montre que l'H₂O₂ peut conduire à la mort de ces cellules (Waghray et al. 2005). Ces résultats suggèrent l'implication des ROS dans la régulation de la fibrogénèse et de l'inflammation.

b. Le stress du RE dans la FPI

Les observations de fibroblastes de poulet par microscopie électronique ont permis d'identifier le RE (Porter Keith et al. 1944; Palade et al. 1954). Cet organite prends une place importante au sein du cytoplasme cellulaire et constitue un réseau très large de tubules allongés et de disques aplatis (Palade et al. 1954). Deux types de RE ont été décrit, 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 joue un rôle plutôt dans le métabolisme lipidique (Cooper 2000). Le RE assure différents rôles importants pour le fonctionnement de la cellule. Il intervient dans le maintien de l'homéostasie calcique (Ca²⁺) (Berridge 2002), dans la synthèse et le stockage des lipides (Cooper 2000) et notamment un rôle très important dans la synthèse, le bon repliement, la maturation et les modifications post-traductionnelles des protéines sécrétées et transmembranaires (Palade 1975; Cooper 2000; Schwarz and Blower 2016). Toute modification conduisant à une altération des fonctions du RE est appelé stress du RE.

Le stress du RE est caractérisé par l'accumulation de protéines mal repliées et conduit à l'activation d'une réponse adaptative, la réponse UPR (Unfolded Protein Response) (Figure 38). La réponse UPR a pour but de restaurer l'homéostasie du RE, en diminuant la biosynthèse générale des protéines, et en augmentant la synthèse des protéines chaperonnes et des protéines impliquées dans les systèmes de dégradation (ERAD, endoplasmic-reticulum-associated protein degradation) (Schröder and Kaufman 2005; Szegezdi et al. 2006). Lors d'un stress au niveau du RE, les trois effecteurs membranaires PERK (pancreatic ER kinase (PKR)-like ER kinase), ATF6 (activating transcription factor 6) et IRE-1 (inositol-requiring enzyme 1) (Figure 38), vont être activés et transduire le signal aboutissant au désengorgement du RE. L'activation des trois effecteurs va être déclenchée par le déplacement de la protéine chaperonne GRP78/Bip (Glucose-regulated protein 78) depuis ces effecteurs vers les protéines mal repliées. Ainsi PERK activé va phosphoryler le facteur eIF2 α (eukaryotic initiation factor) qui à son tour va pouvoir bloquer la traduction de nouvelles protéines (Prostko et al. 1993) et également activer le facteur de transcription ATF4 (Activating transcription factor 4) (Harding et al. 2000) (Figure 38). ATF4 va être transloqué dans le noyau et induire la transcription de gènes cibles impliqués notamment dans la réponse anti-oxydants. Cette voie peut également favoriser l'apoptose

cellulaire en induisant le facteur de transcription pro-apoptotique CHOP (C/EBP Homologous Protein). (Figure 38). ATF6 se dirige vers l'appareil de Golgi (Chen et al. 2002) où il subit un clivage protéolytique libérant sa forme active ATF6N (Haze et al. 1999) (Figure 38). ATF6N se transloque dans le noyau et va pouvoir induire l'expression notamment des protéines chaperonnes (GRP78, GRP94) et les protéines du complexe de dégradation lié au RE (ERAD, endoplasmic-reticulum-associated protein degradation) (Hasnain et al. 2016) (Figure 38). IRE-1 activé induit un épissage de l'ARNm du facteur de transcription XBP1 (Calfon et al. 2002) (Figure 38) libérant sa forme active sXBP (spliced XBP1)(Calfon et al. 2002). sXBP1 se transloque dans le noyau et induit les mêmes gènes cibles que ATF6N (Yoshida et al. 2003) (Figure 38).

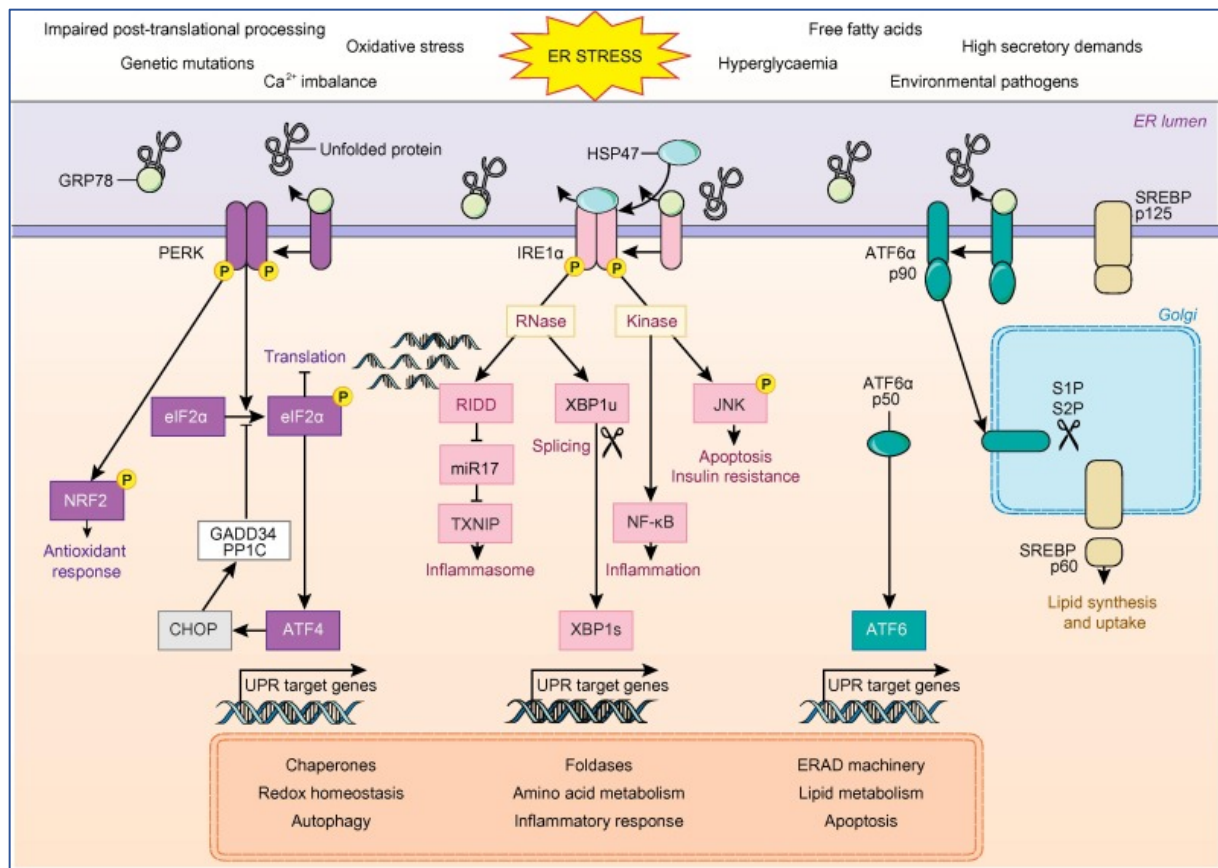


Figure 38: Voies de signalisations activées en réponse à des protéines mal repliées ayant conduit à un stress du RE. L'accumulation de protéine mal repliées conduit à un stress du RE initiant ainsi la voie UPR. Par la suite, la chaperonne GRP78 se dissocie des trois effecteurs transmembranaires au RE, PERK, IRE1a et ATF6 déclenchant ainsi leur voie de signalisation en aval afin de rétablir la protéostase et favoriser la survie cellulaire. La voie de signalisation médiée par PERK induit une phosphorylation du facteur eIF2α, ceci inhibe la traduction pour réduire la charge protéique sur le RE, tout en augmentant l'expression du facteur de transcription ATF4 induisant de nouvelles chaperonnes. La voie de signalisation médiée par IRE1 induit l'épissage de XBP1 entraînant l'activation du facteur de transcription XBP1s. Parallèlement, IRE1a va également recruter des kinases impliquées dans l'inflammation médiée par NFκB ou l'apoptose médiée par JNK. L'ATF6 (p90) est clivé au niveau de l'appareil de Golgi par les protéases S1P et S2P, libérant ainsi le facteur de transcription cytosolique ATF6 (p50). D'après (Lebeaupin et al. 2018).

Le stress du RE est impliqué dans de nombreuses pathologies telles que la maladie d'Alzheimer, l'athérosclérose, les diabètes de types 1 et 2, ou encore la FPI (Korfei et al. 2008). La découverte de l'accumulation de la protéine mutée SFTPC au niveau du RE dans les cellules épithéliales des patients atteints de FPI a permis d'identifier pour la première fois la présence de marqueurs de l'UPR tels que ATF-4, ATF-6 et CHOP dans les formes familiales et sporadiques de la maladie (Lawson et al. 2008) (Lawson et al. 2008; Zhong et al. 2011). Ainsi, par la suite, des études réalisées sur des biopsies pulmonaires des patients atteints de FPI ont montré la présence de ces mêmes marqueurs indépendamment de la présence de mutations génétiques

(Korfei et al. 2008). De manière intéressante, plusieurs études ont rapporté un lien entre la présence de marqueurs du stress du RE et l'apoptose des CEAs (Lawson et al. 2011). *In vitro*, il a été démontré que l'induction d'un stress du RE par la tunicamycine conduit à une apoptose des CEA II, médiée en partie par les caspases 3 et 12 (Lawson *et al.*, 2008; Markart *et al.*, 2007; Mulugeta *et al.*, 2007, Lawson et al., 2011)). Par la suite, l'implication majeure du facteur de transcription CHOP, induite en réponse au stress du RE a été soulignée. Ainsi l'équipe de Ayaub a montré une mortalité et une fibrose induite par la bléomycine plus importante chez les souris déficientes pour CHOP comparées à leur contrôle (Ayaub et al. 2016).

Le stress du RE peut également induire la TEM des CEA II favorisant le processus de fibrogénèse. En effet, l'induction d'un stress du RE par l'administration de tunicamycine ou par l'expression constitutive du mutant SFTPC dans une lignée de CEA de type II conduit à une diminution de l'expression des marqueurs épithéliaux comme la E-cadhérine et ZO-1 et une augmentation de l'expression des marqueurs mésenchymateux S100A4 et de l' α -SMA suite à un stress du RE (Tanjore et al. 2011a; Kage and Borok 2012; Salton et al. 2019) Ce stress conduit également à l'activation de nombreuses voies de signalisation, notamment la voie des MAPK, Smad, β -caténine et Src kinase. Enfin, l'inhibition du stress du RE par une molécule pharmacologique jouant le rôle de chaperonne chimique, le 4-PBA limite la TEM des CEA II induite par l'hypoxie (Delbrel et al. 2019) ou par le TGF- β (Lee et al. 2017).

c. Hypoxie dans la FPI

Le rôle de l'hypoxie dans la pathogénie et la progression des processus fibrosants a été exploré dans le rein, le foie ou encore la peau (F.Higgins et al. 2013). L'hypoxie est définie comme une diminution de la biodisponibilité de l'O₂ aux tissus et aux cellules. L'organisme, un tissu ou un groupe restreint de cellule peuvent se retrouver en situation hypoxique, notamment en altitude en situation hypobarique, mais également dans certaines maladies induisant une insuffisance respiratoire ou une insuffisance cardiaque. Un environnement hypoxique est également décrit dans les cas de cancer et de progression tumorale. Dans les modèles animaux de fibrose induite à la bléomycine, l'utilisation du pimonidazole, sonde fluorescente dont l'expression est négativement corrélée à la PO₂ (Raleigh et al. 1998) démontre la présence de zones hypoxiques chez l'animal (Weng et al. 2014). Les hypothèses sur l'origine de l'hypoxie alvéolaire sont nombreuses, mais sont souvent associées au remaniement tissulaire mais également à la présence d'un environnement très inflammatoire comme lors de la survenue de phases d'exacerbation dans la FPI (Collard et al. 2007). Plusieurs études réalisées sur des

biopsies de patients atteints de FPI ont rapportés une signature hypoxique (Kusko et al. 2016) et l'expression du facteur inductible à l'hypoxie HIF-1 α a également été observée (Tzouvelekis et al. 2007). Le facteur de transcription HIF-1 est un hétérodimère formé par deux sous-unités, HIF-1 α et HIF-1 β . Cet hétérodimère se lie à des promoteurs situés sur l'ADN (Tanjore et al. 2011b) afin d'induire ses gènes cibles. La protéine HIF-1 α est constitutivement exprimée dans le cytoplasme des cellules. En condition normoxique, en présence d'O₂, la prolyl-hydroxylase (PHD) qui existe sous trois isoformes PHD1, PHD2 et PHD3 (Epstein et al. 2001), va hydrolyser HIF-1 α (Figure 39) (Jiang et al. 1996) au niveau de ses résidus prolines (P402 et P564). Par la suite, la Von Hippel Lindau protein (VHL) qui est une sous-unité d'une ubiquitine ligase E3 va ubiquitiner HIF-1 α hydroxylée, conduisant à sa dégradation au sein du protéasome (Watts and Walmsley 2019) (Figure 39). En condition hypoxique, l'absence de dioxygène, rend la PHD inactive (Kaelin and Ratcliffe 2008). Ainsi, HIF-1 α n'est pas hydrolysé ni ubiquitinylé et se stabilise dans le cytoplasme (Figure 39). Par la suite, cette sous-unité transloque dans le noyau où elle formera un hétérodimère avec la sous-unité HIF-1 β qui est constitutivement exprimée, formant ainsi un complexe de transcription HIF-1 α actif. Cet hétérodimère se fixe par la suite à une séquence consensus qui est l'élément de réponse à l'hypoxie (hypoxia response element, HRE) afin d'induire la transcription de ses gènes cibles (Epstein et al. 2001) (Figure 39).

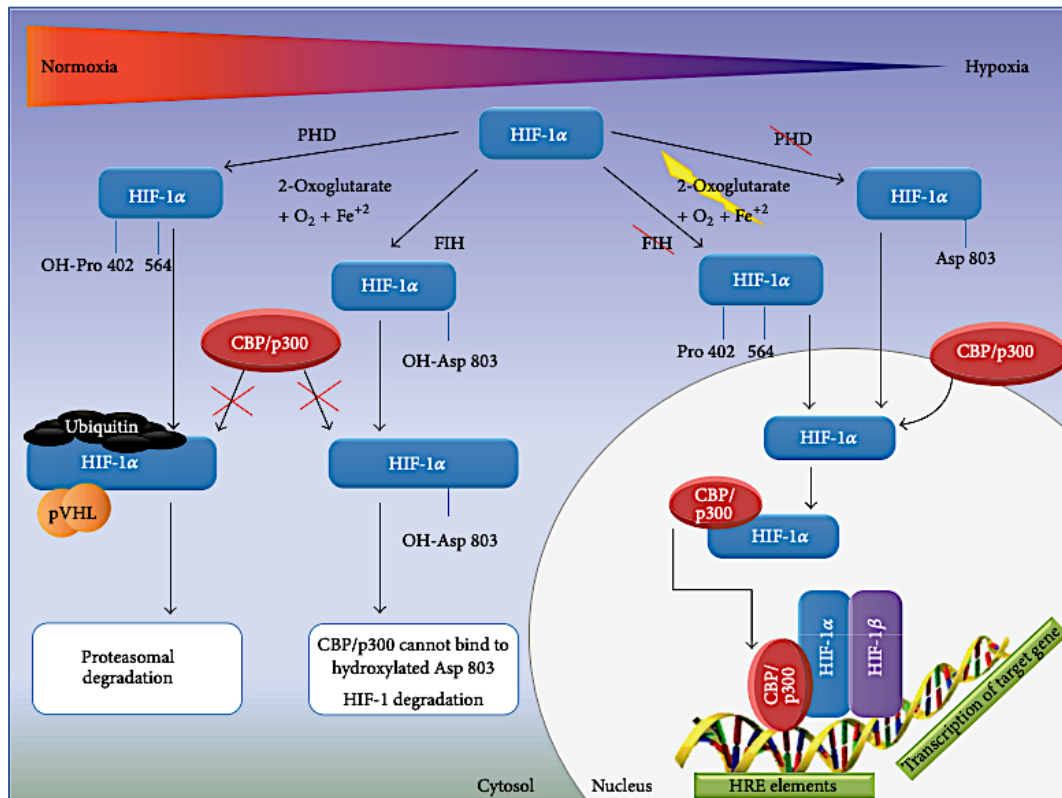


Figure 39: Mécanisme de stabilisation de HIF-1 α . En présence d’oxygène, la protéine PHD hydroxyle le facteur HIF-1 α permettant son ubiquitination par la VHL conduisant à sa dégradation au niveau du protéasome. En absence d’oxygène, la PHD n’est pas fonctionnelle, HIF n’est pas dégradé, il s’accumule dans le cytoplasme puis est transloqué dans le noyau. A ce niveau, un hétérodimère se forme entre HIF-1 α et HIF-1 β , ce facteur, associé à d’autres protéines induisent l’expression de leur gènes cibles. D’après (Semenza 2012).

Un certain nombre de donnée de la littérature, et notamment l’étude de Weng et de ses collaborateurs tendent à penser que la surexpression de HIF pourrait favoriser la fibrogénèse pulmonaire. En effet, dans un modèle murin invalidé pour HIF, les souris étaient protégées des effets de la bléomycine (Weng et al. 2014). L’implication de HIF dans la fibrogénèse est liée à sa capacité à réguler les acteurs moléculaires impliqués dans les évènements cellulaires associés à la fibrogénèse. En effet, parmi les gènes cibles de HIF-1, sont retrouvés les gènes codant pour l’angiogenèse (EPO, VEGF, SERNIP 1, NOX2 PDGF- β ...), la prolifération (TGF- β 3,...), la TEM (ZEB1/2, SNAI 1/2, TGF- α ,...), l’apoptose (BNIP3, MCL1,...), le maintien de l’homéostasie oxydo-reductive (GPX, SOD2, HMOX1), mais également du stress du RE (Zimna and Kurpisz 2015) (Figure 40).

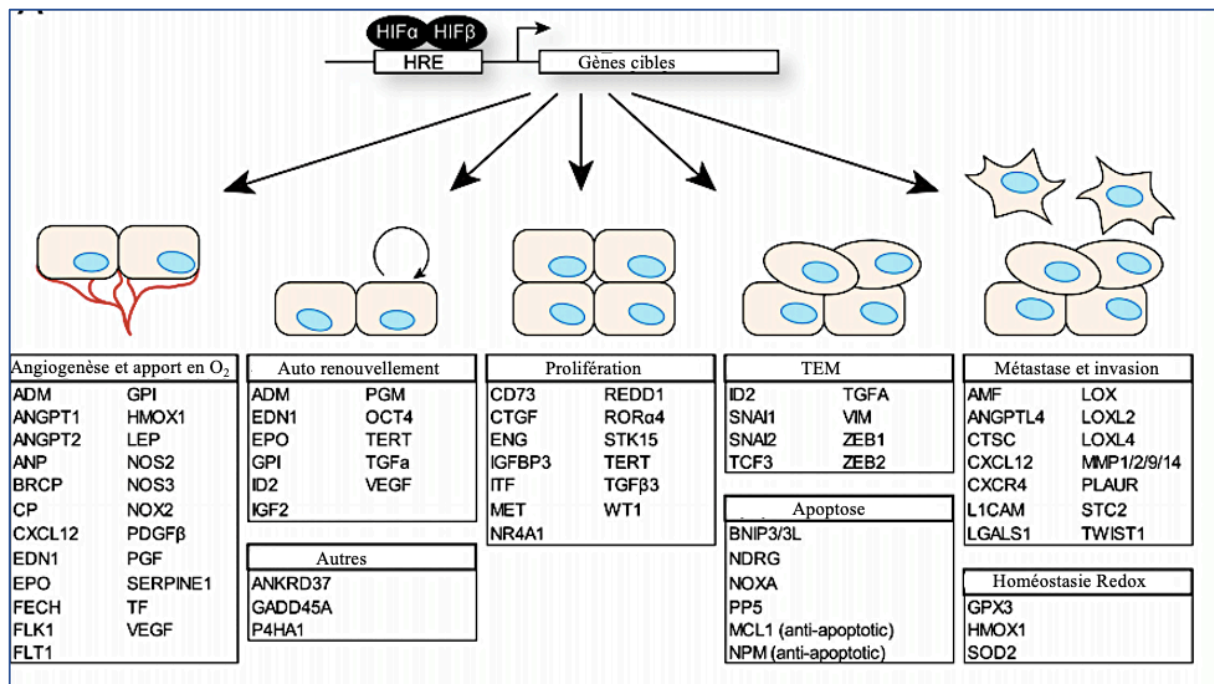


Figure 40: Gènes cibles de HIF-1. Liste non exhaustive des gènes induits par le facteur de transcription induit en hypoxie, HIF-1. D'après (Dengler et al. 2014).

L'implication de HIF dans l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire a été suggérée par de nombreux travaux. En effet, une stabilisation de HIF, ou une expression accrue de HIF favoriserait l'expression des protéines pro-apoptotiques telles que p53, p21, (Belibi et al. 2011), ou Bax et BNIP3 (Bellot et al. 2009). De plus, il a été montré qu'en cas d'hypoxie, HIF-1 α induit l'expression de la LC3-II et de Beclin-1 initiant le processus de l'autophagie (Tzouvelekis et al. 2007) afin de prévenir une accumulation de ROS dans les mitochondries et de la mort cellulaire (Carmeliet et al. 1998). Le facteur HIF-1 α joue également un rôle important dans la TEM en régulant l'expression des inducteurs de TEM TWIST ou ZEB1/2, impliqués notamment dans l'inhibition du marqueur épithélial E-cadhérine (Uzunhan et al. 2016) (Figure 40). Enfin, un lien semble également exister entre l'expression du facteur de transcription HIF-1 et les voies du stress du RE. Des travaux récents de la littérature ainsi que du laboratoire ont clairement mis en évidence un rôle direct de HIF dans la régulation de l'activation des facteurs de transcription ATF4 et CHOP (Korfei et al. 2008; Delbrel et al. 2019). Et de même, la tunicamycine, un inducteur de stress du RE et des voies de signalisation UPR, serait capable d'induire également la stabilisation du facteur HIF indépendamment d'un contexte hypoxique (Novais et al. 2021).

4) Traitement de la FPI

Le stress oxydant jouant un rôle important dans la physiopathologie de la FPI, des médicaments anti-oxydants tel que le N-acétylcystéine (NAC) ont été proposés aux patients. Deux essais se focalisant sur le NAC en monothérapie ou en trithérapie ont été conduits, les essais IFIGENIA et PANTHER. L'essai IFIGENIA comparait l'effet de la prise de NAC *versus* un placebo chez des patients prenant tous de la prednisone (glucocorticoïde de synthèse) et de l'azathioprine (inhibe la biosynthèse des nucléotides pour inhiber la prolifération de cellules immunitaires). Les résultats de cet essai n'ont pas pu évaluer un bénéfice du traitement par NAC par rapport au placebo (Maurits and Juergen 2004). L'essai PANTHER a évalué l'effet d'un traitement par une trithérapie NAC + prednisone + azathioprine *versus* NAC seul *versus* placebo au cours de FPI peu évoluée. Le premier essai fût arrêté quelques mois après le début des inclusions du fait de survenue accrue d'évènements indésirables graves faisant augmenter significativement la mortalité globale ($p=0,01$) et le taux d'hospitalisations non prévues par rapport au placebo (Tzouvelekis et al. 2007; Korfei et al. 2008; Kliment and Oury 2010; Lawson et al. 2011). La présence d'une inflammation importante dans la FPI conduit à l'utilisation des anti-inflammatoires dans les essais thérapeutiques. Cependant, les essais réalisés avec administration de corticoïdes ont montré que ce traitement s'est avéré inefficace (Raghu et al. 2012). En revanche, la prescription de corticoïdes à des doses plus fortes n'est proposée qu'en cas d'exacerbation aiguë. A ce jour, aucun traitement curatif de la FPI n'existe sur le marché. On compte aujourd'hui deux traitements anti-fibrotiques, la Pirfénidone et le Nintédanib. La pirfénidone est une molécule immunosuppressive, ayant des propriétés anti-fibrotiques, anti-inflammatoires et anti-oxydatives (Hope-Gill et al. 2003). Le nintédanib, quant à lui, aurait un effet inhibiteur de la prolifération, de la migration et de la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes au niveau pulmonaire, en activant les cascades de signalisations en aval des récepteurs aux fibroblast growth factor (FGF) et au platelet-derived growth factor (PDGF) (King et al. 2014; Knüppel et al. 2017). Un article paru en 2017 par l'équipe de Knüppel montre le rôle anti-fibrosant de la pirfénidone et du nintédanib par inhibition l'expression de *Col1A1* et la sécrétion du collagène de type I et mais également de la formation faisceaux de fibrilles de collagène (Wollin et al. 2015). D'autres alternatives telles que l'oxygénothérapie ponctuelle peuvent également être prescrites aux patients en cas de besoin. A ce jour, la seule solution à la FPI reste la transplantation pulmonaire.

5) Les syndromes d'apnées du sommeil chez les patients atteints de FPI

Dès 1984, deux études ont montré des troubles du sommeil avec une fragmentation du sommeil et une hypoxémie nocturne en présence d'une fibrose pulmonaire sévère (Perez-Padilla et al. 1985; Gusbin et al. 2013). Une étude réalisée en 2006 sur 37 patients présentant des pneumopathies interstitielles diffuses a montré une perturbation de leur architecture du sommeil et une hypoxie nocturne, 24 patients parmi tous répondaient à la définition du SAHOS (Bye et al. 1984; Perez-Padilla et al. 1985). Le niveau d'atteinte pulmonaire n'est pas un facteur prédictif des troubles de sommeil rencontrés (Krishnan et al. 2008), cependant, les troubles du sommeil présents chez les patients atteints de FPI sont fatals (Aydoğdu et al. 2006; Mermigkis et al. 2007). Il a été montré par notre laboratoire et d'autres une très forte prévalence d'apnées-hypopnées obstructives du sommeil (SAHOS) chez les patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique (Krishnan et al. 2008; Gille et al. 2018).

Partie III : L'hypoxie Intermittente Chronique, un facteur de risque de la FPI ?

Chapitre I : le syndrome d'apnées-hypopnées obstructive du sommeil

I. Les troubles du sommeil de l'adulte : définition et généralités

Les troubles du sommeil ont été décrits pour la première fois au début du 20^e siècle. Le syndrome d'apnées hypopnées du sommeil (SAHS) est la cause la plus fréquente des perturbations respiratoires rencontrées au cours du sommeil. Le SAHS est très répandu, il peut être diagnostiqué chez les personnes à tout âge (Jun et al. 2016). Il est retrouvé chez 15 % de la population (Young et al. 2002b), avec une prévalence plus élevée chez les hommes par rapport aux femmes (Young et al. 2002a, b). L'examen de référence, le plus fiable et le plus utilisé afin de poser le diagnostic du SAHS est la polygraphie respiratoire ou la polysomnographie (PSG) réalisée dans des laboratoires du sommeil si des symptômes, tels que la somnolence diurne sont observés (Sériès 2006). Au cours d'une PSG, différents paramètres sont évalués, comme la saturation sanguine en oxygène grâce à un oxymètre de pouls, l'effort respiratoire par mesure des mouvements respiratoires à l'aide de bandes d'inductances ; le flux aérien à l'aide d'un capteur naso-buccal ; les examens de l'activité cérébrale par électro-encéphalogramme ; cardiaque par électrocardiogramme ; mais également des nerfs et des muscles par électromyogramme (Gottlieb and Punjabi 2020) (Figure 41).

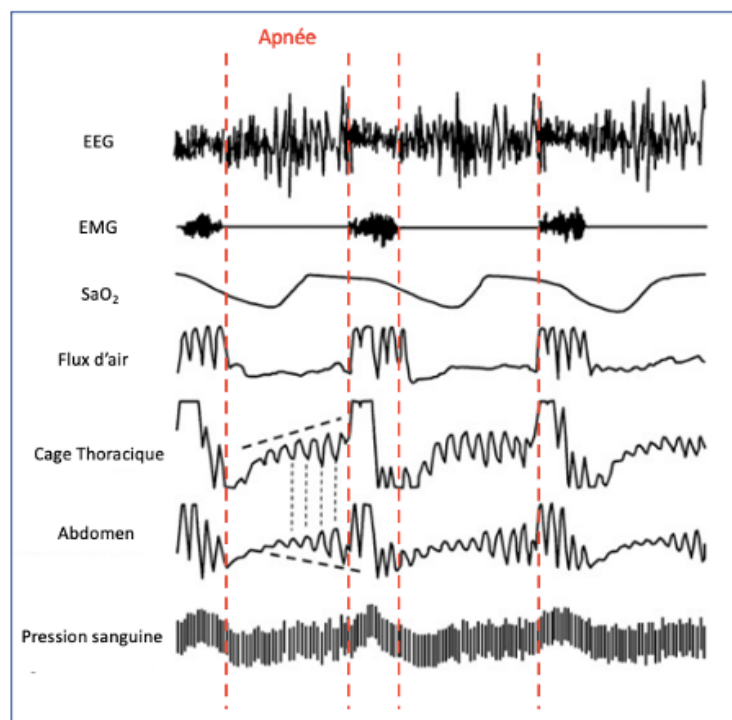


Figure 41: Tracé de polysomnographie illustrant des fragmentations du sommeil. Lors d'une apnée (délimitées par des traits discontinus rouge), on observe sur l'électroencéphalogramme (EEG), une fragmentation du sommeil, une diminution de la saturation sanguine en O₂ (SaO₂) mesuré par oxymètre de pouls, et une diminution de l'amplitude du débit nasal (Flux d'Air). Lors d'une apnée obstructive, les mouvements de la cage thoracique et de l'abdomen (Abdomen) persistent contrairement à l'apnée d'origine centrale comme observée ici avec une altération des mouvements de la cage thoracique. D'après (Dematteis et al. 2009).

En 2005, l'American Academy of Sleep Medicine a réalisé une classification des différents types de SAHS en fonction de leur origine (Thorpy 2012; Sateia 2014) :

- Le syndrome d'apnées-hypopnées obstructives du sommeil (SAHOS) : C'est le trouble le plus fréquent (Somers and Abboud 1993a). Il est caractérisé par une obstruction partielle ou totale des voies aériennes supérieures se traduisant par une réduction (hypopnée) ou un arrêt (apnée) de la ventilation (Figure 41 et Figure 42). Lors d'une apnée obstructive, les mouvements thoraco-abdominaux persistent, témoignant du maintien de l'effort ventilatoire (Young et al. 2002a; Strollo et al. 2014).

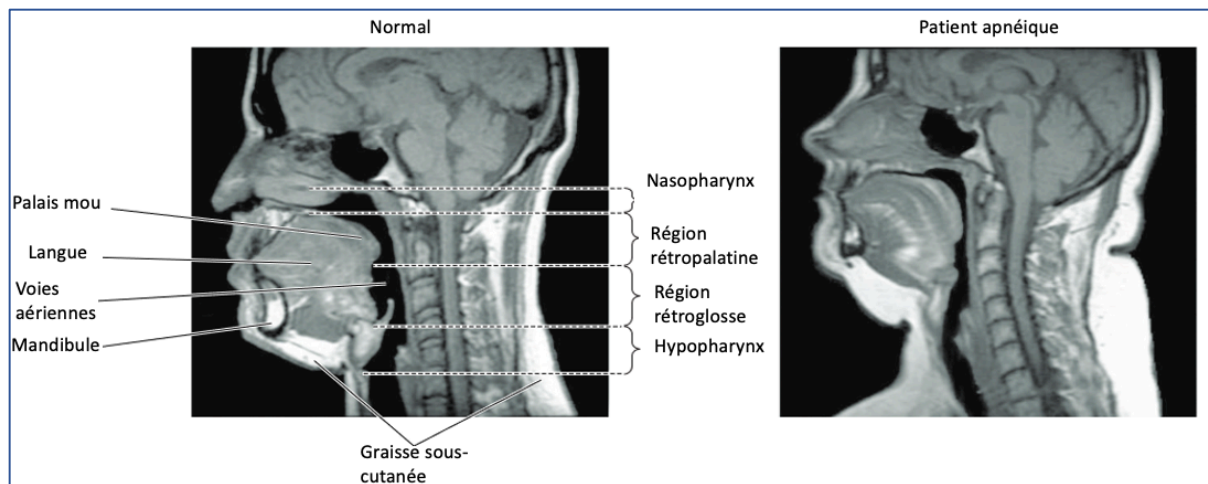


Figure 42: Illustration des VAS chez un sujet sain (gauche) et un patient souffrant de SAHOS sévère (droite) observées par résonance magnétique (IRM). Mise en évidence des quatre régions des voies aériennes supérieures (nasopharynx, région rétropalatine, région rétroglosse, hypopharynx), des tissus mous des voies aériennes supérieures (palais mou, langue, graisse), et des structures craniofaciales (mandibule). Les amas graisseux sont représentés en blanc sur l'IRM. On note chez le patient apnéique des voies aériennes supérieures sont plus petites, à la fois dans la région rétropalatine et rétroglosse. Le palais mou est plus long et la taille de la langue est plus grande ; et c) la quantité de sous-cutané la graisse est plus importante. D'après (Schwab et al. 1995).

- **Le syndrome d'apnées-hypopnées centrales du sommeil (SAHCS)** : caractérisé par des apnées/hypopnées sans obstruction des voies aériennes supérieures (Shkoukani et al. 2002; Strollo et al. 2014). On parlera ici d'apnée centrale. Elle est la plupart du temps associée à des problèmes neurologiques (Solin et al. 2003; White 2005) ou à une insuffisance cardiaque évoluée (DURÁN et al. 2015).

- **Le syndrome d'apnées-hypopnées mixtes du sommeil (SAHMS)** correspond à un arrêt du flux respiratoire débutant par une apnée centrale et se terminant par une apnée obstructive, c'est à dire associé à un effort respiratoire (Somers and Abboud 1993a; Kimoff 1996).

Le SAHOS étant la cause la plus fréquente de ces perturbations respiratoires (Mannarino et al. 2012; Dallaire and Chung 2018), nous nous sommes uniquement intéressés à cette catégorie de trouble du sommeil dans la suite du manuscrit.

II. Le Syndrome d'Apnées Hypopnées Obstructive du Sommeil (SAHOS)

1) Description du syndrome d'apnées hypopnées obstructive du sommeil

a. Définition

Le SAHOS est défini par la présence de critères bien précis observés après polysomnographique ou polygraphique respiratoire associés à la présence de somnolence diurne non expliquée par d'autres facteurs ou deux au moins des critères suivants : ronflements sévères ; sensation d'étouffement ou de suffocation pendant le sommeil ; éveils répétés pendant le sommeil ; sommeil non réparateur ; fatigue diurne ; difficulté de concentration ; nycturie (Richter et al. 2003; Mannarino et al. 2012; DURÁN et al. 2015).

b. Sévérité du SAHOS

La sévérité du SAHOS dépend essentiellement de l'Index d'Apnée Hypopnée (IAH) et du degré de somnolence diurne (Flemons et al. 1999). L'IAH est un index prenant en compte le nombre d'apnée-hypopnée rencontré au cours du sommeil et calculé selon une formule donnant le nombre d'apnées obstructives/hypopnées mesuré par polysomnographie (Figure 43) (Flemons et al. 1999).

$$\text{Index d'Apnée Hypopnée(IAH)} = \frac{\sum(\text{nombre d'apnée} + \text{hypopnée})}{\text{Heure de sommeil}}$$

Sévérité du SAOS:

- $\text{IAH} \leq 4$: Pas de SAOS
- $5 \leq \text{IAH} \leq 14$: SAOS Léger
- $15 \leq \text{IAH} \leq 29$: SAOS Modéré
- $30 \leq \text{IAH}$: SAOS Sévère

Figure 43: Calcul de l'index d'apnée hypopnées et degré de sévérité du syndrome d'apnée obstructif du sommeil. La sévérité du SAHOS est déterminée par l'index d'apnées hypopnées. Cet index est obtenu par la somme du nombre d'apnée-hypopnée rapporté par heure de sommeil.

Lorsque l'index d'apnée-hypopnée (IAH) est inférieur à 4, l'individu ne présente pas de SAHOS, lorsque l'IAH est compris entre 5 à 14, le patient présente un SAHOS léger, un IAH compris entre 15 à 29 est qualifié de modéré tandis qu'un IAH supérieur à 30 définit un SAHOS sévère (Figure 43). L'importance de la somnolence diurne, qui résulte de la fragmentation du

sommeil et des ronflements nocturnes, est aussi à prendre en compte dans la définition de la sévérité des troubles du sommeil. Cependant, dans 15 à 20% des cas, une somnolence diurne non expliquée par d'autres facteurs peut être associée au SAHOS (Remmers et al. 1978; Wolk et al. 2003). Cette somnolence peut être évaluée *via* le questionnaire d'Epworth et classée en 3 stades :

- **Légère** lorsqu'elle a peu de répercussion sur la vie du patient et qu'elle intervient lors d'activité demandant peu d'attention (regarder la télévision).

- **Modérée** lorsqu'elle a une répercussion modérée sur la vie du patient et qu'elle intervient lors d'activité nécessitant une attention plus importante (lors d'une réunion).

- **Sévère** lorsqu'elle perturbe de manière importante la vie du patient et apparaît lors des activités quotidiennes (conduite, repas, conversation).

c. Hypoxémie et micro-éveils

Comme nous le détaillerons plus loin, les répétitions d'apnées ou d'hypopnées rencontrées dans le SAHOS conduisent à de brefs épisodes d'hypoxie-hypercapnie-réoxygénation de façon répétées et cycliques pouvant s'accompagner d'importantes désaturations en dioxygène (Fietze et al. 2004). En effet, Il a été rapporté une haute fréquence de désaturation en dioxygène compris entre 15 et 60 secondes avant une phase de réoxygénation intense pouvant se répéter jusqu'à 8 à 9 heures par nuit pendant le sommeil (Rashid et al. 2021) (Figure 44). Les conséquences de ses désaturations sont une fragmentation du sommeil, une augmentation des épisodes de somnolence diurne, et des risques de dysfonctionnement neurocognitif et de morbidité cardiovasculaires (Gozal et al. 2014; Konecny et al. 2014).

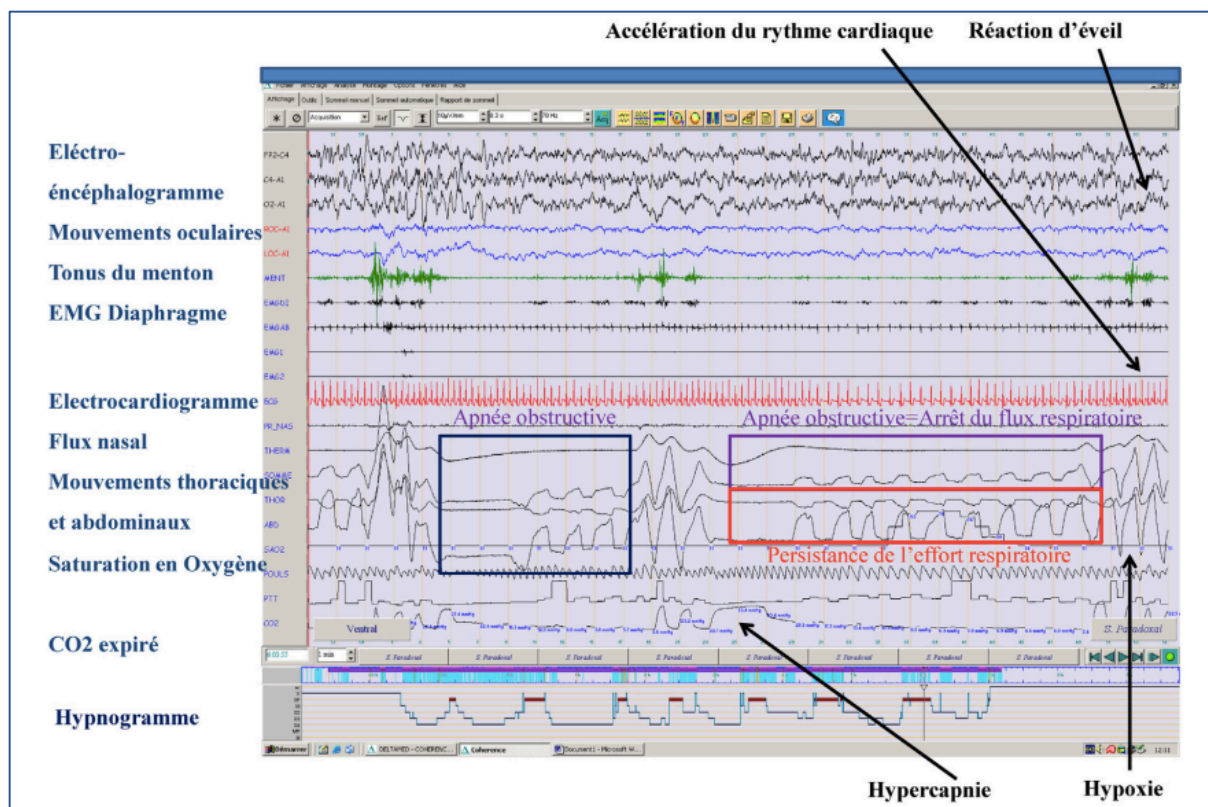


Figure 44: Tracés polysomnographiques illustrant les micro-éveils. Polysomnographie d'un patient présentant un syndrome d'apnée-hypopnée centrale du sommeil. Suite à une apnée (encadré noir) résulte un arrêt du flux respiratoire (encadré violet), parallèlement à cette diminution, il est observé une augmentation de la PaCO₂, observée sur la ligne « CO₂ expiré » (hypercapnie) et une diminution de la PaO₂, observée sur la ligne « saturation en Oxygène » (hypoxie) conduisant à une accélération du rythme cardiaque et une réaction d'éveil afin de permettre la réoxygénation. Il est observé une modification brutale des fréquences électro-encéphalographique (EEG) supérieures à 3 secondes précédées d'un arrêt du flux respiratoire reflétant la survenue d'un micro-éveil. D'après (Franco et al. 2017).

Le réveil fractionné de ces patients (Somers and Abboud 1993b; Mehrtash et al. 2019) serait en partie la conséquence d'une augmentation réflexe de la ventilation-minute et de l'activité sympathique, suite à l'activation des chémorécepteurs périphériques et centraux par l'hypoxie, l'hypercapnie (Wade 1970; Lugliani 1971; Gelfand and Lambertsen 1973) et l'activation du réseau respiratoire (Aboubakr et al. 2001; Gerst et al. 2011). D'autre part, ces afférences périphériques chémosensibles vont activer directement les centres de l'éveil contribuant également à ces micro-réveils (Kimoff 1996). Enfin, les mécanorécepteurs de la paroi thoracique semblent également jouer un rôle dans ces micro-réveils du fait de l'augmentation de l'effort respiratoire lié aux apnées (Kimoff 1996). Ces micro-réveils se produisant en fin d'apnées permettent ainsi l'augmentation de l'activité des muscles dilatateurs des voies aériennes supérieures conduisant à leur réouverture et au rétablissement du flux respiratoire (Shkoukani et al. 2002; Strollo et al.

2014). On observe ainsi une augmentation rapide de la PO₂ et une diminution de la PCO₂ avant un retour au sommeil et un nouveau cycle d'hypoxie/réoxygénation.

d. Facteurs de risques

Le SAHOS touche environ 10 à 20% de la population adulte générale (Young et al. 2002a; Punjabi 2008). La sévérité du SAHOS augmente avec l'âge (Bixler et al. 1998; Young et al. 2002a), Les principaux facteurs de risque de prédisposition à ce syndrome sont, l'obésité (Young et al. 2002a), le sexe masculin (Lynn and Martin 1997; Young et al. 2002a), l'âge, la consommation d'alcool (Taveira et al. 2018), des prédispositions génétiques (Martin et al. 1997) ou une anomalie au niveau des voies aériennes supérieures par exemple. En effet, la perméabilité des voies aériennes supérieures peut être altérée par un rétrécissement anatomique ou des structures pharyngés, une hypertrophie amygdalienne, une macroglossie un dépôt de graisse pharyngée (rencontré dans l'obésité) (Wolk et al. 2003) ou d'une diminution de l'activité des muscles dilatateurs du pharynx induite par le sommeil (Tableau 3).

Mécanismes	Causes
Réduction calibre du pharynx	Obésité (Infiltration de graisse), Hypertrophie des amygdales, Macroglossie, Tumeur du pharynx, ...
Augmentation de la collapsibilité du pharynx	Infiltration graisseuse, Facteurs génétiques, Fragmentation du sommeil, ...
Augmentation de l'effort diaphragmatique	Effort inspiratoire suite à une obstruction nasale
Relâchement réflexe des muscles dilatateurs du pharynx	Respiration par la bouche Obésité Alcool Anesthésie locale pharyngée

Tableau 3: Mécanismes et causes de de la fermeture du pharynx. Différents mécanismes peuvent être à l'origine des SAHOS. La réduction du calibre du pharynx, l'augmentation de la collapsibilité du pharynx, l'augmentation de l'effort diaphragmatique ou le relâchement réflexe des muscles dilatateurs du pharynx par exemple conduisant tous à une obstruction des voies aériennes supérieur altérant ainsi l'oxygénation de l'organisme. Adapté d'après (Delcus 2011).

Du fait de l'absence d'un support rigide, le pharynx présente une susceptibilité à la déformation et à l'affaissement notamment au cours du sommeil. De plus il semble que la disposition des tissus mous ainsi que l'anatomie des voies aériennes supérieures (VAS) soit modifiées chez les patients SAHOS et présentent une augmentation de leur collapsibilité

pouvant favoriser un affaissement de ces muscles au cours du sommeil où le tonus des muscles pharyngés est atténué (Schwab et al. 1995; Eckert and Malhotra 2008; Gottlieb and Punjabi 2020) (Gold et al. 2002). En outre, une altération du fonctionnement des muscles dilatateurs du pharynx permettant de maintenir la perméabilité des VAS est également évoquée. L'effondrement des voies respiratoires à l'origine des épisodes d'apnée-hypopnée est responsable d'une hypercapnie, d'une l'hypoxémie, et d'une augmentation du travail respiratoire du travail respiratoire (Eckert and Malhotra 2008) finissant par provoquer le réveil comme évoqué en amont (Fogel et al. 2003). Chez les patients présentant un SAHOS, il semble que l'activité de ces muscles dilatateurs soit réduite pendant le sommeil (Mezzanotte et al. 1996) et au contraire, présentent une activité accrue l'éveil (Tamisier et al. 2004). En revanche, pendant le sommeil, ce mécanisme échoue, probablement en raison de la diminution de la stimulation des neurones respiratoires (Aboubakr et al. 2001).

e. Comorbidités, complications et mortalité du SAHOS

Le SAHOS est décrit comme étant un facteur de risque indépendant de nombreuses pathologies notamment cardiovasculaires (Hypertension artérielle, Coronaropathie, ...) et métaboliques (Diabète de type 2, ...) (Bradley and Floras 2009; Rakel 2009). Il a été montré que de nombreuses pathologies cardio-vasculaires pouvaient être observées suite à diverses perturbations du sommeil (2012). En effet, chez les patients présentant des SAHOS, il est observé une augmentation de la pression artérielle, la fréquence cardiaque et l'activité sympathique (Somers et al. 1995). Il a été décrit dans une étude clinique un risque plus élevé de développer une complication cardiovasculaire lorsque les patients présentaient un SAHOS sévère non traité. (Yaggi and Mohsenin 2001; Marin et al. 2005). En effet, dans étude réalisée sur une cohorte de 1600 patients atteints de SAHOS modérés à sévères que le risque de décès suite à une complication cardiovasculaires était réduit de trois fois lorsque les patients étaient traités par pression positive continue (PPC) (Marin et al. 2005). Par ailleurs, Cette forte prévalence des SAHS est également retrouvée chez les patients atteints de diabète, en effet, 14,7% de patients présentant un SAHOS modéré à sévère sont diabétiques (Reichmuth et al. 2005). L'obésité et l'apparition de SAHOS sont également étroitement liés, en effet, l'excès de graisse au niveau du cou diminue fortement le calibre des voies respiratoires et favorise leur obstruction (Polonis et al. 2020). Le SAHOS est associé à une augmentation de la mortalité toute cause confondue et notamment lié à l'accident de la route suite à une somnolence diurne observé dans 50% des

patients présentant des perturbations du sommeil (Kapur et al. 2005) et aux complications cardiovasculaires (Rakel 2009).

f. Syndrome d'apnées du sommeil et fibrose pulmonaire idiopathique

Depuis une dizaine d'années, des troubles du sommeil sont décrits chez les patients atteints de pneumopathies interstitielles (Lancaster et al. 2009a; Pihtili et al. 2013; Troy 2014). Il a été récemment suggéré que le SAHOS était une comorbidité importante à la FPI (Raghu et al. 2011; Schiza et al. 2015). En effet, il a été montré une forte prévalence de SAHOS chez les patients atteints de FPI, que la pathologie soit ancienne (Lancaster et al. 2009a) ou nouvellement diagnostiquée. En effet, 88% des patients FPI présentent un SAHOS dont 20% avec un SAHOS léger et 68% avec un SAOS modéré à sévère (Lancaster et al. 2009a). Dans notre étude prospective multicentrique, nous avons observé que 62% des patients présentaient un SAHOS modéré avec un Indice d'Apnées Hypopnées (IAH) entre 15 et 30 événements par heure et 40 % un SAHOS sévère IAH supérieur à 30 événements par heure (Krishnan et al. 2008) (Gille et al. 2017). La forte association entre SAHOS et FPI incidente suggère que le SAHOS pourrait apparaître en même temps que la fibrose, ou plus vraisemblablement préexister à celle-ci.

g. Traitements des SAHOS

Il a été montré que les patients présentant des SAHOS, non traités pour leur perturbation de sommeil présentent un risque significativement plus élevé de mortalité comparé aux patients suivis et soumis à un traitement (Young et al. 2008; Jyothi et al. 2019; Gottlieb and Punjabi 2020). L'index de poids corporel élevé étant l'une des comorbidités du SAHOS, la perte de poids pourrait participer à limiter l'obstruction pharyngée et favoriser une amélioration clinique. Outre la perte de poids, il est conseillé aux patients de limiter leur consommation de boissons alcoolisées et de préconiser un sommeil en décubitus dorsal (Cowan and Livingston 2012; Dixon et al. 2012). Les patients peuvent également se voir proposer des orthèses d'avancement mandibulaire et de protrusion de la langue. Le principe de ces gouttières consiste à propulser la mâchoire inférieure vers l'avant de 5 mm environ afin de libérer la filière aérienne pharyngée postérieure et ainsi libérer le passage de l'air inspiré. L'avancement mandibulaire et la protrusion de la langue ont montré une efficacité clinique diminuant de moitié le nombre d'apnées-hypopnées mais également le ronflement, conduisant à une amélioration de la qualité du sommeil (Attali et al. 2019). Sans efficacité, un traitement chirurgical peut-être proposé. Le traitement chirurgical consiste à retirer l'obstacle oropharyngé tel qu'une hypertrophie

amygdalienne, une ablation ou diminution de la taille de la luette, etc... dans l'objectif de diminuer le volume des tissus entourant la paroi de l'oropharynx (Holty and Guilleminault 2010).

Un autre traitement très utilisé est la pression positive continue (PPC). Ce traitement correspond à l'insufflation par un masque facial, d'air réglé à une pression continue, assurant un maintien ouvert des voies aériennes supérieures en évitant le collapsus de celles-ci (Miles et al. 1993). Durant le sommeil, cet appareil détecte en continu les mouvements respiratoires, et lors d'une altération de ces derniers, les voies aériennes supérieures sont soumises à une pression minimale permettant de corriger ces évènements. Il a été montré que la PPC améliore la qualité de vie des patients présentant des SAHOS et réduit significativement la mortalité (Batool-Anwar et al. 2016). Il a également été montré que cette approche permettait de réduire la fatigue et la somnolence diurne des patients (Chotinaiwattarakul et al. 2009). Dans ce contexte, la PPC a été proposée aux patients FPI et présentant un SAHOS. Les résultats rapportent une amélioration de la vie quotidienne et une diminution de l'IAH de ces patients FPI. présentant un SAHOS modéré à sévère (Mermigkis et al. 2013, 2015, 2017).

Chapitre II : L'hypoxie intermittente chronique (HIC)

Comme évoqué en amont, les répétitions d'apnées ou d'hypopnées rencontrées dans le SAHOS conduisent à une hypoxie intermittente chronique qui semble être l'élément pathogénique majeur du SAHOS (Dempsey et al. 2010). Afin de mimer le SAHOS, et d'étudier les effets de l'HIC sur l'organisme, un modèle expérimental a été développé. Ce modèle consiste à exposer l'animal à des cycles plus ou moins brefs d'hypoxie suivi de périodes de normoxie. Ces épisodes d'agressions répétés conduisent à une désaturation ponctuelle en oxygène artériel (SaO_2), mimant les épisodes d'hypoxie-réoxygénation rencontrés dans le SAHOS (Dewan et al. 2015).

I. Effets de l'hypoxie intermittente chronique sur la commande centrale respiratoire

1) Effet sur les chémorécepteurs

Des études réalisées chez le rat exposé à de l'HIC ont montré une augmentation de l'activité des nerfs sympathiques (Greenberg et al. 1999; Huang et al. 2009), mais également des nerfs phrénique et hypoglosse (Baker and Mitchell 2000; Baker et al. 2001) pendant les périodes de repos. De plus, il a également été montré une augmentation de la ventilation des rats après arrêt de l'exposition à de l'HIC (Fletcher et al. 1992; Knight et al. 2011; Morgan et al. 2016). Toutes ces observations suggèrent que l'HIC induit une plasticité du réseau neuronal respiratoire. En effet, l'augmentation de la réponse ventilatoire à l'hypoxie aiguë suite à une exposition à de l'HIC serait la conséquence d'une sensibilisation et d'une hyperactivité des chémorécepteurs carotidiens et la mise en place d'une plasticité (Peng and Prabhakar 2003, 2004; Peng et al. 2003; Del Rio et al. 2016). De plus, la stimulation des chémorécepteurs périphériques par de l'HIC contribue à l'activation sympathique persistante (Prabhakar 2001). En effet, cette activité sympathique qui résulte de l'exposition à l'HIC est absente chez des rats chémodénervés (Lebke et al. 1997).

2) Effet sur la réponse à l'hypoxie et à l'hypercapnie

Des souris C57BL/6 déficientes pour des neurones sérotoninergiques et exposées à des épisodes d'hypoxie (FiO_2 à 5%) ou d'hypercapnie (FiCO_2 à 7%) intermittentes au cours de leur sommeil ne présentent pas d'induction d'éveil en réponse à l'hypercapnie intermittente, et des

réponses inchangées à l'hypoxie intermittente (Zhao et al. 2006; Buchanan and Richerson 2010). Ainsi, les neurones sérotoninergiques présenteraient un rôle important dans l'induction de l'éveil en réponse à l'hypercapnie telle qu'elle survient dans le SAHOS.

3) Effet sur la plasticité du réseau neuronal respiratoire

A l'éveil, les patients atteints de SAHOS présentent une augmentation du tonus du muscle génioglosse et du diamètre des voies aériennes supérieures (VAS) (Mezzanotte et al. 1992) sans présenter d'obstruction (Mezzanotte et al. 1992; Schwab et al. 1993), suggérant une atteinte durable du système neurorespiratoire. Il a été montré que les obstructions des VAS sont à l'origine d'un cercle vicieux conduisant à des modifications dans le fonctionnement de la CCR (Dempsey et al. 2010).

Les épisodes d'hypoxies-réoxygénation rencontrés dans les SAHOS sont décrits comme des atteintes périphériques résultant de contraintes respiratoires mécaniques. De ce fait, la neuroplasticité induite en réponse à ces épisodes d'hypoxies-réoxygénation pourrait être en partie responsable de l'altération du fonctionnement des voies aériennes supérieures (Dempsey and Smith 2014). En effet, des altérations génétiques de la voie sérotoninergique augmentent le risque de développer un SAHOS (Yilmaz et al. 2005; Bayazit et al. 2006). Ainsi, la sérotonine pourrait véhiculer l'information entre les dysfonctionnements pharyngés et la neuroplasticité respiratoire et jouer un rôle important dans la respiration, et le contrôle des voies aériennes supérieures pendant le sommeil (Yue et al. 2008; De Carvalho et al. 2013). Il a été montré qu'au cours du sommeil, une diminution de l'activité des neurones 5-HT dans les *Raphé Pallidus*, *Obscurus*, *Magnus* mais également une diminution du tonus musculaire pharyngé (Jacobs et al. 2002; McSharry et al. 2014) montrant l'implication de ces neurones dans le contrôle des muscles respiratoires au cours du sommeil.

De plus, il a été montré que de courtes expositions de l'HIC déclenchent une plasticité motrice respiratoire, augmentant la force des contractions respiratoires. Cette augmentation de l'activité motrice respiratoire, qualifiée de facilitation à long terme (en anglais, « Long Term Facilitation », LTF) comme décrit dans la *Partie I. Chapitre III.II.1* de ce manuscrit (Powell et al. 1998; Feldman et al. 2003) semble dépendante de l'activation des récepteurs à la sérotonine (5-HT) (Lovett-Barr et al. 2006), après sécrétion de celle-ci par les neurones du raphé médullaire en réponse à l'hypoxie intermittente (Erickson and Millhorn 1994). L'HIC conduirait donc par ce

mécanisme à une augmentation du débit moteur phrénique chez les animaux anesthésiés (Sandhu et al. 2009) et une augmentation du volume courant ou de la fréquence respiratoire chez les animaux éveillés (Olson et al. 2001; McGuire and Ling 2005).

III. Les effets de l'hypoxie intermittente chronique sur l'organisme

De manière intéressante, des effets bénéfiques et délétères de l'exposition à l'HIC ont été rapportés et sembleraient corrélés à la sévérité de l'hypoxie et la fréquence des cycles (Dale et al. 2014) mais également à la capacité de l'organisme à répondre et activer les mécanismes adaptatifs à l'HIC (Almendros et al. 2014).

1) Effets bénéfiques de l'hypoxie intermittente chronique

En 2014 une étude a mis en avant que l'HIC pouvait procurer des effets bénéfiques sur les paramètres cardiovasculaires, respiratoires, neurologiques et métaboliques. L'exposition à de faibles doses d'hypoxie intermittente ou une exposition modérée ; c'est-à-dire lorsque le taux de dioxygène contenu dans le gaz inhalé est compris entre 9% et 16% d'O₂ ou que le nombre de cycles d'hypoxie-réoxygénation est compris entre 3 à 15 cycles par jour est apparu comme une stratégie thérapeutique prometteuse pour traiter les problèmes respiratoires et non respiratoires (Dale et al. 2014). Une étude réalisée en 2018 par l'équipe de Firat Akat montre que l'exposition de rats ayant développé un diabète de type I à de l'hypoxie intermittente hypobare à environ 70 kPa (incluant ~14% PO₂ ; 6 h/jour pendant 6 semaines) a un effet bénéfique sur le remodelage cardiovasculaire de la fonction ventriculaire gauche (Akat et al. 2018). Des essais cliniques randomisés, réalisés en double aveugle démontrent que la répétition d'une légère hypoxie aiguë (3-5 min de 12-15% d'O₂, suivi de 3-5 min d'intervalles normoxique, puis 5-9 épisodes/jour, durant 15 jours) provoque des effets bénéfiques chez les patients atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive, notamment, une augmentation du temps d'exercice, une augmentation de la réponse ventilatoire hypercapnique, et de la capacité vitale forcée (Burtscher et al. 2009; Haider et al. 2009).

2) Effets délétères de l'hypoxie intermittente chronique

Cependant, des effets délétères sont observés lorsque l'HIC est plus sévère, c'est-à-dire lorsque le taux d'O₂ inhalé est inférieur à 8% ou lorsque le cycle d'hypoxie-réoxygénation est supérieur à 48 cycles par heure (Navarrete-Opazo and Mitchell 2014). L'HIC « sévère » est un

défini comme étant un facteur de risque de nombreuses maladies comme une incidence élevée d'hypertension, des maladies vasculaires périphériques, des accidents vasculaires cérébraux ou de mort subite d'origine cardiaque (Neubauer 2001a, b). De nombreuses études ont mis en avant l'impact de l'HIC dans des altérations cardiaques (Park and Suzuki 2007; Belaidi et al. 2016a; Bourdier et al. 2016). En effet, l'augmentation de l'activité nerveuse sympathique en réponse à l'IHC est l'un des principaux facteurs contribuant à l'augmentation du risque et de la prévalence de l'hypertension et des maladies vasculaires chez les personnes âgées (Kohler and Stradling 2012; Lavie and Lavie 2012). Par ailleurs, l'exposition de souris ou de rats à une HIC sévère (21-5% d'O₂, 8 h/jour) augmente les lésions myocardiques (Park et al. 2007) conduisant à l'infarctus (Bourdier et al. 2016).

De manière intéressante, il a été observé que l'HIC exacerbe de la fibrose pulmonaire induite par la BLM. Des rats instillés avec une dose unique de BLM puis exposés 5 jours après à de l'HIC (10% FiO₂, 30 cycles/h, 10 h pendant 14 ou 35 jours) présentent une augmentation de la quantité de collagène pulmonaire mais également une inflammation et un stress oxydant (Braun *et al.*, 2018; Gille *et al.*, 2018).

IV. Les effets moléculaires de l'HIC et l'impact dans la fibrogénèse

1) Les effets moléculaires dans un contexte d'IHC

Au niveau pulmonaire (Xiong et al. 2021), l'HIC induit une augmentation des ROS, une augmentation du nombre de cellules inflammatoires, une stabilisation du facteur HIF-1 α mais également des marqueurs du stress du RE, autant de facteurs pouvant prédisposer à la fibrogénèse.

a. Le stress oxydant en réponse à l'HIC

L'HIC suite aux épisodes d'hypoxie-réoxygénation conduit à un déséquilibre de la balance oxydant/antioxydant chez les patients présentant un SAHOS, favorisant la production de ROS et l'établissement d'un stress oxydatif majeur (Lavie 2015). L'analyse de plasma et d'urine de patients présentant des SAHOS montre une quantité importante de ROS (Prabhakar et al. 2007) mais également d'une peroxydation lipidique dans le plasma (Lavie et al. 2004). Une étude a montré que l'hydroxylation de l'ADN, mesurée par la quantification de 8-hydroxy-2'deoxyguanosine (8-OHdG), est plus élevée dans les urines des patients présentant des SAHOS sévère (IAH > 30 apnées/heure) par rapport à ceux présentant un SAHOS modéré (IAH < 30 apnées/heure). Ainsi, la quantité de 8-OHdG est corrélée avec le niveau de désaturation

artérielle en oxygène (Yamauchi et al. 2005). De plus, une étude réalisée chez l'Homme, montre que l'exposition à de l'HIC avec des cycles de 2 minutes PO₂ à 45 mm Hg puis 2 minutes PO₂ à 88 mm Hg pendant 6h durant 4 jour augmente la réponse ventilatoire à l'hypoxie (HVR). Ces auteurs montrent que cette augmentation de la HVR est associée à une augmentation de la quantité de ROS mesurés dans le plasma (Pialoux et al. 2009). Des études *in vivo* montrent que l'exposition de souris C57BL/6 à une HIC (Nadir 6 -7% d'O₂) durant 14 jours induit une augmentation de la peroxydation lipidique dans le pancréas (Polak et al. 2013) mais également une augmentation des marqueurs de macrophages et de l'élastase du neutrophile dans le tissu pulmonaire (Tuleta et al. 2016). Par ailleurs, l'exposition de souris à de l'HIC (68 cycles/h, 5% d'O₂) induit, au niveau pulmonaire différents marqueurs de stress oxydatif tels qu'une importante peroxydation lipidique (Da Rosa et al. 2012; Tuleta et al. 2016).

b. L'inflammation en réponse à l'HIC

Une inflammation accrue est identifiée dans le plasma des patients présentant des SAHOS avec notamment la présence de cytokines circulantes tel que l'IL-8 et la MCP-1 (Ohga et al. 2003). D'autres auteurs ont par la suite démontré que cette inflammation était la résultante de l'HIC. En effet, l'HIC peut induire une infiltration de macrophages mais également des cytokines pro-inflammatoires (Umeda et al. 2020) et l'activation du facteur NF_κB (Arnaud et al. 2011). De manière intéressante, il a été montré de l'existence d'une corrélation entre la quantité d'IL-6 mesurée dans le condensat respiratoire et l'indice d'apnées hypopnée des patients présentant des SAHOS (Carpagnano et al. 2002). Des résultats similaires ont été observé par l'équipe de Shamsuzzaman qui a montré que la sévérité du SAHOS est proportionnelle au taux sérique de la protéine C réactive (CRP), marqueur d'inflammation (Shamsuzzaman et al. 2002). Au niveau cellulaire, l'exposition d'hépatocytes ou de macrophages à de l'HIC conduit à une réponse inflammatoire importante avec une augmentation significative de l'expression de l'interleukine 6 (IL-6) ainsi que de l'expression des facteurs de transcriptions HIF et NF_κB (Schaefer et al. 2017).

c. Les stress du RE en réponse à l'HIC

L'exposition à l'HIC, ses conséquences sur l'induction d'un stress oxydant, d'un stress du RE, mais également sur l'induction de HIF et de l'inflammation, pourrait contribuer aux évènements cellulaires impliqués dans la fibrogénèse et jouer un rôle majeur dans l'initiation ou l'exacerbation de la fibrose pulmonaire. L'exposition à de l'HIC (Nadir 5% O₂, 60 cycles/h,)

durant 14 jours, induit, dans les cardiomyocytes, l'expression des marqueurs de stress du RE tel que la protéine régulée par le glucose-78 GRP78, eIF2 α phosphorylé et sXBP1 (Belaidi et al. 2016a). De manière intéressante, les effets de l'HIC sont reversés par le prétraitement des animaux avec un inhibiteur du stress du RE, le TUDCA conférant un rôle important au stress du RE dans la réponse à l'HIC. Ce rôle du stress du RE a également été souligné dans la réponse des cellules pancréatiques à l'HIC pour lesquels une induction de l'autophagie médiée par la voie de signalisation PERK/eIF2 α /ATF4 a été rapportée (Song et al. 2019). Au niveau pulmonaire, des souris exposées à de l'HIC (Nadir à 5% d'O₂) 8 heures par jour durant 4 semaines conduit au développement d'une fibrose caractérisée par une augmentation de l'expression du collagène, et une augmentation du TGF- β 1 (Shi et al. 2020). Celle-ci serait médié par l'activation du stress du RE, et plus particulièrement et des protéines GRP78 et CHOP. Par ailleurs, l'exposition à l'HIC peut également induire une augmentation du nombre de cellules apoptotiques et de l'expression de la caspase-12 clivée, événement médié par l'induction d'un stress du RE (Zhang et al. 2013). Enfin, le traitement des animaux par un inhibiteur du stress du RE (TUDCA) limitait les effets de l'HIC sur la fibrose dans le poumon (Shi et al. 2020).

d. Induction du facteur HIF

Des études *in vivo* montre que l'HIC induit une augmentation du niveau d'ARNm codant pour la protéine HIF-1 α ainsi qu'une augmentation de la stabilisation de ce facteur (Rozen-Zvi et al. 2013). De manière intéressante, des cellules stellaires hépatiques au repos peuvent s'activer sous l'influence du facteur HIF-1 α et produire une quantité de matrice extracellulaire plus importante par rapport au cellules non traitées (Al-Hashem et al. 2019). Un rôle particulièrement important de HIF-1 α dans l'orchestration de la réponse à l'HIC a ainsi été mis en évidence (Semenza 2008; Belaidi et al. 2009; Toffoli et al. 2009; Prabhakar et al. 2020). Cette stabilisation aurait pour but de réguler l'expression des gènes en réponse à ce stress hypoxique (Semenza 2008) s'accompagnant notamment de l'induction d'une réponse inflammatoire (Unnikrishnan et al. 2015), d'un stress oxydant majeur (Lavie et al. 2004) et d'un stress du RE.

i. HIF et stress oxydant

L'activation de ROS/HIF-1 α participe à l'apparition et au développement de nombreuses maladies fibrotiques (Xiong et al. 2021). Il a été démontré que la voie ROS/HIF-1 α est impliquée dans le remodelage vasculaire et l'hypertrophie myocardique (Belaidi et al. 2009) et la fibrose rénale (Liu et al. 2017). Il a également été montré que le stress oxydatif lié à la production de

ROS/HIF-1 α favorise l'apparition d'une inflammation pulmonaire (Palazon et al. 2014). Une récente étude réalisée *in vivo* sur des souris développant une fibrose pulmonaire induite par instillation intra-trachéale de bléomycine à 3UI/g montre qu'une exposition durant 21 jours à de l'HIC (FiO₂ à 10%) aggrave la fibrose pulmonaire (Xiong et al. 2021). Au niveau des adipocytes, l'exposition à de l'HIC conduit à une sénescence cellulaire médiée en partie par les ROS (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 exprimant des marqueurs de sénescence tels qu'une localisation nucléaire de γ -H₂AX et de p16^{Ink4a} comparativement aux individus non-SAHOS. Par ailleurs, *in vitro*, l'exposition des pré adipocytes humains à l'HIC induit l'expression des marqueurs de sénescence avec une augmentation de l'expression de la protéine p16^{Ink4a} ainsi que le nombre de cellules β -galactosidase positives (Polonis et al. 2020).

ii. HIF et inflammation

De nombreuses études montrent l'implication de HIF dans la médiation de l'inflammation (Guo and Chen 2020). En effet, le facteur de transcription NF- κ B, protéine clé dans l'induction des voies inflammatoires (Hayden and Ghosh 2004) peut également réguler à la hausse HIF-1 α (BelAiba et al. 2007). Des études *in vitro*, de culture cellulaire HEK293 et de cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires, montrent que la transfection de NF- κ B induit une augmentation de l'expression de l'ARNm et de la protéine HIF-1 α (BelAiba et al. 2007; Bonello et al. 2007; Görlach and Bonello 2008). De plus, une étude récente a montré une augmentation de l'expression du facteur HIF-1 α chez des patients infectés par le COVID-19, de manière intéressante ceci est associé à une forte augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (Tian et al. 2021). Cette étude conclue également sur le rôle majeur du facteur HIF-1 α dans la mise en place et l'installation d'un profil pro-inflammatoire chez ces patients (Tian et al. 2021). Une autre étude s'intéressant à la place de HIF-1 α et de l'inflammation dans la polyarthrite rhumatoïde montre que HIF-1 α augmente l'expression de TLR-4 dans les macrophages, activant ainsi l'inflammation. HIF-1 α induit également la libération de TNF- α . Par la suite la production de ces facteurs pro-inflammatoires médiée par HIF-1 α va conduire à une augmentation de la sévérité de cette pathologie (Guo and Chen 2020).

iii. HIF et stress du RE

La maturation des protéines est initiée par des modifications post-traductionnelle dans le RE, conduisant au bon repliement/isomérisation des protéines. Il a été montré que cette étape dépend de l'oxygène (Koritzinsky et al. 2013). Ainsi, dans des conditions hypoxiques, il y a une accumulation de protéines mal repliée dans le RE, ce qui déclenche l'UPR reflétant un stress du RE. De nombreuses études montre que l'hypoxie chronique peut favoriser le stress du RE dans divers organes (Yang et al. 2014; Lõpez-Hernández et al. 2015). De plus, une étude menée au sein de notre laboratoire montre que des rats ou des CEA II de rat exposés à de l'hypoxie chronique induit le facteur HIF-1 α mais également des facteurs de transcription des voies de l'UPR indiquant que l'hypoxie et HIF-1 α peuvent déclencher le stress du RE et l'apoptose médiée par CHOP dans les CEA (Delbrel et al. 2019). En conclusion, l'ensemble de ces évènements moléculaires communs dans les mécanismes de la fibrogénèse amène à questionner la place que peut représenter l'HIC sur la fibrose pulmonaire idiopathique.

Hypothèses & objectifs

Dans certaines formes de pathologies pulmonaires interstitielles telles que la fibrose pulmonaire idiopathique, on observe une atteinte des régulations ventilatoires caractérisée par une faible valeur de la capacité vitale forcée associée avec une augmentation de la fréquence respiratoire et une diminution du volume courant (Javaheri and Sicilian 1992), ainsi qu'une dyspnée et surtout des modifications de réponse à l'hypoxie et à l'hypercapnie. A ce jour, l'origine des altérations de la ventilation et de ces régulations n'est pas clairement identifiée. Une partie de ces anomalies respiratoires pourraient être liée à l'augmentation de la rigidité pulmonaire rencontrée dans la fibrose pulmonaire. Néanmoins, cette rigidité peut également avoir un effet sur le fonctionnement du réseau neuronal respiratoire ce qui pourrait à terme, renforcer ou accentuer ces altérations ventilatoires.

Parallèlement à ceci, plusieurs études montrent la présence de syndrome d'apnée-hypopnée obstructives du sommeil (SAHOS) chez les patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique (Lancaster et al. 2009b; Gusbin et al. 2013; Gille et al. 2017). Or, de nombreuses études montrent que les épisodes d'hypoxie-réoxygénation reproduits *in vivo* par exposition à de l'HIC induit une modification de la chémosensibilité centrale et/ou périphérique mais également la mise en place d'une neuroplasticité (Powell et al. 1998; Feldman et al. 2003). Par ailleurs, des études réalisées *in vivo* ont montré que l'exposition des animaux de l'HIC aggravait la fibrose pulmonaire (Gille et al. 2018; KANG et al. 2018).

Partant de ce constat, notre hypothèse est que la fibrose et/ou l'HIC pourrait induire des phénomènes de neuroplasticité responsables des anomalies ventilatoires observées.

Ainsi, notre objectif est de mettre en évidence/identifier les conséquences d'une atteinte pulmonaire sur la CCR et l'impact de l'exposition à l'HIC dans ce contexte.

Résultats

Dans cette partie, nous présenterons les résultats obtenus au cours de ma thèse afin de comprendre quels sont les effets d'une fibrose pulmonaire sur les paramètres ventilatoires et comment les modifications pulmonaires induites par la fibrose peuvent influencer le réseau respiratoire, associées ou non à un contexte de syndrome d'apnée-hypopnées obstructives du sommeil.

Partie I : Dans un premier temps, nous avons mis en place et caractérisé un modèle murin de fibrose pulmonaire obtenu par instillations répétées de bléomycine afin de reproduire le plus fidèlement la fibrose pulmonaire idiopathique rencontrée chez les patients. Par la suite, nous avons utilisé ce modèle afin de mimer des exacerbations aiguës de la fibrose pulmonaire telles que rencontrées chez certains patients.

Partie II : Dans un second temps, nous avons étudié l'impact d'une atteinte pulmonaire de type fibrosante sur les différentes structures respiratoires ponto-bulbaires ainsi que les conséquences sur les réponses ventilatoires à l'hypoxie et l'hypercapnie.

Partie III : Dans cette partie avons étudié l'impact d'une exposition longue à de l'HIC au niveau pulmonaire, sur les variables ventilatoires, et également sur la commande centrale respiratoire. Par la suite, nous avons étudié l'impact d'une longue exposition à de l'HIC sur la fibrose pulmonaire et ses répercussions sur la commande centrale respiratoire.

Partie I : Développement d'un modèle murin de fibrose pulmonaire évolutive et persistante

Afin d'étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la fibrogénèse et de tester de nouvelles approches thérapeutiques, nous proposons la mise en place d'un modèle murin de fibrose pulmonaire chronique et évolutive s'inspirant de l'hypothèse pathogénique des agressions répétées de l'épithélium alvéolaire. Ce modèle a pour ambition de nous permettre d'évaluer les mécanismes participant à la persistance de la fibrose pulmonaire et d'élucider l'implication de chacun des acteurs cellulaires et moléculaires dans la fibrogénèse. Par ailleurs, nous proposons également d'utiliser ce modèle pour l'étude des exacerbations aiguës telles que celles pouvant être observées dans le profil évolutif de certains patients. Ces travaux ont conduit à l'obtention de résultats présentés en deux parties sous forme d'un article original en cours d'écriture et de résultats complémentaires.

Chapitre I : Évolution et persistance de la fibrose pulmonaire après une courte exposition à la Bléomycine.

Chapitre II : Utilisation du modèle de fibrose pulmonaire chronique et stable pour l'étude des exacerbations aiguës (Yegen et al., *à soumettre*).

Chapitre I- Évolution et persistance de la fibrose pulmonaire après une courte exposition à la bléomycine

Introduction

La mise au point de notre modèle a fait l'objet de nombreuses lectures sur les différents modèles existants afin de proposer un protocole d'instillations permettant d'obtenir une fibrose homogène et stable. D'après nos recherches, trois à six instillations intra-trachéales de faibles doses de bléomycine espacées de deux semaines devraient permettre le développement d'une fibrose suffisamment prononcée et stable (Redente et al. 2021). Dans un premier temps, nous avons étudié l'impact de trois instillations répétées de BLM sur l'induction d'une fibrose pulmonaire et nous avons évalué la stabilité/évolution de cette fibrose pulmonaire au cours du temps.

Pour cela, des souris mâles de souche C57BL/6 âgées de 8 semaines ont reçu trois instillations intra-trachéales (IT) de bléomycine à 0,8UI/g ou d'un tampon phosphate salin (PBS) espacées de deux semaines. Deux semaines après la dernière instillation, les souris ont été sacrifiées pour constituer le groupe fibrose (BLM 45d) et le groupe contrôle (PBS). Afin d'évaluer la persistance de la fibrose, un groupe fibrose a été prélevé 90 jours après la dernière instillation de bléomycine (BLM 45d + 90d) (Figure 45).

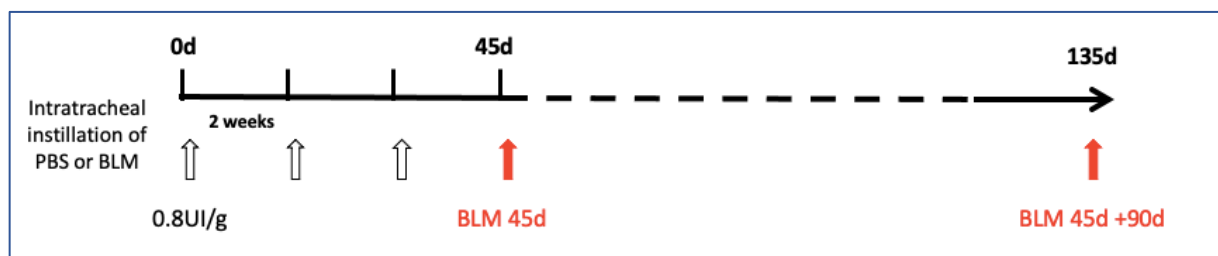


Figure 45: Protocole expérimental. Des souris mâles de souche C57BL6/J âgées de huit semaines ont reçu 3 instillations intratrachéales de bléomycine à 0,8 UI/g ou de PBS espacées de deux semaines. Deux semaines après la dernière instillation, les souris ont été sacrifiées pour former les groupes BLM 45d (n=6) et PBS (n=6), respectivement. Parallèlement, un groupe de souris ayant reçu 3 instillations de BLM à 0,8UI/g a été gardé en vie 90 jours de plus avant d'être sacrifié pour former le groupe BLM 45d + 90d (n=9).

Nota bene: Afin de permettre une meilleure lecture du manuscrit, le matériel et méthode associé à cette partie du travail a été déplacé dans les Annexes.

Résultats

a. Évaluation de la persistance de la fibrose pulmonaire

L'évolution de la fibrose pulmonaire a été évaluée sur des coupes histologiques de biopsies pulmonaires. Une coloration du lobe gauche au rouge Sirius nous a permis d'observer d'une part, l'architecture pulmonaire et l'étendue des lésions et d'autre part, de mettre en évidence et de quantifier les dépôts de collagène de type I et III (Figure 49.A et 49.B). Pour le groupe de souris ayant reçu de la bléomycine (BLM 45d), on observe un remaniement du tissu pulmonaire avec la présence de zones lésionnelles réparties dans l'ensemble du poumon avec une prédominance sous-pleurale. L'analyse des poumons des souris 90 jours après la dernière instillation (BLM 45d + 90d) montre une aggravation de ces lésions, réparties sur l'ensemble de la surface du poumon (Figure 49.A). Dans chaque groupe, l'analyse densitométrique de la coloration rouge nous a permis de quantifier les dépôts de collagène et évaluer la sévérité de la fibrose (Figure 49.B). La quantification du rouge Sirius (Figure 49.C) ne montre pas de différence entre les groupes PBS et BLM 45d alors que 90 jours plus tard (groupe BLM 45d + 90d), la quantité de rouge Sirius est augmentée de manière significative comparé au groupe BLM 45d. Afin d'évaluer la fibrose, la quantité de collagène soluble et insoluble présente dans le lobe inférieur a été quantifiée par la méthode de syrcol modifiée (voir matériel et méthodes en annexe). Ainsi, on observe une quantité de collagène significativement plus importante dans le poumon des souris du groupe BLM 45d comparé aux souris du groupe PBS (Figure 49.D). Nous observons également une augmentation significative de la quantité de collagène au sein du groupe BLM 45d + 90d comparé au groupe BLM 45d (Figure 49.D). L'analyse de la distensibilité pulmonaire (Figure 49.E) montre une diminution significative de la compliance pulmonaire dynamique lorsque les souris sont instillées à la bléomycine (BLM 45d) comparé au groupe instillé au PBS (Figure 49.E). Cependant, celle-ci ne semble pas plus altérée 90 jours après la dernière injection de bléomycine (groupe BLM 45d + 90d) (Figure 49.E).

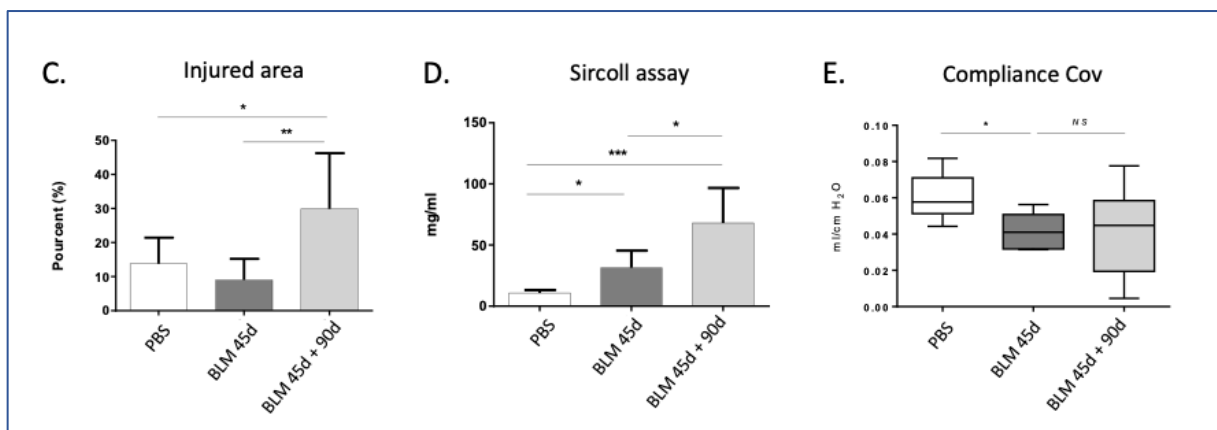
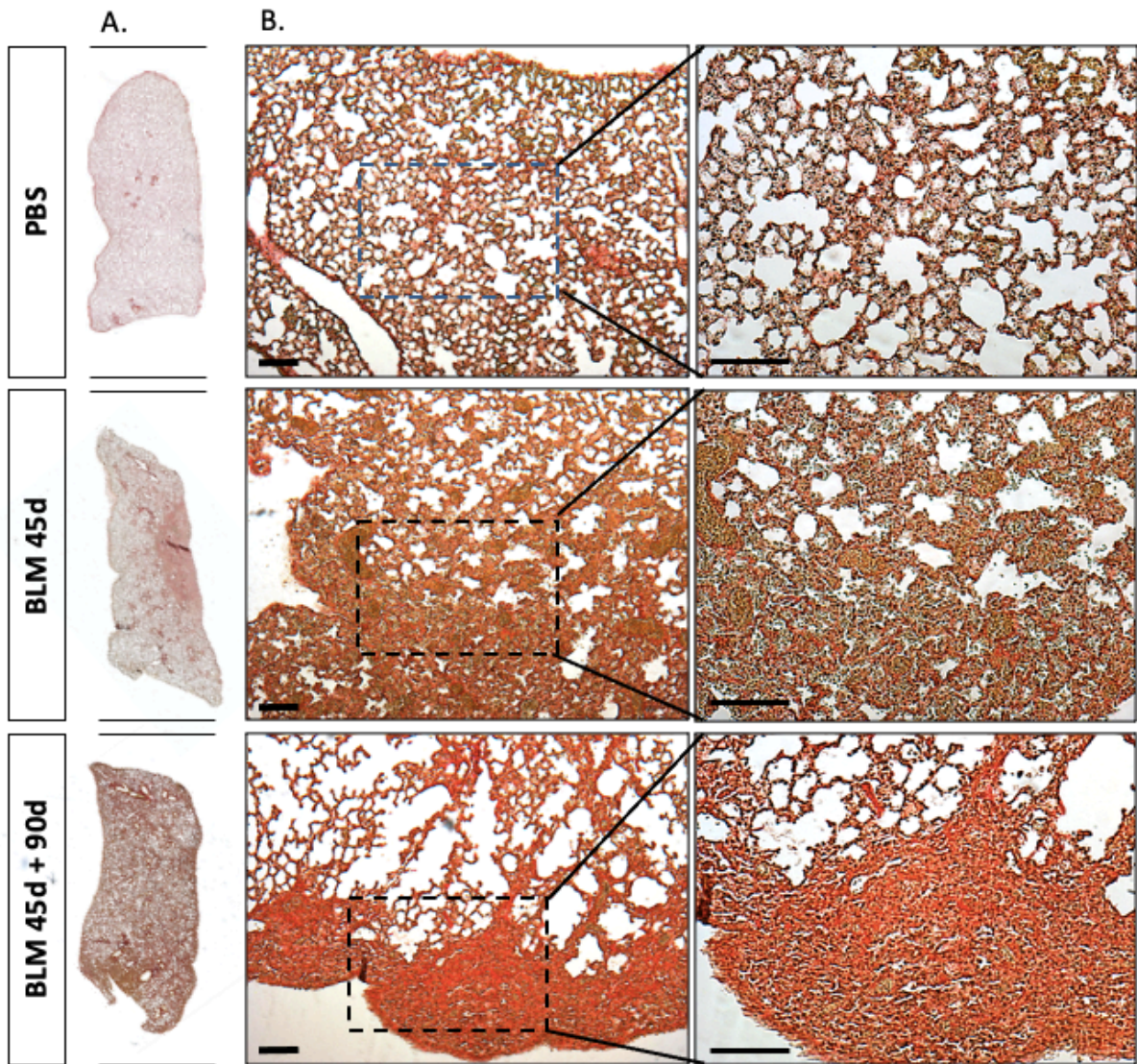


Figure 46: Architecture pulmonaire. A. Cartographies du poumon gauche de souris des groupes PBS, BLM 45d et BLM 45d+90d colorés au rouge Sirius. Une image représentative d'au moins 6 animaux par groupe est représentée. B. Grossissement x100 et x200 (Barre d'échelle=100µm). C. Quantification de l'expression du collagène (coloration rouge). La couleur rouge a été quantifiée à l'aide du logiciel Histolab[®] et rapportée à la surface pulmonaire totale. Toutes les données ont été représentées sous forme de moyenne ± SD, le test de Kruskal-Wallis a été effectué. * p≤0,05 et ** p≤0,001. D. Quantification du collagène soluble total dosé sur le lobe pulmonaire moyen. Les données sont représentées sous forme de moyenne ± SD et soumises au test de Kruskal-Wallis. * p≤0,05 et *** p≤0,0001. E. La compliance pulmonaire dynamique reflétant la distensibilité thoraco-pulmonaire a été mesurée par la méthode de covariance sur des souris anesthésiées et trachéomisées à l'aide d'un pléthysmographe corps entier (Emka[®]). Toutes les valeurs sont représentées en tant que moyenne ± SD et soumises au test de Kruskal-Wallis. * p≤0,05 et ** p≤0,01.

L'expression des gènes codant pour des protéines pro-fibrosantes ont par la suite été analysées par RT-qPCR. L'expression du TGF-β (Figure 50.A), ne montre aucune différence entre le groupe BLM 45d et PBS, cependant, une augmentation non significative entre les groupes BLM 45d et BLM 45d +90d est observée. En revanche, l'expression des gènes codant pour la vimentine (Figure 50.B) et la serpine (Figure 50.C) ne montre aucune différence entre le groupe BLM 45d et le groupe PBS ni entre le groupe BLM45d + 90d et le groupe BLM 45d.

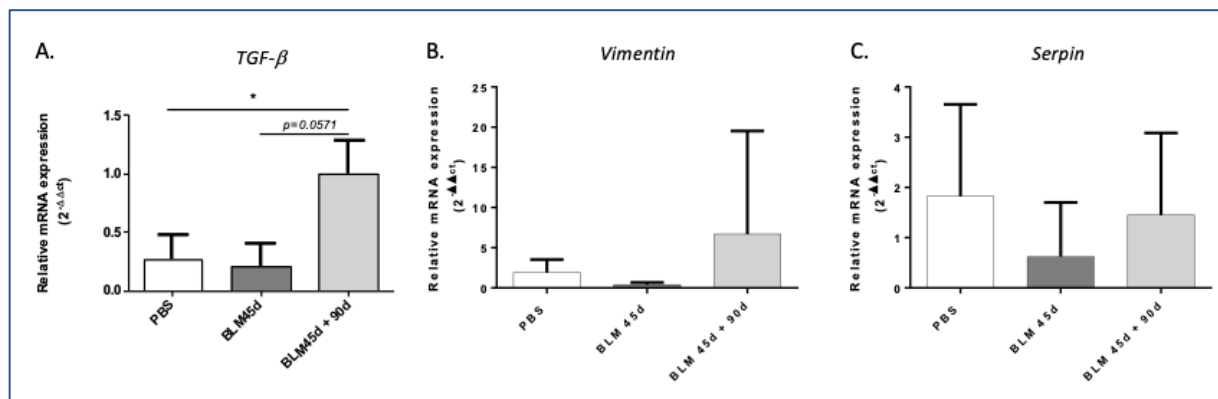


Figure 47: Expression des gènes codant pour des protéines pro-fibrosants. Quantification par RT-qPCR des gènes codants pour les protéines pro-fibrosants TGF-β (A), Vimentine (B) et Serpine 1 (C) dans l'homogénat pulmonaire total des souris du groupe PBS (n=6), BLM 45d (n=6) et du groupe BLM 45d+90d (n=9). Les données sont représentées en tant que moyenne ± SD et soumises au test de Kruskal-Wallis, * p≤0,05.

b. La population cellulaire rencontrée au sein des poumons évolue au cours du temps

Des marquages immunohistochimiques ont été réalisés pour analyser les populations de cellules inflammatoires présentes au sein du tissu fibreux et en dehors des zones de fibrose (Fig 4). L'immunomarquage des macrophages par le F4-80 (Figure 51.A) montre un signal important dans le groupe BLM 45d au sein des zones de fibrose mais également dans les zones éloignées de la fibrose comparé au groupe PBS (Figure 51.A). L'analyse des poumons des

souris BLM 45d + 90d ne présente pas de différence de marquage pour le F4-80 dans les zones de fibrose ni les zones dites « saines » comparées au groupe BLM 45d (Figure 51.A). Un immunomarquage au CD206 a par la suite été réalisé afin d'identifier les macrophages présentant un phénotype de type M2 (Figure 51.B). L'analyse immunohistochimique montre un marquage plus important au sein du groupe BLM 45d + 90d comparé au groupe BLM 45d (Figure 51.B). L'immunomarquage des LT par le CD3 (Figure 51.C) montre un marquage plus important au sein du groupe BLM 45d dans les zones de fibrose et hors fibrose comparée au groupe PBS (Figure 51.C). Aucune différence n'est observée entre le groupe BLM 45d + 90d et le groupe BLM 45d (Figure 51.C). L'analyse des LB par le CD19 (Figure 51.D) montre un marquage au niveau des zones proches et loin de la fibrose (Figure 51.D) pour le groupe BLM 45d, ce marquage est plus important dans les zones de fibrose pour le groupe BLM 45d + 90d. (Figure 51.D).

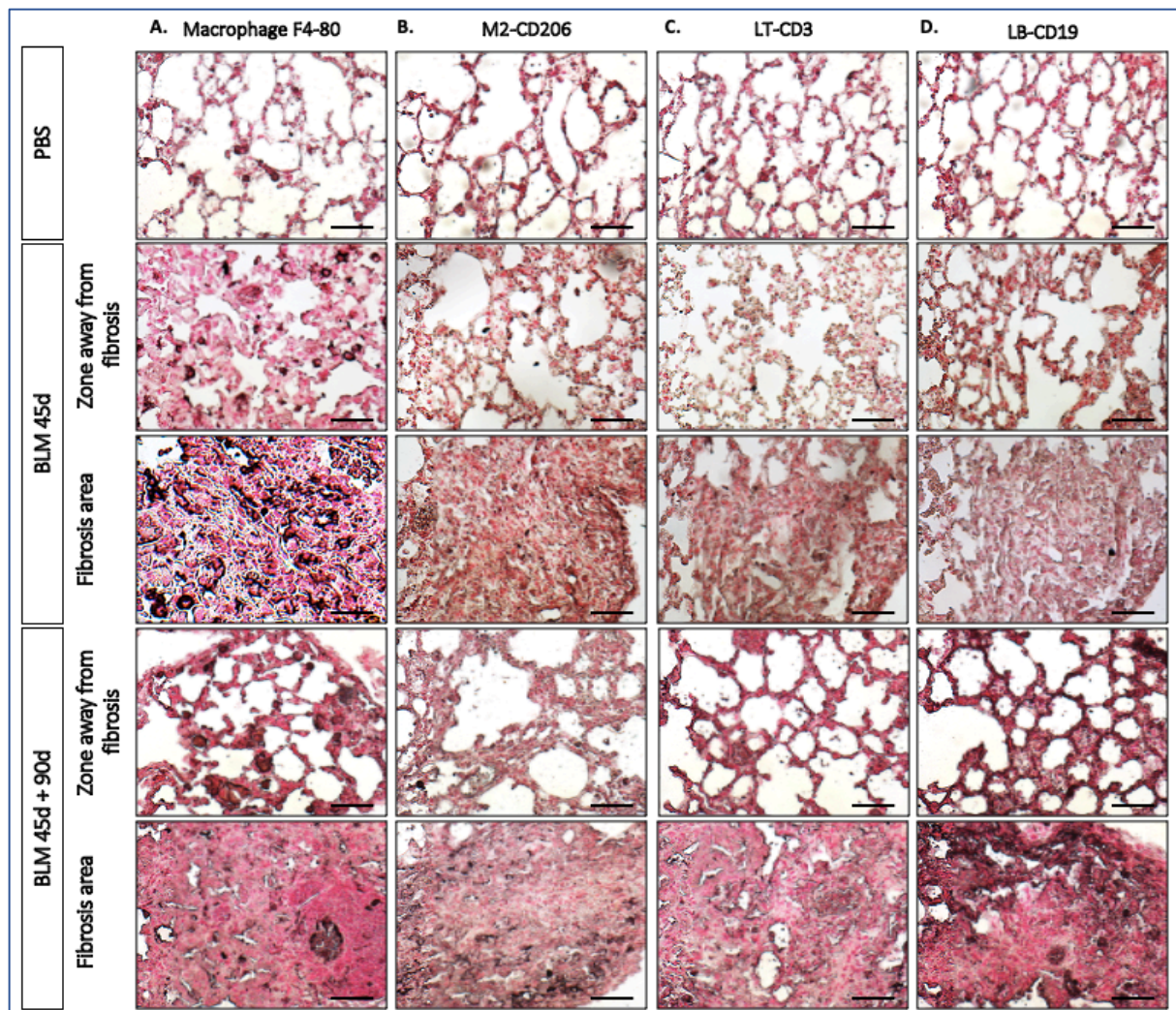


Figure 48: Recherche des types de cellules immunitaires présentes au niveau pulmonaire. Photographies des immunohistochimies réalisées sur des sections pulmonaires de 5µm d'épaisseur pour les protéines F4-80 (A), CD206 (B) CD3 (C) et CD19 (D) pour les groupes PBS (n=6), BLM 45d (n=6) et le groupe BLM 45d+90d (n=9). La zone de fibrose et les zones à distance de cette zone ont été représentées pour chaque groupe. (Grossissement x400, barre d'échelle=50µm). Une image représentative d'au moins 6 groupes d'animaux a été montrée.

Conclusion

Nos résultats montrent l'installation d'une fibrose pulmonaire dès trois instillations intratrachéale de BLM. Cette fibrose est persistante et évolutive au moins jusqu'à trois mois après la dernière instillation. Nous observons également une modification de la population cellulaire inflammatoire retrouvée dans les zones de fibrose chez les souris sacrifiées deux semaines et trois mois après la troisième instillation de BLM.

Chapitre II- Utilisation du modèle de fibrose chronique et stable pour l'étude des exacerbations aiguës.

Introduction

Dans cette seconde partie des résultats, nous souhaitons comparer la sévérité de la fibrose induite après 3 et 6 instillations de bléomycine ainsi que ses caractéristiques moléculaires. Dans cette partie des résultats nous présenterons les caractéristiques histologiques, cellulaires et moléculaires de ces deux propositions de modèles d'étude de la fibrose pulmonaire. Nous présenterons également l'utilisation de ce modèle pour l'étude des exacerbations aiguës (EAs) observées chez certains patients atteints de FPI et son impact au niveau pulmonaire.

Résultats

Les résultats de ce chapitre font l'objet d'un manuscrit à soumettre prochainement

Histopathology and molecular characterisation of a model designed in mice for the study of chronic pulmonary fibrosis and acute exacerbation

Authors' names and affiliation:

Yegen CH¹, Haine L¹, Da Costa Ferreira K¹, Marchant D¹, Bernaudin JF^{1,2,3}, Planes C^{1,3}, Voituron

N^{1-4*}, Boncoeur E^{1*}

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

² Faculté de médecine, Sorbonne Université Paris France

³ Service de Physiologie et d'explorations fonctionnelles, Hôpital Avicenne, APHP, Hôpitaux de Paris, France

⁴ Département STAPS, Université Sorbonne Paris-Nord, Bobigny, France

* Equally contributed to the work

Keywords: Animal model, lung fibrosis, inflammation, apoptosis, oxidative stress, senescence, acute exacerbation

Corresponding author : Pr Emilie Boncoeur (emilie.boncoeur@univ-paris13.fr), Université Sorbonne Paris-Nord, UFR SMBH, Laboratoire "Hypoxie & Poumon", UMR INSERM U1272, 93017 Bobigny, France.

Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) is the most severe form of chronic Interstitial Lung Disease (ILD), mainly observed in the elderly, and characterized by progressive respiratory distress leading to a fatal issue 2 to 4 years after diagnosis. IPF is defined by a histological pattern of Usual Interstitial Pneumonia (UIP) (G et al., 2011). The main UIP feature is a subpleural heterogeneous pulmonary lobules remodeling with presence of fibroblast foci adjacent to hyperplastic epithelial cells and dense scar tissue adjoining normal lung tissue. A cystic honeycomb-like end-stage remodeling and traction bronchiectasis are observed in all patients with an UIP pattern, which increase the disease progression (G et al., 2011). An additional lymphocytic-macrophagic diffuse interstitial inflammation can also be observed. The commonly accepted hypothesis concerning the pathophysiology of IPF is an improper healing of the lung alveolar epithelium after repetitive micro-injuries. IPF is characterized by inefficient repair and uncontrolled activation and proliferation of alveolar epithelium as a result of a set of dysregulated processes such as apoptosis, senescence, epithelial to mesenchymal transition (EMT), induced partly by excessive endoplasmic reticulum stress and oxidative stress, as well as a genetic predisposition (Ptasinski et al., 2021) and overall, an epithelial reprogramming

IPF natural history is heterogeneous, and its evolution remains unpredictable. While most patients present a progressive decline of respiratory function over years, some patients remains stable but others present a fast deterioration of pulmonary function and respiratory failure without any identifiable cause such as infection, pulmonary embolism or heart failure (Maher et al., 2015). In order to identify and describe this sudden and rapid respiratory distress occurring in stable asymptomatic patients, the term of acute exacerbation (AE) has been assigned (Kishaba, 2019). Acute exacerbation in IPF (AE-IPF) cannot be predicted or prevented and the prognosis is usually poor. Unfortunately, for 80% of patients, AE-IPF results in premature death within the year. Current criteria for AE-IPF recognition include previous or concurrent diagnosis of IPF, unexplained worsening or development of dyspnea, with additional radiological patterns superimposed on the underlying UIP pattern. Exclusion criteria are evidence of pulmonary infection, left heart failure, pulmonary embolism and identifiable cause of acute lung injury (Collard et al., 2007). Histopathology of acute exacerbation is characterized by a combination of underlying UIP pattern associated with

superimposed acute lung injury with diffuse alveolar damage and organizing pneumonia (Churg et al., 2011).

The molecular mechanisms involved in acute injury observed during exacerbation phases are poorly known. However, abnormal high expression of several biological markers was identified, such as the Type2 alveolar epithelial cell injury proliferation markers KL6, surfactant protein D or plasminogen activator inhibitor (PAI-1) (Collard et al., 2010). Moreover AE-IPF seems to be supported by acute immunologic regulation involving annexin 1 (Kurosu et al., 2008) and an increase in the collagen-specific molecular chaperone HSP47 (Kakugawa et al., 2013).

For several years, pulmonary fibrosis models were developed to achieve a better understanding of the mechanisms contributing to the alveolar epithelial cell (AEC) damage observed in IPF (Tashiro et al., 2017). The most studied/used and characterized model of pulmonary fibrosis is obtained by a single intratracheal instillation (IT) of a least 2UI/g of bleomycin in mice (Liu et al., 2017, Tashiro et al., 2017). This mice model enabled major advances in understanding fibrotic lung remodeling, documenting the involvement of each lung cell type in the pathophysiology of the disease (Aran et al., 2019), or testing treatments to cure IPF (Jenkins et al., 2017). To briefly describe this model, IT instillations of BLM induce lung inflammation, with, and evidence of altered type II alveolar epithelial cells (AECII). Tissue lesions initially localized in the peribronchial area rapidly spread into the distal lung and an intra-alveolar edema is observed. Fourteen days later, extensive interstitial collagen deposition is observed, along with lymphoid islets and persistent inflammation (Liu et al., 2017). After 21 days, the inflammatory response declines and a significant fibrosis localized in the sub-pleural area is observed. On the 28th day, this fibrosis appears to resolve highlighting an important time point in the pathophysiology of the disease (Chung et al., 2003). However, this model has some limitations. Indeed, a single intratracheal administration of bleomycin usually have a heterogeneous pulmonary lung distribution, which does not reproduce all the UIP histological features (Borzone et al., 2001). Furthermore, in mice who survive, a resorption of the pulmonary fibrosis was observed (Chung et al., 2003). Moreover, this model fails to reproduce the natural course of the disease or the impact of external events on its progression such as acute exacerbation phases.

Based on the IPF pathogenic hypothesis of repetitive micro-injuries, the generation of a new model of pulmonary fibrosis more relevant to the progression of the disease emerged, in which mice receive repeated IT instillations of low doses of bleomycin (Degryse et al., 2010; Redente et al., 2021). Using such a model seems to be promising to understand, anticipate and characterized the exacerbation phases observed in IPF. However, in these studies, few molecular investigations have already been done.

Our study was designed to further our understanding at the histological and molecular level of a chronic lung fibrosis model induced by repetitive IT low doses bleomycin instillation. In addition, this model is aimed to induce AE when fibrosis is well established by increasing the subsequent instilled bleomycin dose. In this report we document the impact of 45- day and 90-day challenges with 3 or 6 IT bleomycin instillations respectively, on lung histology, cell apoptosis, oxidative stress and cell senescence. Moreover, we describe the architectural, histological and molecular changes associated with the acute respiratory distress modeling AE-IPF in patients.

Materials and methods

Ethical Approval: All experiments and methods were performed in accordance with relevant guidelines and regulations. Mice models of pulmonary fibrosis and experimental procedures were approved by the ethical committee (APAFIS #18309-2019010316127879 v16) and done in accordance with with European community's council directive 2010/63/EU for animal care.

Animals: Experiments were performed on 8 -weeks old C57BL/6, male mice (n=31 at the beginning of the experiment) weighing an average of $25\text{g} \pm 2\text{g}$ (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France). All Animals were acclimatized for at least 5 days to the local animal facility and 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 to water and food.

Lung fibrosis induction:

Lung fibrosis was induced by intra-tracheal (IT) instillation of 0,8 UI/g body weight BLM (Sigma-Merck, European Pharmacopoeia) in 100 µl phosphate buffer saline (PBS) every two weeks. Animals were anesthetized with 4% isoflurane delivered to an inhalation chamber and then suspended by their incisors, front teeth on a slanted support; anesthesia is maintained by inhalation with 2% isoflurane through a mask. The tongue was pushed-back and held with forceps; the fluid was placed on the distal part of the oropharynx after the vocal cords with a 20G angiocatheter (BD Insyte, Sandy, Utah). The mice were monitored in cages until they had fully recovered. All mice were weighed daily.

Experimental design:

The mice were randomly divided into 4 groups. The first group of 6 mice received 6 injections of Phosphate Buffer Saline (group PBS), the second one (6 mice) received 3 injections of 0,8 UI/g body weight of BLM (BLM, Sigma-Merck, European Pharmacopoeia) in 100 µl PBS (group BLM45), the third group (6 mice) received 6 injections of 0,8 UI/g body weight BLM in 100 µl PBS (group BLM90) and the fourth group (7 mice) received 4 injections of 0,8 UI/g body weight in 100 µl PBS and the last instillation was performed with 1,6UI/g body weight BLM in 100 µl PBS to create acute exacerbation (group BLM-AE) (Figure 1).

Lung compliance measurement by plethysmography: The pulmonary compliance was evaluated using plethysmograph (Emka technologies). Briefly, mice were sedated (ketamine / xylazine I.P. injection; 100 mg/kg and 20 mg/kg respectively), tracheotomised and ventilated (RoVent Jr., Kent Scientific Corporation; respiratory frequency = 150 bpm, Tidal Volume = 0.27 ml; Insp/Exp ratio = 0.40). A differential pressure transducer is used to obtain a flow signal which reflects the expansion and contraction of the thorax during each ventilation cycle. Compliance and resistance were calculated following flow signal and pressure signals acquisition. Volume signal was obtained by an integration of the flow signal measured by the differential pressure transducer. The pneumotachograph being the only way for air to flow into and out of the chamber, the difference of pressure between inside and outside was proportional to this flow.

Lung sampling for analyses: At the end of the experiment, two weeks after the last instillation, the mice were anesthetized by intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (Fort Dodge Animal Health, at 100 mg / kg) and xylazine (Phoenix Scientific, Inc., St. Joseph, MO, at 20 mg / kg) followed by exsanguination. Injecting PBS into the right ventricle of the heart rinsed the lungs. The right lobe of the lung was isolated through a ligation to prevent the passage of instilled products. The left lobe was inflated and fixed with 4% paraformaldehyde at a pressure of 20 cm H₂O through the cannula. The heart and lungs were removed "en bloc". The right lung was placed in liquid nitrogen and stored at -80 ° C for molecular analyses (RNA and proteins). The left lung was placed in 20 ml of 4% PFA for 24 hours. The next day, the left lungs were placed in cassettes and dehydrated in increasing concentrations of ethanol before paraffin embedded. Sections were cut at 5µm thickness for histology. All slides were observed and described blindly

Left lung optic microscopy analyses:

Hematoxylin-eosin staining: The left lung embedded in paraffin was cut into 5 µm sections for optic microscopy. After a xylene dewaxing step (Carlo Erba, 392602), the tissue was rehydrated by successive decreasing ethanol baths (absolute ethanol: VWR, 20820362), the nuclei were stained in purple with Harris hematoxylin (Sigma, MHS16) and cytoplasm as well

as basic intracellular cellular elements are stained in pink / red by aqueous eosin (Merck, Art.1144). Subsequently, the lungs were dehydrated, mounted and observed under an optic microscope. The extent of lung injury was estimated by the quantification of tissue optic density using HistoLab® Image Analysis Software. The normally aerated alveolar spaces area was calculated as well as the total area of the examined left lung section. Subsequently, the area occupied by the injured tissue was deduced and reported as the percentage of the total lung section.

Masson's Trichrome staining: Additional 5 µm sections were incubated with phosphomolybdic/phosphotungstic acid solution (5 min), stained with aniline blue solution ((VWR International, Rosny-sous-Bois 34015.182, 5 min)), 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.

Sirius red/fast green staining: Additional 5 µm paraffin sections of the left lung were used. After paraffin removal with xylene (Carlo Erba, 392602), the tissue was re-hydrated by successive baths of decreasing ethanol (absolute ethanol: VWR, 20820362), the alveolar epithelium was counterstained with 0.1% Fast Green (Merck, F7252) and type 1 and 3 collagen fibers were stained with 0.1% Picro Sirius Red (VWR, ref K640745). Subsequently, the sections were dehydrated, mounted and observed under the optic microscope. A modified Ashcroft score was used to quantify the severity of fibrosis, according to a panel of five histologic patterns ranging from a healthy lung with normal lung without architectural remodeling (score 1) to a fully remodeled lung (score 5) (Ashcroft et al., 1988).

Immunohistochemistry: Antigen retrieval from deparaffinized and rehydrated 5µm sections was performed in a boiling citrate buffer (10mM Sodium Citrate, 0.05% Tween 20, pH 6.0). Endogenous peroxidases were quenched with 3% hydrogen peroxide for 10 minutes and sections incubated with 5% of normal horse serum for 1 hour to block nonspecific antibody binding sites. Sections were incubated with the different primary antibodies overnight at 4° C (for detail see Table 1). The next day, slides were incubated with biotin-conjugated secondary antibodies (Dako REAL™ Detection System, Peroxidase / DAB⁺, Rabbit / Mouse) for 10 minutes

and then with peroxidase-bound streptavidin (HRP) for 10 minutes. DAB (3,3'-diaminobenzidine) solution and Nuclear fast red (Sigma Aldrich, ref 60700) staining were used to visualize the positive reactions.

TUNEL staining Detection and quantification of apoptosis by TUNEL staining was performed using a ROCHE in situ cell death detection kit (number #11684795910). After dewaxing, tissues were rehydrated and permeabilized with proteinase K. A positive control was performed using DNase I. The labeling protocol was performed according to the manufacturer's instructions. Slides were mounted with Vectashield Antifade mounting medium with DAPI (Vector number H-1200, UK).

Right lung biochemical and molecular biology analyses

Soluble lung collagen: The amount of soluble pulmonary collagen, comprising the collagen released after enzymatic digestion with pepsin, was measured using the Sircol test (Biocolor Ltd., Belfast, UK) according to the manufacturer's instructions.

Caspase 3/7 activities. Their evaluation was done in total lung extract by addition of a luminogenic caspase-3/7 substrate (Caspase-Glo 3/7, Promega), which was cleaved in apoptotic cells to produce a luminescent signal. The assay was performed on 5µg of total protein extract. Luminescence was measured with a plate reader (Bio-TEK®).

Oxidative DNA damage it was assessed in 40 µg of protein extracted from total right lung homogenates by determination of 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OH-dG) concentration by ELISA method according to the manufacturer's instructions (Oxiselect™, Cell Biolabs Inc, San Diego, CA).

Western blots: The whole proteins were extracted from frozen lung samples in RIPA lysis buffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholate and protease inhibitors) at pH 8. Cellular membranes were cleared by centrifugation at 15,000 rpm for 10 min at 4°C and supernatants were aliquoted and immediately frozen before use. For Western blotting, 40 µg of protein extract were separated by SDS-PAGE and transferred to a 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) skim milk powder and incubated with primary antibodies overnight at 4°C (Table 1). The next day, 3 washes with TBST are performed and the blots were incubated for 1 hour with secondary antibodies. Immunoreactive bands were revealed with the West kit (Thermo Scientific), using an image capture system (ChemiDoc MP, Bio-Rad). The individual bands were quantified with Image Lab software (Bio-Rad), protein levels were normalized to their respective internal β -actin control.

ELISA: Inflammatory Interleukin (IL-6, CXCL1 / KC) and Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) concentration were assessed on 50 μ g of total protein extracts according the manufacturer's instructions (Mouse IL-6 DuoSet ELISA DY406-05, Mouse CXCL1 / KC DuoSet ELISA DY453-05 and Mouse TNF- α DuoSet ELISA MTA00B, R&D System). The absorbance was measured at 450nm with BIO-RAD, Model 680 Microplate Reader.

Reverse transcription - quantitative polymerase chain reaction (RT - qPCR): 30mg of lung tissue were placed in 800 μ l of TRIzol reagent (Qiazol® Lysis reagent) and homogenized on ice using an Ultra-Turrax homogenizer. RNA extraction was performed following the manufacturer's instructions. Total RNA was quantified by measuring the absorbance at 260 nm, using a reader Nanodrop (Nanospec, BioSpecNano software). Extraction quality and the purity of the RNA (260nm) were evaluated using 260nm / 280nm and 260nm / 230nm ratios. Single-strand cDNAs were synthesized from 0.5 μ g of total RNA according to the manufacturer instructions (Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit Reaction Mix, ThermoFisher scientific, Illkirch, France).

Resulting cDNA samples were 1:10 diluted and amplified by PCR conducted 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 ribosomal 18S sub-unit. Relative quantification was performed using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (AB Applied Bio Systems, Step One Plus Real Time PCR). Primer sequences used for quantitative real-time PCR are listed in Table 2.

Statistics: Graph and statistical analyses were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, version 9) Data are presented as the mean \pm SD. Comparisons among groups were assessed using Mann Whitney. $p < 0.05$ differences were considered significant.

Table 1: Antibodies used for Western Blot analysis.

Antibody	References	Host	Antibody type	Dilution
p16 ^{INK4}	Sc-1661, Santa Cruz Biotechnology	Mouse	Monoclonal	1 : 500
p- γ H ₂ AX	05-6369-1, Merck	Mouse	Monoclonal	1 : 500
ATF4	NBP2-67766	Rabbit	Monoclonal	1 : 200
NRF2	Sc-722	Rabbit	Polyclonal	1 : 600
β -actin	A5316, Sigma	Mouse	Monoclonal	1 : 3000

Table 2: Antibodies used for Immunohistochemistry.

Antibody	References	Host	Antibody type	Dilution
F4-80	D259R, Cell Signaling Technology	Rabbit	Monoclonal	1 : 250
CD3	D4V8L, Cell Signaling Technology	Rabbit	Monoclonal	1 : 200
CD19	D4V4L, Cell Signaling Technology	Rabbit	Monoclonal	1 : 800
HIF-1 α	NB100-479, Novus Biological	Rabbit	Polyclonal	1 : 750

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

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
<i>CXCL1</i>	5'- GCA-CAC-TCA-AGA-ATG-GTC-GC-3'	5'-GGG-GAC-ACC-CTT-TAG-CAT-CT -3'
<i>BNIP3</i>	5'TTT-GGG-ATC-TAC-ATT-GGA-AGG-C -3'	5'-GTG-CAG-ACA-CCC-AAG-GAT-CA -3'
<i>Serpin</i>	5'- GCA-CAA-CCC-GAC-AGA-GAC-AA-3'	5'- ATG-AAG-GCG-TCT-CTT-CCC-AC-3'
<i>18S</i>	5'- GTA-AGT-GCG-GGC-CAT-AAG-CTT-3'	5'-AGT-CAA-GTT-CGA-CCG-TCT-TCT-CA-3'

Results

Acute injury by high dose bleomycin instillation increases lung remodeling and worsens fibrosis area

A < 20% mortality was observed in the BLM groups in the entire protocol. A first death was observed after the third BLM instillation at 30 days, and no more death was observed after the 4th injection at day 45 (Figure 1B). In the BLM groups, a significant defect in the expected physiological weight gain was observed immediately after the first instillation as compared to PBS instilled mice (Figure 1C). After the 4th injection at day 45, the body weight was stabilized in the BLM-treated groups. Exacerbation induced a significant decrease in the body weight and approximately 40% of mice died (Figure 1B). Interestingly, mice death occurred in parallel with a strong and significant decrease in bodyweight in the BLM-AE group as compared to the BLM90 group.

At the lung level, cartography of Hematoxylin-Eosin (HE) staining showed remarkable modification in lung morphology as compared to PBS (Figure 2A-G). It was more pronounced at 90 days compared to 45 days (Figure 2C-E). Quantification of injured area on HE staining (Figure 2I) confirmed significant higher injured lung areas in the BLM90 group as compared to PBS group, and an increase, while not significant ($p=0,1$), in the BLM-AE group as compared to the BLM90 group. However, a mean modified Aschcroft score of 2,9/5 was obtained after 3 instillations of BLM (BLM45), and a score of 4,5/5 was observed in the BLM90 group with only a slight non-significant increase in the BLM-AE group (4,7/5) as compared to BLM90 (Figure 2J).

Observation of lung sections stained with Sirius red/fast green focused on fibrosis area (Figure 2B., D., F., G) showed an excessive extracellular matrix with compact collagenous deposits associated with air spaces reduction in BLM90 and BLM-AE groups as compared to the BLM45 group. In BLM45 sparse fibrosis with cellular hyperplasia (D) are observed while we show dense lesions with alveolar collapse and collagenous deposits (in red) in BLM 90 and BLM-AE (F, H respectively). A severe interstitial thickening and accentuated alveolar collapse was also observed. The ratio of the red/green staining, which represents the proportion of collagen vs cellular background respectively, confirmed this observation (supplemental data S2). The quantification of total collagen by the Sircol method revealed a significant burst in

collagen synthesis associated with an acute exacerbation on an already chronic lung fibrosis. Indeed, the soluble collagen concentration was doubled in the BLM-AE group as compared to BLM 45 and 90 groups (Figure 2K).

The pulmonary distensibility analysis (Figure 2L) showed a significant reduced compliance in the BLM45 group, worsened in BLM90 group as compared to the PBS group, and that this effect was strengthened in the BLM-AE group.

Acute exacerbation is characterized by additional lesions on the chronic fibrosis pattern

Six IT instillations of low-dose BLM (BM90 group) lead to a significant pulmonary fibrosis mainly localized at the subpleural level (Figure 3A) with cystic cavities (Figure 3B, D, G), airway traction features mimicking of traction bronchiectasis observed in UIP (Figure 3E) compact areas (Figure 3C and 3D) both fibrosing with collagenous and cellular deposits (Figure 3B, D, E, F) associating alveolar cell epithelial hyperplasia (Figure 3F). A marked alveolar collapse (Figure 3 B-G) was a constant feature.

In addition to the pattern observed in the BLM90 group (Figure 3A), exacerbation by a high dose of bleomycin (Figure 3H) induced superadded widespread perivascular cellular foci localized in the vicinity of vessels (I, L, arrow) with a marked diffuse inflammation characterized by inflammatory monocellular component (K.-N.). In denser areas, in addition to inflammatory cells, organized intra-alveolar (Figure 3 N) or interstitial (Figure K, M, N) loose collagenous fibromyxoid scars were observed (J., K., M., N., arrows) as well as at the periphery of these lesions (I., arrows). Such features are suggestive of lesions observed in patients with acute exacerbations of IPF (Churg et al., 2011). Reactive airway epithelial cells were also observed (Figure 3L)

Evolution of lung fibrosis markers

The stress markers classically associated with pulmonary fibrosis *i.e.* apoptosis, oxidative stress and the presence of senescent cells were analyzed 45 days and 90 days after the first IT bleomycin injection, and the impact of AE on these markers was investigated. No TUNEL positive cells were detected in the PBS group (Figure 4C), few positive cells were detected in the BLM45 group (Figure 4F), and an increasing number of positive cells were observed in the BLM90 group (Figure 4I). No evident difference was shown between the BLM90 (Figure 4I) and the BLM-AE group (Figure 4L). Such an effect was also observed through

the cleavage activity of the pro-apoptotic caspase 3/7 (Figure 4M). Caspases activities were significantly induced in the BLM groups (BLM45, BLM90, BLM-AE) as compared to the PBS group and no significant increase was observed in the BLM-AE group as compared to the BLM90 group (Figure 4M).

Induction of oxidative DNA damage (8-OH-dG, Figure 6A) was observed in the BLM90 and BLM-AE groups without differences between these two groups (Figure 5A). In the same way the phosphorylation of γ H₂AX (Figure 5B) was significantly increased in BLM90 group as compared to PBS group and a slight but significant decrease was observed for the BLM-AE group (Figure 5B). In addition, modulation of ATF-4 (Figure 5C) and NRF-2 (Figure 5D) was observed. A significant decrease at 45 days (BLM45) followed by a significant increase at 90 day (BLM90) was observed in ATF4 and NRF2 protein level (Figure 5C and 5D). Interestingly ATF4 levels decreased in the BLM-AE group (Figure 5C).

A relative increase in two markers associated with cell senescence (p16^{INK4} protein, Figure 6A, C, E, G and p21^{WAF1} protein, Figure 6B, D, F, H) was observed. In the BLM45 group, an increased staining in p16^{INK4} expression was observed in the fibrosis area in modified epithelial cells (Figure 6C). This was more pronounced in the BLM90 group (Figure 6E). Expression of p21^{WAF1} was observed in the BLM90 group (Figure 6F), particularly in the fibrosis area. In the BLM-AE group (Figure 6G, H) an increased staining of both p21^{WAF1} (Figure 6H) and p16^{INK4} (Figure 6H) was observed in the fibrosis area.

Inflammation is observed in the acute exacerbation model of pulmonary fibrosis.

Macrophages (Figure 7A, D, G, J) and B (Figure 7B, E, H, K) or T-lymphocytes (Figure 7C, F, I, L) were present within the remodeled interstitium of BLM or BLM-AE groups while not in the PBS group. After BLM instillation a dense infiltrate of F4-80 macrophages is observed in the fibrosis area or in the vicinity of the fibrosis at 45 day (7D), decline at 90 days (7G) and shows an upsurge after exacerbation (BLM-AE, 7J). A similar observation was done for T (Figure 7E, H) and B lymphocytes (Figure 7F, L). However, exacerbation displayed a more important infiltration of B-lymphocytes in the fibrosis area as compared to the other BLM groups (Figure 7I).

Inflammation was further quantified through the expression of pro-inflammatory cytokines within the whole right lung extract. Significant increased levels of KC (Figure 7M)

and TNF- α (Figure 7N) were observed in the BLM45 group as compared to the PBS group. Next, inflammation seemed to be resolved in the BLM90, as a decrease in expression was found to achieve levels measured in the PBS group (Figure 7M and 7N). Interestingly, a significant induction of KC and TNF- α was observed in the BLM-AE group as compared to BLM90 and PBS group reaching the levels of the BLM45 group.

HIF-1 α is associated with the worsening effect of acute injury on lung fibrosis severity.

When reported HIF-1 α staining to the isotype (Figure 8B, D), immunohistochemistry analysis of factor HIF-1 α doesn't showed significant increase in labeling in the BLM90 group (Figure 8C) as compared to the PBS group (Figure 8A).

Interestingly, acute exacerbation induced a strong increase in the expression of HIF-1 α protein in the cytoplasm of AECII (BLM-AE, Figure 8E). Moreover, BLM induced a light increase in *Bnip3* and *Serpin1* mRNA HIF-responsible genes, which was strongly enhanced in the BLM-AE group (Figure 8G and 8H).

Discussion

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a multifactorial lung disease characterized by progressive and irreversible deterioration of lung function (Martinez et al., 2017). In order to understand the physiological and molecular mechanisms involved in the development and maintenance of this disease, murine models of pulmonary fibrosis have been developed. The most widely used murine model consists on a single intra-tracheal instillation of bleomycin at a significant dose ranging from 2 IU/g to 3.5 IU/g. Some of the histopathological and biological hallmarks observed in this murine model are comparable to what was reported in patients with IPF (Borzone et al., 2001; Degryse and Lawson, 2011; Limjunyawong et al., 2014). With the help of these models part of the pathophysiology encountered in this fibrosis-type lung disease has been clarified. Among these, the role of AECs in the aberrant repair of the alveolar epithelium has been well described, in particular the disruption of the dialogue between AECs and underlying fibroblasts but also the role of the different mediators involved in this repair fibroblasts (Zolak and de Andrade, 2012).

However, these models of fibrosis developed in 14 days present many disadvantages. First, they are more representative of an acute damage leading to tissue fibrosis than a progressive interstitial lung disease. Second, as the evolution of the fibrosis is limited, this model contrasts to the known natural chronic and progressive evolution of human IPF (Borzone et al., 2001). Indeed, in these mice models, fibrosis resolves in most of cases, which is at variance with the fatal course of IPF in patients (Moore and Hogaboam, 2008). Therefore, the need to develop a murine model of pulmonary fibrosis presenting more histological and molecular similarities with the IPF disease has emerged. A new stable murine model of lung fibrosis based on repetitive instillation of bleomycin has been developed (Degryse et al., 2010; Redente et al., 2021).

Using a similar model based on repeated micro aggression, we went further in its characterization and use to study acute exacerbation. This model presents a stable pulmonary fibrosis with more uniform distribution of fibrotic lesions, and no reversibility of the lesions observed during the experiments. At 45 days (BLM45), moderate fibrotic changes are clearly observed with a significant collagen deposition but also partially rarefied and enlarged alveolar spaces, with the presence of isolated fibrotic masses in some mice, and quantified by a 2,9/5 mean Ashcroft score. After six IT instillations of BLM, *i.e.* 90 days after the first IT

instillation (BLM90), the stage of fibrosis has evolved with a mean Ashcroft score of 4,5/5. The lungs were severely damaged and the pulmonary architecture altered. The remodeled areas covers more than 50% of the total surface of the lung with confluent fibrotic masses in the subpleural area. At 90 days (BLM90), mice presented an important quantity of soluble collagen, a decrease in the distensibility of the lung, enlarged airspaces surrounded by fibrosis with hyperplastic or bronchiolar-like type epithelium, alveolar collapse with important cystic cavities closed to honeycomb, and epithelial cell apoptosis, as observed in biopsies of IPF patients (Raghu et al., 2018). In addition to IPF-like pattern IHC also revealed a significant presence of macrophages, T and B cells.

To complete the characterization of this model, we present a cellular and molecular analysis of the main features characterizing IPF, and premature aging, *i.e.* apoptosis rate, oxidative stress, DNA damage and cellular senescence (Lehmann et al., 2017; Phan et al., 2021; Selman and Pardo, 2014). Our results demonstrated that 6 instillations of BLM (BLM90) were necessary to ensure the instauration of classical molecular features of IPF (Konigsberg et al., 2021). 90 days and 6 IT instillations of BLM were required to found TUNEL-positive AECs as described in biopsies from IPF patients (King et al., 2011; Selman et al., 2001). Indeed, in the BLM90 group, we noted a major oxidative stress with an increase in DNA oxidation through 8-OH-dG detection as also reported in patients with IPF (Kuwano et al., 2003; Matsuzawa et al., 2015). Next, we showed the modulation of ATF4 and NRF2, two transcription factors which cooperatively work in the redox homeostasis regulation of the cell (Kasai et al., 2020, 2019). Interestingly, in our model, we reported a lower expression of NRF2, as observed in IPF and in bleomycin-induced fibrosis mice model (Ahmad et al., 2020; Artaud-Macari et al., 2013; Walters et al., 2008). Finally, we observed the induction of cell cycle regulators p21^{WAF1} and p16^{INK4} mainly reported in IPF lung biopsies (Álvarez et al., 2017; Disayabutr et al., 2016; Wu et al., 2020) and implicated in cellular senescence and aging .

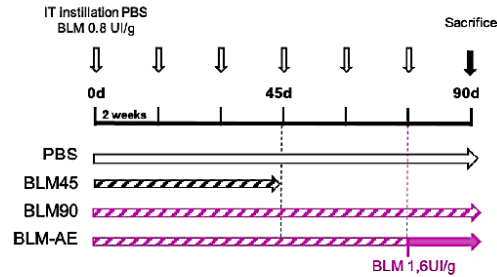
When mice receive a high dose bleomycin challenge to generate AE (BLM-AE), we observed an exacerbation of the main histological and molecular features of lung fibrosis. Histopathology showed superadded inflammatory and organizing pneumonitis features as observed in patients (Kishaba, 2019). Although apoptosis seems to be almost stable, we observed a more compact pulmonary remodeling with an increase in collagen content leading to a decrease in pulmonary compliance. A major observation made was an activated

inflammatory response. Indeed, we observed an increase in pro-inflammatory cytokines KC and TNF- α associated with a higher recruitment of macrophages, T and B lymphocytes in the fibrosis areas. This phenomenon strengthens the insight of our model which is in line with observations made in AE in IPF patients in which an increased level of IL-6 and IL-8 has been reported either in the BAL (Marchioni et al., 2018; Schupp et al., 2015) or in blood (Papisiris et al., 2018).

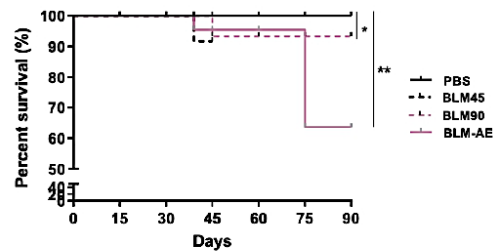
Acute exacerbations of respiratory function in IPF patients leads to episodes of severe acute hypoxemia sharing features similar to acute respiratory distress syndrome (Marchioni et al., 2018). Moreover, acute exposure of alveolar epithelial cells to environmental hypoxia favors the secretion of pro-inflammatory cytokines in the lung by recruitment of macrophages (Chao et al., 2011), and hypoxia has been proposed to explain alveolar epithelial cells deregulation in the pathogenic process of IPF (Burman et al., 2018; Delbrel et al., 2019, 2018; Tzouvelekis et al., 2007). Furthermore, HIF-1 α has been suggested to play a critical role in regulating the inflammatory response as a decrease in the secretion of pro-inflammatory cytokines has been observed in HIF^{-/-} mice (Suresh et al., 2019). Although hypoxemia has not been studied in our model, we could suggest a role for hypoxia in the epithelial response to AE. Indeed, we observed a strong increase in hypoxia-induced transcription factor (HIF) labeling in lung from BLM-AE mice as compared to BLM45 or BLM90 (Table 4). We also observed increased mRNA expression of *Bnip3* and *Serpin1* HIF-dependent genes both strongly implicated either in apoptosis and autophagy (Mellor and Harris, 2007) and fibrosis (Ueno et al., 2011) or in IPF.

In conclusion, our study provides new insights into this progressive and persistent murine model of lung fibrosis for the study of IPF, confirms the clinical relevance of this model presenting many characteristic features observed in IPF patients and the potential use of this model for the study of acute exacerbation in fibrosing interstitial pneumonitis. Furthermore, we proposed that this model could also be used to test the impact of new therapeutic molecules with curative aims or the impact of the environment or comorbidities on the development and evolution of the disease.

A. Experimental Design



B. Survival of Kaplan Meier



C. Body Weight Gain

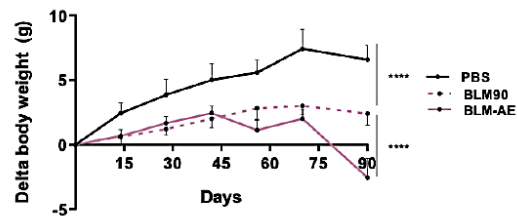


Figure 1: Experimental protocol, survival and weight curves. (A) Eight-week-old C57BL6/J males mice received 3 or 6 intratracheal instillations of bleomycin at 0,8 IU/g or PBS every two weeks to form the BLM45, BLM90 and PBS groups, respectively. At the same time, a group of mice received a dose of BLM at 1,6 IU/g during the last instillation, thus forming the Acute Exacerbation group (BLM-AE). **(B)** Mice survival was recorded every day until the end of the experimental design for the different groups (PBS, n=6; BLM45; n=6; BLM90, n=6; and BLM-AE, n=7) and plotted on a Kaplan-Meier curve. **(C)** Body weight monitoring was established throughout the experiment, the difference in weight compared to the weight measured on day 0 before IT instillations of PBS (n=6), BLM45 (n=6), BLM90 (n=6) and BLM-AE (n=7) groups are reported on a graph. ** p<0,001.

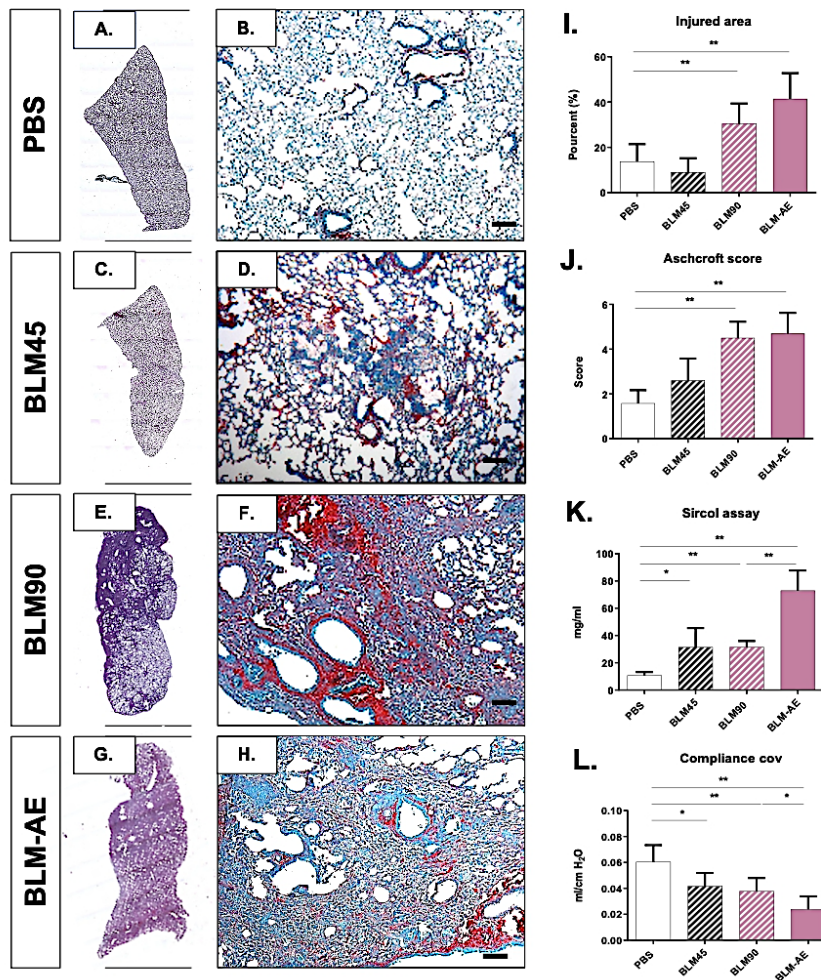


Figure 2: Histological study and analysis of collagen deposits (A., C., E., G.): Representative mapping of hematoxylin and eosin-stained whole lung sections at low magnification from the PBS, BLM45, BLM90 and BLM-AE groups respectively (B.,D.,F.,H.): Representative higher magnification of Sirius red and fast green lung sections from the PBS, BLM45, BLM90 groups (scale bar corresponding to 100µm). (I.); Lung injured area was estimated by quantification of sections density after H&E staining using HistoLab® Image Analysis Software and expressed as the percentage of the total lung section. Injury quantification was normalized to the mean value of control group and presented as a percentage. (J.): Histogram representing the average modified Aschroft's score after analysis of Sirius red/fast green stained sections for the PBS, BLM45, BLM90 and BLM-AE groups (scale bar corresponding to 100µm). (K.) Quantification of total soluble collagen in the right lung middle lobe by the Sircol method. (L.) Lung compliance was measured by plethysmography. Raw data in (I., J., K. L.) were submitted to Mann-Whitney test to compare each group with control group (mean ± SD, control PBS group (n=6) versus BLM45 (n=6), BLM90 (n=6) and BLM-AE (n=7) groups, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 respectively).

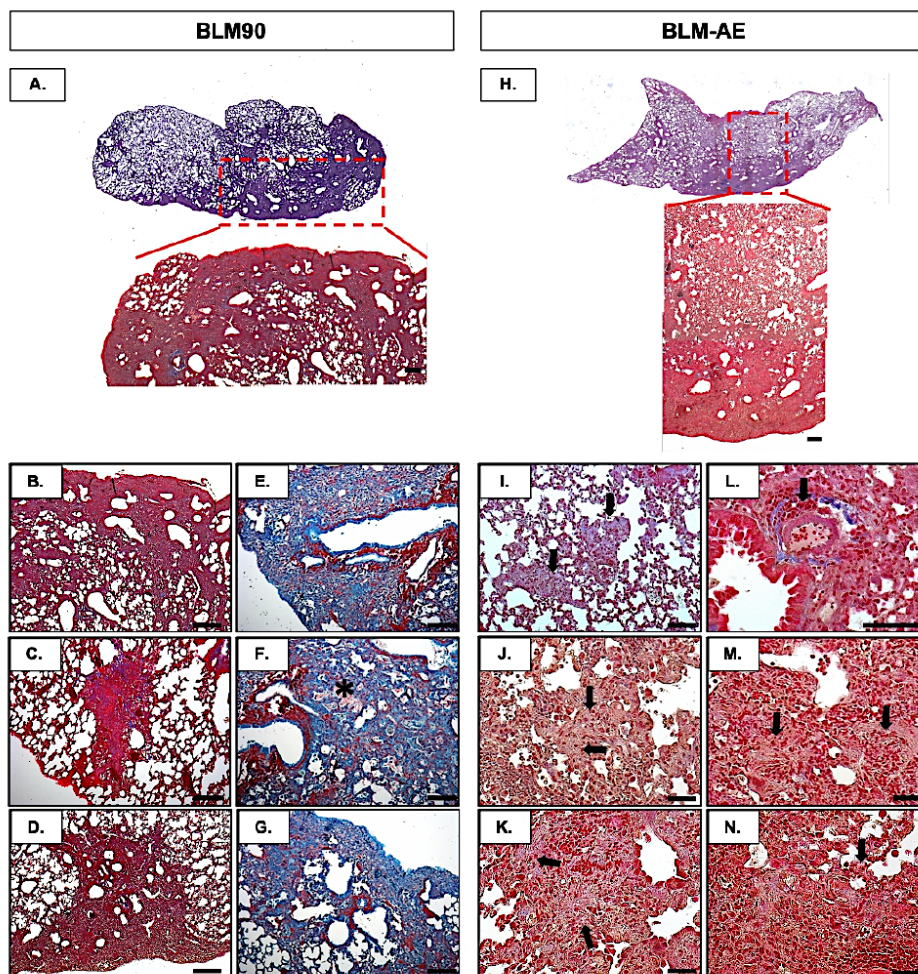


Figure 3: Lung histopathology in the BLM90 and BLM-AE groups. Sections were either HE stained (A., B., D., H., J., M.), or by the Masson's (C., I., K., L.,N.) or Sirius red (E.-G.) methods. (B.-G.) and (I.-N.) except for L scale bars correspond to 100 μ m. (A.,H.) low magnification showing the preferential subpleural location with depth extent of the diseased areas in both groups. (B.-G.) Illustrations of pathological features observed in the BLM 90 group with subpleural cystic (B.,D.,G.) or central (C.) fibrosis with airway traction (E.) associated with epithelial hyperplasia (F., asterisk). (I.-N.) Illustrations of the super added cellular and inflammatory interstitial focal lesions observed in the BLM-AE group compared to BLM90 mice. Connective tissue deposits were pointed out by arrows.

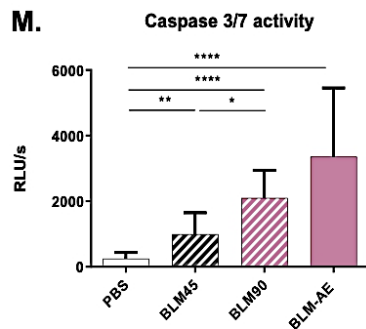
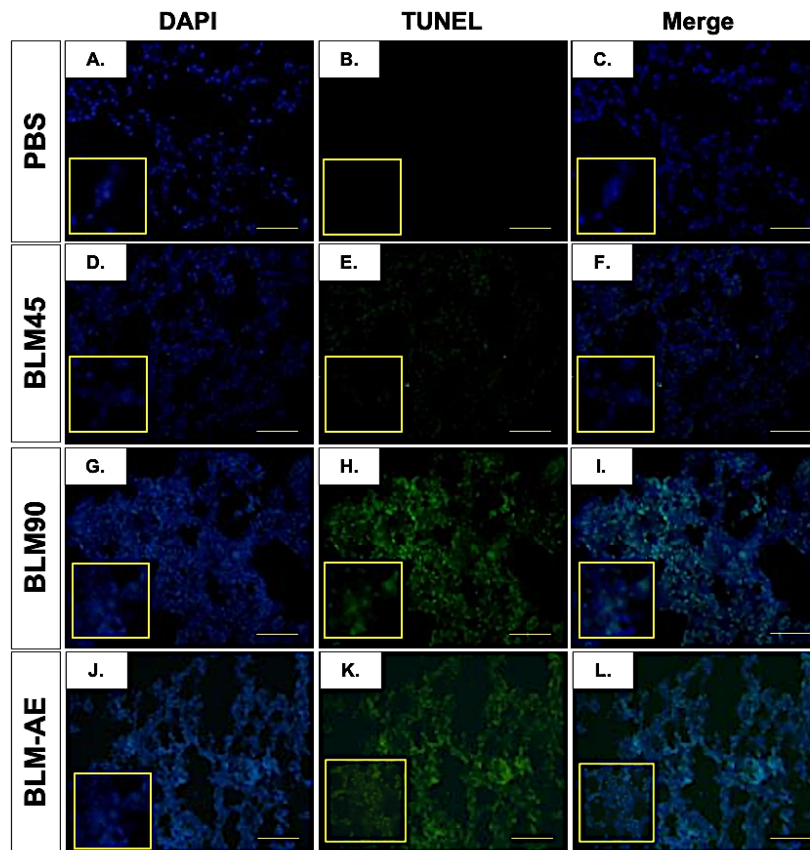


Figure 4: Measurement of apoptosis. (A.-L.) Evaluation of DNA breaks by the TUNEL technique. A representative image of at least n=3 mice from the PBS, BLM45, BLM90 and BLM-AE group is shown. Nuclei were labeled with DAPI (blue) (A., D., G., J.), 3'OH extremities were labeled with a TUNEL probe (green) (B., E., H., K.) and a merge was performed by Image J (C., F., I., L.) Scale bar corresponding to 50µm. **(M)** Measurement of caspase 3 & 7 activities by CaspaseGlo® technique in PBS (n=6), BLM45

(n=6), BLM90 (n=6) and BLM-AE (n=7) groups. All values are represented as mean \pm SD; Mann-Whitney analysis was performed. * p \leq 0,01, ***p \leq 0,0001.

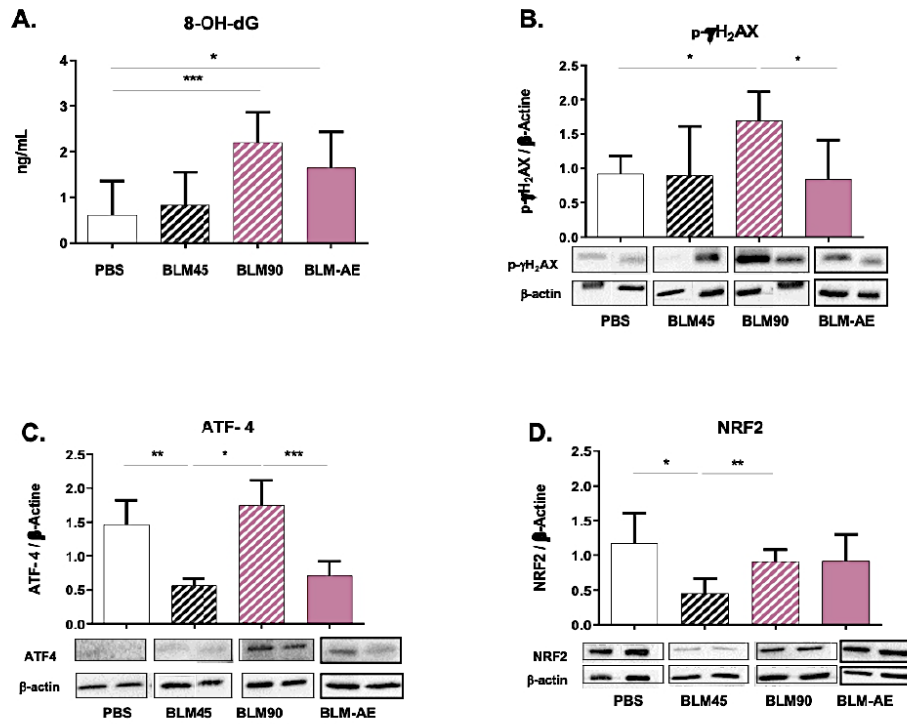


Figure 5: Analysis of oxidative stress. (A.) The concentration of 8-OH-dG was assessed by ELISA in whole lung homogenate from PBS, BLM45, BLM90 and BLM-AE mice. (B.) Western blot quantification of p-γH₂AX, ATF-4 (C.), and NRF2 (D.) proteins in total lung homogenates from PBS, BLM45, BLM90 and BLM-AE mice. The expression levels of p-γH₂AX, ATF-4, and NRF2 were related to the expression level of β-actin for each condition. A representative blot of n=6 mice per group is show. All values are represented as mean ± SD; Mann-Whitney analysis was performed. *p<0.05 and **p<0.01.

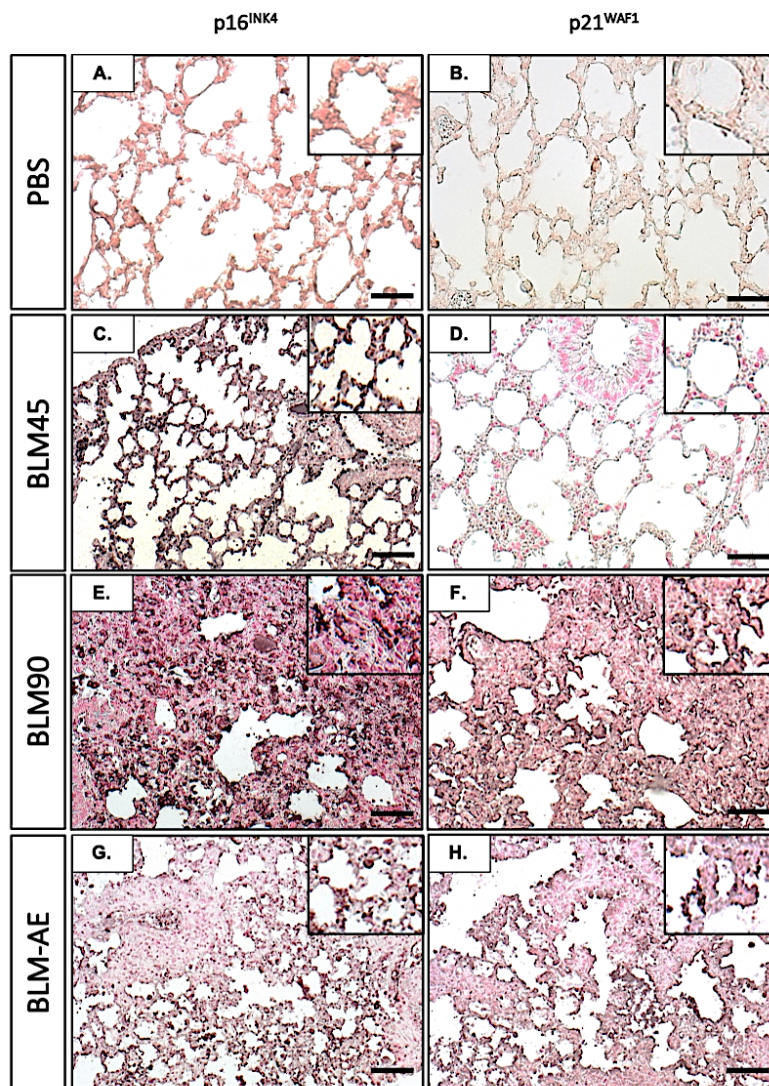


Figure 6: Analysis of senescence markers. (A.) Photographs of 5- μ m serial lung sections immunostained for p16^{INK4} (A., C., E., G.) and p21^{WAF1} (B., D., F., H.) protein (scale bar corresponding to 100 μ m). Representative image of PBS (n=6, A., B.), BLM45 (n=6, C., D.), BLM90 (n=6, E., F.), and BLM-AE (n=7, G., H.) groups is shown. Increased expression of p16^{INK4} in the BLM90 (E.) and more in the BLM-AE (G.) group is shown, mainly localized in alveolar epithelial cells in or in the vicinity of fibrotic area. p21^{WAF1} expression is observed only in the BLM-AE group (H.), in remained tissue specifically in alveolar epithelial cells.

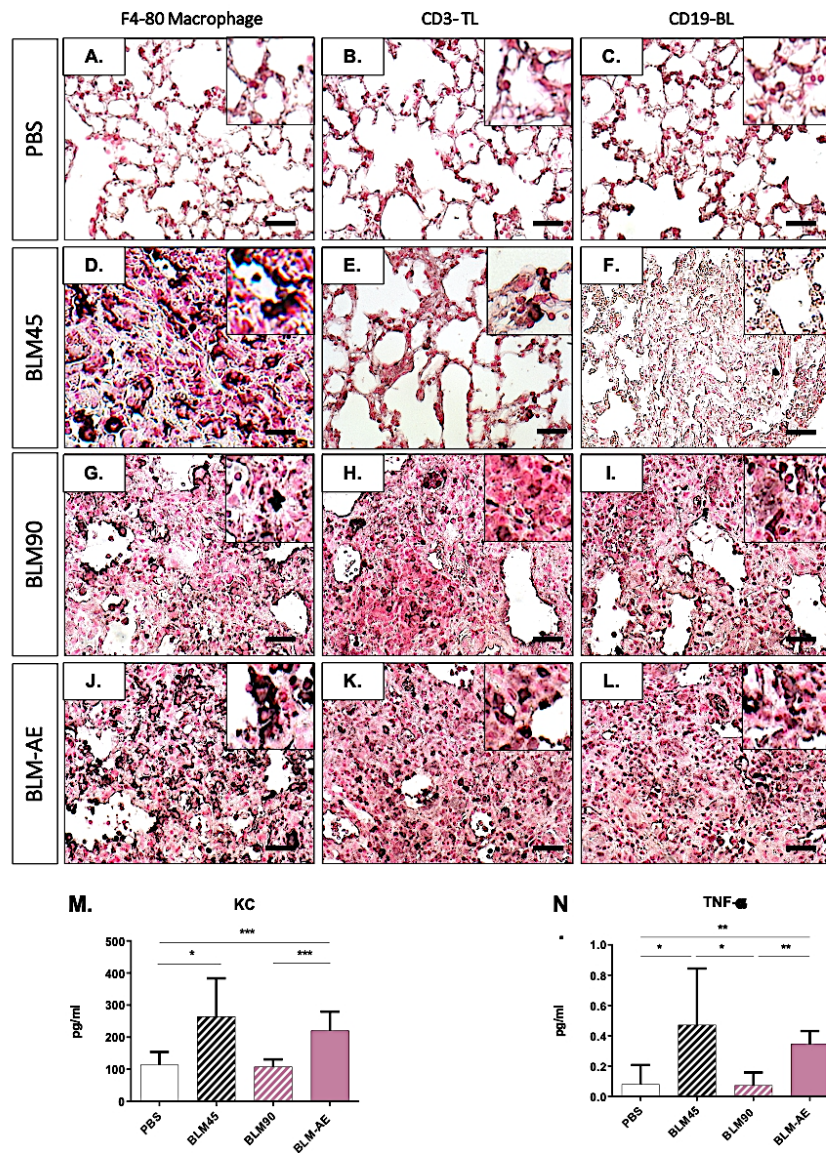


Figure 7: Identification of macrophage and lymphocyte cell populations. (A-L): Immunostained representative lung sections for F4-80 macrophages (A., D., G., J.), CD3 T-Lymphocytes (B., E., H., K.) and CD19 B-lymphocytes (C., F., I., L.) identification in the PBS (A., B., C.), BLM45 (D., E., F.), BLM90 (G., H., I.) and BLM-AE (J., K., L.) groups. Scale bar corresponding to 100 μ m. A representative image of PBS (n=6), BLM45 (n=6), BLM90, and BLM-AE (n=7) groups are shown. After BLM instillation a dense infiltrate of F4-80 macrophages is observed in BLM45 group (D), decline in the BLM90 group (G) and shows an upsurge after exacerbation (BLM-AE, J). A B and T lymphocytes infiltration was observed in

BLM90 (H, I, respectively) more marked after exacerbation (K, L respectively). **(M, N)**: Quantification of KC **(M.)**, and TNF- α **(N.)** pro-inflammatory proteins in whole lung protein lysates from PBS (n=6), BLM45 (n=6), BLM90 (n=6) and BLM-AE (n=7) mice group. All values are represented as mean \pm SD; Mann Whitney analysis was performed. * p \leq 0,01, **p \leq 0,001, ***p \leq 0,0001.

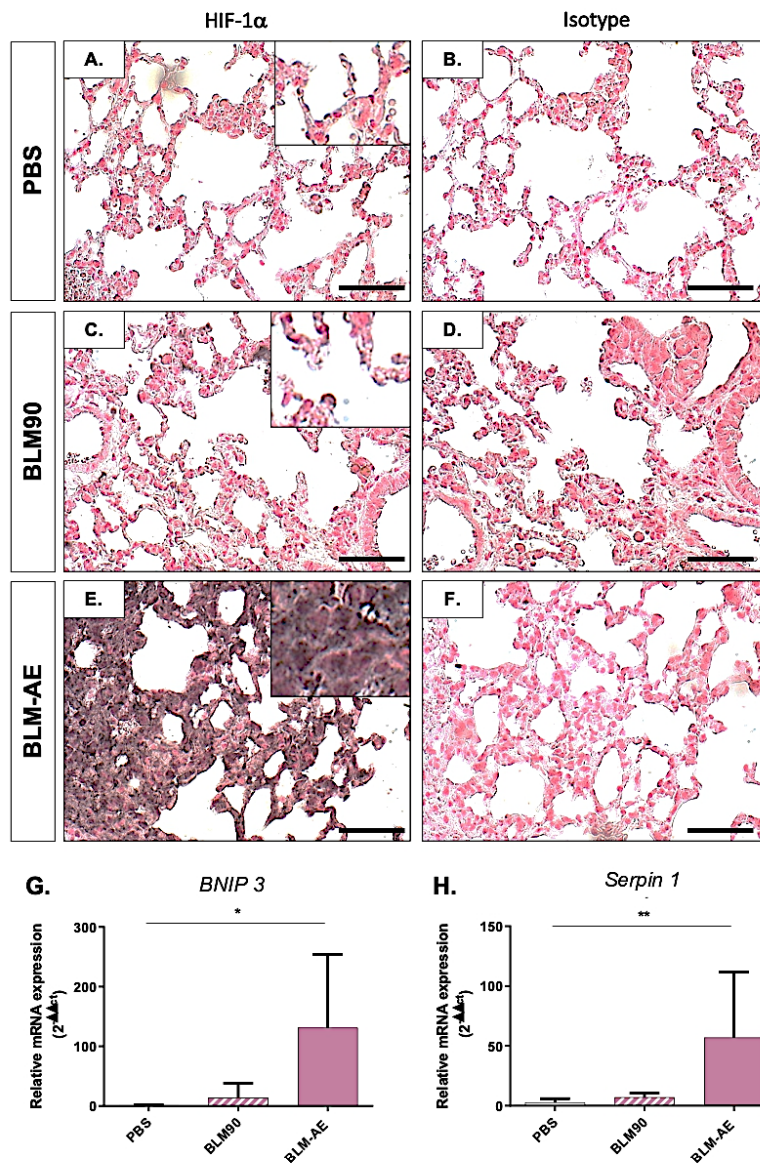


Figure 8: Hypoxia-induced factor HIF-1 α immunostaining and expression level of target genes. (A., C., E.) Photographs of 5- μ m serial lung sections immunostained for HIF-1 α protein and a rabbit isotype (B., D., F.). (Scale bar corresponding to 50 μ m). A representative image of PBS (n=6, A., B.), BLM90 (n=6, C., D.), and BLM-AE (n=7, E., F.) groups was shown. When reported to the staining of isotype (5B.-D.), no significant HIF-1 α staining is observed in the BLM90 group (C.) as compared to the PBS control group (D.). A significant increase staining of HIF-1 α is observed in the BLM-AE group (E.) mainly

localized in modified alveolar epithelial cells. (G.) mRNA expression of *Bnip3* and (H.) mRNA of *Serpin1* quantified by RT-qPCR from PBS (n=6), BLM90 (n=6), and BLM-AE (n=7) mice per groups; Effect of BLM or BLM-AE was presented as fold induction normalized to the mean value of PBS group and reported to 1. All values are represented as mean \pm SD; Mann Whitney analysis was performed. * $p \leq 0,01$, ** $p \leq 0,001$.

References

- Ahmad, A., Alkharfy, K.M., Jan, B.L., Ahad, A., Ansari, M.A., Al-Jenoobi, F.I., Raish, M., 2020. Thymoquinone treatment modulates the Nrf2/HO-1 signaling pathway and abrogates the inflammatory response in an animal model of lung fibrosis. *Exp Lung Res* 46, 53–63. <https://doi.org/10.1080/01902148.2020.1726529>
- Álvarez, D., Cárdenes, N., Sellarés, J., Bueno, M., Corey, C., Hanumanthu, V.S., Peng, Y., D’Cunha, H., Sembrat, J., Nouriaie, M., Shanker, S., Caufield, C., Shiva, S., Armanios, M., Mora, A.L., Rojas, M., 2017. IPF lung fibroblasts have a senescent phenotype. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 313, L1164–L1173. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00220.2017>
- Aran, D., Looney, A.P., Liu, L., Wu, E., Fong, V., Hsu, A., Chak, S., Naikawadi, R.P., Wolters, P.J., Abate, A.R., Butte, A.J., Bhattacharya, M., 2019. Reference-based analysis of lung single-cell sequencing reveals a transitional profibrotic macrophage. *Nat Immunol* 20, 163–172. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0276-y>
- Artaud-Macari, E., Goven, D., Brayer, S., Hamimi, A., Besnard, V., Marchal-Somme, J., Ali, Z.E., Crestani, B., Kerdine-Römer, S., Boutten, A., Bonay, M., 2013. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 nuclear translocation induces myofibroblastic dedifferentiation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Antioxid Redox Signal* 18, 66–79. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4240>
- Ashcroft, T., Simpson, J.M., Timbrell, V., 1988. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol* 41, 467–470. <https://doi.org/10.1136/jcp.41.4.467>
- Borzone, G., Moreno, R., Urrea, R., Meneses, M., Oyarzún, M., Lisboa, C., 2001. Bleomycin-induced chronic lung damage does not resemble human idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 163, 1648–1653. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.7.2006132>
- 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>
- Chao, J., Wood, J.G., Gonzalez, N.C., 2011. Alveolar macrophages initiate the systemic microvascular inflammatory response to alveolar hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol* 178, 439–448. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2011.03.008>
- Chung, M.P., Monick, M.M., Hamzeh, N.Y., Butler, N.S., Powers, L.S., Hunninghake, G.W., 2003. Role of repeated lung injury and genetic background in bleomycin-induced fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29, 375–380. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2003-0029OC>
- Churg, A., Wright, J.L., Tazelaar, H.D., 2011. Acute exacerbations of fibrotic interstitial lung disease. *Histopathology* 58, 525–530. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2010.03650.x>
- Collard, H.R., Calfee, C.S., Wolters, P.J., Song, J.W., Hong, S.-B., Brady, S., Ishizaka, A., Jones, K.D., King, T.E., Matthay, M.A., Kim, D.S., 2010. Plasma biomarker profiles in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 299, L3-7. <https://doi.org/10.1152/ajplung.90637.2008>

- Collard, H.R., Moore, B.B., Flaherty, K.R., Brown, K.K., Kaner, R.J., King, T.E., Lasky, J.A., Loyd, J.E., Noth, I., Oltman, M.A., Raghu, G., Roman, J., Ryu, J.H., Zisman, D.A., Hunninghake, G.W., Colby, T.V., Egan, J.J., Hansell, D.M., Johkoh, T., Kaminski, N., Kim, D.S., Kondoh, Y., Lynch, D.A., Müller-Quernheim, J., Myers, J.L., Nicholson, A.G., Selman, M., Toews, G.B., Wells, A.U., Martinez, F.J., Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network Investigators, 2007. Acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 176, 636–643. <https://doi.org/10.1164/rccm.200703-463PP>
- Degryse, A.L., Lawson, W.E., 2011. Progress toward improving animal models for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Med Sci* 341, 444–449. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e31821aa000>
- Degryse, A.L., Tanjore, H., Xu, X.C., Polosukhin, V.V., Jones, B.R., McMahon, F.B., Gleaves, L.A., Blackwell, T.S., Lawson, W.E., 2010. Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 299, L442–452. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00026.2010>
- 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>
- Disayabutr, S., Kim, E.K., Cha, S.-I., Green, G., Naikawadi, R.P., Jones, K.D., Golden, J.A., Schroeder, A., Matthay, M.A., Kukreja, J., Erle, D.J., Collard, H.R., Wolters, P.J., 2016. miR-34 miRNAs Regulate Cellular Senescence in Type II Alveolar Epithelial Cells of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLoS ONE* 11, e0158367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158367>
- G, R., Hr, C., Jj, E., Fj, M., J, B., Kk, B., Tv, C., Jf, C., Kr, F., Ja, L., Da, L., Jh, R., Jj, S., Au, W., J, A., D, B., C, C., U, C., M, E., Dm, H., T, J., Ds, K., Te, K., Y, K., J, M., Nl, M., Ag, N., L, R., M, S., Rf, D., Bs, G., Sl, P., Hj, S., 2011. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Evidence-Based Guidelines for Diagnosis and Management [WWW Document]. *American journal of respiratory and critical care medicine*. <https://doi.org/10.1164/rccm.2009-040GL>
- Jenkins, R.G., Moore, B.B., Chambers, R.C., Eickelberg, O., Königshoff, M., Kolb, M., Laurent, G.J., Nanthakumar, C.B., Oltman, M.A., Pardo, A., Selman, M., Sheppard, D., Sime, P.J., Tager, A.M., Tatler, A.L., Thannickal, V.J., White, E.S., ATS Assembly on Respiratory Cell and Molecular Biology, 2017. An Official American Thoracic Society Workshop Report: Use of Animal Models for the Preclinical Assessment of Potential Therapies for Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 56, 667–679. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0096ST>
- Kakugawa, T., Yokota, S.-I., Ishimatsu, Y., Hayashi, T., Nakashima, S., Hara, S., Sakamoto, N., Kubota, H., Mine, M., Matsuoka, Y., Mukae, H., Nagata, K., Kohno, S., 2013. Serum heat shock protein 47 levels are elevated in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell Stress Chaperones* 18, 581–590. <https://doi.org/10.1007/s12192-013-0411-5>

- Kasai, S., Shimizu, S., Tatara, Y., Mimura, J., Itoh, K., 2020. Regulation of Nrf2 by Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Physiology and Pathology. *Biomolecules* 10, E320. <https://doi.org/10.3390/biom10020320>
- Kasai, S., Yamazaki, H., Tanji, K., Engler, M.J., Matsumiya, T., Itoh, K., 2019. Role of the ISR-ATF4 pathway and its cross talk with Nrf2 in mitochondrial quality control. *J Clin Biochem Nutr* 64, 1–12. <https://doi.org/10.3164/jcbn.18-37>
- King, T.E., Pardo, A., Selman, M., 2011. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 378, 1949–1961. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60052-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60052-4)
- Kishaba, T., 2019. Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Medicina (Kaunas)* 55, E70. <https://doi.org/10.3390/medicina55030070>
- Konigsberg, I.R., Borie, R., Walts, A.D., Cardwell, J., Rojas, M., Metzger, F., Hauck, S.M., Fingerlin, T.E., Yang, I.V., Schwartz, D.A., 2021. Molecular Signatures of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2020-0546OC>
- Kurosu, K., Takiguchi, Y., Okada, O., Yumoto, N., Sakao, S., Tada, Y., Kasahara, Y., Tanabe, N., Tatsumi, K., Weiden, M., Rom, W.N., Kuriyama, T., 2008. Identification of annexin 1 as a novel autoantigen in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *J Immunol* 181, 756–767. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.1.756>
- Kuwano, K., Nakashima, N., Inoshima, I., Hagimoto, N., Fujita, M., Yoshimi, M., Maeyama, T., Hamada, N., Watanabe, K., Hara, N., 2003. Oxidative stress in lung epithelial cells from patients with idiopathic interstitial pneumonias. *European Respiratory Journal* 21, 232–240. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00063203>
- Lehmann, M., Korfei, M., Mutze, K., Klee, S., Skronska-Wasek, W., Alsafadi, H.N., Ota, C., Costa, R., Schiller, H.B., Lindner, M., Wagner, D.E., Günther, A., Königshoff, M., 2017. Senolytic drugs target alveolar epithelial cell function and attenuate experimental lung fibrosis ex vivo. *European Respiratory Journal* 50. <https://doi.org/10.1183/13993003.02367-2016>
- Limjunyawong, N., Mitzner, W., Horton, M.R., 2014. A mouse model of chronic idiopathic pulmonary fibrosis. *Physiol Rep* 2, e00249. <https://doi.org/10.1002/phy2.249>
- Liu, T., De Los Santos, F.G., Phan, S.H., 2017. The Bleomycin Model of Pulmonary Fibrosis. *Methods Mol Biol* 1627, 27–42. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8_2
- Maher, T.M., Whyte, M.K.B., Hoyles, R.K., Parfrey, H., Ochiai, Y., Mathieson, N., Turnbull, A., Williamson, N., Bennett, B.M., 2015. Development of a Consensus Statement for the Definition, Diagnosis, and Treatment of Acute Exacerbations of Idiopathic Pulmonary Fibrosis Using the Delphi Technique. *Adv Ther* 32, 929–943. <https://doi.org/10.1007/s12325-015-0249-6>
- Marchioni, A., Tonelli, R., Ball, L., Fantini, R., Castaniere, I., Cerri, S., Luppi, F., Malerba, M., Pelosi, P., Clini, E., 2018. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: lessons learned from acute respiratory distress syndrome? *Crit Care* 22, 80. <https://doi.org/10.1186/s13054-018-2002-4>
- Martinez, F.J., Collard, H.R., Pardo, A., Raghu, G., Richeldi, L., Selman, M., Swigris, J.J., Taniguchi, H., Wells, A.U., 2017. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat Rev Dis Primers* 3, 17074. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.74>
- Matsuzawa, Y., Kawashima, T., Kuwabara, R., Hayakawa, S., Irie, T., Yoshida, T., Rikitake, H., Wakabayashi, T., Okada, N., Kawashima, K., Suzuki, Y., Shirai, K., 2015. Change in serum marker of oxidative stress in the progression of idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulm Pharmacol Ther* 32, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2015.03.005>

- Mellor, H.R., Harris, A.L., 2007. The role of the hypoxia-inducible BH3-only proteins BNIP3 and BNIP3L in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 26, 553–566. <https://doi.org/10.1007/s10555-007-9080-0>
- Moore, B.B., Hogaboam, C.M., 2008. Murine models of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294, L152–160. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00313.2007>
- Papiris, S.A., Tomos, I.P., Karakatsani, A., Spathis, A., Korbila, I., Analitis, A., Kolilekas, L., Kagouridis, K., Loukides, S., Karakitsos, P., Manali, E.D., 2018. High levels of IL-6 and IL-8 characterize early-on idiopathic pulmonary fibrosis acute exacerbations. *Cytokine* 102, 168–172. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.08.019>
- Phan, T.H.G., Paliogiannis, P., Nasrallah, G.K., Giordo, R., Eid, A.H., Fois, A.G., Zinellu, A., Mangoni, A.A., Pintus, G., 2021. Emerging cellular and molecular determinants of idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell Mol Life Sci* 78, 2031–2057. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03693-7>
- Raghu, G., Remy-Jardin, M., Myers, J.L., Richeldi, L., Ryerson, C.J., Lederer, D.J., Behr, J., Cottin, V., Danoff, S.K., Morell, F., Flaherty, K.R., Wells, A., Martinez, F.J., Azuma, A., Bice, T.J., Bouros, D., Brown, K.K., Collard, H.R., Duggal, A., Galvin, L., Inoue, Y., Jenkins, R.G., Johkoh, T., Kazerooni, E.A., Kitaichi, M., Knight, S.L., Mansour, G., Nicholson, A.G., Pipavath, S.N.J., Buendía-Roldán, I., Selman, M., Travis, W.D., Walsh, S., Wilson, K.C., American Thoracic Society, European Respiratory Society, Japanese Respiratory Society, and Latin American Thoracic Society, 2018. Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med* 198, e44–e68. <https://doi.org/10.1164/rccm.201807-1255ST>
- Redente, E.F., Black, B.P., Backos, D.S., Bahadur, A.N., Humphries, S.M., Lynch, D.A., Tuder, R.M., Zemans, R.L., Riches, D.W.H., 2021. Persistent, Progressive Pulmonary Fibrosis and Epithelial Remodeling in Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 64, 669–676. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2020-0542MA>
- Schupp, J.C., Binder, H., Jäger, B., Cillis, G., Zissel, G., Müller-Quernheim, J., Prasse, A., 2015. Macrophage activation in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One* 10, e0116775. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116775>
- 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>
- Selman, M., Pardo, A., 2014. Revealing the pathogenic and aging-related mechanisms of the enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis. an integral model. *Am J Respir Crit Care Med* 189, 1161–1172. <https://doi.org/10.1164/rccm.201312-2221PP>
- Suresh, M.V., Balijepalli, S., Zhang, B., Singh, V.V., Swamy, S., Panicker, S., Dolgachev, V.A., Subramanian, C., Ramakrishnan, S.K., Thomas, B., Rao, T.C., Delano, M.J., Machado-Aranda, D., Shah, Y.M., Raghavendran, K., 2019. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 α Promotes Inflammation and Injury Following Aspiration-Induced Lung Injury in Mice. *Shock* 52, 612–621. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001312>
- Tashiro, J., Rubio, G.A., Limper, A.H., Williams, K., Elliot, S.J., Ninou, I., Aidinis, V., Tzouveleakis, A., Glassberg, M.K., 2017. Exploring Animal Models That Resemble Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Front Med (Lausanne)* 4. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00118>

- Tzouveleakis, A., Harokopos, V., Paparountas, 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-1alpha in disease pathogenesis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 176, 1108–1119. <https://doi.org/10.1164/rccm.200705-683OC>
- Ueno, M., Maeno, T., Nomura, M., Aoyagi-Ikeda, K., Matsui, H., Hara, K., Tanaka, T., Iso, T., Suga, T., Kurabayashi, M., 2011. Hypoxia-inducible factor-1 α mediates TGF- β -induced PAI-1 production in alveolar macrophages in pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 300, L740-752. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00146.2010>
- Walters, D.M., Cho, H.-Y., Kleeberger, S.R., 2008. Oxidative stress and antioxidants in the pathogenesis of pulmonary fibrosis: a potential role for Nrf2. *Antioxid Redox Signal* 10, 321–332. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1901>
- Wu, Q., Zhang, K., Jiang, S., Fu, L., Shi, Y., Tan, R., Cui, J., Zhou, Y., 2020. p53: A Key Protein That Regulates Pulmonary Fibrosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2020, e6635794. <https://doi.org/10.1155/2020/6635794>
- Zolak, J.S., de Andrade, J.A., 2012. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Immunol Allergy Clin North Am* 32, 473–485. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2012.08.006>

Supplemental materiel

Ashcroft scoring: Score 1 corresponds to a lung with no fibrotic burden at the most flimsy small fibers in some alveolar walls and with normal lung. Score 2 corresponds to clearly fibrotic changes with alveoli partly enlarged and rarefied, but no fibrotic masses. Score 3 corresponds to presence of single fibrotic masses (>10% of microscopic field). Score 4 corresponds to lung with confluent fibrotic masses (>10%) with a lung structure severely damaged but still preserved and score 5 corresponds to large continuous fibrotic masses (>50%) and lung architecture mostly not preserved.

Supplemental data 1:

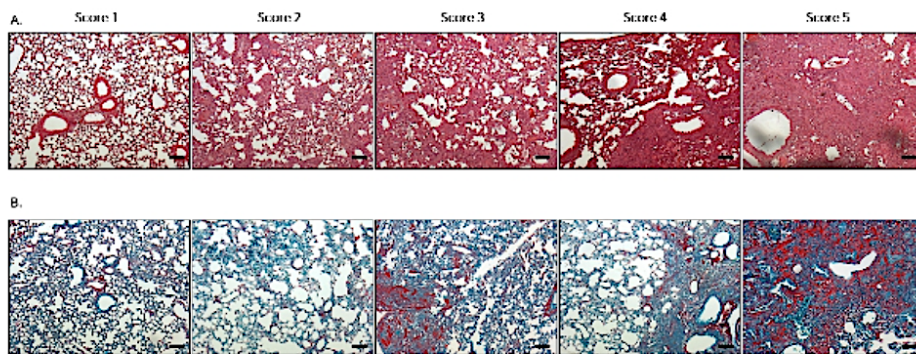


Figure S1: Evaluation of the pulmonary lesion by Ashcroft score. (A, B) Ashcroft score scale. Photographs panel of mouse lungs stained with hematoxylin/eosin (A) and Sirius red/fast green stain (B).

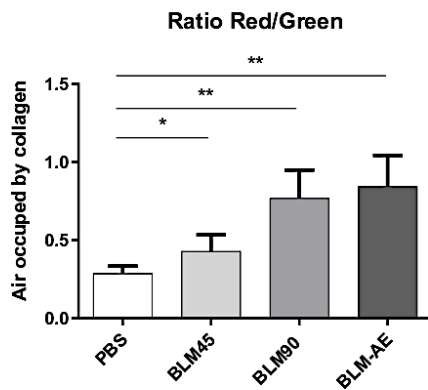


Figure S2. Light microscopy quantification of Sirius red staining reported to fast green staining quantification in each group. Data represents means \pm SD, PBS (n=6), BLM45 (n=6), BLM90 (n=6) and BLM-AE (n=7). **p \leq 0.001, One-way ANOVA Kruskal-Wallis analysis was performed.

Conclusion générale de la partie I

Dans le modèle murin obtenu par trois injections IT de faibles doses de Bléomycine (BLM 45d) nous confirmons la présence d'importants dépôts de collagène témoignant du développement d'une fibrose pulmonaire. Nos résultats montrent également que cette fibrose est évolutive, avec manifestement un changement de population de cellules circulantes, et une augmentation du nombre de macrophages présentant un phénotype de type M2 (pro-fibrosant) au cours du temps au sein des zones de fibrose lorsque les animaux sont maintenus en vie 90 jours après la dernière instillation (chapitre 1). Nous mettons également en évidence que la fibrose obtenue après 3 instillations (BLM 45d) présente un niveau d'inflammation important et que celui-ci semble atténué après 6 instillations (BLM 90d) (chapitre 2). Par ailleurs, cette fibrose est plus sévère et plus proche de ce que l'on peut observer chez le patient atteint de FPI, avec notamment l'expression des principaux marqueurs apoptotiques et de stress oxydant. L'utilisation de ce modèle pour étudier les phases d'exacerbation aiguë (EA) (chapitre 2) a montré que l'instillation d'une dose plus forte de bléomycine provoque une aggravation de la fibrose pulmonaire et une inflammation importante similaire à ce qui est retrouvé chez les patients FPI suite à une EA. Nos résultats mettent également en évidence une stabilisation du facteur HIF-1 α ainsi que l'induction de certains de ces gènes cible en réponse à cette nouvelle agression.

Toutes ces caractéristiques rendent ce modèle très intéressant pour l'étude des mécanismes intervenant dans l'instauration, le développement et l'exacerbation de la fibrose pulmonaire. Ainsi, ce modèle pourrait-être utilisé pour développer et tester de nouvelles approches thérapeutiques de la fibrose pulmonaire.

Partie II : Impact d'une fibrose pulmonaire sur la commande centrale respiratoire

Introduction

Comme mentionné dans le *chapitre II de l'introduction*, la fibrose pulmonaire conduit à un déclin de la fonction respiratoire dont l'origine pose encore question. Quelques anciennes études suggèrent que les patients atteints de FPI présentent une altération des régulations ventilatoires (Launois et al. 1991), une faible valeur de capacité vitale forcée (CVF), une augmentation de la fréquence respiratoire et une diminution du volume courant (V_T) (Javaheri and Sicilian 1992). De manière intéressante, il a été suggéré que les pathologies respiratoires, *via* leurs conséquences sur la mécanique ventilatoire ou les échanges gazeux, puissent affecter la commande centrale respiratoire (CCR) (Raux et al. 2007).

Notre hypothèse est que les altérations du parenchyme pulmonaire, caractérisées par l'augmentation de la rigidité pulmonaire d'une part et la modification des échanges gazeux suite à un épaissement de la MEC d'autre part, puissent conduire à des modifications au niveau du réseau neuronal respiratoire *via* des phénomènes de neuroplasticité. Dans ce contexte, nous proposons d'étudier sur le modèle de fibrose pulmonaire que nous venons de caractériser l'impact des atteintes pulmonaires sur la mécanique ventilatoire, ainsi que sur le réseau de neurones associés à la commande centrale respiratoire. Ces travaux ont conduit à l'obtention de résultats présentés ci-après sous forme d'un article original en cours d'écriture.

Résultats

Les résultats de cette partie font l'objet d'un article en cours d'écriture.

Title Bleomycine-induced pulmonary fibrosis alters the functioning of the respiratory neural network and abolished the ventilatory adaptation to hypoxia and hypercapnia in mice

Authors

Céline-Hivda Yegen¹, Dominique Marchant¹, Emilie Boncoeur^{1,*}, Nicolas Voituron^{1,2,*,#}

* Both senior authors contributed equally

Affiliation

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

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

Corresponding author : Pr Nicolas Voituron (nicolas.voituron@sorbonne-paris-nord.fr), Université Sorbonne Paris Nord, UFR SMBH, Laboratoire "Hypoxie & Poumon", UMR INSERM U1272, 93017 Bobigny, France.

Tel: +33148387632

Abstract

Idiopathic pulmonary fibrosis is a lung disease affecting the deep lung. Some patients present impaired ventilatory parameters characterised by low forced vital capacity values associated with an increased respiratory rate, a decreased tidal volume and an altered ventilatory response to hypercapnia. To date, the origin of the alterations in ventilatory mechanics and regulation remain unknown. Part of these respiratory abnormalities may be related to the increased pulmonary stiffness encountered during pulmonary fibrosis. However, this rigidity may also have an effect on the functioning of the respiratory neural network, which could ultimately reinforce or accentuate these ventilatory alterations. Indeed, the central respiratory drive is elaborated by a network of respiratory neurons located at the ponto-bulbar level whose activity is permanently regulated by peripheral (chemical or mechanical) and/or central afferents. To this end, we sought to understand what the consequences of pulmonary fibrosis on ventilatory parameters and how the modification of pulmonary rigidity could influence the functioning of the respiratory neuronal network. In a mouse model of pulmonary fibrosis obtained by 6 repeated intratracheal instillations of bleomycin, we first observed an increase in minute ventilation characterised by an increase in respiratory rate and tidal volume, a desaturation and a decrease in lung compliance. Furthermore, BLM-induced pulmonary fibrosis led to neuroplasticity at the level of the neuronal respiratory network and an alteration of the ventilatory response to hypoxia and hypercapnia. Thus our results showed the pulmonary fibrosis induced not only modification of the pulmonary architecture but also central adaptation of the respiratory neural network.

Introduction

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is an interstitial lung disease characterized by an excessive collagen deposition in the alveolar epithelium leading to a fatal restrictive respiratory failure. In the absence of effective treatment, the median survival from diagnosis is around 3 years with a variable disease course among patients (slowly progressive, with occasional exacerbation episodes or more rarely rapidly progressive (King et al. 2011; Raghu et al. 2011) and high mortality (Dempsey 2006). Old studies showed in patients with interstitial lung diseases a dyspnea, an impairment of ventilatory variables characterized by a low value of forced vital capacity associated with an increase in respiratory frequency, and a decrease in tidal volume (Javaheri and Sicilian 1992). A decrease in the ventilatory response to hypercapnia has also been reported in patients with pulmonary fibrosis (Launois et al. 1991). However this point was controversial. Indeed, a recent review of the literature suggested that ventilatory response to CO₂ rebreathing was unchanged (Plantier et al. 2018).

Histologically, patients with IPF displayed honeycombed alveolar epithelium and fibroblastic foci. Currently, the retained physio-pathologic hypothesis consists in a deregulation of the dialog between fibroblasts and the alveolar epithelial cells composing the alveoli. This deregulation would play an essential role in the process of fibrosis development by allowing an aberrant healing of the alveolar epithelium and excessive collagen deposit (Raghu et al. 2011; Bendstrup 2014). The excess of collagen and the transformation of the parenchyma into scar tissue is at the origin of a pulmonary stiffness in patients with IPF, decreasing lung volumes (Nava and Rubini 1999), as well as the pulmonary distensibility, and finally results in a decline in lung function due alteration of the mechanical properties of the lung (Plantier et al. 2018). In mice, functional decline being positively correlated with pulmonary fibrosis degree (Manali et al. 2011). The pulmonary compliance was also an important component of the load of the respiratory muscle and the work of breathing (Crystal et al. 1997). Alteration in pulmonary gaz exchange was also observed in IPF patients associated with a reduction of the diffusing capacity, an increase of the physiological dead space, and a chronic arterial hypoxemia (Plantier et al. 2018).

These alterations could results in an activation of the central respiratory drive in IPF patients (Meerhaeghe et al. 1981; Di Marco et al. 1983). Indeed, respiratory diseases affect the central respiratory drive through their consequences on the ventilatory mechanics and/or on the gas exchanges, leading to an increase in the command to the respiratory muscles (Raux et al. 2007). As a matter of fact, some pulmonary pathologies were characterized on the mechanical level by an increase in the load imposed on the respiratory system, whose nature depends on the pathology concerned: resistive load (e.g. asthma), elastic load (e.g. pulmonary oedema) or threshold load (e.g. intrinsic positive expiratory pressure in emphysema) (Raux et al. 2007). Thus, some ventilatory adaptations

were being set up to overcome external mechanical loads. However, few things were known concerning pulmonary fibrosis impact on respiratory neuronal network.

The Respiratory Rhythm Generator (RRG) produces the basic periodic oscillatory activity of ventilation (Funk and Greer 2013). Then, the Central Pattern Generator (CPG), usually described as a bilateral, mainly ventral, ponto-bulbar column, translates this basic oscillation into a coordinated pattern of activity, which is transmitted to the respiratory motoneurons (Funk and Greer 2013). This CPG permanently received a large number of peripheral and central afferents modulating its activity in order to adjust the ventilatory pattern to the metabolic (blood gas, pH, ...) or mechanical (posture, lung inflation, tracheal pressure, thoracic expansion, ...) informations. Thus, mechanical afferents (C-type fibers, Rapidly Adapting Receptors (RAR) or Slowly Adapting Receptors (SAR)) located in the lung parenchyma, bronchi and respiratory muscles (Raux et al. 2007), as well as chemosensitives afferents (peripheral and central chemoreceptors; (Nattie and Li 2012)) were able to modulate pulmonary ventilation in response to the various stimuli encountered. The first central relay of information from these peripheral afferents corresponds to the commissural and medial subdivisions of the nucleus of the tractus solitarius (SolC and SolM), which were the main areas of projection of sensory fibres from the sinus nerve (Torrealba and Claps 1988) and vagal nerve (Kalia and Mesulam 1980; Contreras et al. 1982). Neurons in the SolC and SolM integrate and relay information from these peripheral afferences to other regions of the central nervous system involved in the elaboration of central respiratory control.

Neuronal respiratory network is talented for neuroplasticity that consist in a persistent change in the neural control system based on prior experiences (Mitchell and Johnson stephen 2001). This phenomenon, may involved structural and functional modifications at the neuronal respiratory network level. Indeed, as described above, rhythm generation and pattern formation were permanently influenced by chemoreceptors, mechanoreceptors and neuromodulatory systems (Mitchell and Johnson stephen 2001). Moreover, plasticity could be induced by hypoxia, hypercapnia or lung injury (Mitchell and Johnson stephen 2001). Indeed, numerous components of neuronal respiratory network can show neuroplasticity after lesion-induced changes in breathing behavior (Forster 2003).

In this context, our hypothesis was that damage to the lung parenchyma due to the pulmonary fibrosis could lead to changes in the respiratory neuronal network through neuroplasticity mechanisms. For this purpose we propose to investigate in a persistent mice model of chronic lung fibrosis induced by repeated instillations of BLM (Degryse et al. 2010) the ventilatory mechanics, the ventilatory regulation to hypoxia and hypercapnia, as well as the pulmonary fibrosis-induced neuronal plasticity at the respiratory network level.

Methods

Animals and Ethical approval

All experiments were conducted in C57Bl/6j male mice (n= 12, Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France). The animals were aged about 8 weeks and weighed 26.3 ± 0.7 g at the beginning of the experiments. From reception, the animals were housed in standard cages with a 12h/12h lighting conditions and received a standard diet with ad libitum access to drinking water in our animal facility (agreement number C9300801). After one week of acclimatization, experimental procedures were initiated.

Experimental protocols was approved by the ethic committee in animals experiment Charles Darwin, done in accordance with the European communities Council Directive of September 22, 2010 (2010/63/EU) for animal care and conducted in accordance with French laws for animal care (APAFIS #18309-2019010316127879 v16).

Induction of pulmonary fibrosis

We have developed an original model of pulmonary fibrosis in C57Bl/6j mice, obtained by repeated intra-tracheal instillations of BLM (Sigma-Merck, European Pharmacopoeia, Reference Standard) under general anesthesia (3% isoflurane). Briefly, 6 intra-tracheal instillations of low doses of BLM (0.8 UI.g^{-1}) or PBS were performed with an interval of two weeks between two administrations (Degryse et al. 2010). Survival and body weight were monitored during the entire experimental protocol. All the following analyses were carried out 2 weeks after the last instillation.

In vivo measurement of ventilatory variables

Ventilatory variables analyses were performed using an adaptation of the technique developed by Drorbaugh and Fenn (Drorbaugh and Fenn 1955) and modified by Bartlett and Tenney (Bartlett and Tenney 1970), called "whole body plethysmography". As previously described (Voituron et al. 2009; Niane et al. 2011; Samillan et al. 2013) breathing variables were measured non-invasively in unanesthetized and unrestrained animals using whole-body flow barometric plethysmograph (Emka technologies, Paris, France). Basically, this method consists of recording the pressure variations in a recording chamber during spontaneous ventilation. Briefly, mice were placed in a recording chamber ventilated with air at room temperature ($21\text{-}22^\circ\text{C}$). A differential pressure transducer measured the pressure difference between the recording chamber and a reference chamber. Thus, whole body plethysmography provides measurement of respiratory frequency (f_R in cycle per min, c.min^{-1}), as well as tidal volume (V_T in μl) and minute ventilation (\dot{V}_E in ml.min^{-1}) which were normalized by the weight

(V_T , $\mu\text{l. g}^{-1}$ and \dot{V}_E , $\text{ml.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$). The T_i/T_{tot} and V_T/T_i ratios will also be determined to provide an indication of breathing time and an index of inspiratory drive (Milic Emili and Grunstein 1976).

To analyze the hypoxic ventilatory response (HVR) and the hypercapnic ventilatory response (HcVR), air was replaced with a hypoxic (10% O_2) or hypercapnic (4% CO_2) gas mixture for 10 minutes. Briefly measurements were performed in normoxia (21% O_2) for 30 minutes, then hypoxia for 10 min followed by 10 min of recovery period in normoxia, then hypercapnia for 10 min followed again by recovery period in normoxia (10 min).

Peripheral oxygen saturation

After short sedation with isoflurane 3% during 2 minutes, animals' neck was shaved and then a collar sensor was put in place. After waking, mice were habituated for 10 min and the peripheral blood saturation (SpO_2 , %) was recorded during 10 min in normoxic condition through this non-invasive method of infrared pulse oximetry (mouseOx Plus, Starr life science) (Lax et al. 2014; Gille et al. 2018).

Evaluation of lung compliance

The pulmonary compliance was evaluated in mice using plethysmograph (Emka technologies). Briefly, Mice were sedated (ketamine / xylazine I.P. injection; 100 mg/kg and 20 mg/kg respectively), tracheotomised and ventilated (RoVent Jr., Kent Scientific Corporation; respiratory frequency = 150 bpm, Tidal Volume = 0.27 ml; Insp/Exp ratio = 0.40). A differential pressure transducer is used to obtain a flow signal which reflect the expansion and contraction of the thorax during each ventilation cycle. Compliance and resistance were calculated following flow signal and pressure signals acquisition. Volume signal was obtained by an integration of the flow signal measured by the differential pressure transducer. The pneumotachograph being the only way for air to flow into and out of the chamber, the difference of pressure between inside and outside was proportional to this flow.

Lung and brain sampling

After measuring lung compliance, a thoracotomy was realised. Then, right pulmonary lobes were isolated through a ligation to the hilum to prevent the passage of the perfusion solution. After this step, mice were transcardially perfused with 0.9% saline-buffered solution followed by 4% paraformaldehyde (Chem Cruz, SC-253236B) in 0.1M Phosphate-buffered saline solution (pH 7.4). Thus, the left lobes as well as the brain were fixed. After fixation, the brain and the heart/lung unit were removed. The right lung lobes were separated, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for other studies. The left lobes were placed in 20ml 4% paraformaldehyde for 24 hours and paraffin embedded. Sections were cut at $5\mu\text{m}$ thickness for Masson's trichrome staining. Finally, the brain was post-fixed

for 48h at 4°C and then cryoprotected in 30% sucrose solution for 2 days at 4°C for immunohistochemistry.

Sirius Red staining

Lung sections of 5µm thickness were dewaxed in two xylene baths and then rehydrated by successive ethanol baths at decreasing concentration. The collagen fibers 1 and 3 were stained with 0.1% Sirius Red (Sigma, Cat#365548) and Wash in two changes of acidified water. Subsequently, the lungs are dehydrated, mounted and observed under the microscope. Then, preparations were dehydrated with absolute alcohol, cleared with xylene and mounted with hydrophobic mounting solution.

Immunohistochemistry

Analysis of FOSB/ΔFOSB-positive cells expression

The brainstem was coronally sectioned at 40µm using a cryostat. One section out of two was collected in 0.1M Phosphate-buffered saline solutions for immunohistochemistry processing. The other ones were placed in cryoprotective solution and stored at -20°C for later use. Sections were processed for FOSB/ΔFOSB immunohistochemistry as previously described (Perrin-Terrin et al. 2016; Baum et al. 2018). Briefly, sections were incubated for 48h at 4°C with a mouse monoclonal antibody directed against FOSB/ΔFOSB (F-7, Sc-398595 Santa Cruz used at 1:2000). Then, sections were incubated 2h at room temperature with a biotinylated goat anti-mouse secondary antibody (Vector Laboratories BA200 used at 1:2000) and for 1h with avidin-biotin-peroxydase complex (ABC, VECTASTAN, Elit PK-100 standard, ZE0622). Peroxydase activity were detected using 0,015% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Roth, CN75.3), 0,4% nickel ammonium sulphate (Alfa Aesar, 12519), and 0,006% hydrogen peroxide (Fischer BioReagents, BP2633) in 0,2M tris-HCl buffer (pH 7.6). Sections were washed, mounted on silane-treated slides, air-dried, dehydrated with absolute alcohol, cleared with xylene and coverslipped. Control sections were treated in parallel without primary or secondary antibodies. No labelling was observed in these conditions.

Double labelling of FOSB/ΔFOSB-positive cells with neurokinin 1 receptor or serotonin

The distribution analysis of FOSB/ΔFOSB-positive cells was associated with Neurokinin 1 receptor (NK1-R) in order to localise more precisely the respiratory rhythm generator (the Pre-Bötzinger complex, (Gray et al. 2001). FOSB/ΔFOSB-positive cells were labelled according to the same protocol as described above. Then sections were incubated with NK1-R antibody (Anti-substance P receptor antibody produced in rabbit, Sigma Aldrich S8305, 1:2500) or 5-HT antibody (Anti-Serotonin antibody produced in rabbit, Sigma Aldrich S5545, 1:2500) for 48h at 4°C followed by incubation with secondary

biotinylated antibody (Biotinylated Anti rabbit IgG produce in horse, Vector Laboratories, BA-1100 1:2000) for 2h at room temperature and finally revealed with ABC kit. Thereafter, NK1-R labelling was detected with 0,192% DAB (Roth, CN75.3), 3,6% NaCl (Fisher S/3160/60), 4% Nickel (Alfa Aesar 12519) and 0,0125 % H₂O₂. Sections were then washed, mounted on silane-treated slides, air-dried, dehydrated with absolute alcohol, cleared with xylene and coverslipped. Control sections were made without primary or secondary antibodies. No labelling was observed in these conditions.

Quantification of the number of FOSB/ΔFOSB-positive cells

Sections were examined under a light microscope (Axioskop Zeiss Germany)) and FOSB/ΔFOSB-positive cells were analysed in brainstem structures related to respiratory control using standard landmarks (Paxinos and Franklin 2012): commissural part, median part and ventrolateral part of nucleus of the solitary tract (SolC, SolM and SolVL respectively); *raphe magnus nucleus (RMg)*; *raphe pallidus nucleus (RPa)*; *raphe obscurus nucleus (ROb)*; retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group (RTN/pFRG) and hypoglossal nucleus (12N).

Counts were performed by eye at higher magnification (x400). Bilateral structures were analysed on one side and positives cells were counted in the entire area for the median structures. For each structure, results were expressed as the mean number of positive-cells per section. For double-labeled cells, results were expressed as the mean percentage of double-labeled cells among the total number of FOSB/ΔFOSB-positive cells in the pre-Bötzinger complex (NK1-R), The RTN/pFRG (NK1-R) or the medullary Raphe (5-HT). Distribution of FOSB/ΔFOSB-positive cells was represented on drawings to illustrate their location and photos (QImaging Retiga 2000R Fast 1394) were taken to illustrate double-labelled cells.

Statistical analysis

Graph and statistical analyses were performed with GraphPad Prism (GraphPad Software, version 9). Data were presented as the mean ± SD. D'Agostino-Pearson Omnibus normality test was realized to assess the distribution of the data. Comparisons among groups were assessed using Mann-Whitney test. **p*<0.05 differences were considered to be significant.

Results

Repeated instillations of BLM lead to collagen deposits distributed throughout the lung and alters the ventilatory mechanics in mice

Fifteen days after the first instillation, body weight was significantly lower in BLM group as compared to control (data not shown). This difference persists until the end (J90) and weight gain remains about 50% lower in the BLM group (Table 1). As already observed (Yegen et al., 2021-in preparation) Survival of the BLM group significantly decreased after the third instillation (82%; Data not shown). At the lung level, the extent of fibrosis is observed on lung biopsy mapping by collagen deposition stained with Sirius red (Figure 1A, 1B). As expected, a large and extensive collagen deposition was observed in the lung of BLM group as compared to PBS group.

At the beginning of the protocol (J0), the respiratory variables were not different between PBS and BLM group (Table 1, Figure 1C, 1D). However, after 90 days of bleomycin treatment, minute ventilation (\dot{V}_E) was significantly increased in BLM group as compared to PBS group (Table 1, Figure 2C, 2D, 2E, 2F). Indeed, mice with BLM-induced pulmonary fibrosis displayed an important increase in V_T and f_R (Table 1, Figure 2F). Moreover, fifteen days after the end of the protocol, the BLM group displayed a significant increase in the T_i/T_{tot} and V_T/T_i ratio as compared to the PBS group (Table 1). Finally, BLM group show a significant decrease in lung compliance (Figure 1G) and SpO_2 (Figure 1H) as compared to PBS group. Our results showed that greater the fibrosis (determined according to an histological score, Yegen et al., 2021 – in preparation; Figure 2) the lower is the saturation and the compliance. Conversely, when the histological fibrosis score increased, the \dot{V}_E increased (Figure 2).

Pulmonary fibrosis induces neuroplasticity at the respiratory network level

As compared to PBS group, BLM group displayed a significantly higher number of FOSB/ Δ FOSB-positive cells in the SolC, SolM and SolVL (+170% to +200%, Table 2, figure 2A, 2B, 2C, 2D), RTN/pFRG (Table 2, Figure 3C, 3D, 3E, 3F). The localisation of the NK1-R distribution associated with that of FOSB/ Δ FOSB-positive cells suggested that neurons of the pre-Bötzing complex (Figure 4) displayed a long-term modification of their activity following an experimental induction of pulmonary fibrosis (Figure 4B, 3D). Indeed, among the FOSB/ Δ FOSB-positive cells in pre-Bötzing complex, 100% expressed NK1R in PBS while 77% expressed it in the BLM group. Finally, an increase in FOSB/ Δ FOSB-positive cells was also observed in the RMg of the BLM group (Table 2, Figure 3D, 3F), where 67% of these positive cells were 5-HT positives (Figure 5B, 5D).

BLM-induced pulmonary fibrosis abolishes chemoreflex

Exposure of mice to hypoxic stress (10% O₂) significantly increases the ventilatory flow rate of PBS mice from the first minute until the end of exposition (Figure 6A). Two minutes after the end of hypoxia, minute ventilation had decreased in order to return to control values (Figure 6A). This increase in minute ventilation (\dot{V}_e) observed in PBS group was characterized by an increase in V_T (Figure 6B) and f_R (Figure 6C). However, BLM-induced pulmonary fibrosis abolishes hypoxic ventilatory response (Figure 6A). Indeed, exposure of BLM mice to a hypoxic gas mixture (10% O₂) did not modify neither the V_T (Figure 6B) nor their f_R (Figure 6C). In the same way, while exposure to 8% of CO₂ led to an increase in \dot{V}_e in PBS mice (Figure 6D) mainly due to an increase in f_R from the first minute until the end of exposition (Figure 6E, 6F), no hypercapnic ventilatory response was observed in the BLM group (Figure 6D, 6E, 6F).

Discussion

Idiopathic pulmonary fibrosis is a deep lung disease. This pulmonary pathology of unknown origin is characterized by an excessive accumulation of collagen fibers leading to a thickening of the extracellular matrix (Vuorio et al. 1989). The aim of this study was to characterize the impact of persistent fibrosis on the ventilatory function and on the neuronal plasticity of the ponto/bulbar respiratory network. Our main results suggested that BLM-induced pulmonary fibrosis led to modification of pulmonary mechanics leading to neuronal plasticity.

Pulmonary Fibrosis alters ventilatory mechanics

We observed alteration of ventilatory variables in our mice model of IPF, which was consistent with what is observed in the patient with IPF (Olukogbon et al. 2016). These patients displayed an increase in minute ventilation associated with increased respiratory rate and decreased tidal volume (Javaheri and Sicilian 1992; FUMEAUX et al. 2003). The breathing time as well as the inspiratory drive (given respectively by the T_i/T_{tot} and V_i/T_i ratios; Milic Emili and Grunstein 1976) was also increased following the induction of pulmonary fibrosis. In a mouse model of pulmonary fibrosis induced by a single intra-tracheal instillation of BLM, the work of breathing was significantly correlated with lung fibrosis histopathology score (Phillips et al. 2012), which was in line with our results. Our murine model of pulmonary fibrosis obtained after repeated bleomycin instillation presents a diffuse collagen deposition in the whole lung. This could explain, at least in part, the decrease in pulmonary compliance. This decrease is consistent with that observed in the literature for murine models of pulmonary fibrosis obtained by repeated instillation (Redente et al. 2021) and would be in response to an increase in the collagen content of the pulmonary parenchyma. As there were mechanical afferents from mechanoreceptors located in the lung parenchyma, bronchi and respiratory muscles (Raux et al. 2007), the modification of the lung resistance could affect the thoraco-pulmonary mechanoreceptors, which in turn can affect the control of ventilation (Figure 6). Indeed, a disturbance of the ventilatory mechanics can have a significant effect on the respiratory control (Maszczyk et al. 1990). Furthermore, we observed that mice developing pulmonary fibrosis 90 days after the first IT instillation of BLM showed a decrease in SpO_2 , as observed in patients with IPF (Arizono et al. 2020). The observed desaturation could activate peripheral chemoreceptors (Khoo et al. 1982; Lahiri et al. 1983) and participate to the minute ventilation augmentation (Figure 7). Then, the alterations in ventilatory mechanics and gas exchanges at the level of the alveolar-capillary membrane could be associated to alteration of ventilatory variable (Figure 6) but also with the sensation of dyspnea (Schelegle et al. 2001; Plantier et al. 2018).

The pulmonary fibrosis-induced increase in ventilation could reflect the need for the animals to make an "effort" to compensate for the increase in pulmonary rigidity (mechanical origin) and/or could be related to the presence of an hypoxemia (central origin, which is a consequence of the alteration of gas exchange due to the thickening of the alveolar-capillary membrane (Launois et al. 1991). These results suggested that the mechanism underlying the increase in \dot{V}_E may also have a central origin. In point of fact, central nervous system received different kinds of afferences including metabolic afferents from central and peripheral chemoreceptors (Raux et al. 2007; Dean and Putnam 2010).

Pulmonary fibrosis led to a neuroplasticity phenomenon

Breathing results from the rhythmic contraction of the ventilatory muscles, which depend on a central respiratory drive that determines the respiratory frequency and the tidal volume. A neuronal network located at the ponto-medullary level generates this central command. Thus, the observed changes in ventilatory variables observed in our mouse model of pulmonary fibrosis could also reflect a change in the functioning of this respiratory neuronal network. Our hypothesis was that the modification of the pulmonary mechanics and hypoxemia due to fibrosis could be at the origin of a neuroplasticity due to the afferents from chemo and mecano-receptors. Indeed, in IPF patients, increase in ventilatory effort induced by exercise could be attributed to increased afferents from the lungs and/or chest wall (Meerhaeghe et al. 1981). Furthermore, the disturbance of the ventilatory mechanics can have a significant effect on the respiratory control (Maszczyk et al. 1990). Analysis of the different structures within the respiratory neural network showed in our pulmonary fibrosis mice model an increase in the number of FosB/ Δ FosB positive cells suggesting that some of them modify their activities in response to lung damage. The thoraco-pulmonary mechanoreceptors as well as the chemoreceptors, via their afferences, could be at the origin of a neuroplasticity phenomenon affecting respiratory control. It was previously suggested that the ventilatory alterations observed in patients with stable diffuse interstitial lung disease would be the result of neural mechanisms (Di Marco et al. 1983). Our results tried to elucidate this point. It seems that lung damage could be associated with long-term changes in the sensitivity of pulmonary sensory receptors (Undem and Kollarik 2005) and/or altered synaptic plasticity in second-order neurons in the nucleus tractus solitarius as well as in higher-order synapses (Getsy et al. 2019). Indeed, SolC and SolM were the first central relay of information from the peripheral chemosensory and mechanical afferents (Torrealba and Claps 1988). Neurons in the SolC and SolM integrate and relay information to other respiratory neuronal network such as (Figure 7) RTN/pFRG (Takakura et al. 2006). So, changes of chemo and mecanoreceptors activity can affect the entire respiratory neuronal network and explain the observed increase at the level of the pre-Bötzinger complex leading to an increase of the respiratory motor output, which could modify the

respiratory pattern. Thus, it seems that chest wall mechanoreceptors sensitive to rib cage expansion, as well as chemoreceptors could contribute to these responses.

Pulmonary fibrosis-induced ventilatory deregulation: a neural origin?

Studies conducted in the 1980s in patients with interstitial lung disease showed a "fast and shallow" respiratory profile compared to healthy subjects during maximal and progressive exercise. This higher respiratory drive observed during exercise could be attributed to an increase in afferent reflexes from the lungs and/or chest wall (Meerhaeghe et al. 1981). It is also reported in some patients an alteration of the respiratory responses to hypoxia and hypercapnia (Rhoads and Brody 1969; Roncoroni et al. 1975) and in particular a decrease in the ventilatory response to hypercapnia (Launois et al. 1991) but there were few hypotheses to explain this. As mentioned above, alteration in pulmonary gas exchange was also observed in IPF patients associated with a reduction of the diffusing capacity and an increase of the physiological dead space (Plantier et al. 2018). This phenomenon could affect the sensitivity threshold of the chemoreceptors, explaining the lack of response of our animals. Another hypothesis was that the neuroplasticity phenomena mentioned above impact the function of the main central chemoreceptors (RTN/pFRG and medullary *raphe*), abolishing the ventilatory response to hypercapnia. However, this hypothesis remains speculative and needs to be tested. A third explanation may lie in the already high level of \dot{V}_e of BLM mice at rest. We can therefore hypothesize that in BLM group the chemosensitive reflex arc was normal but that the respiratory system cannot translate this command into an increase in V_e beyond that observed at rest. This hypothesis remains also speculative and needs to be tested. Thus, the alterations in ventilatory observed in patients with IPF could be the result of metabolic constraints encountered during pulmonary fibrosis, but also in response to a central adaptation or a defect of the respiratory effector.

Conclusion

Our results showed that pulmonary fibrosis-induced lung damage affect the central respiratory drive through their consequences on the ventilatory mechanics and/or on the gas exchanges, leading to an increase in the command to the respiratory muscles. The activation of the respiratory neurons was evidenced by neuroplasticity in response to this pulmonary damage, suggesting that the observed anomalies were not only related to peripheral lung mechanical effects but also to a central adaptation of the respiratory neural network.

Figures and tables

Table 1: Ventilatory parameters: Representation of ventilatory flow rate (V_E , in ml per min per g), tidal volume (V_T , in μl per g), respiratory rate (f_R , in cycles per min), inspiratory time to total time (T_i , T_{tot} , in sec), tidal volume to T_i (V_T/T_i , in μl per g per min) measured by whole-body plethysmography on non-anesthetized, free-moving animal.

		PBS group	BLM group
Survival (%)	J90	100	≈ 20
Body weight (g)	JO	24.3 ± 1.3	23.1 ± 1.3
	J90	33.1 ± 1.3 **	27.8 ± 2.3 *,####
V_E (ml.g⁻¹min⁻¹)	JO	2.16 ± 0.13	1.83 ± 0.13
	J90	1.81 ± 0.12	4.81 ± 0.13 ###
V_T ($\mu\text{l.g}^{-1}$)	JO	8.47 ± 0.61	7.27 ± 0.65
	J90	7.23 ± 1.22	13.87 ± 1.23###
f_R (c.min⁻¹)	JO	255 ± 32	255 ± 30
	J90	250 ± 23	346 ± 27 *,###
T_i/T_{tot}	JO	0.30 ± 0.11	0.29 ± 0.11
	J90	0.31 ± 0.13	0.34 ± 0.11 *,.#
V_T/T_i ($\mu\text{l.g.min}^{-1}$)	JO	0.12 ± 0.17	0.10 ± 0.13
	J90	0.16 ± 0.13	0.41 ± 0.14 ###

Table 2: Counting of positive neurons for FOSB/ Δ FOSB in the ponto-bulbar respiratory centers

	PBS group	BLM group
Solc	5.50 ± 2.16	10.95 ± 6.59**
Solm	5.93 ± 2.37	10.77 ± 2.35*
Solvl	4.54 ± 2.04	7.67 ± 1.75*
RTN/pFRG	5.15 ± 1.77	10.39 ± 5.68**
ROb	4.35 ± 1.75	6.60 ± 2.13
RMg	5.72 ± 1.56	12.49 ± 5.44**
RPa	5.58 ± 1.56	6.96 ± 2.11
12N	5.27 ± 2.53	6.69 ± 2.34

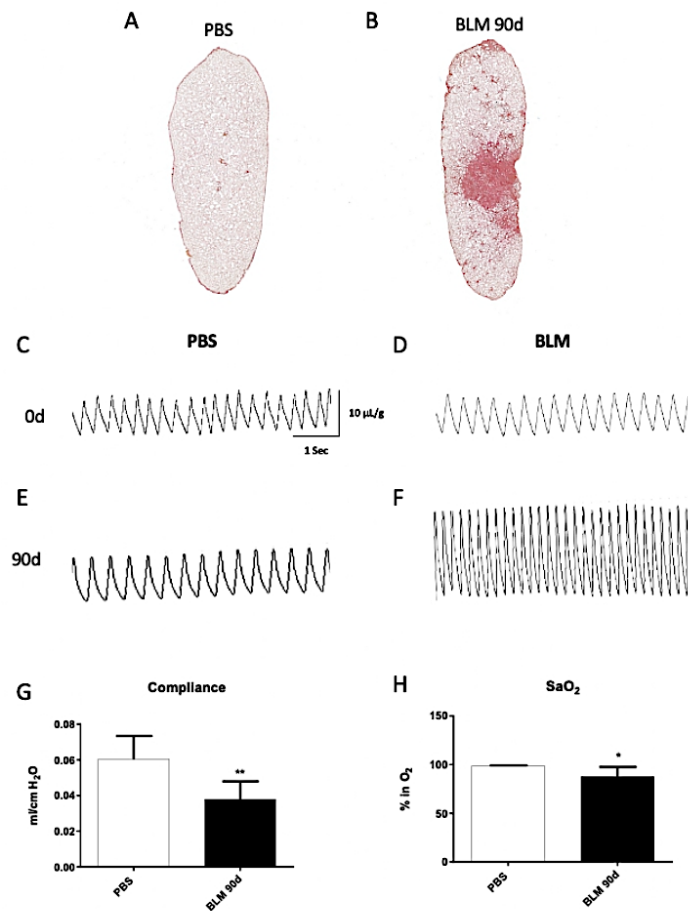


Figure 1: Measurement of ventilatory parameters of mice developing pulmonary fibrosis obtained by repeated instillations of bleomycin. Cartography of a 5µm thick section of lung stained with Sirius Red from PBS (A) and BLM (B) groups. A representative lung slice was shown for each group. Plethysmographic recording of breathing in PBS (C, E) or BLM (D, F) groups recorded at 0 days (C, D) and at the end of experimental induction of pulmonary fibrosis (90 days, E, F). Calibration bar in x-axis: 1 sec and y-axis: 10µl/g. (G) Measurement of lung compliance by covariance method (C_{cov} , ml/cm H₂O) using whole body plethysmography on anesthetized and tracheomized mice in the PBS (n=6) and BLM 90d (n=6) groups. (H) Measurement of peripheral oxygen saturation (SpO_2 , % in O₂) by pulse oximeter placed at the shaved neck of vigorous mice constituting the PBS (n=6) and BLM 90d (n=6) groups. All values were represented as mean ± SD, Mann-Whitney test was performed. * $p \leq 0,01$, ** $p \leq 0,001$.

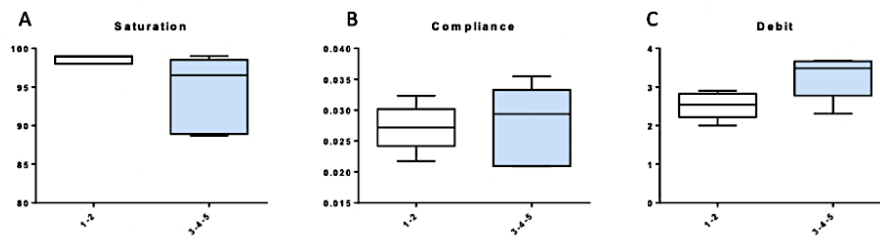


Figure 2: Histogram representing the correlations between the severity of lung damage and ventilatory functions. Scores of 1 to 2 represent lung injury representing less than 20% of the total lung area. Scores between 3 and 5 represent lung damage representing more than 20% of the total lung surface. A. Represents the correlation of blood oxygen saturation with the degree of severity of pulmonary fibrosis B. Represents the correlation of pulmonary compliance with the degree of severity of pulmonary fibrosis. C. Represents the correlation of flow rate with the degree of severity of pulmonary fibrosis.

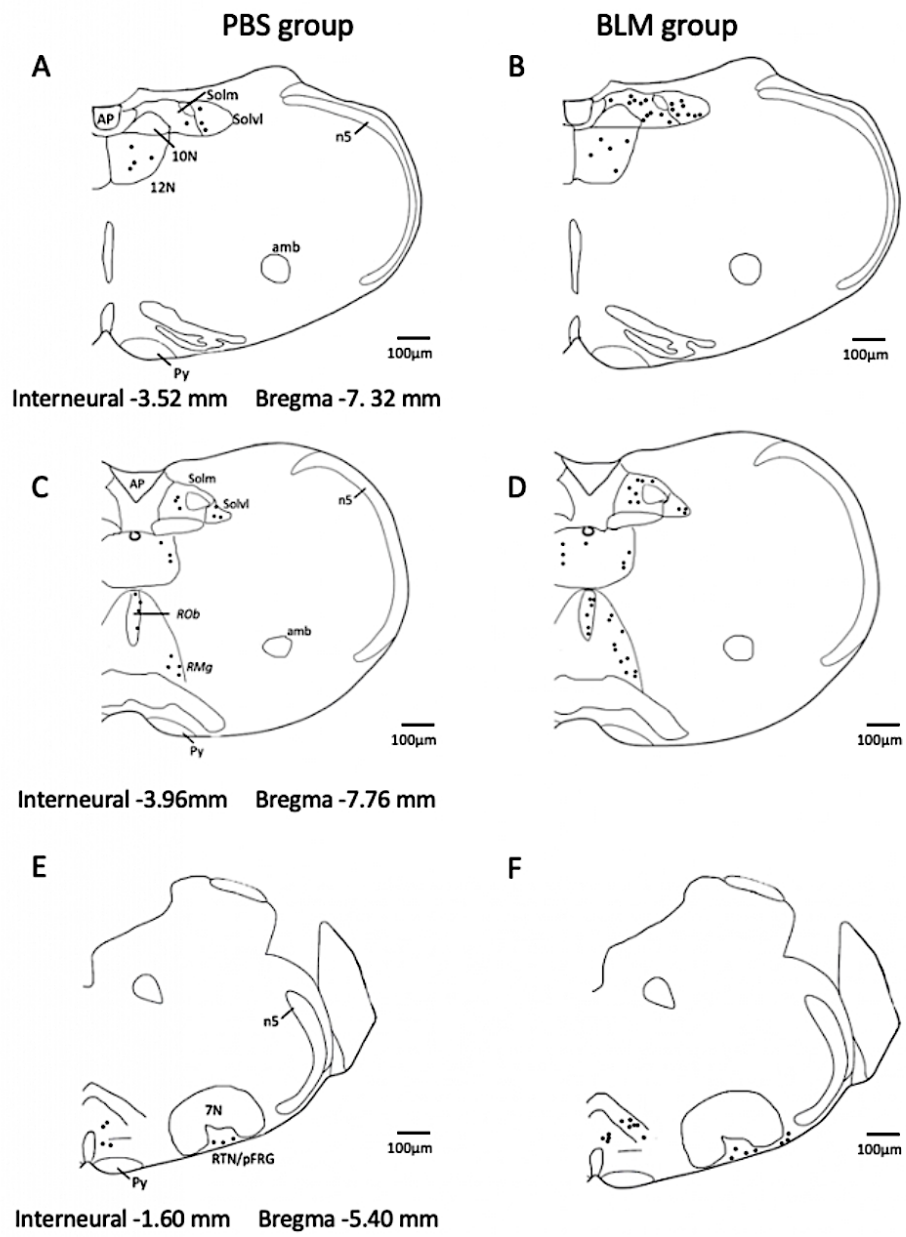


Figure 3: Representative labelling showing changes in FOSB/ Δ FOSB expression due to bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Drawing showing the distribution of the FOSB/ Δ FOSB positive cells (black dots) in the respiratory related structure in PBS (A, C, E) and BLM (B, D, F) groups. Scale bar = 100 μ m. Abbreviations: SolM: median part of nucleus of the solitary tract; SolVL: ventrolateral part of the nucleus of the solitary tract; raphe magnus nucleus (*RMg*); raphe pallidus nucleus (*RPa*); raphe obscurus nucleus (*ROb*); retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group (RTN/pFRG) and hypoglossal nucleus (12N).

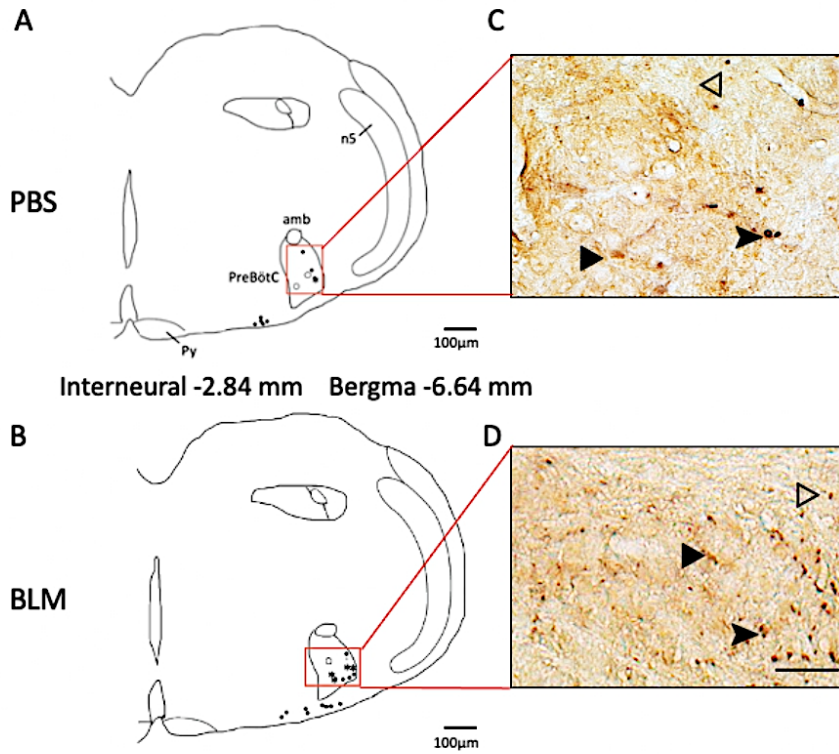


Figure 4: pulmonary fibrosis-induced FOSB/ Δ FOSB expression at the level of pre-Bötzinger complex. Drawing showing the distribution of the FOSB/ Δ FOSB positive cells (black dots), NK1-R positive cells (White dots), or both (Star) in the pre-Bötzinger complex in PBS (A) and BLM (B) Photomicrographs (C, D) below the drawing (A, B) correspond to the regions delimited in red. Black arrows indicate FOSB/ Δ FOSB positives cells, white arrows indicate NK1-R positives cells and grey arrows indicate double positives cells. Scale bar = 100 μ m for the drawing and 100 μ m for the photos

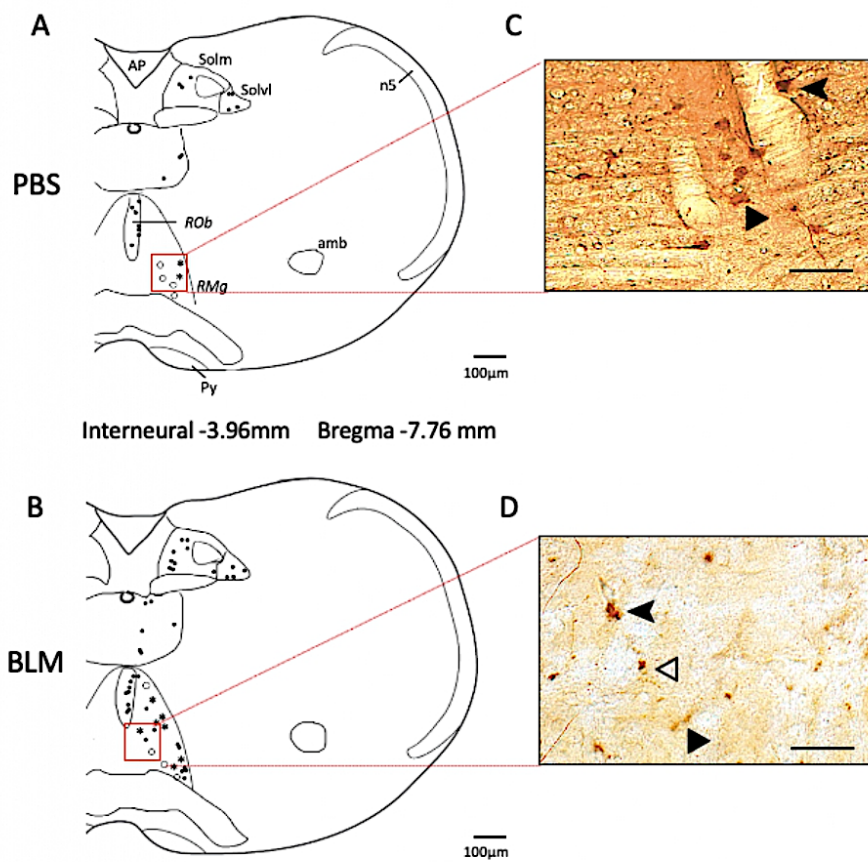


Figure 5: Some FOSB/ΔFOSB positive cells were serotonergic at the level of the *Raphe magnus*. Drawing showing the distribution of the FOSB/ΔFOSB positive cells (black dots), 5-HT positive cells (White dots), or both (Star) in the Raphe Magnus in PBS (A) and BLM (B). Photomicrographs (C, D) below the drawing (A, B) correspond to the regions delimited in red. Black arrows indicate FOSB/ΔFOSB positive cells, white arrow indicates NK1-R positive cells and grey arrows indicate double positive cells. Scale bar = 100μm for the drawing and 100μm for the photos.

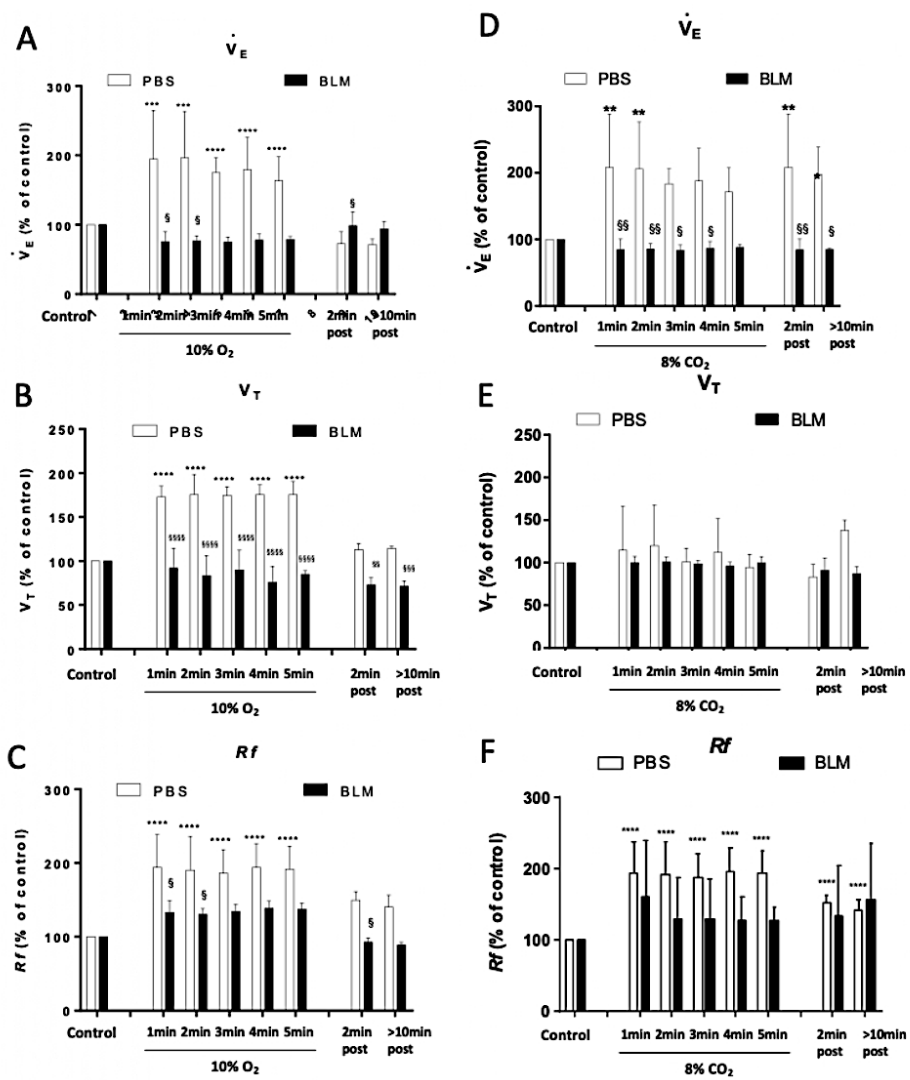


Figure 6: Ventilatory response to hypoxia and hypercapnia in mice developing pulmonary fibrosis. PBS (white bar) and BLM (black bar) mice were exposed to 10% O₂ (hypoxia; A, B, C) and 4% CO₂ (hypercapnia; D, E, F) for 10 minutes each and a 15-minute recovery period. (A) and (D) represent ventilatory flow (\dot{V}_E) in response to hypoxia and hypercapnia; (B) and (E) represent tidal volume (V_T) in response to hypoxia and hypercapnia; (C) and (F) represent respiratory rates (f_R) in response to hypoxia and hypercapnia.

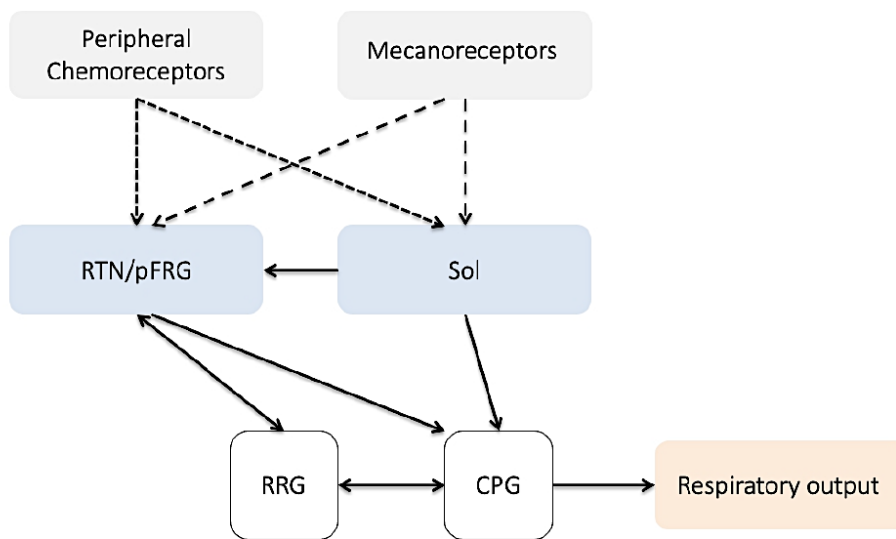


Figure 7: Schematic diagram showing the potential mechanism at the origin of the pulmonary fibrosis-induced neuroplasticity leading to increase of the ventilatory drive. Solid line indicates interconnection between respiratory structures; Fine dotted lines indicate afferences from peripheral chemoreceptors; Broad dotted lines indicate afferences from mecanoreceptor. Abbreviations: CPG: Central Pattern Generator, RRG: respiratory rhythm generator, RTN/pFRG: retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group; Sol: nucleus of the solitary tract.

References

- Arizono S, Furukawa T, Taniguchi H, et al (2020) Supplemental oxygen improves exercise capacity in IPF patients with exertional desaturation. *Respirology* 25:1152–1159. <https://doi.org/10.1111/resp.13829>
- Bartlett D, Tenney SM (1970) Control of breathing in experimental anemia. *Respir Physiol* 10:384–395. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(70\)90056-3](https://doi.org/10.1016/0034-5687(70)90056-3)
- Baum DM, Sausseureau M, Jeton F, et al (2018) Effect of gender on chronic intermittent hypoxic FosB expression in cardiorespiratory-related brain structures in mice. *Front Physiol* 9:1–16. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00788>
- Bendstrup E (2014) Idiopathic Pulmonary Fibrosis “ Diagnosis and Treatment. *Gen Med Open Access* 03:646–664. <https://doi.org/10.4172/2327-5146.1000161>
- Contreras RJ, Beckstead RM, Norgren R (1982) The central projections of the trigeminal, facial, glossopharyngeal and vagus nerves: an autoradiographic study in the rat. *J Auton Nerv Syst* 6:303–322. [https://doi.org/10.1016/0165-1838\(82\)90003-0](https://doi.org/10.1016/0165-1838(82)90003-0)
- Crystal RG, West, Weibel (1997) *The Lung: : Scientific Foundation* 2nd Edition
- Dean JB, Putnam RW (2010) The caudal solitary complex is a site of central CO₂ chemoreception and integration of multiple systems that regulate expired CO₂. *Respir Physiol Neurobiol* 173:274–287. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2010.07.002>
- Degryse AL, Tanjore H, Xu XC, et al (2010) Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 299:442–452. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00026.2010>
- Dempsey OJ (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>
- Di Marco AF, Kelsen SG, Cherniack NS, Gothe B (1983) Occlusion pressure and breathing pattern in patients with interstitial lung disease. *Am Rev Respir Dis* 128:958–959. <https://doi.org/10.1164/arrd.1983.128.5.958a>
- Drorbaugh JE, Fenn WO (1955) A BAROMETRIC METHOD FOR MEASURING VENTILATION IN NEWBORN INFANTS. *Pediatrics* 16:81–87
- Forster H V. (2003) Invited Review: Plasticity in the control of breathing following sensory denervation. *J Appl Physiol* 94:784–794
- FUMEAUX T, ROTHMEIER C, JOLLIET P (2003) Les fibroses pulmonaires en réanimation Pulmonary fibrosis in the intensive care unit. *Réanimation* 12:37–45. [https://doi.org/10.1016/s1624-0693\(02\)00007-5](https://doi.org/10.1016/s1624-0693(02)00007-5)
- Funk GD, Greer JJ (2013) The rhythmic, transverse medullary slice preparation in respiratory neurobiology: Contributions and caveats. *Respir Physiol Neurobiol* 186:236–253. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2013.01.011>
- Getsy PM, Mayer CA, MacFarlane PM, et al (2019) Acute lung injury in neonatal rats causes postsynaptic depression in nucleus tractus solitarii second-order neurons. *Respir Physiol Neurobiol* 269:103250. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2019.103250>

- Gille T, Didier M, Rotenberg C, et al (2018) Intermittent hypoxia increases the severity of bleomycin-induced lung injury in mice. *Oxid Med Cell Longev* 2018:.
<https://doi.org/10.1155/2018/1240192>
- Gray PA, Janczewski WA, Mellen N, et al (2001) Normal breathing requires preBötzinger complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons. *Nat Neurosci* 4:927–930.
<https://doi.org/10.1038/nn0901-927>
- Javaheri S, Sicilian L (1992) Lung function, breathing pattern, and gas exchange in interstitial lung disease. *Bmj* 47:93–97
- Kalia M, Mesulam M -M (1980) Brain stem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat: I. The cervical vagus and nodose ganglion. *J Comp Neurol* 193:435–465. <https://doi.org/10.1002/cne.901930210>
- Khoo MCK, Kronauer RE, Strohl KP, Slutsky AS (1982) Factors inducing periodic breathing in humans: A general model. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 53:644–659.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1982.53.3.644>
- King TE, Pardo A, Selman M (2011) Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 378:1949–1961.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60052-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60052-4)
- Lahiri S, Maret K, Sherpa MG (1983) Dependence of high altitude sleep apnea on ventilatory sensitivity to hypoxia. *Respir Physiol* 52:281–301. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(83\)90086-5](https://doi.org/10.1016/0034-5687(83)90086-5)
- Launois S, Clergue F, Medrano G, et al (1991) The control of respiration in pulmonary fibrosis. The effect of O₂ and CO₂. *Rev Mal Respir* 8:67–73
- Lax S, Wilson MR, Takata M, Thickett DR (2014) Using a non-invasive assessment of lung injury in a murine model of acute lung injury. *BMJ Open Respir Res* 1:1–8.
<https://doi.org/10.1136/bmjresp-2013-000014>
- Manali ED, Moschos C, Triantafillidou C, et al (2011) Static and dynamic mechanics of the murine lung after intratracheal bleomycin. *BMC Pulm Med* 11:33. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-11-33>
- Maszczyk Z, Radwan L, Kozirowski A (1990) Control of breathing in patients with mechanical disorders of the lung. *Pneumonol Pol*
- Meerhaeghe A Van, Scano G, Sergysels R, et al (1981) Respiratory drive and ventilatory pattern during exercise in interstitial lung disease. *Bull Eur Physiopathol Respir*
- Milic Emili J, Grunstein MM (1976) Drive and Timing Components of Ventilation. *Chest* 70:131–133.
<https://doi.org/10.1378/chest.70.1.131>
- Mitchell GS, Johnson stephen (2001) plasticity in respiratory motor control. *J Appl Physiol* 90:1593–1599
- Nattie E, Li A (2012) Central chemoreceptors: Locations and functions. *Compr Physiol* 2:221–254.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c100083>
- Nava S, Rubini F (1999) Lung and chest wall mechanics in ventilated patients with end stage idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 54:390–395. <https://doi.org/10.1136/thx.54.5.390>
- Niane LM, Donnelly DF, Joseph V, Bairam A (2011) Ventilatory and carotid body chemoreceptor responses to purinergic P2X receptor antagonists in newborn rats. *J Appl Physiol* 110:83–94.

- <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00871.2010>
- Olukogbon KL, Thomas P, Colasanti R, et al (2016) Breathing pattern and breathlessness in idiopathic pulmonary fibrosis: An observational study. *Respirology* 21:344–349. <https://doi.org/10.1111/resp.12686>
- Paxinos G, Franklin K (2012) Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. Psychology
- Perrin-Terrin AS, Jeton F, Pichon A, et al (2016) The c-FOS protein immunohistological detection: A useful tool as a marker of central pathways involved in specific physiological responses in vivo and ex vivo. *J Vis Exp* 2016:1–9. <https://doi.org/10.3791/53613>
- Phillips JE, Peng R, Burns L, et al (2012) Bleomycin induced lung fibrosis increases work of breathing in the mouse. *Pulm Pharmacol Ther* 25:281–285. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2011.10.001>
- Plantier L, Cazes A, Dinh-Xuan AT, et al (2018) Physiology of the lung in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir Rev* 27:1–14. <https://doi.org/10.1183/16000617.0062-2017>
- Raghu G, Collard HR, Egan JJ, et al (2011) An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: Idiopathic pulmonary fibrosis: Evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 183:788–824. <https://doi.org/10.1164/rccm.2009-040GL>
- Raux M, Fiamma MN, Similowski T, Straus C (2007) Contrôle de la ventilation : physiologie et exploration en réanimation. *Reanimation* 16:511–520. <https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2007.09.008>
- Redente EF, Black BP, Backos DS, et al (2021) Persistent, progressive pulmonary fibrosis and epithelial remodeling in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 64:669–676. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2020-0542MA>
- Rhoads GG, Brody JS (1969) Idiopathic alveolar hypoventilation: clinical spectrum. *Ann Intern Med* 71:271–278. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-71-2-271>
- Roncoroni AJ, Figueroa Casas J., Puy RJ., et al (1975) Idiopathic Interstitial Pulmonary Fibrosis with Hypercapnia. 32:
- Samillan V, Haider T, Vogel J, et al (2013) Combination of erythropoietin and sildenafil can effectively attenuate hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Pulm Circ* 3:898–907. <https://doi.org/10.1086/674758>
- Schelegle ES, Walby WF, Mansoor JK, Chen AT (2001) Lung vagal afferent activity in rats with bleomycin-induced lung fibrosis. *Respir Physiol* 126:9–27. [https://doi.org/10.1016/S0034-5687\(00\)00228-0](https://doi.org/10.1016/S0034-5687(00)00228-0)
- Takakura ACT, Santos Moreira T, Colombari E, et al (2006) Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats. *J Physiol* 572:503–523. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.103788>
- Torrealba F, Claps A (1988) The carotid sinus connections: a WGA-HRP study in the cat. *Brain Res* 455:134–143. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90122-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90122-9)
- Undem BJ, Kollarik M (2005) The role of vagal afferent nerves in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2:355–360. <https://doi.org/10.1513/pats.200504-033SR>
- Voituron N, Zanella S, Menuet C, et al (2009) Early breathing defects after moderate hypoxia or

hypercapnia in a mouse model of Rett syndrome. *Respir Physiol Neurobiol* 168:109–118.
<https://doi.org/10.1016/j.resp.2009.05.013>

Vuorio EI, Makela JK, Vuorio TK, et al (1989) Characterization of excessive collagen production during development of pulmonary fibrosis induced by chronic silica inhalation in rats. *Br J Exp Pathol* 70:305–315

Conclusion générale de la partie II

L'analyse de la fonction pulmonaire des souris développant une fibrose pulmonaire par six instillations répétées BLM montre une diminution de la compliance pulmonaire, de leur saturation en O₂ et une altération des variables ventilatoires. On observe chez ces souris, une augmentation de la ventilation supportée par une augmentation de la fréquence respiratoire et du volume courant. L'analyse des structures respiratoires ponto-bulbaires nous a permis d'identifier les structures support de la neuroplasticité comme les sous-divisions commissurales et médianes du noyau du tractus solitaire (c-NTS et vl-NTS), structures décrites comme étant les sites de projection des afférences périphériques. Nous observons également une activation du préBötC, reflet de l'augmentation de la fréquence respiratoire. En outre, une activation du noyau rétrotrapézoïde / groupe respiratoire parafacial (RTN/pFRG) et des *Raphés bulbaires (RMg)* est observée. Ces structures sont décrites pour avoir un rôle dans la régulation de la ventilation en réponse à une variation d'O₂, CO₂ et/ou pH. De plus, nous observons une altération de la réponse ventilatoire à l'hypoxie et à l'hypercapnie. Ces altérations peuvent être liées à une modification du fonctionnement du réseau neuronal respiratoire et/ou à une modification du seuil de sensibilité des chémorécepteurs ou des mécanorécepteurs.

Partie III : Impact du syndrome d'apnée obstructive du sommeil sur la fibrose pulmonaire idiopathique

Introduction

Nous avons vu dans l'introduction la forte prévalence des SAHOS modérés à sévères chez les patients présentant une FPI (Lancaster et al. 2009a; Gille et al. 2017). Le SAHOS, de par ses épisodes récurrents d'hypoxie-réoxygénation rencontrés au cours du sommeil liés aux apnées obstructives constituent un stress d'HIC pouvant participer au développement ou à l'aggravation de la fibrose pulmonaire. Une étude réalisée *in vivo* au sein de notre laboratoire montre que l'exposition à l'HIC d'un modèle murin de fibrose pulmonaire induit par une forte dose de bléomycine, conduit à une aggravation de la fibrose pulmonaire associée à l'apparition d'un stress oxydant et d'une réponse inflammatoire importante (Gille et al. 2018). Par ailleurs, pendant ma thèse nous avons identifié l'implication de marqueurs pro-fibrosants et du stress du RE dans cet effet (Haine et al. 2021a). En outre, les phases d'hypoxie- réoxygénation rencontrées dans le SAHOS peuvent avoir des effets sur le réseau neuronal respiratoire ainsi que sur la fonction respiratoire et le réseau de neurones respiratoires. À ce jour, ces différents éléments n'ont jamais été abordés dans un contexte de fibrose pulmonaire.

Pour cela, nous proposons de documenter l'impact de l'HIC sur le développement, la sévérité ou l'exacerbation de la fibrose mais également son impact sur la commande centrale respiratoire.

Les résultats de cette Partie III seront présentés en trois grands chapitres :

Chapitre I : Étude moléculaire de l'impact de l'hypoxie intermittente chronique sur la sévérité de la fibrose pulmonaire (Ces résultats font l'objet d'un article publié récemment dans la revue *life* (Haine et al. 2021a).

Chapitre II : Impact d'une exposition prolongée à de l'hypoxie intermittente chronique au niveau pulmonaire et sur l'élaboration de la commande centrale respiratoire.

Chapitre III : Impact d'une exposition à de l'hypoxie intermittente chronique sur la commande centrale respiratoire dans un contexte de fibrose pulmonaire.

Chapitre I- Étude moléculaire de l'impact de l'hypoxie intermittente chronique sur la sévérité de la fibrose pulmonaire

Introduction

De nombreuses études ont mis en évidence la forte prévalence des SAHOS dans la FPI, ainsi qu'un effet aggravant de l'HIC sur la fibrose pulmonaire induite expérimentalement (Braun et al. 2018; Gille et al. 2018; KANG et al. 2018). Cependant, les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'origine de ces aggravations restent méconnus.

Dans une étude à laquelle j'ai contribué nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires impliqués dans cet effet aggravant, et à la place que peut jouer le SAHOS dans la fibrogénèse, en testant un protocole de préexposition ou de co-exposition des animaux à de l'HIC avant l'initiation de la fibrose expérimentale.



Ces travaux réalisés sur un modèle murin de fibrose pulmonaire obtenue par instillation unique de bléomycine ont conduit à l'obtention de résultats récemment publiés dans la revue *Life*

Résultats

Les résultats de ce chapitre ont fait l'objet d'un article publié dans le journal « Life » en 2021.

Article

Sleep Apnea in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Molecular Investigation in an Experimental Model of Fibrosis and Intermittent Hypoxia

Liasmine Haine ¹, Juliette Bravais ¹, Céline-Hivda Yegen ¹, Jean-Francois Bernaudin ^{1,2}, Dominique Marchant ¹, Carole Planès ^{1,3}, Nicolas Voituron ^{1,4,†}  and Emilie Boncoeur ^{1,*,†} 

¹ UMR INSERM U1272 Hypoxie & Poumon, Université Sorbonne Paris Nord, 93017 Bobigny, France; liasmine.haine@univ-paris13.fr (L.H.); juliette.bravais@outlook.fr (J.B.); celinehivda.yegen@univ-paris13.fr (C.-H.Y.); jf.bernaudin-univ@orange.fr (J.-F.B.); dominique.marchant@univ-paris13.fr (D.M.); carole.planes@aphp.fr (C.P.); nicolas.voituron@univ-paris13.fr (N.V.)

² Faculté de Médecine, Sorbonne Université, 75012 Paris, France

³ Service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles, Hôpital Avicenne, APHP, Hôpitaux de Paris, 93000 Bobigny, France

⁴ Département STAPS, Université Sorbonne Paris-Nord, 93000 Bobigny, France

* Correspondence: emilie.boncoeur@univ-paris13.fr

† Equally contributed to the work.



Citation: Haine, L.; Bravais, J.; Yegen, C.-H.; Bernaudin, J.-F.; Marchant, D.; Planès, C.; Voituron, N.; Boncoeur, E. Sleep Apnea in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Molecular Investigation in an Experimental Model of Fibrosis and Intermittent Hypoxia. *Life* **2021**, *11*, 973. <https://doi.org/10.3390/life11090973>

Academic Editors: Jean-Paul Richalet and Marta Bueno

Received: 27 August 2021

Accepted: 10 September 2021

Published: 15 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Background: High prevalence of obstructive sleep apnea (OSA) is reported in incident and prevalent forms of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). We previously reported that Intermittent Hypoxia (IH), the major pathogenic element of OSA, worsens experimental lung fibrosis. Our objective was to investigate the molecular mechanisms involved. Methods: Impact of IH was evaluated on C57BL/6J mice developing lung fibrosis after intratracheal instillation of Bleomycin (BLM). Mice were Pre-exposed 14 days to IH before induction of lung fibrosis or Co-challenged with IH and BLM for 14 days. Weight loss and survival were daily monitored. After experimentations, lungs were sampled for histology, and protein and RNA were extracted. Results: Co-challenge or Pre-exposure of IH and BLM induced weight loss, increased tissue injury and collagen deposition, and pro-fibrotic markers. Major worsening effects of IH exposure on lung fibrosis were observed when mice were Pre-exposed to IH before developing lung fibrosis with a strong increase in sXBP1 and ATF6N ER stress markers. Conclusion: Our results showed that IH exacerbates BLM-induced lung fibrosis more markedly when IH precedes lung fibrosis induction, and that this is associated with an enhancement of ER stress markers.

Keywords: obstructive sleep apnea; idiopathic pulmonary fibrosis; ER stress; intermittent hypoxia

1. Introduction

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is the most common form of chronic interstitial lung disease in elderly adults [1,2]. The well-accepted hypothesis to explain the pathogenesis of the disease is related to recurrent micro-aggressions of the alveolar epithelium by various endogenous and exogenous factors (viruses, cigarette smoke, gastroesophageal reflux, pollutants, etc.). Indeed, repetitive alveolar aggressions induce a deregulation of epithelial–mesenchymal interaction and lead to an aberrant repair of the injured epithelium [2]. Alveolar epithelial cell (AEC) phenotype and function are altered and fibroblast proliferation is enhanced. AECs undergo apoptosis [3,4] and/or epithelial–mesenchymal transition (EMT) [5,6]. Moreover, fibroblasts are activated into myofibroblasts. A characteristic micro-environment is formed, principally made up of pro-fibrotic mediators (TGF β , PDGF, CTGF, etc.) [7]. Accumulation of extracellular matrix (ECM) is then observed, which leads to parenchymal rigidity and contributes to an alteration of lung function [2].

Recently, several studies reported the high prevalence of obstructive sleep apnea (OSA) syndrome in IPF patients [8,9]. Indeed, 62% of patients with newly diagnosed IPF present a moderate to severe OSA [8], suggesting that OSA could precede (or at least occur at the same time as) the onset of IPF [8]. Interestingly, the use of OSA therapy by continuous positive airway pressure (CPAP) was shown to be effective on some clinical aspects, improving daily living activities and quality of sleep in IPF patients [10]. However, the impact of OSA on IPF development is unclear [9], and the molecular mechanisms involved in these effects are poorly understood.

OSA consists of repeated upper airway obstructions leading to transient reduction in inspiratory air flow caused by increased resistance in the upper airways [11]. These obstructions induce hypercapnia and hypoxemia [12]. Thus, OSA is characterized by cyclic episodes of hypoxia–re-oxygenation during sleep named “intermittent hypoxia, (IH)” which is particularly deleterious through the generation of oxidative stress and inflammation response and is considered as a key factor in OSA-related comorbidities [13,14].

Interestingly, IH exposure, the main pathogenic element of OSA, negatively impacts lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury [15]. Indeed, we and others showed that IH worsens the severity of lung fibrosis in rodent models of Bleomycin (BLM)-induced lung fibrosis [16,17] by an undefined molecular mechanism.

Among the molecular mechanisms that may be involved both in IH and in IPF pathogenesis, endoplasmic reticulum (ER) stress seems to play a significant role. ER stress markers have been found overexpressed in IPF biopsies [18] as well as in mouse models of Bleomycin-induced lung fibrosis [19], and in the heart and lung of mice exposed to intermittent hypoxia [20,21]. ER is involved in calcium homeostasis and in the synthesis, maturation and folding of proteins. When 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–ATF4) and ATF6 are initiated by the release and the shifting of the GRP78 and GRP75 chaperone proteins on unfolded proteins [22]. As a consequence, UPR will moderate the overall proteins synthesis, promote their degradation, or induce apoptosis or change in cells phenotype by EMT [19,23,24]. Interestingly, ER stress-induced lung apoptosis and fibrosis have recently been observed in the lung of mice exposed to IH [21].

In this study, we document the impact of IH on lung fibrosis severity, and we investigate the molecular mechanisms involved in the worsening effect of IH on lung fibrosis and the impact of a pre-exposure to IH. We show that IH increases ECM deposition and the expression of pro-fibrotic factors. Moreover, we evidence that pre-exposure to IH before the induction of lung fibrosis enhances the expression of ER stress markers.

2. Materials and Methods

2.1. Ethical Approval

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

2.2. Animals

Experiments were performed in 54 C57BL/6J male mice (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France), about 8 weeks old. All animals were housed in standard conditions in a 12 h/12 h light/dark cycle, at an ambient temperature of 20–22 °C, and had *ad libitum* access to water and food.

2.3. Lung Fibrosis Induction

Lung fibrosis was induced by a single intra-tracheal instillation of Bleomycin (BLM, Bellon–Sanofi, Aventis, France) at 2 IU/g in 100 µL of PBS. The control group was instilled with 100 µL of PBS. The same qualified experimenter always performed instillations.

Weight and survival were monitored daily. Induction and presence of fibrosis injury was confirmed by histological analysis (Hematoxylin–Eosin and Aniline blue staining).

2.4. Experimental Design

To document the impact of the main pathogenic aspect of OSA, i.e., hypoxia–reoxygenation, we exposed mice to intermittent hypoxia.

Mice were exposed to intermittent hypoxia (IH; 30 cycles/hour, 8 h/day, Nadir 7% O₂) or intermittent air (IA) (day-14). Fourteen days later, Bleomycin (BLM) (2 IU/g) or PBS instillations were performed (day 0). Mice were then exposed to IH or IA at d1 and sacrificed 2 weeks later (d15). Six experimental groups of at least 5 mice were compared: Control (12 mice); IH exposure (14 d, 9 mice); IH exposure (28 d, 8 mice); BLM exposure (11 mice); Co-challenge (5 mice) and Pre-exposure (9 mice) (Figure 1).

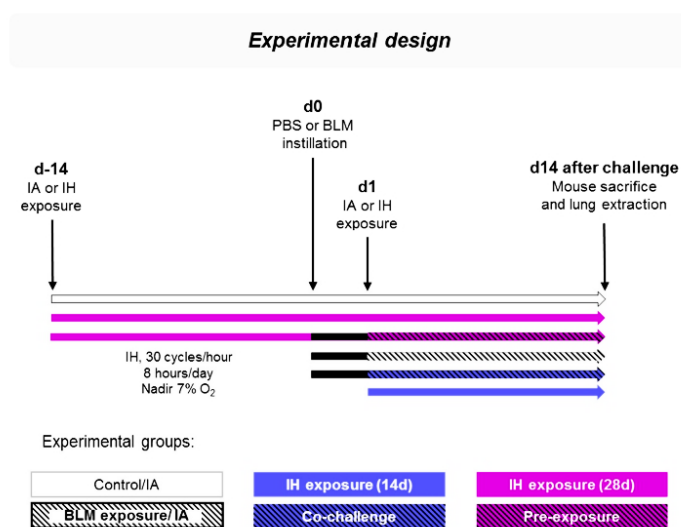


Figure 1. Experimental design of Bleomycin instillation and Intermittent Hypoxia exposure. Mice were exposed to Intermittent Hypoxia (IH; 30 cycles/hour, 8 h/day, Nadir 7% O₂, magenta color) or intermittent air (IA, white color) (day-14). Fourteen days later, Bleomycin (BLM, black color) or PBS was instilled intratracheally (day 0). Mice were then exposed at d1 to IA or IH; black hatched bars are for BLM/IA exposure, blue color for IH exposure (14 d), blue hatched black for the Co-challenge group, and magenta hatched black for the Pre-exposure. Two weeks later (d14), mice were sacrificed and lungs were extracted for molecular and histological analyses.

2.5. Intermittent Hypoxia Exposure

As previously described [17], mice were placed in a customized plexiglas chamber (VelO₂X, Baker Ruskinn-Alliance Bio Expertise, France) associated with an automated nitrogen/air delivery system (Iconic, Baker Ruskinn-Alliance Bio Expertise, France). 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 [25], the nadir was reached by adding nitrogen slowly (around 58 s) and the reoxygenation was rapid through oxygen flushing (around 26 s). Mice were exposed for 30 cycles/hour, 8 h/day (during their sleep period) for 14 or 28 days. Control animals were exposed to IA in an identical chamber flushed with the same alternating period with air.

2.6. 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 the lung, trachea was cannulated and a thoracotomy was performed. Lung was rinsed by an injection of physiological saline through the pulmonary artery. 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 were placed in 20 mL 4% paraformaldehyde for 24 h and paraffin embedded. Sections were cut at 5- μm thickness for histology.

2.7. Histological Staining

Left pulmonary lobe sections were deparaffinized with xylene, rehydrated and rinsed before Haematoxylin–Eosin (H&E) or Aniline blue (AB) staining. For H&E staining, 5- μm lung sections were consequently stained with Haematoxylin (RAL Diagnostics, Bordeaux, France, 362850-2500, 10 min), 80% ethanol (5 min) and alcoholic Eosin (VWR International, Rosny-sous-Bois, France, 10047103, 2 min). For AB staining, 5- μm lung sections were stained with aniline blue solution (VWR International, Rosny-sous-Bois 34015.182, 5 min), and rinsed with 0.1% acetic acid solution (2 min). After H&E or AB staining process, sections were washed, mounted, dehydrated with ethanol, and cleared with xylene and cover-slipped using mounting medium for microscopic analysis.

2.8. Lung Injury and Fibrosis Quantification

Lung injury was estimated by the quantification of tissue density after H&E staining using HistoLab® Image Analysis Software version 10.1 (Microvision Instrument, Every, France). The normally aerated alveolar spaces area was calculated as well as the total area of the examined left lung section. Subsequently, the area occupied by the injured tissue was deduced and reported as the percentage of the total lung section.

Fibrosis (i.e., collagen deposition) was evaluated by the quantification of the deep blue AB staining using HistoLab® Image Analysis Software version 10.1 (Microvision Instrument, Every, France). Collagen deposition area was reported to the total area of the left lung section.

2.9. Quantitative Real-Time Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction

Total RNA was isolated from right lung tissues (superior lobe) using Trizol reagent protocol (Thermo Scientific, Illkirch, France). In this process, 1 μg of total RNA was used to synthesize cDNA using Maxima first strand cDNA synthesis kit for RT-qPCR (Thermo Scientific, Illkirch, France) according to the manufacturer's instructions.

Resulting cDNAs were diluted to 1/10⁶ and amplified by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) using SYBR Green (Absolute SYBR Green Rox Mix; Thermo Scientific, Illkirch, France) with specific gene primers designed to have 25–30 cycle threshold values (Table 1).

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

Gene	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
<i>Collagen 1a1</i>	GTGGTGACAAGGGTGAGACA	GAGAACCAGGAGAACCAGGA
<i>Collagen 3a1</i>	TACACCTGCTCCTGTGCTTC	CATTCTCCCACTCCAGACT
<i>Serpin 1</i>	GCACAACCCGACAGAGACAA	ATGAAGGCGTCTCTCCAC
<i>Cxcl 12</i>	CCTTCAGATTGTGCAAGGCTG	TCCTTTGGGCTGTGTGCTT
<i>Pdgf β</i>	TCGCCTGCAAGTGTGAGACA	CCGAATGGTCACCCGAGCTT
18S	GTA AGT GCG GGC CAT AAG CTT	AGT CAA GTT CGA CCG TCT TCT CA

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

2.10. Lung Protein Extraction and Immunoblotting Analysis

Total proteins were isolated from right lung (inferior lobe). Tissues samples were 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 (Thermo Scientific, Illkirch, France). Proteins concentration was determined using BCA kit (Thermo Scientific, Illkirch, France) according to the manufacturer's instructions.

Forty micrograms (40 μ g) of proteins were used for western blotting according to standard procedures. Briefly, proteins were electrophoresed in denaturized 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.

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

Antibodies (Anti-)	Type	Host	Dilution	Reference	Manufacturer
β -ACTIN	Primary antibodies	Mouse	1/5000	A5316	Sigma
ATF6-N		Mouse	1/1000	Clone 1-7 MAB 6762	Abnova
ATF4		Rabbit	1/1000	SC-200 (C-20)	Santa Cruz
GRP 78		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 antibodies	Goat	1/3000	P0447	Dako
Anti-rabbit IgG HRP		Goat	1/3000	P0448	Dako

2.11. Data and Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism[®] software version 9. Results are presented as means \pm standard deviations (SD). D'Agostino–Pearson omnibus normality test was used to assess the distribution of the data.

Friedman test followed by Dunn's multiple comparisons test was performed to estimate the difference in mice weight as compared to initial weight. T-test or Mann–Whitney test were applied to compare the difference in mice weight between control group and other three groups and between Co-challenge or Pre-exposure condition versus BLM-challenged group. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Mann–Whitney test was performed to compare the effect of Bleomycin challenge, intermittent hypoxia exposure (14 d or 28 d), Co-challenge or Pre-exposure condition versus control group at the histological and molecular levels and the effect. This test was also applied to compare differences between the Co-challenge group or Pre-exposure group versus BLM-exposure group. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Intermittent Hypoxia Promotes Tissue Remodelling and Collagen Deposition That Worsens BLM-Induced Lung Fibrosis

Animals were exposed to IH and/or BLM as presented in Figure 1.

No mortality was observed in the six groups: control, IH exposure (14 d), Co-challenge, BLM exposure, IH exposure (28 d), Pre-exposure (data not shown). Intermittent hypoxia

exposure or BLM instillation alone did not induce a body weight loss after 14 or 28 days (Figure 2A and Figure 2B, respectively). As compared to BLM alone, double challenge of BLM instillation and IH exposure leads to a significant weight loss from the fifth days after BLM instillation (Figure 2A, $p = 0.01$). The pre-conditioning with 14 days of IH before the double challenge (Pre-exposure group) leads to a significant weight decrease occurring the next days after BLM instillation (Figure 2B, $p = 0.032$). Impact of IH alone or in co-treatment with BLM on lung fibrosis was documented by the measurement of lung injury and collagen deposition on tissue sections (Figure 2C). Lung injury was documented by Haematoxylin and Eosin (H&E) staining (Figure 2C upper panel), and fibrotic areas were estimated as the deep blue areas after aniline blue (AB) staining (Figure 2C lower panel).

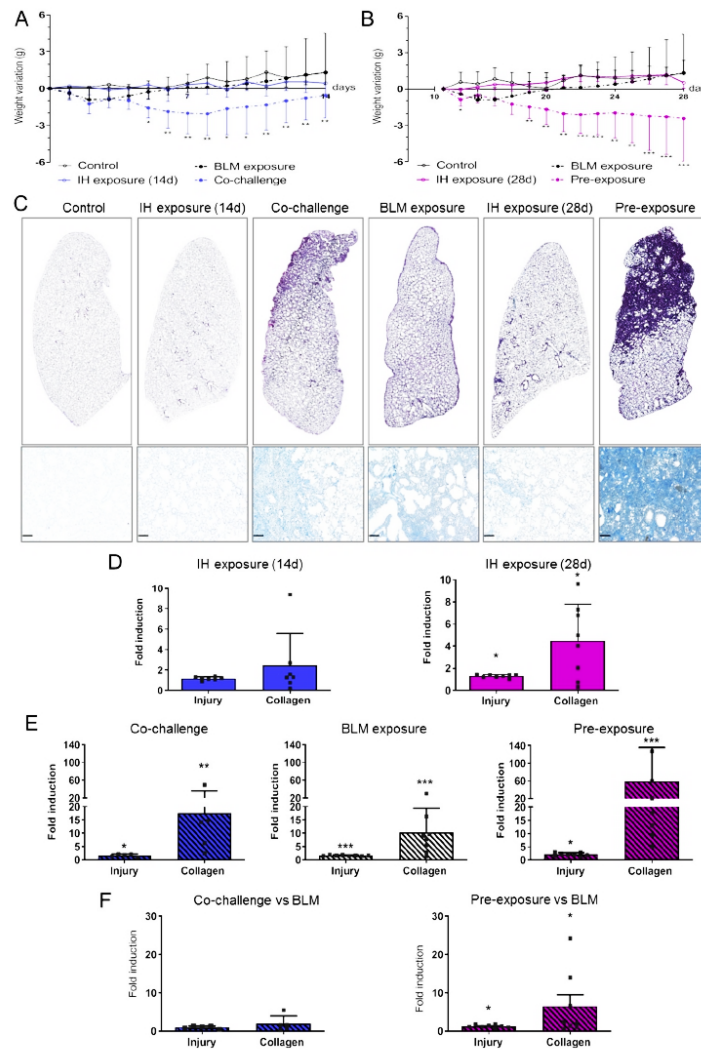


Figure 2. The effect of Bleomycin instillation and or intermittent hypoxia exposure on lung injury and lung collagen

deposition. Bleomycin instillation and intermittent hypoxia exposure were performed according to the experimental design. (A) Variation of mouse body weights in the Co-challenge (14 d) protocol; (B) Variation of mouse body weights in the Pre-exposure (28 d) protocol. Weight loss or gain was calculated by the difference between the daily mice weight (dx) and the initial mice weight at day 0 (Δ weight = dx – d0). Friedman test was performed to evaluate the difference in delta weight relative to initial weight (Δ weight (dx – d0) versus initial weight at d0). Difference on delta weight between Co-challenged or Pre-exposed group versus BLM exposure group was evaluated by T-test or Mann–Whitney test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). (C) Histological staining of lung sections. Haematoxylin-eosin (H&E) staining was used to assess lung remodelling (upper panel) and Aniline Blue staining (AB) for visualization of lung collagen deposition (lower panel). Five μ m sections of paraffin-embedded left lung were prepared from mice exposed to the experimental design. H&E results were represented by cartography of total left lung section area using Cartography[®] software. Pictures shown are representative of multiple experiments ($n \geq 5$) (D,E) Lung injury was estimated by the quantification of tissue density after H&E staining using HistoLab[®] Image Analysis Software. The normally aerated alveolar spaces area was calculated as the total area of the examined left lung section. Subsequently, the area occupied by the injured tissue was deduced and reported as the percentage of the total lung section. Fibrosis *ie.* collagen deposition was evaluated by the quantification of the deep blue AB staining using HistoLab[®] Image Analysis Software. Collagen deposition area was reported to the total area of the left lung section. The effects of IH exposure (14 d, $n = 7$ or 28 d, $n = 8$), BLM exposure ($n = 8$), Co-challenge ($n = 5$) or Pre-exposure ($n = 8$) were presented as fold induction normalized to the mean value of control group and reported to 1. Each “■” represent one animal included in the protocol. Raw data were submitted to Mann–Whitney test to compare each group with control group (Control group versus others groups, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Y axis is represented in two segments with both bottom and top at 50% length. (F) Co-challenge and Pre-exposure experimental conditions were compared to BLM exposure alone. The effects of Co-challenge ($n = 5$) or Pre-exposure ($n = 8$) are presented as fold induction normalized to the mean value of BLM exposure group and reported to 1. Each “■” represent one animal included in the protocol. Raw data were submitted to Mann–Whitney test to compare each group with BLM exposure group (BLM exposure group versus others groups, * $p < 0.05$).

A 14-day IH exposure did not induce remarkable modification in lung morphology, and no significant increase in lung injury and collagen deposition has been observed (Figure 2C,D). Co-challenge and Pre-exposure with IH as well as BLM exposure alone induced architectural changes with epithelium damage and fibrosis evidenced by collagen deposition (Figure 2C). Double challenge induced parenchymal remodelling with compact lung structure and alveolar collapse (H&E staining, Figure 2C), a reduction of alveolar spaces (Figure 2C), and an excessive extracellular matrix synthesis and collagen deposition (Figure 2C,D). This observation was more pronounced when mice where pre-exposed 14 days to IH before the double challenge. In this condition, we observed a severe interstitial thickening and an accentuated alveolar collapse with a total loss of alveolar space (H&E staining, Figure 2C upper panel). Furthermore, IH pre-exposure induced an excessive extracellular matrix synthesis with an important proportion of collagen deposition (AB staining, Figure 2C lower panel). These observations were confirmed by the quantification of histological abnormalities, showing a significant increase in tissue remodelling and collagen deposition (Figure 2D,E). When comparing the Co-challenge or the Pre-exposure effect to the BLM impact on lung injury, we observed that only the Pre-exposure worsens the injury and collagen deposition observed in the BLM exposure alone (Figure 2F).

3.2. Intermittent Hypoxia Increases Collagen and the Production of Pro-Fibrotic Mediators and Contributes to Its Worsening Effect on BLM-Induced Lung Fibrosis

Expression of *Collagen 1a1*, *Collagen 3a1*, and pro-fibrosing mediators *Cxcl12*, *Pdgf- β* and *Serp11* were quantified by RT-qPCR in each condition. Both 14 d and 28 d IH exposure significantly induced expression of *Col1a1* and *Col3a1* gene expression (data not shown) but the magnitude of this effect was relatively low as compared to other challenges (Figure 3A). Interestingly, as highlighted in the heatmap (Figure 3A), Co-challenge and Pre-exposure induced strong up-regulation of *Col3a1* and *Pdgf- β* as compared to BLM exposure (Figure 3A). BLM exposure, Co-challenge and Pre-exposure induced a significant increase in *Col1a1*, *Col3a1*, *Cxcl12*, *Pdgf- β* and *Serp11* gene expression as compared to control condition (Figure 3B and Figure 3C, respectively). The major effect of IH exposure

on BLM-induced pro-fibrotic factors is observed in the Pre-exposure group with a strong induction of *Col3a1* expression (red in the heatmap).

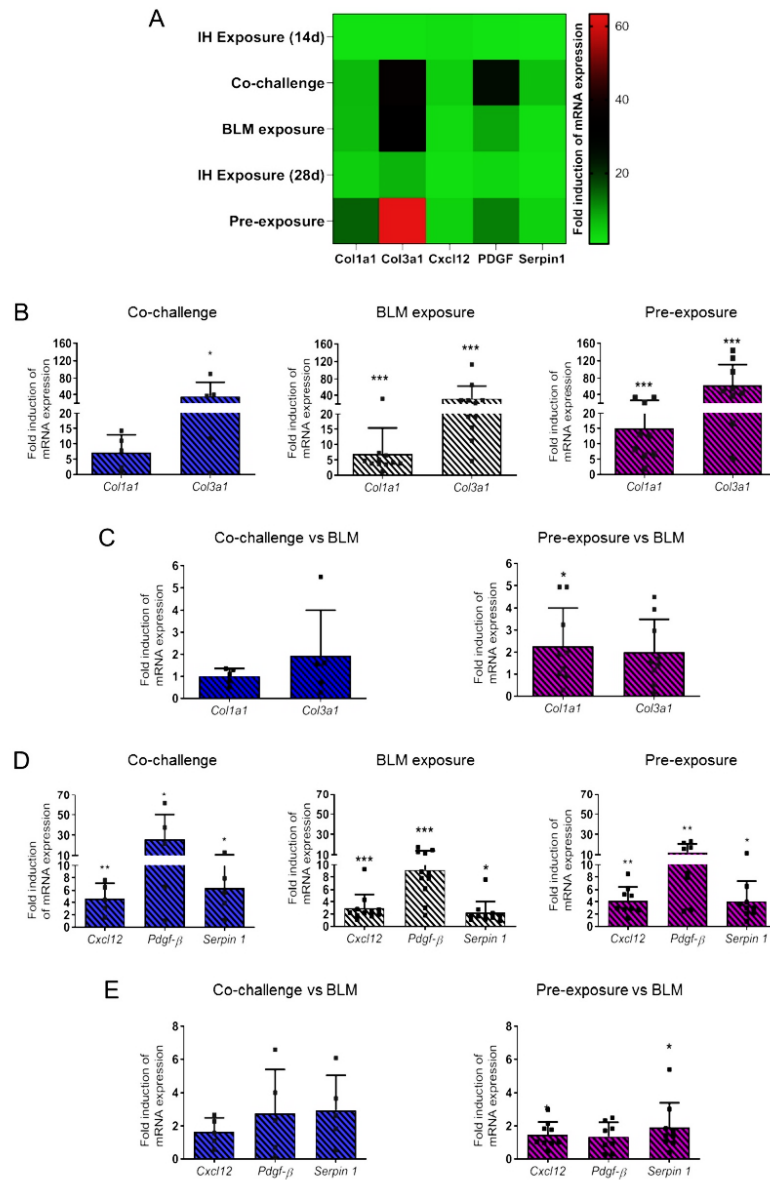


Figure 3. The effect of Bleomycin instillation and/or intermittent hypoxia exposure on collagen and pro-fibrotic marker expression. Bleomycin instillation and intermittent hypoxia exposure were performed according to the experimental design. (A) Heatmap representing mRNA expression of Collagen 1a1 (*Col1a1*), Collagen 3a1 (*Col3a1*) and pro-fibrotic markers (*Cxcl12*, *Pdgf-β* and *Serpin1*) quantified by RT-qPCR. RT-qPCR were performed on right lung total lysates (superior lobe)

from mice exposed to each experimental protocol. Relative quantification of mRNA gene expression was performed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method with 18S as an internal control. Effect of each protocol was presented as fold induction normalized to the mean value of control group and reported to 1. (B) Statistical representation of mRNA expression of Collagen 1a1 (Col1a1) and Collagen 3a1 (Col3a1) in the Co-challenge, BLM exposure and Pre-exposure group. Each “■” represent one animal included in the protocol. Raw data were submitted to Mann–Whitney test to compare each group with control group (Control group versus others groups, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ with IH exposure (14 d, $n = 7$ or 28 d, $n = 7$), BLM exposure ($n = 11$), Co-challenge ($n = 5$) or Pre-exposure ($n = 9$). Y axis is represented in two segments with both bottom and top at 50% length. (C) The effects of the double challenge BLM/IH in the Co-challenge or in the Pre-exposure experimental conditions on Collagen 1a1 (Col1a1) and Collagen 3a1 (Col3a1) were compared to BLM exposure alone. The effects of Co-challenge ($n = 5$) or Pre-exposure ($n = 9$) are presented as fold induction normalized to the mean value of BLM exposure group and reported to 1. Each “■” represent one animal included in the protocol. Raw data were submitted to Mann–Whitney test to compare each group with BLM exposure group (BLM exposure group versus others groups, * $p < 0.05$). (D) Statistical representation of mRNA expression of pro-fibrotic markers (Cxcl12, Pdgf- β and Serpin1) in the Co-challenge, BLM exposure and Pre-exposure group. Each “■” represent one animal included in the protocol. Raw data were submitted to Mann–Whitney test to compare each group with control group (Control group versus others groups, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ with IH exposure (14 d, $n = 7$ or 28 d, $n = 7$), BLM exposure ($n = 11$), Co-challenge ($n = 5$) or Pre-exposure ($n = 9$). Y axis is represented in two segments with both bottom and top at 50% length. (E) The effects of the double challenge BLM/IH in the Co-challenge or in the Pre-exposure experimental conditions on pro-fibrotic markers (Cxcl12, Pdgf- β and Serpin1) were compared to BLM exposure alone. The effects of Co-challenge ($n = 5$) or Pre-exposure ($n = 9$) are presented as fold induction normalized to the mean value of BLM exposure group and reported to 1. Each “■” represent one animal included in the protocol. Raw data were submitted to Mann–Whitney test to compare each group with BLM exposure group (BLM exposure group versus others groups, * $p < 0.05$).

When comparing the Co-challenge or the Pre-exposure effects to the BLM alone effect on collagen and pro-fibrotic mediators, we observed that only the Pre-exposure condition emphasizes *Col1a1*, *Cxcl12* and *Serpin 1* expression already observed in the BLM exposure alone (Figure 3C,E).

3.3. Intermittent Hypoxia Modulates ER Stress Response That Enhances BLM Impact on ER Stress Markers

Protein level expression of the three major transcription factors induced for the resolution of ER stress, i.e. sXBP1, ATF6N and ATF4, and the expression of the mitochondria-to-ER chaperone GRP75 and GRP78 were analysed by western blot in each condition (Figure 4A,B).

Western blots analysis demonstrated that long-time exposure (28 days) of mice to IH induced an increase in the expression of the mitochondria-to-ER chaperone GRP75. Interestingly, whereas BLM exposure alone induced the expression of either the ER chaperone GRP78 and the mitochondria-to-ER chaperone GRP75, no induction was observed either in the Co-challenge or Pre-exposure experimental condition (Figure 4B). Expression of GRP78 was slightly induced in the BLM exposure condition and GRP75 in the BLM condition and in the long time IH exposure (28 d) condition.

Analysis of ER stress markers modulation showed an increase in the expression of sXBP1 in each condition, except for long IH exposure (28 d). ATF6N was strongly induced in the BLM and Pre-exposure condition, while ATF4 was only induced in the long time IH exposure (28 d) (Figure 4B). Statistical analyses of the expression of sXBP1, ATF6N and ATF4 (Figure 4C) confirmed the observations made in Figure 4A,B. BLM exposure significantly induced sXBP1 and ATF6N expression, an effect which was not observed in the Co-challenge group. Finally, the major increase in the expression of both sXBP1 and ATF6N in the Pre-exposure group observed in the Heatmap representation (Figure 4B) was confirmed by the statistical analyses in Figure 4C.

When comparing the Co-challenge or the Pre-exposure effects to the BLM alone effect on collagen and pro-fibrotic mediators, we observed that only the Pre-exposure condition emphasizes *ATF6N* expression already observed in the BLM exposure alone (Figure 4D).

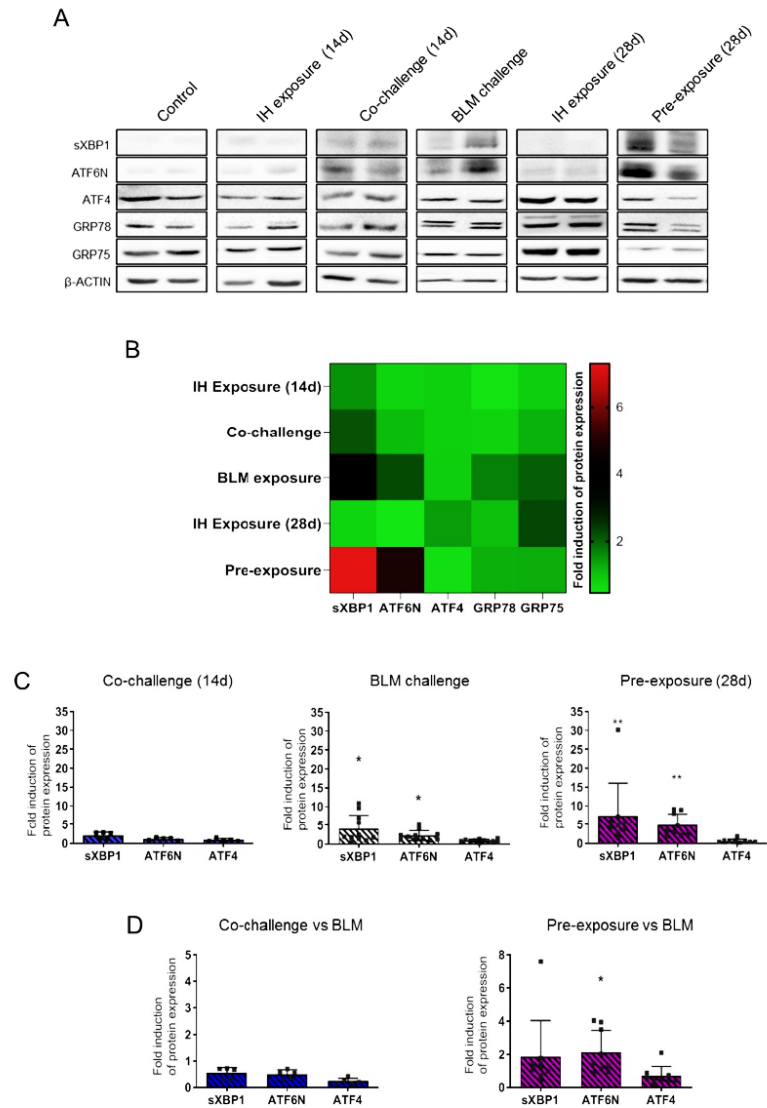


Figure 4. The effect of Bleomycin instillation and/or intermittent hypoxia exposure on ER stress markers and chaperones expression. Bleomycin instillation and intermittent hypoxia exposure were performed according to the experimental design. (A) Western blot analysis of ER stress markers sXBP1, ATF6N, ATF4, and chaperones GRP78, GRP75 protein expression. Western blots were performed on right lung total lysates (inferior lobe) from mice exposed to each experimental protocol. Blots shown were representative of four experiences. (B) Heatmap representing the quantification of protein expression of ER stress markers (sXBP1, ATF6N, ATF4) and chaperones (GRP78, GRP75) analysed by western blot. Densitometry analysis of each band has been obtained with Image Lab software. Protein expression was normalized to β -actin. Expression of each protein tested is presented as a mean value expressed in fold induction normalized to the mean value of control group reported to 1. (C) Statistical representation of the quantification of ER stress markers expression in the Co-challenge, BLM challenge and Pre-exposure group. Each “■” represent one animal included in the protocol. Raw data were submitted

to Mann–Whitney test to compare each group with control group (Control group versus others groups, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) with IH exposure (14 d, $n = 9$ or 28 d, $n = 8$), BLM exposure ($n = 11$), Co-challenge ($n = 5$) or Pre-exposure ($n = 9$). (D) The double challenge BLM/IH in the Co-challenge or in the Pre-exposure experimental condition were compared to BLM alone exposure. The effects of Co-challenge ($n = 5$) or Pre-exposure ($n = 9$) are presented as fold induction normalized to the mean value of BLM exposure group and reported to 1. Each “■” represent one animal included in the protocol. Raw data were submitted to Mann–Whitney test to compare each group with BLM exposure group (BLM exposure group *versus* others groups, * $p < 0.05$).

4. Discussion

In the present study, we proposed to investigate the link between OSA and IPF, to explore the impact of presenting OSA before IPF, and to decipher the mechanisms involved in the worsening effect of intermittent hypoxia on the severity of lung fibrosis previously observed [17]. Here, we hypothesized that this effect would be secondary, at least in part, to an increased cellular ER stress.

To address this question, we used a mouse model of lung fibrosis induced by intratracheal instillation of Bleomycin. Different concentrations of Bleomycin are used to induce pulmonary fibrosis depending on the mice strain, the source of the Bleomycin as well as the housing conditions in the animal facility [26]. This widely-characterized model recapitulates at day 14 after BLM instillation many features of human lung fibrosis i.e. collagen deposition within the alveolar interstitium, a thickening of the alveolar walls and masses of fibrosing-type lesions on the lung surface [27]. In our experimental conditions, no significant aggravating effect of IH on lung fibrosis severity was observed by histological analysis in mice Co-challenged with IH and BLM. However, as compared to BLM alone, when mice were pre-exposed to IH, a significant weight loss, and an aggravated lung fibrosis is observed, characterized by a more reshaped lung parenchyma with an excessive increase in collagen deposition.

Twenty eight days of IH exposure alone significantly increased the induction of *Collagen 1a1* and *Collagen 3a1* mRNA expression in whole lung extracts and protein deposition in lung parenchyma, two fundamental events in fibrosis development [28]. Furthermore, and in agreement with the study of Shi et al. [21], IH significantly increased the *Pdgf- β* and *Cxcl 12* mRNA pro-fibrotic markers expression. *Cxcl12* and *Pdgf- β* are well identified in the pathogenesis of IPF [29] and well known to induce the proliferation, and migration of fibroblasts [30], and to chemoattract circulating fibrocytes [31].

As reported by others, we found an increase in the expression of extracellular matrix component (collagens) and pro-fibrotic *Cxcl12*, *Pdgf- β* and *Serpin 1* mediators in mice challenged with BLM [32]. Interestingly, as compared to mice treated with BLM alone, we observed an additive effect with increased expression of *Collagen 1a1*, *Cxcl12* and *Serpin 1* mRNA expression when mice were pre-exposed to IH before BLM challenge. Interestingly, IH and BLM both induced the expression of *Serpin 1* (PAI-1 in Human). PAI-1 was shown to be up-regulated in AEC II cells from IPF patient [33], and could play a critical role in the development of lung fibrosis [34] through induction of cell senescence [35]. Interestingly, cellular senescence has also been proposed to explain the pathophysiology of IPF [36], and its potential role in the aggravating effect of IH cannot be excluded.

Twenty-eight days IH exposure also induced an increase in the expression of ATF4, and GRP75 mitochondria-to-ER chaperone ER stress markers. These findings are in agreement with a recent study that showed an induction of ATF4 ER stress marker in lung after four weeks of IH exposure [21]. In the latter study, Shi et al. suggested that the lung ER stress induced by IH was 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 [37]. Moreover oxidative stress response was described as a major deleterious consequence of IH in lung [38]. Indeed, it has been recently proposed that the NF- κ B/NRF2 signaling pathway could partly explain the deleterious impact of IH on lung fibrogenesis [39].

Induction of sXBP1, ATF6N and GRP78 ER stress markers was considered as a common molecular feature of IPF, also observed in BLM-induced lung injury in mice [19,32]. The origin of ER stress observed in lung biopsies from IPF patients and mice lung in experimental fibrosis is not completely understood and the implication of a hypoxic microenvironment of AEC cells has been proposed [19,40]. IH effects on the induction of ER stress markers were widely studied in several organs. In particular, the induction of GRP78, CHOP, sXBP1 mRNA has been reported in cardiomyocytes of mice in a model of ischemia-reperfusion injury [20]. Intriguingly, IH exposure alone, BLM exposure alone and the double challenge induced distinct UPR pathways. IH exposure activated the ATF4 branch of the UPR, BLM exposure the XBP1/ATF6 branch, and the double challenge exacerbated the activation of ATF6. The precise mechanism of this switch remains to be determined. We could hypothesize that activation of ATF6N directs the cells to a senescent phenotype (as proposed by Kim et al. [41]) mainly observed in IPF [36] and described as a consequence of both exposure to IH [42] and to BLM treatment [43]. Future studies are needed to decipher the implication of cell senescence and its relationship with ER stress in the worsening effect of IH in lung fibrosis, and will be essential to understand the molecular mechanisms involved in lung fibrogenesis.

Our study aimed to understand the impact of OSA on IPF by exploring the effect of intermittent hypoxia—the key pathogenic element of OSA—on the severity of experimental lung fibrosis. This approach has some limitations. For instance, the hypercapnia component present in OSA (due to the physical obstruction of the throat) was not integrated in our model, and we cannot exclude a worsening additive effect of hypercapnia. Moreover, abnormal mechanical strains applied on the lung parenchyma during increased respiratory efforts associated with OSA were not taken into consideration in the present study. OSA has been reported in prevalent and incident case of IPF [8], and we tried to address the question whether OSA could modulate the course of pulmonary fibrosis. We showed that the major impact of IH on lung fibrosis was observed when IH started 14 days before induction of lung fibrosis by intratracheal instillation of BLM. The major pathogenic feature reported in IH and in related-comorbidities of OSA are oxidative stress and inflammatory response. However, BLM also induced an oxidative stress and inflammation [44]. In our study, we showed that the additive and worsening effect of IH on lung fibrosis involved the induction of pro-fibrotic markers and the expression of ER stress transcription factors. Interestingly, distinct UPR signalling pathways were activated by IH and BLM exposure. Unfortunately, the relationship between induction of ER stress and oxidative stress could not be investigated in our experimental model since BLM alone induces DNA strand breaks and localized oxidative stress. However, in our study we could not exclude a synergic effect of IH and BLM on lung fibrosis.

5. Conclusions

To conclude, this experimental study highlighted the critical role of intermittent hypoxia in the induction of lung Endoplasmic Reticulum (ER) stress in the context of lung fibrosis. Because lung ER stress plays a key role in the development of Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF), our results support the concept that intermittent hypoxia related to Obstructive Sleep Apnea (OSA) should be considered as a potential worsening factor in IPF. Therefore, preventing deleterious effects of intermittent hypoxia with Continuous Positive Airway Pressure (CPAP) could represent an attractive approach to limit IPF exacerbation. Interestingly, a recent study has demonstrated a positive effect of OSA treatment with CPAP on ER stress on obese subjects [45]. Therefore, it would be highly useful to investigate the potential impacts of CPAP on ER stress/pro-fibrotic marker expression in IPF patients and on their lung function evolution.

Author Contributions: Conceptualization, N.V. and E.B.; methodology and validation, L.H., J.B., C.-H.Y., D.M., C.P., N.V. and E.B.; writing—review and editing, L.H., C.P., J.-F.B., N.V. and E.B.; supervision, N.V. and E.B.; funding acquisition, C.P., N.V. and E.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the “Bonus Qualité Recherche” (NV, 2014 and EB, 2020) and the “Institut Fédératif de Recherche Bio-médicale” programs of the University Sorbonne Paris Nord. This work was also supported by a Legs Poix grant (NV, 2018, CP 2013 and 2016).

Institutional Review Board Statement: Experimental protocol was approved by the Charles Darwin Ethics committee, 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).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would like to thank Jean-Paul Richalet for helpful discussion.

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

References

- Barratt, S.L.; Creamer, A.; Hayton, C.; Chaudhuri, N. Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF): An Overview. *J. Clin. Med.* **2018**, *7*, 201. [CrossRef]
- Selman, M.; King, T.E.; Pardo, A. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Prevailing and Evolving Hypotheses about Its Pathogenesis and Implications for Therapy. *Ann. Intern. Med.* **2001**, *134*, 136–151. [CrossRef]
- Mermigkis, C.M.; Tsakanika, K.; Polychronopoulos, V.; Karagianidis, N.; Mermigkis, D.; Bouros, D. Expression of bcl-2 protein in bronchoalveolar lavage cell populations from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Acta Cytol.* **2001**, *45*, 914–918. [CrossRef]
- Plataki, M.; Koutsopoulos, A.V.; Darivianaki, K.; Delides, G.; Siafakas, N.M.; Bouros, D. Expression of Apoptotic and Antiapoptotic Markers in Epithelial Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Chest* **2005**, *127*, 266–274. [CrossRef]
- Goldmann, T.; Zissel, G.; Watz, H.; Drömann, D.; Reck, M.; Kugler, C.; Rabe, K.F.; Marwitz, S. Human alveolar epithelial cells type II are capable of TGF β -dependent epithelial-mesenchymal-transition and collagen-synthesis. *Respir. Res.* **2018**, *19*, 138. [CrossRef]
- Willis, B.C.; Liebler, J.M.; Luby-Phelps, K.; Nicholson, A.G.; Crandall, E.D.; du Bois, R.M.; Borok, Z. Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition in Alveolar Epithelial Cells by Transforming Growth Factor- β 1: Potential Role in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Pathol.* **2005**, *166*, 1321–1332. [CrossRef]
- Allen, J.T.; A Spiteri, M. Growth factors in idiopathic pulmonary fibrosis: Relative roles. *Respir. Res.* **2002**, *3*, 13. [CrossRef]
- Gille, T.; Didier, M.; Boubaya, M.; Moya, L.; Sutton, A.; Carton, Z.; Baran-Marszak, F.; Sadoun-Danino, D.; Israël-Biet, D.; Cottin, V.; et al. Obstructive sleep apnoea and related comorbidities in incident idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* **2017**, *49*, 1601934. [CrossRef] [PubMed]
- Lancaster, L.H.; Mason, W.R.; Parnell, J.A.; Rice, T.; Loyd, J.; Milstone, A.P.; Collard, H.R.; Malow, B.A. Obstructive Sleep Apnea Is Common in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Chest* **2009**, *136*, 772–778. [CrossRef]
- Mermigkis, C.; Bouloukaki, I.; Antoniou, K.M.; Mermigkis, D.; Psathakis, K.; Giannarakis, I.; Varouchakis, G.; Siafakas, N.M.; Schiza, S.E. CPAP therapy in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and obstructive sleep apnea: Does it offer a better quality of life and sleep? *Sleep Breath.* **2013**, *17*, 1137–1143. [CrossRef]
- Young, T.; Palta, M.; Dempsey, J.; Skatrud, J.; Weber, S.; Badr, S. The Occurrence of Sleep-Disordered Breathing among Middle-Aged Adults. *N. Engl. J. Med.* **1993**, *328*, 1230–1235. [CrossRef]
- Badran, M.; Ayas, N.; Laher, I. Cardiovascular Complications of Sleep Apnea: Role of Oxidative Stress. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2014**, *2014*, 1–10. [CrossRef]
- Dewan, N.A.; Nieto, F.J.; Somers, V.K. Intermittent Hypoxemia and OSA. *Chest* **2015**, *147*, 266–274. [CrossRef]
- Sforza, E.; Roche, F. Chronic intermittent hypoxia and obstructive sleep apnea: An experimental and clinical approach. *Hypoxia* **2016**, *4*, 99–108. [CrossRef]
- Kim, S.W.; Kim, I.K.; Yeo, C.D.; Kang, H.H.; Ban, W.H.; Kwon, H.Y.; Lee, S.H. Effects of chronic intermittent hypoxia caused by obstructive sleep apnea on lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Exp. Lung Res.* **2020**, *46*, 1–11. [CrossRef]
- Braun, R.; Broytman, O.; Braun, F.M.; Brinkman, J.A.; Clithero, A.; Modi, D.; Pegelow, D.F.; Eldridge, M.; Teodorescu, M. Chronic intermittent hypoxia worsens bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **2018**, *256*, 97–108. [CrossRef] [PubMed]
- Gille, T.; Didier, M.; Rotenberg, C.; Delbrel, E.; Marchant, D.; Sutton, A.; Dard, N.; Haine, L.; Voituren, N.; Bernaudin, J.-F.; et al. Intermittent Hypoxia Increases the Severity of Bleomycin-Induced Lung Injury in Mice. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, 1–13. [CrossRef]
- Korfei, M.; Ruppert, C.; Mahavadi, P.; Henneke, I.; Markart, P.; Koch, M.; Lang, G.; Fink, L.; Bohle, R.-M.; Seeger, W.; et al. Epithelial Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Sporadic Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2008**, *178*, 838–846. [CrossRef]
- Delbrel, E.; Soumare, A.; Naguez, A.; Label, R.; Bernard, O.; Bruhat, A.; Fafournoux, P.; Tremblais, G.; Marchant, D.; Gille, T.; et al. HIF-1 α triggers ER stress and CHOP-mediated apoptosis in alveolar epithelial cells, a key event in pulmonary fibrosis. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 17939. [CrossRef] [PubMed]

20. Belaidi, E.; Thomas, A.; Bourdier, G.; Moulin, S.; Lemarié, E.; Levy, P.; Pépin, J.-L.; Korichneva, I.; Godin-Ribuot, D.; Arnaud, C. Endoplasmic reticulum stress as a novel inducer of hypoxia inducible factor-1 activity: Its role in the susceptibility to myocardial ischemia-reperfusion induced by chronic intermittent hypoxia. *Int. J. Cardiol.* **2016**, *210*, 45–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Shi, Z.; Xu, L.; Xie, H.; Ouyang, R.; Ke, Y.; Zhou, R.; Yung, W.-H. Attenuation of intermittent hypoxia-induced apoptosis and fibrosis in pulmonary tissues via suppression of ER stress activation. *BMC Pulm. Med.* **2020**, *20*, 1–11. [[CrossRef](#)]
22. Tanjore, H.; Lawson, W.E.; Blackwell, T.S. Endoplasmic reticulum stress as a pro-fibrotic stimulus. *Biochim. et Biophys. Acta (BBA)-Mol. Basis Dis.* **2013**, *1832*, 940–947. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Delbrel, E.; Uzunhan, Y.; Soumare, A.; Gille, T.; Marchant, D.; Planès, C.; Boncoeur, E. ER Stress is Involved in Epithelial-To-Mesenchymal Transition of Alveolar Epithelial Cells Exposed to a Hypoxic Microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1299. [[CrossRef](#)]
24. Szegezdi, E.; Logue, S.; Gorman, A.; Samali, A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* **2006**, *7*, 880–885. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Pun, M. Human model of obstructive sleep apnea: How incomplete is it? *J. Appl. Physiol.* **2020**, *129*, 47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Tashiro, J.; Rubio, G.A.; Limper, A.H.; Williams, K.; Elliot, S.J.; Ninou, I.; Aidinis, V.; Tzouveleki, A.; Glassberg, M.K. Exploring Animal Models That Resemble Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Front. Med.* **2017**, *4*, 118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Miles, T.; Hoyne, G.F.; A Knight, D.; Fear, M.; E Mutsaers, S.; Prêle, C.M. The contribution of animal models to understanding the role of the immune system in human idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin. Transl. Immunol.* **2020**, *9*, e1153. [[CrossRef](#)]
28. Hansen, N.U.B.; Karsdal, M.A.; Brockbank, S.; Cruwys, S.; Rønnow, S.R.; Leeming, D.J. 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.* **2016**, *17*, 1–10. [[CrossRef](#)]
29. Xu, Z.; Mo, L.; Feng, X.; Huang, M.; Li, L. Using bioinformatics approach identifies key genes and pathways in idiopathic pulmonary fibrosis. *Medicine* **2020**, *99*, e22099. [[CrossRef](#)]
30. Nishioka, Y.; Azuma, M.; Kishi, M.; Aono, Y. Targeting platelet-derived growth factor as a therapeutic approach in pulmonary fibrosis. *J. Med. Investig.* **2013**, *60*, 175–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. 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. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J. Clin. Investig.* **2004**, *114*, 438–446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Hsu, H.-S.; Liu, C.-C.; Lin, J.-H.; Hsu, T.-W.; Hsu, J.-W.; Su, K.; Hung, S.-C. Involvement of ER stress, PI3K/AKT activation, and lung fibroblast proliferation in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–11. [[CrossRef](#)]
33. Jiang, C.; Liu, G.; Luckhardt, T.; Antony, V.; Zhou, Y.; Carter, A.B.; Thannickal, V.J.; Liu, R.-M. Serpine 1 induces alveolar type II cell senescence through activating p53-p21-Rb pathway in fibrotic lung disease. *Aging Cell* **2017**, *16*, 1114–1124. [[CrossRef](#)]
34. Rabieian, R.; Boshtam, M.; Zareei, M.; Kouhpayeh, S.; Masoudifar, A.; Mirzaei, H. Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 as a Regulator of Fibrosis. *J. Cell. Biochem.* **2018**, *119*, 17–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Rana, T.; Jiang, C.; Liu, G.; Miyata, T.; Antony, V.; Thannickal, V.J.; Liu, R.-M. 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.* **2020**, *62*, 319–330. [[CrossRef](#)]
36. Liu, R.-M.; Liu, G. Cell senescence and fibrotic lung diseases. *Exp. Gerontol.* **2020**, *132*, 110836. [[CrossRef](#)]
37. Sarcinelli, C.; Dragic, H.; Piecyk, M.; Barbet, V.; Duret, C.; Barthelaix, A.; Ferraro-Peyret, C.; Fauvre, J.; Renno, T.; Chaveroux, C.; et al. ATF4-Dependent NRF2 Transcriptional Regulation Promotes Antioxidant Protection during Endoplasmic Reticulum Stress. *Cancers* **2020**, *12*, 569. [[CrossRef](#)]
38. Tuleta, I.; Pizarro, C.; Nickenig, G.; Juergens, U.; Skowasch, D. Deleterious effects of intermittent hypoxia on lung tissue. *Eur. Respir. J.* **2016**, *48*, PA2070. [[CrossRef](#)]
39. Kang, H.H.; Kim, I.K.; Yeo, C.D.; Kim, S.W.; Lee, H.Y.; Im, J.H.; Kwon, H.Y.; Lee, S.H. 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.* **2020**, *83*, S63–S74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Burman, A.; Kropski, J.A.; Calvi, C.L.; Serezani, A.P.; Pascoalino, B.D.; Han, W.; Sherrill, T.; Gleaves, L.; Lawson, W.E.; Young, L.R.; et al. Localized hypoxia links ER stress to lung fibrosis through induction of C/EBP homologous protein. *JCI Insight* **2018**, *3*, 23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Kim, H.S.; Kim, Y.; Lim, M.J.; Park, Y.-G.; Park, S.I.; Sohn, J. The p38-activated ER stress-ATF6 α axis mediates cellular senescence. *FASEB J.* **2019**, *33*, 2422–2434. [[CrossRef](#)]
42. Polonis, K.; Becari, C.; Chahal, C.A.A.; Zhang, Y.; Allen, A.M.; Kellogg, T.A.; Somers, V.K.; Singh, P. Chronic Intermittent Hypoxia Triggers a Senescence-like Phenotype in Human White Preadipocytes. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–14. [[CrossRef](#)]
43. Zhang, X.; Dong, Y.; Li, W.-C.; Tang, B.-X.; Li, J.; Zang, Y. Roxithromycin attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by targeting senescent cells. *Acta Pharmacol. Sin.* **2021**, 1–11. [[CrossRef](#)]
44. Hagiwara, S.-I.; Ishii, Y.; Kitamura, S. Aerosolized Administration of N-Acetylcysteine Attenuates Lung Fibrosis Induced by Bleomycin in Mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2000**, *162*, 225–231. [[CrossRef](#)]
45. Perrini, S.; Cignarelli, A.; Quaranta, V.N.; Falcone, V.A.; Kounaki, S.; Porro, S.; Ciavarella, A.; Ficarella, R.; Barbaro, M.; Genchi, V.A.; et al. Correction of intermittent hypoxia reduces inflammation in obese subjects with obstructive sleep apnea. *JCI Insight* **2017**, *2*, e94379. [[CrossRef](#)]

Conclusion

De nombreuses études décrivent la présence des marqueurs du stress du RE dans des biopsies pulmonaires de patients atteints de FPI (Korfei et al. 2008) ou au sein de modèles animaux (Hsu et al. 2017). Les résultats obtenus dans cet article confirment que l'exposition à de l'hypoxie intermittente chronique (HIC) exacerbe la fibrose pulmonaire induite par la BLM. Cette aggravation est plus importante lorsque l'exposition à l'HIC précède l'induction de la fibrose pulmonaire et semble être en lien avec l'activation des marqueurs du stress du RE et des marqueurs pro-fibrosants.

Chapitre II- Impact d'une exposition prolongée à de l'hypoxie intermittente chronique au niveau pulmonaire et sur l'élaboration de la commande centrale respiratoire.

Introduction

Dans nos précédents travaux (Haine et al. 2021a), nous avons mis en évidence que l'exposition à des temps relativement courts d'hypoxie intermittente (28 jours) conduisait à l'induction de l'expression des marqueurs associés au développement de la fibrose, tels que le *Colla1*, *Col3a1*, le *PDGF-β* et le *CXCL12*. Nous proposons dans ce travail d'étudier l'impact d'une exposition plus longue, soit de 45 ou 90 jours d'HIC sur la fonction pulmonaire et les marqueurs de fibrose.

Résultats

Des souris C57BL/6 mâles de 8 semaines ont été exposées à l'HIC (Nadir à 7% O₂ - pic à 21% O₂) durant 8 heures par jour à une fréquence de 30 cycles par heure (Figure 52). Les souris ont été sacrifiées le dernier jour d'exposition à l'HIC, soit après 45 jours (groupe HIC 45d) ou 90 jours d'exposition (groupe HIC 90d). Le groupe contrôle a été laissé en normoxie (F_iO₂ 21% O₂ - groupe Nx) (Figure 52). Les prélèvements des poumons ont été réalisés dès la fin de l'exposition.

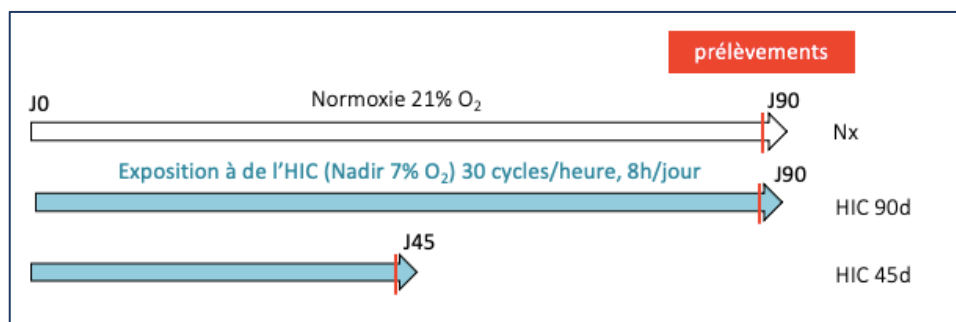


Figure 49: Design expérimental. Des souris mâles de souche C57BL/6 de 8 semaines ont été exposé à la normoxie, (Nx, n=6) ou à l'hypoxie intermittente chronique (HIC) avec un nadir à 7% d'O₂ à une fréquence de 30 cycles/jour, 8h/j durant 45 jours (groupe HIC 45d ; n=7) ou 90 jours (groupe HIC 90d ; n=6).

a. Analyse des marqueurs pro-fibrosants

Les dépôts de collagène ont été analysés sur des coupes histologiques de biopsies pulmonaires colorées au rouge Sirius-Fast Green (Figure 53.A). L'analyse des lames

histologiques montrent une grande proportion de tissu ayant été coloré au rouge Sirius contre coloré au Fast Green confirmant des dépôts de collagène de type I et III après 45 jours d'exposition à de l'HIC (HIC 45d) comparé au groupe normoxie (Nx) (Figure 53.A). Il est observé un dépôt de collagène de type I et III plus important après 90 jours d'exposition à de l'HIC (HIC 90d) comparé au groupe HIC 45d (Figure 53.A). La quantification du collagène total pulmonaire par la technique du Sircoll (Figure 53.B) confirme une quantité de collagène plus importante dans le poumon des souris exposés à de l'HIC durant 45 jours (HIC 45d) comparées au groupe normoxie (Nx) (Figure 53.B). L'analyse de la distensibilité pulmonaire (Figure 53.C) montre une diminution non significative ($p=0,0523$) après 45 jours d'exposition à de l'HIC (HIC 45d) comparé au groupe Nx (Figure 53.C).

Nota Bene : Les échantillons prélevés dans le groupe exposés 90 jours à de l'HIC sont en cours d'analyse (HIC 90d), c'est pourquoi, nous ne présenterons que les groupes exposés à 45 jours d'Hypoxie Intermittente (HIC 45d) dans la suite du manuscrit.

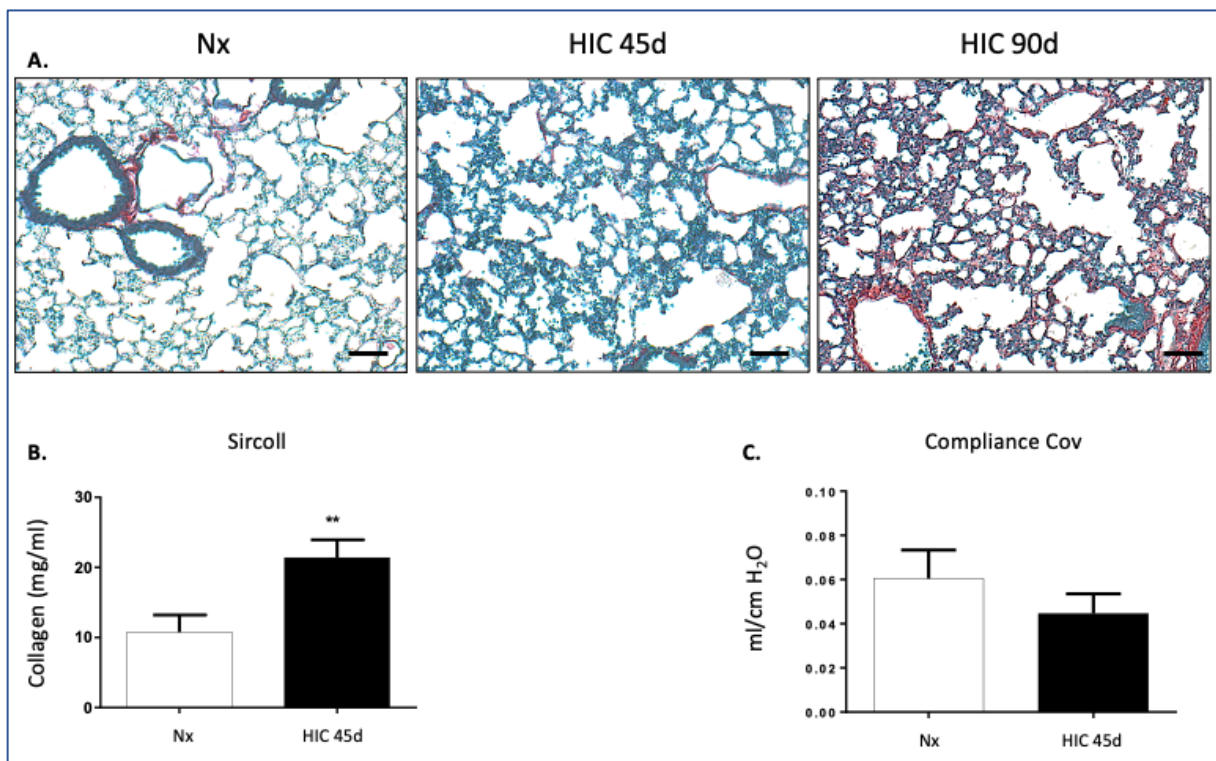


Figure 50: Architecture pulmonaire. A. Photographies représentant des coupes du lobe gauche du poumon inclus en paraffine et colorées au rouge Sirius-Fast green des groupes Nx (n=6), HIC 45d (n=7) et HIC 90d (n=6). Une photographie représentative pour chaque groupe a été représentée. B. Quantification du collagène au sein du lobe pulmonaire intermédiaire (grossissement x200, barre d'échelle=100µm). Toutes les valeurs sont représentées en tant que moyenne ± SD et soumises au test de Mann-Whitney. ** $p<0.001$. C. Représentation de la compliance pulmonaire des souris. Toutes les valeurs sont représentées en tant que moyenne ± SD et soumises au test de Mann-Whitney.

L'analyse de l'expression des gènes pro-fibrosants tel que le collagène 1 (*Col1a1*) (Figure 54.A), le collagène 3 (*Col3a1*) (Figure 54.B) et la fibronectine (*Fn1*) (Figure 54.C) ne montre aucune différence significative entre le groupe HIC 45d et le groupe contrôle Nx.

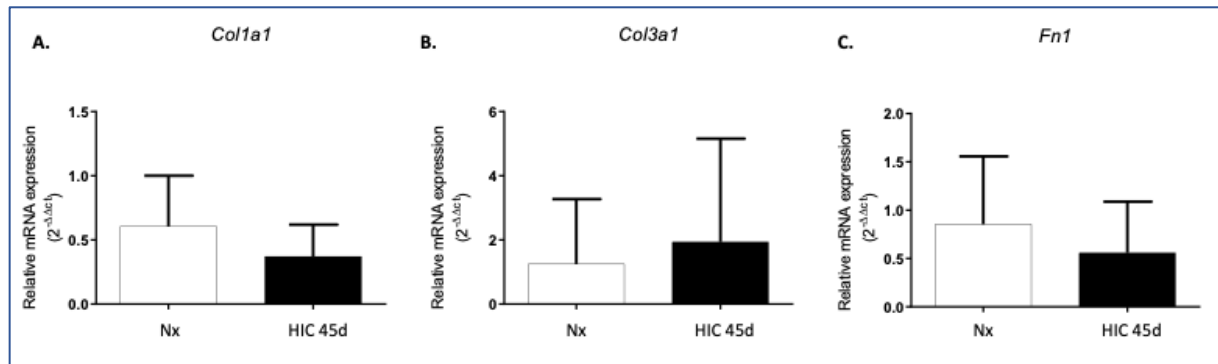


Figure 51 : Expression des gènes codant pour des protéines pro-fibrosantes. Quantification des gènes codants pour les protéines pro-fibrosantes collagène 1 (*Col1a1*) (A), collagène 3 (*Col3a1*) (B) et Fibronectin (*Fn1*) (C) dans l'homogénat pulmonaire total des groupes Nx (n=11) et HIC 45d (n=11). Toutes les valeurs sont représentées en tant que moyenne \pm SD et soumises au test de Mann-Whitney.

b. Analyse des variables ventilatoires

La fonction pulmonaire a été analysée par mesure des variables ventilatoires (Tableau 4), le débit ventilatoire (\dot{V}_E), le volume courant (V_T), la fréquence respiratoire (Rf), le temps d'inspiration (T_i), le temps d'expiration (T_e), le temps total d'un cycle respiratoire (T_{tot}), la compliance pulmonaire et la saturation en O_2 . Nous observons une augmentation non significative du débit ventilatoire caractérisé par une augmentation de la fréquence respiratoire chez les souris HIC 45d comparé à leur contrôle Nx (Tableau 4). Cependant, les autres paramètres ne sont pas modifiés lorsque les animaux sont exposés pendant 45j à de HIC (HIC 45d) comparé au jour 0 ou à la condition Nx (Tableau 4).

		Nx	HIC 45d
V_E (ml.g⁻¹min⁻¹)	J0	2.14 ± 0.2	1.47 ± 0.3
	J45	1.8 ± 0.1	2.35 ± 0.1
V_T (μl. g⁻¹)	J0	8.4 ± 0.6	7.4 ± 0.1
	J45	7.2 ± 1.2	8 ± 0.2
Rf (c.min⁻¹)	J0	255 ± 32	262 ± 23
	J45	250 ± 23	355 ± 17**
T_i/T_{tot}	J0	0.30 ± 0.2	0.32 ± 0.1
	J45	0.31 ± 0.1	0.31 ± 0.1
T_V/T_i (μl.g. s⁻¹)	J0	0.12 ± 0.1	0.1 ± 0.1
	J45	0.14 ± 0.1	0.16 ± 0.1
Saturation O₂	J45	98 ± 0.5	98 ± 1

Tableau 4 : Fonction ventilatoire, compliance pulmonaire et saturation en O₂. Représentation du débit ventilatoire (\dot{V}_E , en ml par min par g), volume courant (V_T , en μl par g), fréquence respiratoire (Rf , en cycles par min), temps d'inspiration par rapport au temps total (T_i , T_{tot} , en sec), volume courant par rapport au T_i (V_T/T_i , en μl par g par min) dans les groupes normoxie (n= 11) et HIC 45d (n=11) mesurées par pléthysmographie de corps entier sur animal non-anesthésié et libre de ses mouvements. Toutes les valeurs sont représentées en tant que moyenne ± SD et soumises au test de Mann-Whitney.

c. Analyse des structures respiratoires ponto-bulbaires

La quantification des neurones positifs pour le marqueur d'activité neuronale à long terme FOSB/ Δ FOSB (Figure 55) montre une augmentation de la quantité de neurones FOSB/ Δ FOSB positifs dans la sous-division ventro-latérale du noyau du tractus solitaire (vl-NTS), du noyau rétrotrapézoïde / groupe respiratoire parafacial (RTN/pFRG) et des raphés bulbaires obscurus (*ROb*) et magnus (*RMg*) dans le groupe de souris exposées à l'HIC pendant 45 jours (HIC 45d) comparé au groupe contrôle laissé en normoxie (Nx).

	Nx	HIC 45d
c-NTS	5.50 ± 2.16	10.58 ± 6.59
m-NTS	5.93 ± 2.37	10.52 ± 8.27
vl-NTS	4.54 ± 2.04	8.45 ± 3.59*
RTN/pFRG	5.15 ± 1.77	13.01 ± 3.12*
ROb	4.35 ± 1.75	10 ± 2.13*
RMg	5.72 ± 1.56	15 ± 2.12*
RPa	5.58 ± 1.56	11.0 ± 4.29
12N	5.27 ± 2.53	6.42 ± 2.55

Figure 52: Tableau représentant le nombre moyen de cellule FOSB/ Δ FOSB positifs par structure et par coupe. Toutes les valeurs sont représentées en tant que moyenne \pm SD et soumises au test de Mann-Whitney. * $p \leq 0.05$, les étoiles représentent les significativités entre les groupes HIC 45d et Nx.

d. Analyse des cytokines pro-inflammatoires

Les dosages des cytokines pro-inflammatoires, IL-1 β (Figure 56.A) et KC (CXCL8) (Figure 56.B), ne montre aucune différence entre les groupes exposés à l'HIC 45 jours (HIC 45d) et le groupe normoxie (Nx). Le dosage de la cytokine pro-inflammatoire TNF- α (Figure 56.C) montre une augmentation de cette cytokine dans le groupe HIC 45d par rapport au groupe normoxie.

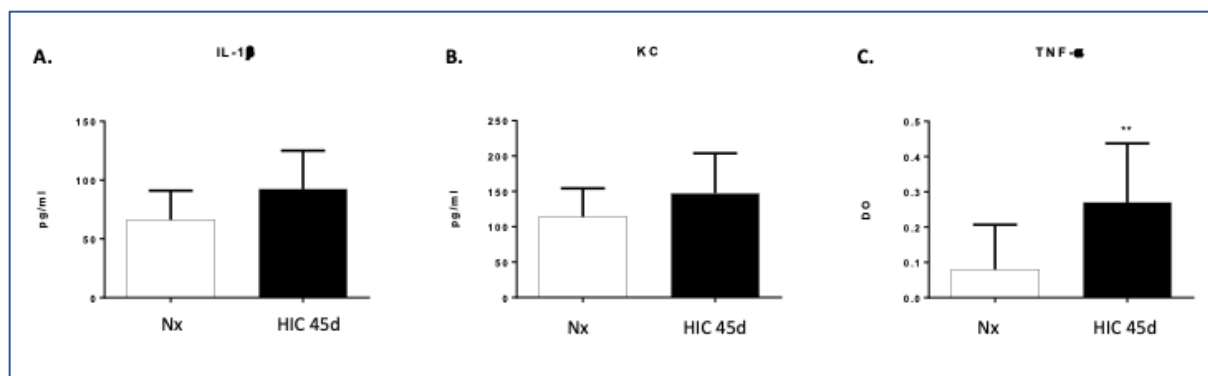


Figure 53: Expression des cytokines pro-inflammatoires. Quantification des protéines pro-inflammatoires IL-1 β (A), IL-8 (B) et TNF- α (C) dans l'homogénat pulmonaire total des souris du groupe Nx (n=11) et HIC 45d (n=11). Toutes les valeurs sont représentées en tant que moyenne \pm SD et soumises au test de Mann-Whitney. **p \leq 0,001.

e. Analyse du 8-OHdG

Le stress oxydatif a été évalué par quantification du 8-OHdG (Figure 57), cette analyse montre une augmentation significative de la quantité d'ADN hydroxylé après 45 jours d'exposition à de l'HIC (HIC 45d) comparé au groupe normoxie (Nx).

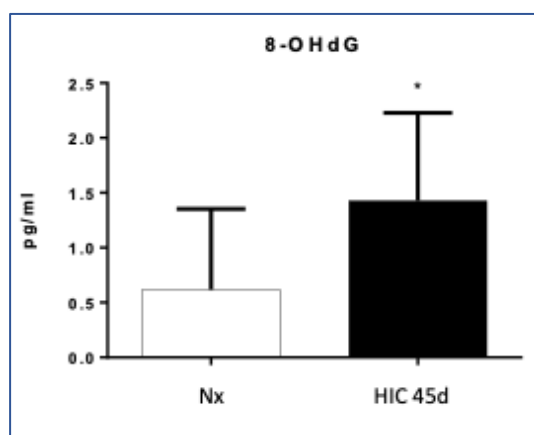


Figure 54: Dosage de la cytokine pro-oxydante 8-OHdG. Quantification de la 8-OHdG dans l'homogénat pulmonaire total des souris du groupe Nx (n=12) et HIC 45d (n=9). Toutes les valeurs sont représentées en tant que moyenne \pm SD et soumises au test de Mann-Whitney. *p \leq 0,005.

f. Réponses ventilatoires à l'hypoxie (HVR)

L'analyse de la réponse ventilatoire à l'hypoxie (Figure 58) montre une augmentation de la ventilation (\dot{V}_E) des souris du groupe Nx et HIC 45d (Figure 58.A), par rapport à leur condition pré-hypoxique. Cette augmentation de la ventilation est supportée par une augmentation du volume courant (Figure 58.B) et de la fréquence respiratoire (Figure 58.C).

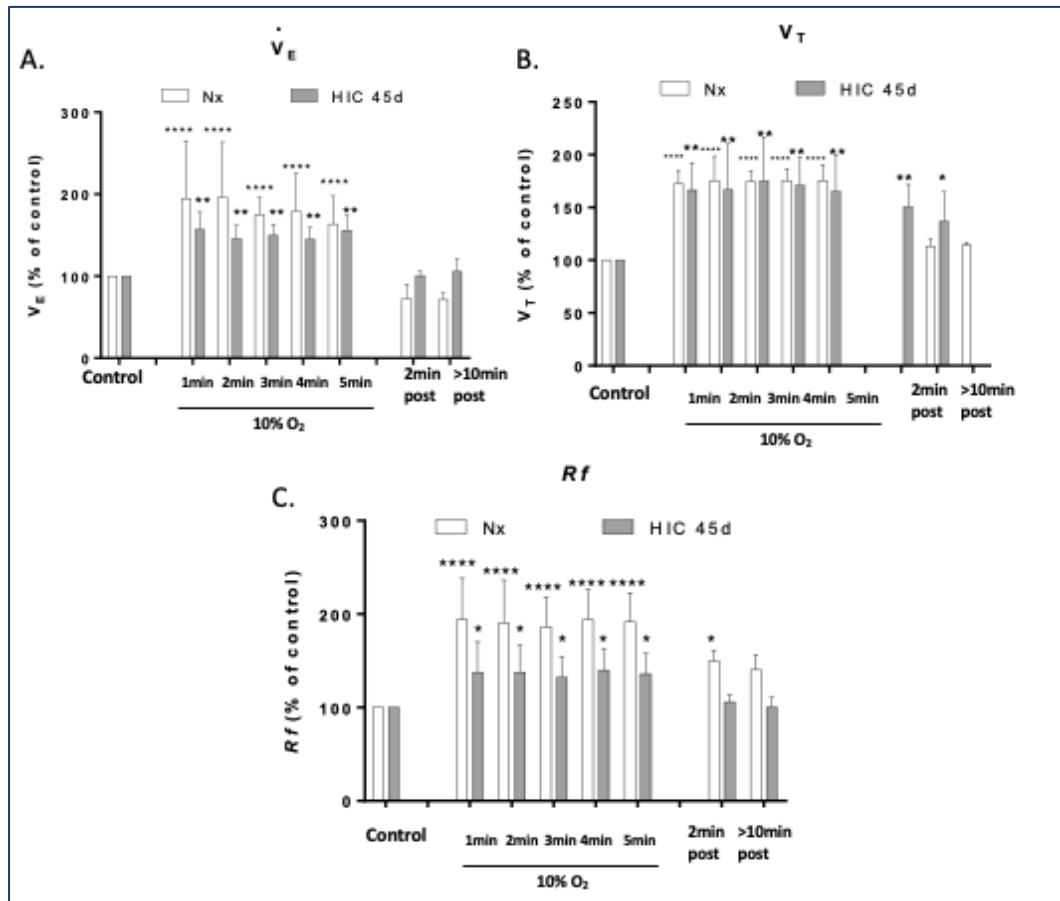


Figure 55: Réponse ventilatoire à l'hypoxie (HVR). Les souris ont été exposées à un mélange d'air normoxique à 21% d'O₂ puis exposées durant 10 minutes à un mélange hypoxique à 10% d'O₂ avant un retour en condition normoxique (21% d'O₂) durant 10 minutes. A. Mesure du débit ventilatoire (\dot{V}_E) obtenu par le produit du volume courant (V_T) et de la fréquence respiratoire (Rf). B. Mesure du volume courant. C. Mesure de la fréquence respiratoire. Toutes les valeurs sont représentées en tant que moyenne \pm SD et soumises au test de Mann-Whitney. * compare chaque condition à sa condition normoxique (contrôle).

g. Réponses ventilatoires à l'hypercapnie (HcVR)

L'analyse de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie (HcVR) (Figure 59) montre une augmentation non significative du débit ventilatoire (\dot{V}_E) (Figure 59.A). On observe également une augmentation de la ventilation chez les HIC 45d par rapport à leur condition pré-hypercapnique (Figure 59.C). Cette réponse à l'hypercapnie observée chez les souris Nx et HIC 45d est supportée par une augmentation de la fréquence respiratoire (Rf) (Figure 59.C).

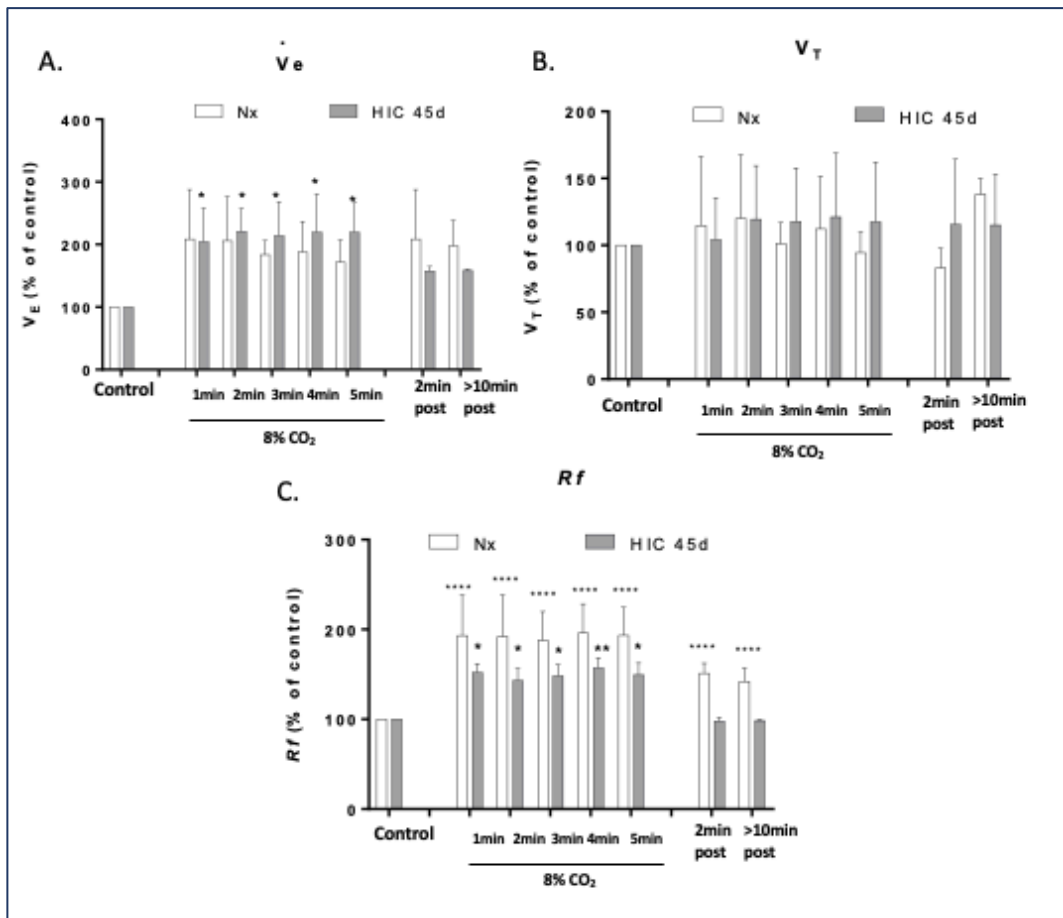


Figure 56: Réponse ventilatoire à l'hypercapnie (HcVR). Les souris ont été exposées à un mélange d'air normoxique à 21% d'O₂ puis exposées durant 10 minutes à un mélange d'air hypercapnique à 8% d'CO₂ avant un retour en condition normoxique (21% d'O₂) durant 10 minutes. A. Mesure du débit ventilatoire (\dot{V}_E) obtenu par le produit du volume courant (V_T) et de la fréquence respiratoire (Rf). B. Mesure du volume courant. C. Mesure de la fréquence respiratoire. Toutes les valeurs sont représentées en tant que moyenne \pm SD et soumises au test de Mann-Whitney. * compare chaque condition à sa condition normoxique (contrôles).

Conclusion

Ces résultats montrent que l'exposition à de l'hypoxie intermittente chronique pendant plusieurs semaines conduit à des dépôts de collagène dans le poumon et une augmentation de la quantité de collagène quantifiée au Sircoll. Cependant, cette quantité de collagène n'impacte pas les variables ventilatoires. De plus, nous observons que 45 jours d'exposition à de l'hypoxie intermittente chronique induit un stress oxydatif et une augmentation de la cytokine pro-inflammatoire TNF- α dans le tissu pulmonaire. De plus, nous montrons que 45 jours d'exposition à de l'HIC induit une activation du la sous-division ventro-latérale du noyau du tractus solitaire (vl-NTS), du noyau rétrotrapézoïde/groupe respiratoire parafacial (RTN/pFRG) et des raphés bulbaires obscurus (*ROb*) et magnus (*RMg*).

Chapitre III- Impact d'une exposition à de l'hypoxie intermittente chronique sur la commande centrale respiratoire dans un contexte de fibrose pulmonaire.

Introduction

Nous avons vu dans la Partie III de l'introduction que l'hypoxie intermittente chronique induit une neuroplasticité respiratoire en modifiant les seuils de chémosensibilité des chémorécepteurs périphériques (Lovett-Barr et al. 2006; Mateika and Syed 2013).

Dans cette partie du travail, nous proposons d'étudier, dans un contexte de fibrose pulmonaire stable et chronique, la répercussion de l'exposition à l'HIC sur le réseau de neurones respiratoires ponto-bulbaires.

Résultats

Pour réaliser ce travail, nous avons utilisé le modèle murin de fibrose chronique et stable obtenu après 90 jours de traitement à la Bléomycine présentée dans la *Partie I. Chapitre II* des résultats. Des souris mâles C57BL/6 de 8 semaines ont reçu 6 instillations IT de BLM à 0,8 UI/g ou de PBS toutes les deux semaines. Deux semaines après la dernière instillation les souris ont été sacrifiées afin de former deux groupes, le groupe instillé à la bléomycine et laissé en normoxie/air (BLM/AI) et le groupe contrôle instillé au PBS et laissé en normoxie/air (PBS/AI) (Figure 60). Afin d'étudier l'impact de l'HIC dans le contexte de fibrose pulmonaire, à J45, un groupe d'animaux a été exposé à de l'HIC en plus du protocole d'instillation IT de bléomycine toutes les deux semaines jusqu'à J90 (groupe BLM/HIC).

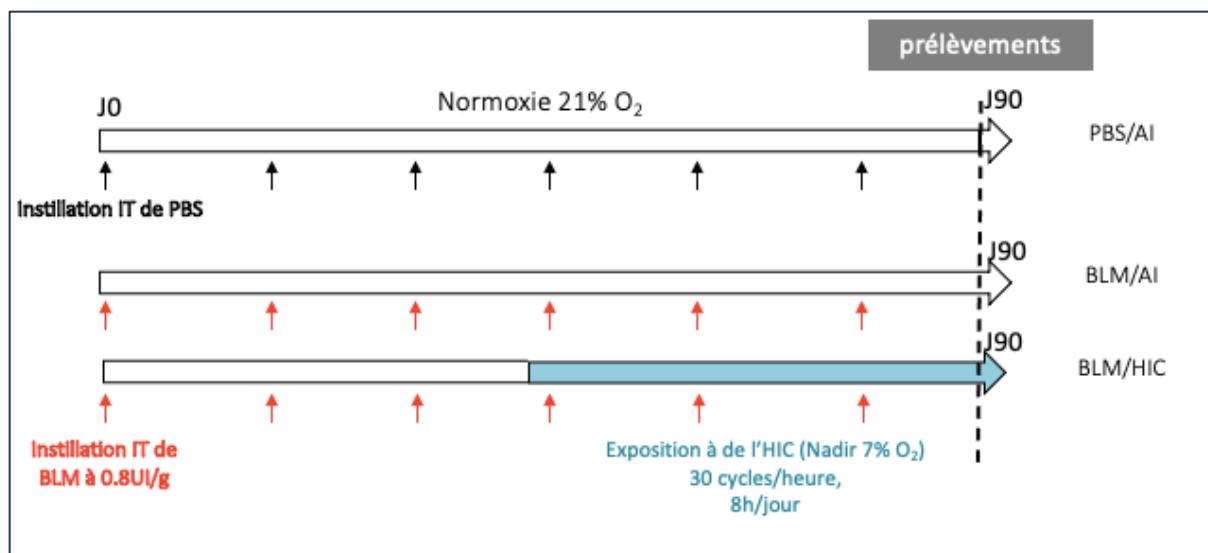


Figure 57: Protocole expérimental. Des souris mâles de souche C57BL/6 de 8 semaines ont reçu 6 instillations IT de BLM à 0,8UI/g (flèche rouge) ou de PBS (flèche noire). Deux semaines après la dernière instillation IT, les souris ont été sacrifiées afin de former respectivement les groupes BLM/AI (n=6) et PBS/AI (n=6). Un groupe de souris ayant reçu 6 instillations de BLM a été exposé à de l'HIC (nadir 7% O₂, 30 cycles/h, 8h/jours) le jour de la 4^e instillation jusqu'à la fin du protocole expérimental. Deux semaines après la dernière instillation, les souris ont été prélevées afin de constituer le groupe BLM/HIC (n=9).

a. Analyse des marqueurs pro-fibrosants et de la compliance pulmonaire

Comme montré précédemment, l'instillation de bléomycine (BLM/AI) induit un dépôt de collagène de type I et III (Figure 61.A), cependant l'exposition à de l'HIC (BLM/HIC) ne semble pas exacerber visuellement cet effet. La quantification du collagène dans le poumon par Sircoll (Figure 61.B) montre une augmentation de la quantité de collagène dans le groupe de souris présentant une fibrose et exposées à l'HIC (BLM/HIC) par rapport au groupe fibrose (BLM/AI) (Figure 61.B). L'analyse de la compliance pulmonaire (Figure 61.C) ne montre pas de différence significative entre le groupe fibrose pulmonaire (BLM/AI) et le groupe fibrose exposé à l'HIC (BLM/HIC), alors qu'une diminution significative est observée par rapport au groupe control (PBS/AI) (Figure 61.C).

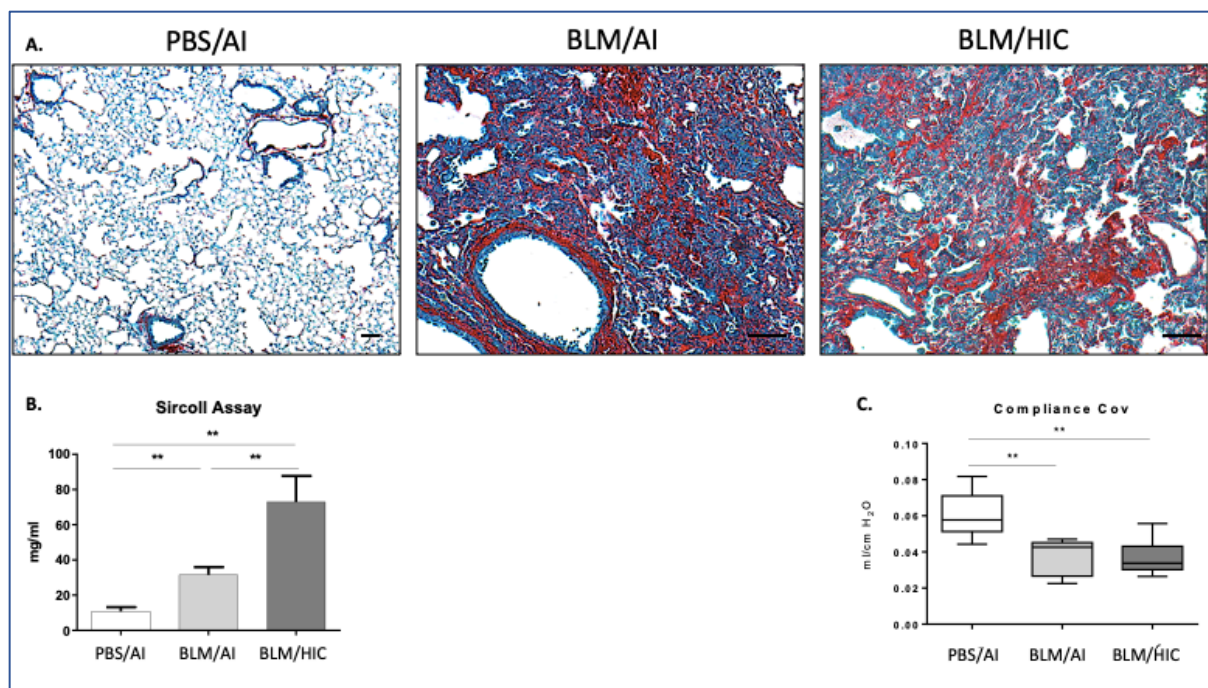


Figure 58: Architecture pulmonaire. A. Photographies représentant des coupes de poumon gauche inclus en paraffine et colorés au rouge Sirius-Fast green des groupes PBS/AI (n=11), BLM/AI (n=11) et BLM/HIC (n=9). Une photographie représentative par groupe a été illustré (barre d'échelle=100µm). B. Quantification du collagène dans le lobe inférieur du poumon. Toutes les valeurs sont représentées en tant que moyenne ± SD et soumises au test ANOVA One way. ** p≤0,001. C. La compliance dynamique pulmonaire sur des souris anesthésiées et trachéomisées à l'aide d'un pléthysmographe corps entier. Les résultats sont représentés en tant que moyenne ± SD et soumises au test de ANOVA One way. ** p≤0,001.

L'expression des gènes codants pour des protéines pro-fibrosantes tels que le collagène 1 (*Coll1a1*) (Figure 62.A), le collagène 3 (*Col3a1*) (Figure 62.B) et la fibronectine (*Fn1*) (Figure 62.C), ne montre aucune différence entre les différents groupes.

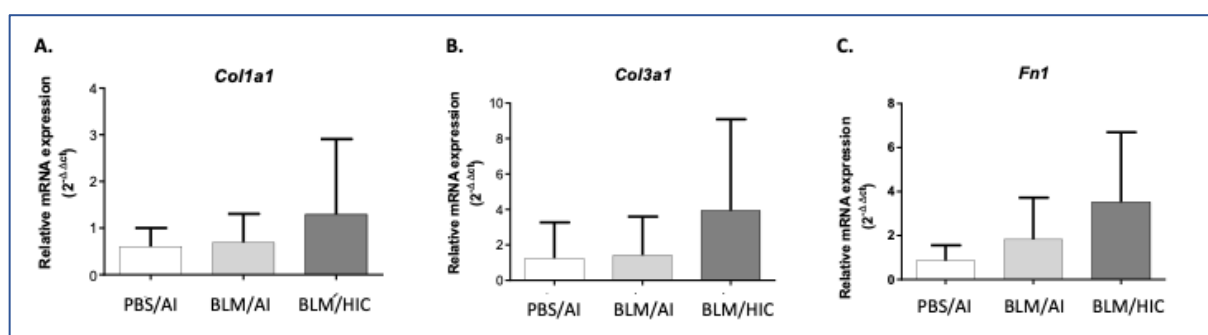


Figure 59: Expression des gènes codant pour des protéines pro-fibrosants. Quantification par RT-qPCR de l'expression des gènes codants pour les protéines pro-fibrosantes collagène 1 (*Col1a1*) (A), collagène 3 (*Col3a1*) (B) et Fibronectin (*Fn1*) (C) dans l'homogénat pulmonaire total des souris du groupe PBS/AI (n=11), BLM/AI (n=10) et BLM/HIC (n=9). Toutes les valeurs sont représentées en tant que moyenne ± SD et soumises au test ANOVA One way.

b. Analyse des cytokines pro-inflammatoires

La quantification des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β (Figure 63.A), CXCL8 (Figure 63.B) et TNF- α (Figure 63.C), ne montre aucune différence significative entre les groupes.

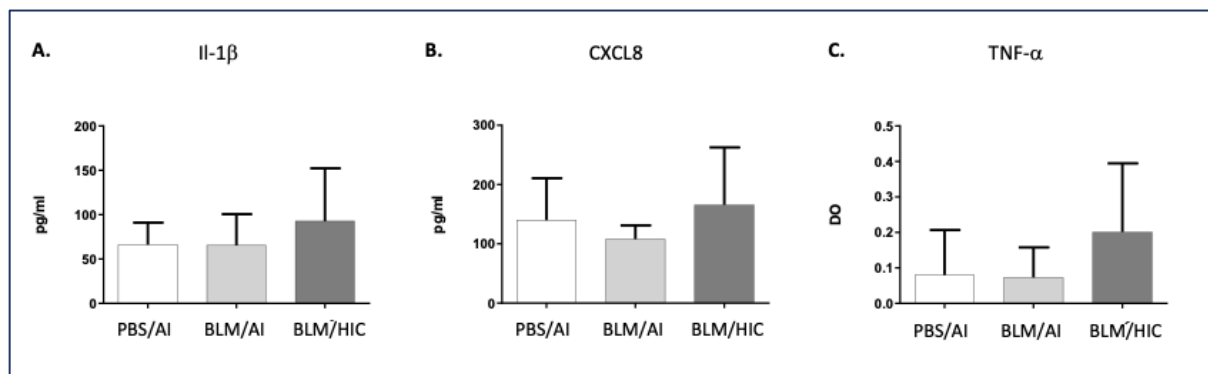


Figure 60: Expression des cytokines pro-inflammatoires. Quantification des protéines pro-inflammatoires IL-1 β (A), CXCL8 (B) et TNF- α (C) dans l'homogénat pulmonaire total des souris du groupe PBS/AI (n=11), BLM/AI (n=11) et BLM/HIC (n=9). Toutes les valeurs sont représentées en tant que moyenne \pm SD et soumises au test ANOVA One way.

c. Analyse de la fonction pulmonaire

L'analyse de la fonction pulmonaire montre que les souris BLM/AI présentent une augmentation de la ventilation (\dot{V}_E) supportée par une augmentation du volume courant (V_T) et de la fréquence respiratoire (Rf) (Tableau 5) comparé au groupe PBS/AI. Ces paramètres ne sont pas modifiés après expositions à de l'HIC au sein du groupe BLM/HIC comparé au groupe BLM/AI.

		PBS/AI	BLM/AI	BLM/HIC
V_E (ml.g⁻¹min⁻¹)	J0	2.14 ± 0.02	1.8 ± 0.02	1.7 ± 0.27
	J90	1.8 ± 0.03	4.8 ± 0.06 ^{**} , ^{##}	3.5 ± 0.38 [*] , [#]
V_T (μl. g⁻¹min)	J0	8.4 ± 0.6	7.2 ± 0.6	6.8 ± 0.9
	J90	7.2 ± 1.2	13.8 ± 1.2 [*] , ^{##}	9.8 ± 0.9
Rf (c.min⁻¹)	J0	255 ± 32	255 ± 30	255 ± 30
	J90	250 ± 23	346 ± 27 [*] , ^{##}	360 ± 14 [*] , ^{##}
T_i/T_{tot}	J0	0.30 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.30 ± 0.03
	J90	0.31 ± 0.01	0.34 ± 0.02	0.32 ± 0.02
T_v/T_i (μl.g. s⁻¹)	J0	0.12 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.01
	J90	0.13 ± 0.1	0.27 ± 0.1	0.19 ± 0.1
Saturation O₂	J90	98.64 ± 0.50	96.82 ± 4.06	98.48 ± 0.67

Tableau 5: Fonction ventilatoire et saturation en O₂. Représentation du débit ventilatoire (\dot{V}_E , en ml par min par g), du volume courant (V_T , en μ l par min par g), de la fréquence respiratoire (Rf , en cycles par min), du temps d'inspiration (T_i , en sec), du temps d'expiration (T_e , en sec), du temps total d'un cycle respiratoire ($T_{tot}=T_i+T_e$, en sec), du temps d'inspiration par rapport au temps total (T_i , T_{tot} , en sec), du volume courant par rapport au T_i (V_T/T_i , en μ l par g par min. Toutes les valeurs pour sont représentées en tant que moyenne \pm SD et soumises au test de Kruskal-Wallis. * compare à la fin de la 6^e instillation, les groupes BLM/AI ou BLM/HIC au groupe PBS/AI et # compare la condition J90 à la condition J0 respectivement à chaque groupe. Mesure en normoxie de la saturation en O₂ (en %) par oxymétrie de pouls infrarouge (mouseOxPlus®). Toutes les valeurs sont représentées en tant que moyenne \pm SD et soumises au test ANOVA Two way.

d. Analyse des structures respiratoires ponto-bulbaires

La quantification des neurones positifs pour le marqueur d'activité neuronale à long terme FOSB/ Δ FOSB (Figure 64) montre une augmentation de la quantité de neurones FOSB/ Δ FOSB positifs dans la sous-division commissural, médiane et ventro-latérale du noyau du tractus solitaire (c-NTS, m-NTS, vl-NTS), du noyau rétrotrapezoïde/groupe respiratoire parafacial (RTN/pFRG), le raphé magnus (*RMg*) et le noyau hypoglosse (12N) dans le groupe de souris présentant une fibrose pulmonaire exposées à l'HIC (BLM/HIC) comparé au groupe présentant une fibrose seule (BLM/AI).

	PBS/AI	BLM/AI	BLM/HIC
c-NTS	5.50 ± 2.16	10.95 ± 6.59**	28.45 ± 13.34 ^{\$\$\$}
m-NTS	5.93 ± 2.37	10.77 ± 2.35*	28.04 ± 17.16 [§]
vl-NTS	4.54 ± 2.04	7.67 ± 1.75*	21.12 ± 14.05 [§]
RTN/pFRG	5.15 ± 1.77	10.39 ± 5.68**	26.71 ± 12.17 ^{\$\$}
ROb	4.35 ± 1.75	6.60 ± 2.13	13.69 ± 11.19
RMg	5.72 ± 1.56	12.49 ± 5.44**	28.94 ± 14.26 [§]
RPa	5.58 ± 1.56	6.96 ± 2.11	20.41 ± 16.19
12N	5.27 ± 2.53	6.69 ± 2.34	21.71 ± 10.13 ^{\$\$\$}

Figure 61: Tableau représentant le nombre moyen de cellule FOSB/ Δ FOSB positifs par structure et par coupe. Toutes les valeurs sont représentées en tant que moyenne \pm SD et soumises au test ANOVA One way. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, les étoiles représentent les significativités entre les groupes BLM/AI et BLM/HIC, les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD. * compare le groupe BLM/AI au groupe PBS/AI et [§] compare le groupe BLM/HIC au groupe BLM/AI.

e. Réponses ventilatoires à l'hypoxie (HVR)

L'analyse de la réponse ventilatoire à l'hypoxie (Figure 65) montre une augmentation de la ventilation (\dot{V}_E) des souris du groupe PBS/AI (Figure 65.A) par rapport à leur condition normoxique. Cette augmentation de la ventilation est supportée par une augmentation du volume courant (Figure 65.B) et de la fréquence respiratoire (Figure 65.C). En revanche, aucune réponse à l'hypoxie n'est observée pour les groupes BLM/AI et BLM/HIC (Figure 65.A).

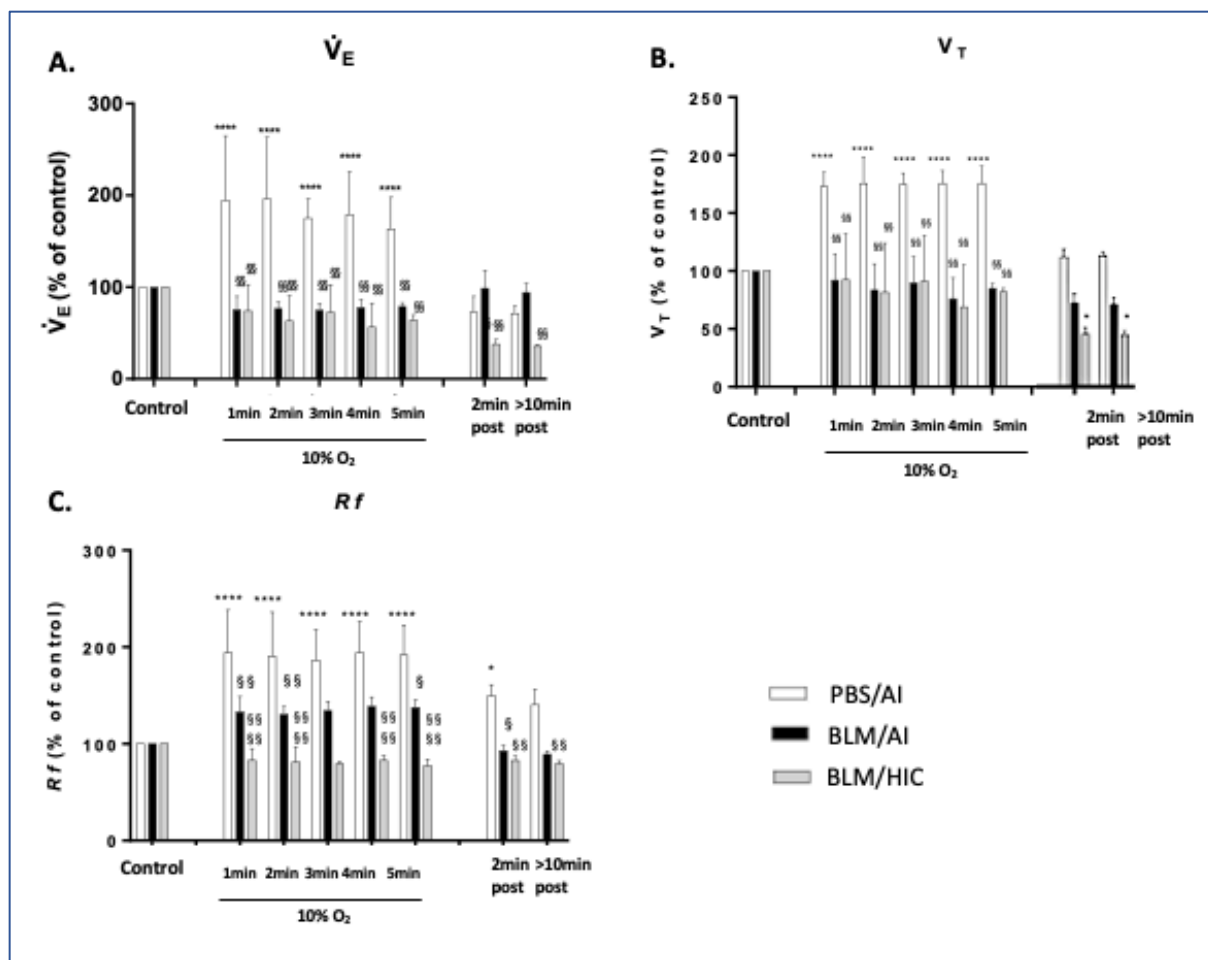


Figure 62: Réponse ventilatoire à l'hypoxie (HVR). Les souris ont été exposées à un mélange d'air normoxique à 21% d'O₂ puis exposées durant 10 minutes à un mélange hypoxique à 10% d'O₂ avant un retour en condition normoxique (21% d'O₂) durant 10 minutes. A. Mesure du débit ventilatoire (\dot{V}_E) obtenu par le produit du volume courant (V_T) et de la fréquence respiratoire (Rf). B. Mesure du volume courant. C. Mesure de la fréquence respiratoire. Toutes les valeurs sont représentées en tant que moyenne \pm SD et soumises au test ANOVA Two way. * compare chaque condition à sa condition normoxique et les \$ compare les conditions aux groupes contrôles.

f. Réponses ventilatoires à l'hypercapnie (HcVR)

L'analyse de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie (HcVR) (Figure 66) montre une augmentation non significative du débit ventilatoire (\dot{V}_E) (Figure 66.A) dans le groupe PBS/AI, lié à une augmentation significative de la fréquence respiratoire (Rf) (Figure 66.C). On note également une augmentation du débit ventilatoire dans le groupe BLM/HIC alors que le groupe BLM/AI ne semble pas répondre à l'hypercapnie.

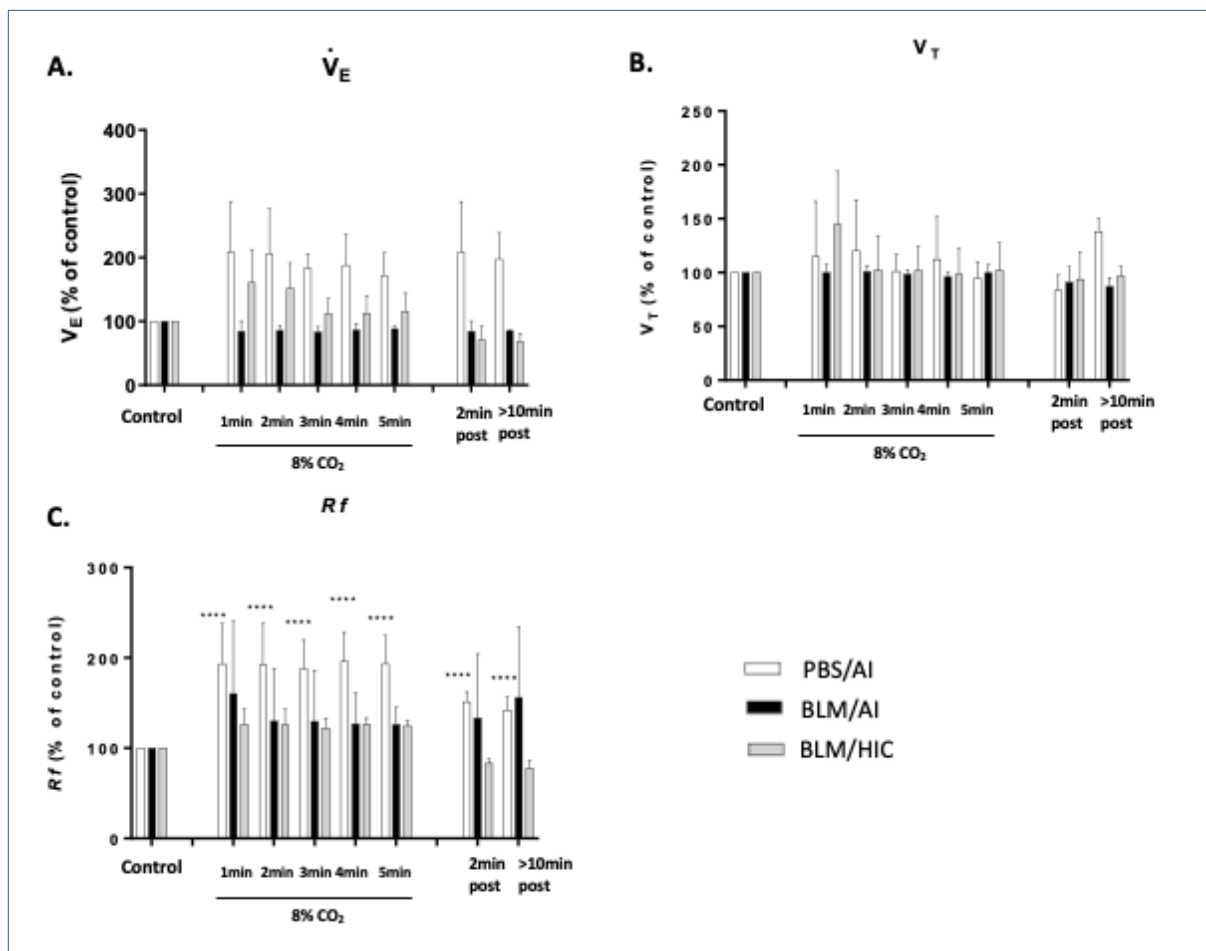


Figure 63: Réponse ventilatoire à l'hypercapnie (HcVR). Les souris ont été exposées à un mélange d'air normoxique à 21% d'O₂ puis exposées durant 10 minutes à un mélange d'air hypercapnique à 8% d'CO₂ avant un retour en condition normoxique (21% d'O₂) durant 10 minutes. A. Mesure du débit ventilatoire (\dot{V}_E) obtenu par le produit du volume courant (V_T) et de la fréquence respiratoire (Rf). B. Mesure du volume courant. C. Mesure de la fréquence respiratoire. Toutes les valeurs sont représentées en tant que moyenne \pm SD et soumises au test ANOVA Two way. * compare chaque condition à sa condition normoxique et les \$ compare les conditions aux groupes contrôles.

Conclusion

Chez les souris présentant une fibrose pulmonaire, l'exposition à l'HIC conduit à une augmentation de la quantité de collagène et une activation supplémentaire des neurones dans les sous-divisions commissurales et médianes du noyau du tractus solitaire (c-NTS et m-NTS) et le 12N.

Discussion générale

Mes travaux de recherches ont permis d'évaluer l'impact d'une atteinte pulmonaire de type fibrosante sur le réseau de neurones respiratoires associé ou non à un contexte d'hypoxie intermittente chronique.

La première partie de mes travaux a permis de mettre en place et de caractériser un modèle murin de fibrose pulmonaire chronique et stable dans le temps qui présente de nombreuses caractéristiques histologiques et moléculaires se rapprochant de celles observées chez les patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique. Nous avons par la suite utilisé ce modèle pour évaluer la possibilité de recréer et d'étudier les phases d'aggravation de la maladie (EA). Par la suite, nous avons montré qu'une aggravation aiguë de la fibrose pulmonaire induit un remodelage supplémentaire avec une augmentation de la quantité de collagène, une apoptose, une inflammation et la présence du facteur HIF-1 α .

Dans la seconde partie de nos travaux, nous avons montré qu'une fibrose pulmonaire chronique modifie la ventilation de base et abolie les réponses ventilatoires suite à un stimulus hypoxique et hypercapnique. Nous avons également caractérisé l'impact de modifications de l'architecture pulmonaire sur le réseau respiratoire et identifié les structures présentant une neuroplasticité.

Pour finir, nous avons décrit l'impact d'expositions longues à de l'hypoxie intermittente chronique sur la sévérité de la fibrose pulmonaire ainsi que sa répercussion sur les réponses ventilatoires, le réseau et la plasticité des neurones respiratoires.

Comparaison du modèle murin de fibrose pulmonaire obtenu par instillation unique de bléomycine à celle obtenue par instillations répétées

I. Les modèles murins de fibrose pulmonaire

La physiopathologie de la FPI est décrite comme un dérèglement de la réponse de l'épithélium pulmonaire à des lésions chroniques conduisant à une réparation aberrante de l'épithélium alvéolaire et l'instauration d'un tissu cicatriciel. L'ensemble de ces lésions conduit à la destruction des structures pulmonaires et au développement d'une insuffisance respiratoire chronique. De nombreuses études montrent qu'une grande variété de cytokines pro-inflammatoires comme le TGF- β , le TNF- α ou des interleukines jouent un rôle important dans la pathogénicité de la fibrose pulmonaire idiopathique. La/les causes de la maladie restent mal connues et aucun traitement curatif n'est encore disponible pour soigner les patients. Afin de mieux comprendre la physiopathologie de la FPI, il est nécessaire de disposer d'un modèle animal développant une fibrose pulmonaire assez proche de celle retrouvée chez les patients (De Vuyst and Camus 2000). Un des premiers modèle murin de fibrose pulmonaire étudié résultait d'une déficience en tyrosine phosphatase SHP1, qui conduisait à une inflammation sévère au sein de différents organes, notamment des poumons (Rossi et al. 1985). Cependant, il a été montré que ce modèle reflète davantage une alvéolite inflammatoire avec œdème et ne présente que très peu de caractéristiques spécifiques de la fibrose (Bringardner et al. 2008). Ainsi, il a été nécessaire de développer un modèle murin de fibrose pulmonaire présentant l'ensemble des caractéristiques décrit selon l'« Usual Interstitial Pattern ». De nombreux modèles de fibrose pulmonaire obtenus par mutations génétiques ou par traitement pharmacologiques ont été proposés. Parmi les modèles génétiques, des modèles de fibrose obtenues par surexpression du TGF- β (Sime et al. 1997) du TNF- α (Miyazaki et al. 1996) d'IL-1 β (Kolb et al. 2001) ou d'IL-13 (Zhu et al. 1999) ont été proposé chez la souris. Cependant, ces modèles présentent tous des limites. Les modèles obtenus par surexpression du TGF- β et du TNF- α développent des fibroses réversibles dans le temps (Lee et al. 2004; Redente et al. 2014). Les modèles obtenus par surexpression des interleukines conduisent au développement d'une fibrose très inflammatoire limitant les études des mécanismes impliqués dans son développement (Zhu et al. 1999; Kolb et al. 2001). Parmi les fibroses pulmonaires obtenues suite à un traitement pharmacologique, on retrouve la fibrose déclenchée par injection de FITC (Christensen et al. 1999), ou par de la silice

(Shoeb et al. 2019). Un autre modèle de fibrose pulmonaire, le plus étudié aujourd'hui est celui induit par une instillation intra-trachéale de Bléomycine (BLM) (TIANJU et al. 2017).

II. Modèle murin de fibrose pulmonaire obtenu par instillation de bléomycine

1) Rappels sur le modèle murin de fibrose pulmonaire le plus utilisé

La bléomycine (BLM) est une molécule extraite d'un antibiotique qui a été isolé d'une souche de *Streptomyces verticillus* en 1967 (Umezawa et al. 1967). La BLM a été utilisée avec succès pour traiter de nombreux cancers et le lymphome de Hodgkin. Cette molécule entraîne des ruptures d'ADN simple et double brin, ce qui a pour conséquence d'interrompre le cycle cellulaire et de produire des radicaux libres superoxyde et hydroxyde qui détruisent l'ADN (Claussen and Long 1999). L'un des effets secondaires du traitement à la BLM est sa capacité à provoquer des lésions cellulaires importantes et une inflammation localisée. On observe alors chez les patients traités avec de la bléomycine un œdème interstitiel avec une infiltration de cellules inflammatoires et immunitaires et une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui peuvent conduire au développement d'une fibrose pulmonaire interstitielle (également appelée alvéolite fibrosante) (Bonniaud 2005; Sleijfer and Pasquet 2008; Biya et al. 2016).

De ce fait, la bléomycine a été utilisée chez la souris pour créer un modèle expérimental de fibrose pulmonaire (Moore and Hogaboam 2008). Ce modèle murin reste le mieux décrit et le plus utilisé. Il a permis la description de multiples phénomènes moléculaires et cellulaires impliqués dans la fibrogénèse pulmonaire et a été utilisé pour tester de nombreuses stratégies thérapeutiques.

Le développement d'une fibrose pulmonaire plus ou moins sévère a été observé pour différentes doses de bléomycine injectées à l'animal mais également pour différentes souches de souris utilisées (Gabetta 1989). Ainsi des doses variables de 1,25 UI/kg (Hecker et al. 2015) jusqu'à un maximum de 4 UI/kg (Ortiz et al. 2003; Rojas et al. 2005) de bléomycine ont été injectés chez l'animal. Suite à l'instillation de la BLM, trois étapes majeures sont observées : une **étape inflammatoire** 8 jours après l'instillation (J8), illustratif de ce modèle et caractérisée par un large infiltrat cellulaire composé essentiellement de cellules inflammatoires telles que les lymphocytes et les macrophages, mais aussi la présence de marqueurs pro-inflammatoires tels que des cytokines et chimiokines (Izbicki et al. 2002; Moore and Hogaboam 2008); puis une **phase**

fibrosante avec un pic à J14, une fibrose établie jusqu'à J21 et enfin une **résorption des lésions** après 28 jours (Figure 67) (Janick-Buckner et al. 1989; Izbicki et al. 2002; Tashiro et al. 2017).

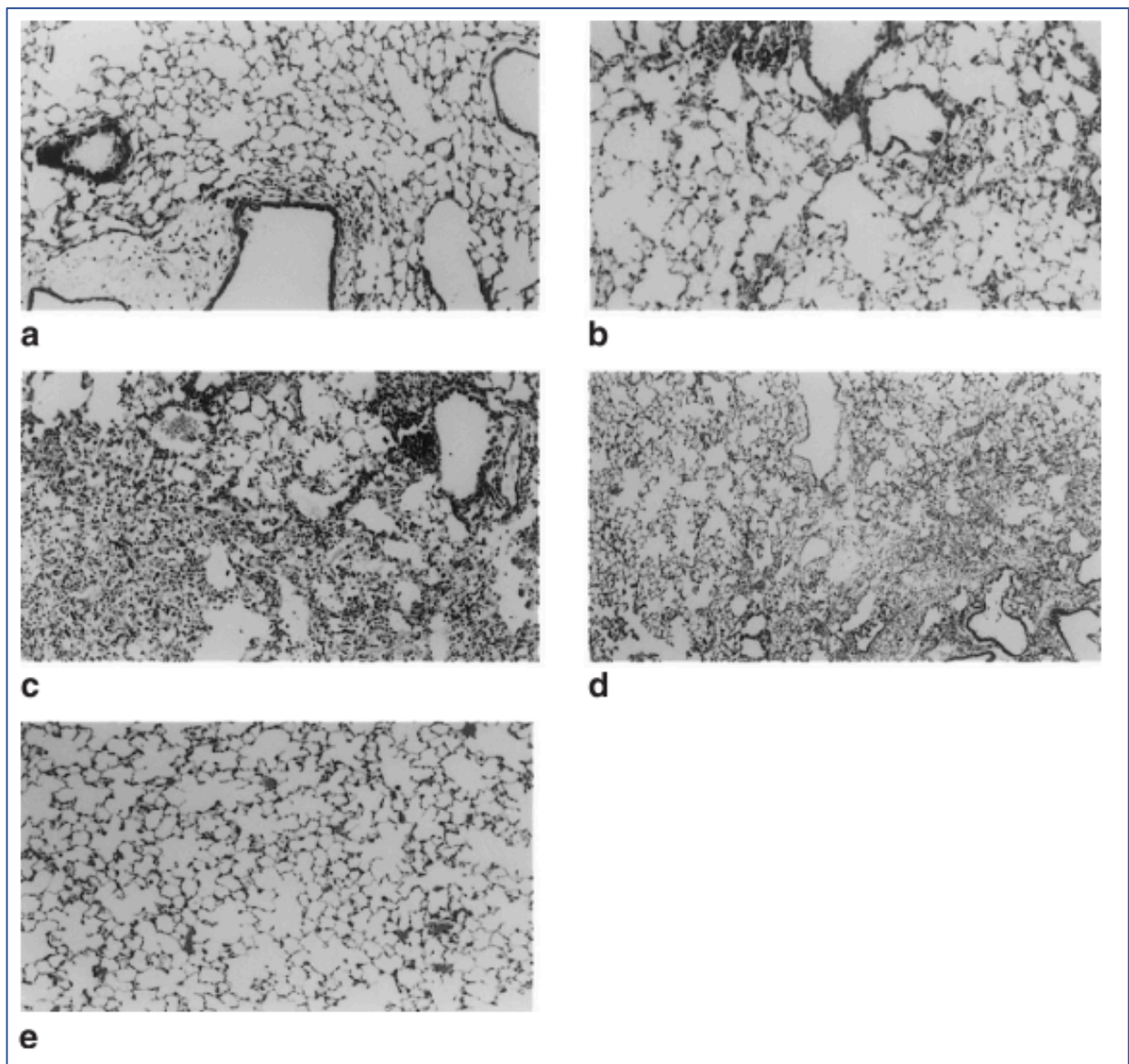


Figure 64: Installation d'une fibrose pulmonaire induit par la bléomycine au cours du temps. Photographies représentant des poumons de souris traitées à la bléomycine ou PBS coloré à l'hématoxyline-éosine A. Trois jours après l'instillation, il est observé une augmentation du nombre de lymphocytes au niveau péri-vasculaire et péribronchique. B. Six jours après l'instillation de BLM, il est observé une fibrose sous-pleurale. C. Quatorze jours plus tard, il est observé une augmentation du nombre de macrophage dans les espaces alvéolaires mais également de foyer de fibroblastes. D. A 21e jours, il est observé des lésions importantes avec des zones denses de fibroses. E. Poumon traité avec une solution saline ne présentant pas de remodelage l'architecture pulmonaire. D'après (Izbicki et al. 2002).

La fibrose semble se développer de manière péribronchique, aléatoirement et de manière hétérogène suivant la diffusion de la bléomycine entre les deux poumons ; contrairement à une

distribution sous-pleurale observée chez le patient (Figure 68) (Borzzone et al. 2001; Harari and Caminati 2005; Nalysnyk et al. 2012).

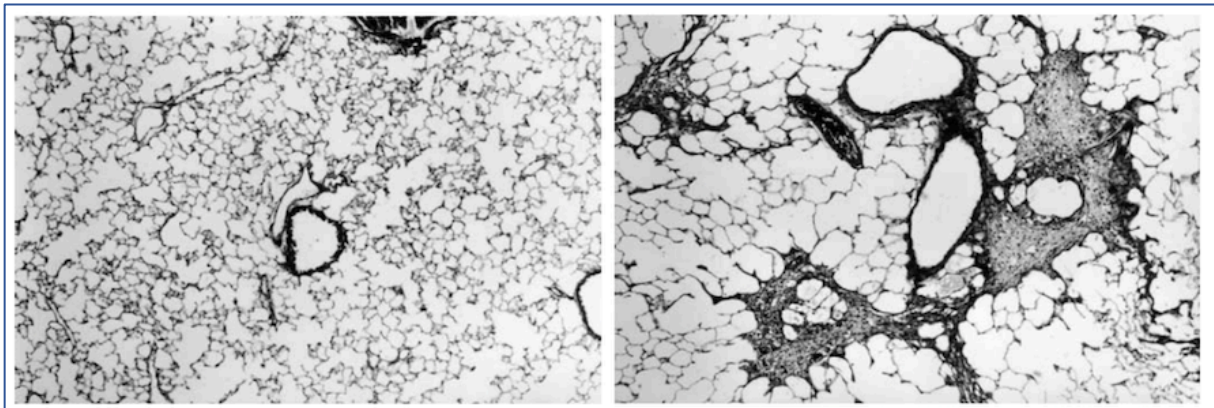


Figure 65: Fibrose pulmonaire hétérogène observé suite à une instillation unique de bléomycine. Photographies de poumon de rat traité avec du PBS (à gauche) ou de la bléomycine (à droite) coloré à l'hématoxyline-éosine (grossissement x40). L'instillation d'une dose unique de BLM conduit à des dépôts de fibrose péribronchique répartis de manières hétérogènes sur la surface du poumon. Adaptée d'après (Borzzone et al. 2001).

Un des points critiques majeur de ce modèle est la réversibilité des lésions, ce qui n'est pas le cas chez le patient, et le fait que la fibrogénèse ne suive pas le cours normal d'évolution de la maladie. Bien que l'étude du caractère réversible de cette fibrose soit très intéressante dans un but thérapeutique, cet aspect limite les études consistants à la compréhension des mécanismes à l'origine de la persistance de la fibrose pulmonaire observée chez l'homme.

Par ailleurs, on observe dans ce modèle, une distribution hétérogène des altérations de la compliance pulmonaire dynamique avec une atteinte très forte pour certaines souris et des altérations moins significatives pour d'autres (Borzzone et al. 2001; Moore and Hogaboam 2008). Cette observation diffère de la dyspnée et des signes de restriction avec une diminution de la capacité vitale forcée et de la compliance pulmonaire observée chez tous les patients FPI (Harari and Caminati 2005). Ainsi, il a été nécessaire de proposer de nouveaux modèles, plus proche ce qui est observé et décrit chez l'homme avec une fibrose pulmonaire évolutive au cours du temps.

2) Caractéristiques du nouveau modèle murin de fibrose pulmonaire

Le modèle animal que nous avons développé par injection répétée d'une dose de bléomycine à 0,8UI/g espacée de deux semaines permet de générer à chaque instillation des micro-agressions de l'épithélium alvéolaire. Ces micro-agressions vont conduire à

l'instauration progressive de la fibrose pulmonaire au cours du temps mimant ce qui est décrit chez les patients (Degryse et al. 2010)(Redente et al. 2021). L'inflammation en réponse à la BLM pouvant être un facteur concomitant au développement de la lésion (Rosa et al. 2014), nous avons espacés les instillations de 15 jours afin de nous affranchir du pic inflammatoire observé 7 jours après une instillation de BLM. Nos résultats montrent l'installation d'une fibrose pulmonaire dès trois instillations IT de BLM, caractérisée par un remaniement du tissu pulmonaire et la présence d'une quantité importante de collagène dans les poumons. Ces observations rejoignent celles caractérisant l'UIP (Adamson and Prieditis 1998; Reed et al. 2015; Williamson et al. 2015; Gschwandtner et al. 2017). Le développement d'une fibrose pulmonaire peu inflammatoire dans ce modèle a également été rapporté par l'équipe d'amber Degryse (Degryse et al. 2010).

Dans notre modèle, l'induction de l'ensemble des marqueurs classiquement décrits dans la FPI, tels que l'expression des gènes pro-fibrosants *Coll1a1*, *Col3a1* et *Fnl*, mais également l'infiltration de différentes populations de cellules inflammatoires notamment des macrophages, des lymphocytes T et des lymphocytes B correspondant aux critères UIP ne sont observable qu'après 6 instillations IT, bien que de nombreuses cytokines pro-inflammatoires en sont détectés que suite à 3 instillations. Dans les poumons des souris ayant reçus trois instillations IT de BLM et prélevées trois mois plus tard, les analyses histologiques et les quantifications de collagène montrent la persistance de la fibrose au cours du temps. Ces mêmes observations ont été rapportées très récemment par l'équipe d'Elizabeth Redent jusqu'à 12 semaines après trois instillations IT de BLM (Redente et al. 2021). De manière intéressante, nous avons réalisé une description histologique précise des biopsies pulmonaires sur lesquelles nous observons une fibrose évoluant naturellement de manière très similaire à ce qui est observé chez les patients avec la présence des foyers de fibrose localisés au niveau sous-pleural. Les immunomarquages montrent une population de lymphocytes de type B et de macrophages de type M2 pro-fibrosants. Ces macrophages de type M2, majoritairement présents dans un poumon fibrotique (Gordon and Martinez 2010; Wynn et al. 2013) sont nécessaires à la résolution de la lésion et sécrètent de nombreux facteurs de croissance, notamment le TGF- β , mais également le FGF, le PDGF, le VEGF (Duru et al. 2016), la L-Arginine contribuant à la synthèse du collagène (Mills 2012), ou encore CCL18 (Schraufstatter et al. 2012) chémoattractant des lymphocytes T et activateur des fibroblastes (Chenivresse and Tsicopoulos 2018). Cependant, l'analyse des différents types de cellules inflammatoires présentent au niveau des zones de fibrose, n'a pas permis d'identifier de neutrophiles, pourtant décrit comme participants à la

fibrogénèse chez le patient *via* leur action sur la prolifération et la différenciation des fibroblastes et l'activation du TGF- β (Gregory et al. 2015).

Enfin, de manière complémentaire aux analyses effectuées par l'équipe de Redente (Redente et al. 2021), nous avons analysé les paramètres ventilatoires associées à cette fibrose chronique et évolutive. L'analyse de la fonction pulmonaire montre la diminution de la compliance pulmonaire et une altération des variables ventilatoires avec une augmentation de la ventilation caractérisée par une augmentation de la fréquence de manière similaire à ce qui est observé chez les patients FPI (FUMEAUX et al. 2003; Harari and Caminati 2005).

III. Caractérisation des évènements cellulaires et moléculaires observés dans ce modèle murin de fibrose pulmonaire

1) Mise en évidence d'une apoptose des cellules pulmonaire

L'apoptose joue un rôle crucial dans la physiopathologie de la FPI, et peut contribuer à une réparation aberrante de l'épithélium alvéolaire si celle-ci est altérée ou dérégulée (Uhal et al. 1998; Maeyama et al. 2001; Plataki et al. 2005; Uhal 2008). En effet, alors que les CEA II meurent par un excès d'apoptose, les fibroblastes présentent une résistance accrue à la mort cellulaire programmée (Drakopanagiotakis et al. 2008; Im et al. 2016). Cependant, le manque d'élimination des fibroblastes observé dans la FPI pourrait également être associé à un défaut d'efferocytose (Blirando 2021) impliqué également dans l'orientation des macrophages vers un phénotype M2 pro-fibrosant. (Lee et al. 2012). Nos résultats montrent la présence d'une augmentation de l'activité des caspase 3 et 7 mais également une dégradation importante de l'ADN témoignant d'une apoptose dans notre modèle de fibrose pulmonaire. Nos analyses histologiques montrent que les principales cellules TUNEL positives (apoptotiques) sont les CEA II. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature, démontrant une augmentation des protéines pro-apoptotiques Bax ou caspase 3 et une diminution des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 dans les CEA de patients atteints de FPI (Plataki et al. 2005). Cependant, il serait intéressant d'analyser, dans notre modèle, les variations d'expressions de ces marqueurs.

2) Mise en évidence d'un stress oxydant et de l'expression des marqueurs de senescence

Le stress oxydant est impliqué dans de nombreuses pathologies et pourrait contribuer à l'initiation de la fibrogénèse dans la FPI. En effet, une quantité importante d'espèces réactives

de l'oxygène (ROS) (Teramoto, S. 1995; Rahman et al. 1999) et une augmentation des marqueurs de stress oxydatif a été rapporté dans les poumons et dans le sérum des patients atteints de FPI (Rahman et al. 1999). Par ailleurs, une altération du système redox dans le LBA de ces patients a également été décrite (Beeh et al. 2002). Dans notre étude, les poumons d'animaux avec une fibrose pulmonaire induite expérimentalement présentent une quantité importante de 8-OHdG et de p- γ H₂AX. Ces facteurs témoignent de lésions au niveau de l'ADN, et sont souvent associées à la présence d'un stress oxydant majeur. L'analyse de l'expression de facteurs pro et anti-oxydants dans notre modèle permettra de confirmer la présence de ce déséquilibre. Cette information est d'autant plus importante que l'existence d'un stress oxydant peut conduire à un état de sénescence cellulaire, qui est par ailleurs mis en évidence chez les patients FPI au niveau des fibroblastes mais également des CEA II (Minagawa et al. 2011; Demaria et al. 2014; Álvarez et al. 2017; Liu and Liu 2020). Dans notre modèle, par immunohistochimie, nous avons mis en évidence l'expression des acteurs du cycle cellulaire p16^{INK4} et p21^{WAF1} qui semblent être exprimés niveau des CEA II. L'expression de ces marqueurs associés à la senescence renforce l'hypothèse d'un mécanisme complexe et intégré dans la physiopathologie de la fibrose pulmonaire mêlant inflammation et apoptose médié par le SASP que sécrètent ces cellules sénescents (Zhu et al. 2014) sur les cellules environnantes telles que les cellules épithéliales, endothéliales, les fibroblastes et les macrophages (Kasahara et al. 2001; Yokohori et al. 2004).

3) La place de l'inflammation dans les exacerbations aiguës

Certains patients atteints de FPI peuvent voir leur fonction respiratoire se dégrader très rapidement suite à la survenue d'une exacerbation aiguë (EA). À ce jour, il n'existe pas de modèle animal idéal pour l'étude de la survenue des exacerbations aiguës idiopathiques. Une seule étude rapporte l'utilisation du virus de l'herpès dans un modèle de fibrose pulmonaire induit par de la FITC (Moore and Hogaboam 2008) provoquant une augmentation des réponses fibrotiques (Lok et al. 2002). Cependant, l'induction d'une infection virale complexifie l'utilisation de ce modèle. Ainsi, nous proposons un modèle d'EA provoqué par une instillation de BLM à forte dose sur un modèle de fibrose déjà installée. De manière intéressante, il a été montré que le lavage broncho alvéolaire (LBA) des patients ayant une EA présentent une quantité importante de neutrophiles (Schupp et al. 2015), et un taux élevé de chimiokines IL-8 et CXCL1 activant les macrophages M1, et attirant et activant les neutrophiles (Schupp et al. 2015). Nous n'avons pas récupéré le LBA de nos souris après l'EA et cette donnée aurait pu être très informative sur l'effet de cette instillation plus forte de BLM sur l'aggravation de la fibrose.

Cependant, nos résultats montrent une quantité importante des cytokines pro-inflammatoires KC et du TNF- α mais également une quantité plus importante de marquage F4-80 (macrophages). Nous observons également une stabilisation plus importante du facteur HIF-1 α . De manière intéressante, un rôle de HIF en tant que régulateur de l'immunité et de l'inflammation a été proposé (Palazon et al. 2015; Wang et al. 2020). HIF induirait le facteur TNF- α (Haddad and Land 2001), ou encore NF-KB, favorisant la survie des neutrophiles, et entraînant une inflammation importante (Walmsley et al. 2005). La présence de marquages très importants de HIF sur les coupes histologiques d'animaux exposés à une EA suggère la présence d'un microenvironnement hypoxique très localisé au niveau des CEA. Cette hypoxie localisée a été observée sur les scanner de patients et observés après TM et injection de f-MISO (Porter et al. 2021) mais également sur les biopsies de patients et dans les modèles murins de fibrose pulmonaire via l'expression de HIF (Tzouvelekis et al. 2007; Weng et al. 2014; Burman et al. 2018; Delbrel et al. 2019) et semblerait contribuer au processus fibrosant via l'activation de l'apoptose (Bernard et al. 2018), de la TEM (Uzunhan et al. 2016) et du stress du RE (Delbrel et al. 2019). De plus, il a été décrit que les patients présentant une EA ont un déclin de leur fonction respiratoire (Kim et al. 2006; Churg et al. 2007). Ainsi, il serait intéressant de documenter l'existence d'un tel déclin dans notre modèle.

Impact d'une fibrose pulmonaire sur le réseau de neurones respiratoires

I. Conséquence d'une activation du réseau de neurone respiratoire en réponse à une fibrose pulmonaire

Les patients atteints de FPI présentent un épaissement de leur épithélium alvéolaire ou des troubles de circulation pouvant conduire à un défaut de perfusion pulmonaire (Plantier et al. 2018) pouvant générer une hypoxémie. De plus, cette hypoxémie peut également être la résultante d'une augmentation de l'espace mort ou d'une altération de la perfusion pulmonaire (Plantier et al. 2018). Ce taux de variation d'O₂ (King et al. 2001) peut être détecté par les chémocapteurs périphériques sensibles aux variations de PaO₂, PaCO₂ et de pH (Dejours 1962; Biscoe et al. 1970; Fitzgerald and Dehghani 1982; Andrade et al. 2018) comme décrit dans *la Partie I. Chapitre III de l'introduction*. De plus, l'accumulation d'un excès de collagène conduit à une rigidité pulmonaire se traduisant par une diminution de la compliance pulmonaire (Raghu 2011), pouvant être perçue par les mécanorécepteurs thoraco-pulmonaires (Mathew and Ghosh 1995) ou les récepteurs à l'étirement (Carr and Undem 2003; Del Negro et al. 2018). Nos travaux montrent que les souris développant une fibrose pulmonaire présentent une activation des sous divisions commissural et médiane du noyau du tractus solitaire (c-NTS et du m-NTS), structures caractérisées comme point d'entrées des afférences périphériques chimiques (Torrealba and Claps 1988; Finley and Katz 1992) et mécaniques (Kalia and Mesulam 1980a, b). Par la suite, le NTS projette vers l'ensemble du réseau neuronal respiratoire (Schelegle et al. 2001; Pascual et al. 2002; Buchanan and Richerson 2010; Wakai et al. 2015). Cependant, dans notre étude, nous n'avons pas réussi à discriminer si la neuroplasticité avait pour origine les contraintes mécaniques au niveau pulmonaire et/ou l'hypoxémie induite par le remaniement pulmonaire. De plus, nos résultats montrent une augmentation de fréquence respiratoire chez les animaux présentant une fibrose pulmonaire. Cette augmentation de la ventilation peut être liée à une augmentation de l'activité du préBötC consécutive à la stimulation du réseau respiratoire par les afférences périphériques. De plus nous montrons une augmentation d'activité dans le RTN/pFRG ce qui pourrait être le reflet de la mise place d'une expiration active comme suggéré dans la littérature.

II. Altération de la réponse ventilatoire à l'hypoxie et à l'hypercapnie dans la fibrose pulmonaire

Dans notre modèle, l'analyse des structures neuro-respiratoires montre que la fibrose pulmonaire induit une activation, des trois sous-divisions du NTS, du RTN/pFRG et des *Raphés bulbaires*. La littérature montre que le RTN/pFRG et les *Raphés bulbaires* sont impliqués dans les régulations chémoréflexes (Richerson 2004; Corcoran et al. 2009; Da Silva et al. 2011; Ray et al. 2011). Ainsi, les phénomènes de neuroplasticité liés à la fibrose pulmonaire et observés au niveau du RTN/pFRG et des *Raphés bulbaires* pourraient être à l'origine des modifications des réponses ventilatoires à l'hypoxie et à l'hypercapnie dans notre modèle, suggérant que ces altérations puissent avoir une origine centrale. D'autre part, l'hypoxémie consécutive à la fibrose pourrait modifier les seuils de sensibilité des chémorécepteurs contribuant également à l'abolition de ces réponses ventiatoires. Ces données sont en accord avec les observations cliniques rapportant une altération des régulations ventilatoires chez certains patients atteints de FPI (Launois et al. 1991; Javaheri and Sicilian 1992).

Limite du modèle d'hypoxie intermittente chronique dans les phénomènes d'aggravation de la FPI liés au SAHOS

De nombreuses études observent des SAHOS chez les patients atteints de FPI sans savoir si il précède l'apparition de la pathologie et les mécanismes moléculaires ne sont pas parfaitement connus (Mermigkis et al. 2007; Lancaster et al. 2009a; Gille et al. 2018). L'analyse des biopsies pulmonaires de patients atteints de FPI (Korfei et al. 2008) mais également des poumons de souris développant une fibrose pulmonaire (Hsu et al. 2017) montrent la présence de marqueurs du stress du RE. De plus, des études montrent que l'exposition à de l'HIC induit un stress du RE (Belaidi et al. 2016b; Shi et al. 2020), et que cette induction pourrait dépendre de la stabilisation du facteur HIF-1a par l'HIC. Induisant les protéines HIF, PERK, ATF-4, et CHOP (Belaidi et al. 2016b), également décrits dans le processus de fibrogénèse, l'HIC pourrait être un facteur aggravant de la fibrose pulmonaire. Cependant, dans notre modèle, l'ajout d'une HIC dans un modèle de fibrose installé ne semble pas moduler l'expression de ces facteurs. Durant ma thèse, nous avons également montré que le pré-conditionnement à de l'HIC durant 28 jours avant le développement de la fibrose pulmonaire exacerbe la fibrose pulmonaire par un mécanisme impliquant un stress du RE (Haine et al. 2021a). Ainsi, afin d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'aggravation de la fibrose pulmonaire associé à de l'HIC, il serait intéressant d'évaluer dans notre modèle l'impact d'une préexposition à de l'HIC sur la sévérité de la fibrose. De ce fait, suite à l'exposition à de l'HIC, une fibrose pulmonaire induite par 3 instillations répétées comme décrit dans la *Partie I* des résultats peut être envisagée.

Bien que le modèle classiquement utilisé pour mimer le SAHOS soit l'exposition à une hypoxie intermittente, il ne permet pas de prendre en considération la composante hypercapnique ni l'obstruction des VAS. En effet, le SAHOS est défini par une répétition d'épisodes d'hypoxie-hypercapnie réoxygénation. Il a été montré que l'exposition à de l'hypercapnie entraîne une neuroplasticité respiratoire au niveau des *Raphés bulbaires* suite à l'activation de la voie sérotoninergiques (Yue et al. 2008; De Carvalho et al. 2013). Dans notre modèle expérimental visant à mimer les effets du SAHOS, les cycles d'HIC sont uniquement générés par une baisse de la FiO_2 sans impacter le taux de CO_2 , ne prenant pas en considération les épisodes d'hypercapnie que l'on peut observer chez les patients. Ainsi, nous nous confrontons à une limite non négligeable de ce modèle. En effet, la chémosensibilité au CO_2/H^+

qui pourrait influencer la plasticité neuronale associée au SAHOS n'est pas prise en compte dans ce modèle et pourrait jouer un rôle majeur dans la sévérité de la fibrose pulmonaire.

Par ailleurs, chez les patients présentant un SAHOS, on observe une altération de la stimulation des VAS, ce qui pourrait contribuer aux effets délétères sur le poumon. Ces contraintes mécaniques ne sont pas reproduites dans notre protocole expérimental. De ce fait, les répercussions de la stimulation des mécanorécepteurs pharyngés dans les sous-divisions commissural et médiane du noyau du tractus solitaire (c-NTS et m-NTS) ne sont pas pris en compte dans notre modèle. Or de nombreuses études ont montré que les stimuli mécaniques induisent une activation du TGF- β par le biais des plusieurs types cellulaires (Sakata et al. 2004; Wipff et al. 2007; Sarrazy et al. 2014), suivie d'une fibrogénèse (Giacomini et al. 2012; Reed et al. 2015). Ainsi, la stimulation des mécanorécepteurs pharyngés suite à l'obstruction des voies aériennes supérieures dans les SAHOS mais également l'inspiration forcée rencontrée durant la respiration chez les patients FPI pourrait-être un stimulus pour l'activation du TGF- β 1 et pourrait jouer un rôle important dans les processus de maintien de la fibrose pulmonaire (Froese et al. 2016).

Afin d'étudier plus en détail l'impact du SAHOS sur la fibrogénèse, il serait alors important d'intégrer les stimuli permettant la stimulation des afférences pharyngées et neuronale induits par l'hypercapnie (Aronson et al. 1991; Kimoff 1996).

Conclusion et Perspectives

Les approches expérimentales développées au cours de cette thèse ouvrent de nombreuses perspectives pour l'étude et la compréhension des mécanismes physiologiques et moléculaires impliqués dans la FPI. Ainsi partant de l'hypothèse pathogénique des agressions répétées de l'épithélium pulmonaire pour expliquer le développement de la FPI, nous avons caractérisé un nouveau modèle murin présentant de nombreuses similitudes avec la pathologie humaine, tant sur le point de l'atteinte des paramètres ventilatoires, que des modifications de l'architecture pulmonaire observée sur des biopsies pulmonaires histologiques, mais également des mécanismes moléculaires décrits dans la littérature. Ainsi nous avons choisi d'étudier durant ce travail doctoral l'impact de la fibrose pulmonaire sur la commande centrale respiratoire et les réponses ventilatoires ainsi que l'impact de l'IHC mimant le SAHOS dans ces conditions. Par ailleurs ce modèle peut également permettre l'étude de l'impact des phases d'exacerbations aiguës sur la détérioration de la fonction pulmonaire.

Il est connu que de nombreuses populations cellulaires sont impliquées dans la fibrose pulmonaire (Janick-Buckner et al. 1989; Renzoni et al. 2014), ainsi il est intéressant de se pencher sur la prévalence et le rôle de chacun de ces acteurs dans le processus de développement de maintien et d'évolution de la fibrose. Ce travail doctoral a permis de proposer un modèle animal d'étude de l'initiation, et de l'évolution de la fibrose pulmonaire très proche de ce qui est observé chez le patient. Ainsi nous avons montré que la population cellulaire du tissu pulmonaire est en constante évolution, avec notamment des modifications phénotypiques dans les populations de cellules immunitaires. En revanche, nous n'avons pas identifié le rôle précis des différentes populations cellulaires tout au long du développement de la fibrose ni durant les phases d'EA. Dans cette continuité, il serait envisageable d'identifier les populations cellulaires rencontrées dans ces deux modèles par une technique quantitative telle que la cytométrie en flux.

L'étude du transcriptome de ces différents types cellulaires à différents temps de développement de la fibrose serait très informative. En effet, nous pourrions dans un premier temps définir l'évolution des changements phénotypiques des macrophages, depuis leur polarisation M1 pro-inflammatoire vers une polarisation M2 pro-fibrosant en fonction du stade de fibrose. Dans un second temps, nous pourrions décrire l'évolution de l'expression des gènes impliqués dans les phénomènes de TEM, apoptose ou sénescence dans les CEA II afin

d'identifier de nouvelles cibles moléculaires impliquées dans l'évolution et la persistance de la fibrose.

De plus, les cellules sénescents peuvent contribuer à l'aggravation de la fibrose pulmonaire en stimulant de manière chronique l'inflammation *via* leur SASP. Nous observons une augmentation de l'expression des marqueurs associés à la senescence chez les souris présentant une exacerbation aiguë. Dans cette continuité, il serait intéressant d'identifier le type de cellules sénescents dans notre modèle et d'analyser leur SASP afin d'identifier les cytokines produites et les conséquences sur le transcriptome des cellules avoisinantes.

Nos résultats suggèrent l'implication du facteur HIF, de l'inflammation, du stress oxydant et de l'apoptose dans les EA rencontrées dans la FPI. Afin de confirmer l'implication et le rôle de ces stress cellulaires, il serait envisageable de mimer une EA chez des souris déficientes pour le facteur HIF-1 α afin d'évaluer le degré de sévérité de la fibrose développée. De plus, il serait intéressant de quantifier ce facteur mais également certaines de ses cibles par la technique du western blot. Une EA est définie comme étant un déclin rapide de la fonction respiratoire suite à la survenue d'un mécanisme idiopathique. Dans notre étude, il serait d'autant plus intéressant d'analyser la fonction respiratoire des souris développant une fibrose pulmonaire et ayant une EA afin de les comparer aux souris sans EA. Durant nos travaux, nous avons mesuré les variables ventilatoires des souris développant une fibrose pulmonaire et ayant eu une exacerbation aiguë mais également leur réponse ventilatoire à l'hypoxie (HVR) et l'hypercapnie (HcVR), cependant, par manque de temps nous n'avons pas pu analyser ces données à ce jour.

Deux études s'intéressant à la survenue des EA ont montré une corrélation entre la présence d'un pic de pollution et la survenue d'EA (Johannson 2018; Sesé et al. 2018). De plus, une étude menée au Chili a montré que les niveaux d'exposition aux PM (particules) et au dioxyde d'azote (NO₂) était associé au risque d'hospitalisation pour FPI (Dales et al. 2020). Ainsi, il a été suggéré que la pollution atmosphérique, à laquelle le tractus respiratoire est exposé au quotidien, pourrait jouer un rôle important dans l'apparition ou l'aggravation de pathologies pulmonaires. La pollution atmosphérique pourrait favoriser ou aggraver la fibrose pulmonaire soit directement en accélérant les processus physiopathologiques, soit indirectement en potentialisant l'effet d'autres facteurs déclenchants comme c'est le cas lors d'exacerbations aiguës. Grâce à notre modèle murin de fibrose pulmonaire chronique, stable et peu inflammatoire, nous pourrions décrire et évaluer les effets d'atmosphères polluées complexes

reproduisant de façon réaliste la pollution de l'air sur l'évolution de la fonction pulmonaire et sur la sévérité de la fibrose.

Sur une première approche neurobiologique, nous avons montré que la fibrose pulmonaire induisait une activation des structures respiratoires ponto-bulbaires probablement par la mise en jeu des afférences chémo et mécanosensibles. De même, nous observons une sur-activation des structures respiratoires ponto-bulbaires suite à une exposition des souris développant une fibrose pulmonaire à de l'HIC. Cependant nous n'avons pas réussi à discriminer la part de chacune de ces composantes. Ainsi il serait intéressant de réaliser des marquages rétrogrades pour identifier les lieux de projections de ceux-ci. De plus, il serait également intéressant d'évaluer l'activité des motoneurones innervant les muscles respiratoires afin d'identifier l'impact d'une atteinte pulmonaire sur leur fonctionnement. Toujours au sein de ces structures respiratoires ponto-bulbaires activées par la fibrose pulmonaire, il serait intéressant de savoir si les cellules présentant une neuroplasticité (FOSB positives) sont des cellules gliales, des neurones matures ou immatures. De plus, il serait intéressant de savoir si la neuroplasticité est supportée par le renforcement de connections synaptiques existantes ou la création de nouvelles connections. Enfin il est envisagé d'évaluer l'impact des aggravations induites par la bléomycine sur les différentes structures respiratoires étudiées. Ces observations nous permettront de mieux comprendre l'impact des EA sur le déclin de la fonction respiratoire. D'autre part pour identifier le rôle des chémorécepteurs dans l'abolition des réponses ventilatoires à l'hypoxie et à l'hypercapnie, il serait également intéressant de les mettre au silence via chemodénervation ou par une exposition à l'hyperoxie.

De nombreuses études ont montré la forte prévalence des SAHOS chez les patients atteints de FPI (Lancaster et al. 2009a; Gusbin et al. 2013; Gille et al. 2017). Dans la littérature, aucune étude ne s'est intéressée à la fonction pulmonaire de ces patients comparés aux patients FPI ne présentant pas de SAHOS. Les épisodes d'hypoxie réoxygénation rencontrés dans le SAHOS ont été décrits comme facteurs aggravant la fibrose pulmonaire dans un modèle *in vivo* (Gille et al. 2018; KANG et al. 2018; Haine et al. 2021a; Xiong et al. 2021). Dans notre étude, nous démontrons un rôle de l'HIC dans le déclin de la fonction respiratoire des animaux présentant une fibrose pulmonaire, mise en évidence par une augmentation de la ventilation de ces animaux comparés aux souris développant une fibrose pulmonaire et non exposée à de l'HIC. Ainsi, il serait important d'analyser les variables ventilatoires des patients atteints de FPI et présentant un SAHOS dans le but d'évaluer le rôle du SAHOS dans le déclin de la fonction pulmonaire des patients atteints de FPI.

Dans la FPI, les cellules épithéliales alvéolaires (CEA) lésées subissent un stress du réticulum endoplasmique (RE) au-delà de leurs capacités de résilience, entrent en sénescence, voire en apoptose, et ne sont pas capables de proliférer et de ré-épithélialiser intégralement l'épithélium alvéolaire. Dans la littérature, il est rapporté que le stress du RE des CEA II occupe une place importante dans la survenue de la fibrose pulmonaire (Lawson et al. 2008). L'aggravation de la fibrose pulmonaire suite à de l'exposition à de l'HIC est médiée par l'induction d'un stress du RE (Haine et al. 2021a). Dans notre modèle, nos analyses réalisées sur lysat pulmonaire total ne montrent pas de marqueurs du stress du RE. De ce fait, il serait intéressant d'évaluer dans un premier temps sur coupe histologique ou sur tranche de poumon, les types cellulaires exprimant ces différents marqueurs. Par ailleurs, il serait intéressant d'isoler les différentes populations cellulaires pulmonaires impliquées dans la pathogenèse de la FPI comme les CEA, les fibroblastes et les macrophages des souris développant une fibrose et exposées à de l'HIC afin d'évaluer l'expression des marqueurs du stress du RE.

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 (Yegen et al. 2020; Haine et al. 2021b). D'autre part, une récente étude montre que l'Epo carbamylé reverse les effets délétères de l'HIC (Andrade et al. 2021). Dans ce contexte nous pourrions envisager de traiter les souris présentant une fibrose pulmonaire exposées et ou non à l'HIC avec de l'Epo carbamylée afin d'identifier d'éventuels effets bénéfiques sur la sévérité de la fibrose pulmonaire.

Références bibliographiques

- Abbott SBG, Stornetta RL, Fortuna MG, et al (2009) Photostimulation of retrotrapezoid nucleus Phox2b-expressing neurons in vivo produces long-lasting activation of breathing in rats. *J Neurosci* 29:5806–5819. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1106-09.2009>
- Aboubakr SE, Taylor A, Ford R, et al (2001) Long-term facilitation in obstructive sleep apnea patients during NREM sleep. *J Appl Physiol* 91:2751–2757. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.91.6.2751>
- Adamson IYR, Bowden DH (1984) Role of polymorphonuclear leukocytes in silica-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 117:37–43
- Adamson IYR, Prieditis H (1998) Silica deposition in the lung during epithelial injury potentiates fibrosis and increases particle translocation to lymph nodes. *Exp Lung Res* 24:293–306. <https://doi.org/10.3109/01902149809041536>
- Agusti AGN, Roca J, Gea J, et al (1991) Mechanisms of gas-exchange impairment in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 143:219–225. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/143.2.219>
- Akat F, Fıçıcılar H, Durak A, et al (2018) Intermittent hypoxia induces beneficial cardiovascular remodeling in left ventricular function of type 1 diabetic rat. *Anatol J Cardiol* 19:259–266. <https://doi.org/10.14744/AnatolJCardiol.2018.00236>
- Akira M (1967) CT findings during phase of accelerated deterioration in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Angew Chemie Int Ed* 6(11), 951–952 79–83
- Al-Hashem F, Al-Humayed S, Amin SN, et al (2019) Metformin inhibits mTOR–HIF-1 α axis and profibrogenic and inflammatory biomarkers in thioacetamide-induced hepatic tissue alterations. *J Cell Physiol* 234:9328–9337. <https://doi.org/10.1002/jcp.27616>
- Alheid GF, Gray PA, Jiang MC, et al (2002) Parvalbumin in respiratory neurons of the ventrolateral medulla of the adult rat. *J Neurocytol* 31:693–717. <https://doi.org/10.1023/A:1025799830302>
- Alheid GF, Jiao W, McCrimmon DR (2011) Caudal nuclei of the rat nucleus of the solitary tract differentially innervate respiratory compartments within the ventrolateral medulla. *Neuroscience* 190:207–227. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.06.005>
- Alheid GF, McCrimmon DR (2008) The chemical neuroanatomy of breathing. *Respir Physiol Neurobiol* 164:3–11. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2008.07.014>
- Almendros I, Wang Y, Gozal D (2014) The polymorphic and contradictory aspects of intermittent hypoxia. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 307:. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00089.2014>
- Alonso A, Merchán P, Sandoval JE, et al (2013) Development of the serotonergic cells in murine raphe nuclei and their relations with rhombomeric domains. *Brain Struct Funct* 218:1229–1277. <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0456-8>
- Altschuler SM, Bao X, Bieger D, et al (1989) Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the rat: Sensory ganglia and nuclei of the solitary and spinal trigeminal tracts. *J Comp Neurol* 283:248–268. <https://doi.org/10.1002/cne.902830207>
- Álvarez D, Cárdenes N, Sellarés J, et al (2017) IPF lung fibroblasts have a senescent phenotype. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 313:L1164–L1173. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00220.2017>

- Ambrosini V, Cancellieri A, Chilosi M, et al (2003) Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: Report of a series. *Eur Respir J* 22:821–826. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00022703>
- Anderson TM, Garcia AJ, Baertsch NA, et al (2016) A novel excitatory network for the control of breathing. *Nature* 536:76–80. <https://doi.org/10.1038/nature18944>
- Andrade DC, Toledo C, Diaz HS, et al (2021) Carbamylated form of human erythropoietin normalizes cardiorespiratory disorders triggered by intermittent hypoxia mimicking sleep apnea syndrome. *J Hypertens* 39:1125–1133. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000002756>
- Andrade RJ, Freitas SR, Hug F, et al (2018) The potential role of sciatic nerve stiffness in the limitation of maximal ankle range of motion. *Sci Rep* 8:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32873-6>
- Arany PR, Flanders KC, Kobayashi T, et al (2006) Smad3 deficiency alters key structural elements of the extracellular matrix and mechanotransduction of wound closure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:9250–9255. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602473103>
- Arizono S, Furukawa T, Taniguchi H, et al (2020) Supplemental oxygen improves exercise capacity in IPF patients with exertional desaturation. *Respirology* 25:1152–1159. <https://doi.org/10.1111/resp.13829>
- Armanios M (2012) Telomerase and idiopathic pulmonary fibrosis. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* 730:52–58. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.10.013>
- Armanios MY, J-L Chen J, Cogan JD, et al (2007) Vanderbilt University School of Medicine, Nashville; the Veterans Affairs Medical Center. undefined
- Arnaud C, Beguin PC, Lantuejoul S, et al (2011) The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition. *Am J Respir Crit Care Med* 184:724–731. <https://doi.org/10.1164/rccm.201012-2033OC>
- Aronson RM, Carley DW, Onal E, et al (1991) Upper airway muscle activity and the thoracic volume dependence of upper airway resistance. *J Appl Physiol* 70:430–438. <https://doi.org/10.1152/jappl.1991.70.1.430>
- Ashitani J, Mukae H, Taniguchi H, et al (1999) Granulocyte-colony stimulating factor levels in bronchoalveolar lavage fluid from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 54:1015–1020. <https://doi.org/10.1136/thx.54.11.1015>
- ATS E, ERS A (2002) American Thoracic Society American Thoracic Society / European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. 165:277–304
- Attali V, Vecchierini MF, Collet JM, et al (2019) Efficacy and tolerability of a custom-made Narval mandibular repositioning device for the treatment of obstructive sleep apnea: ORCADES study 2-year follow-up data. *Sleep Med* 63:64–74. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2019.04.021>
- Avdeev SN (2018) Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulmonologiya* 28:469–482. <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2018-28-4-469-482>
- Ayaub EA, Kolb PS, Mohammed-Ali Z, et al (2016) GRP78 and CHOP modulate macrophage apoptosis and the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Pathol* 239:411–425. <https://doi.org/10.1002/path.4738>
- Aybar DO, Kılıc SP, Çınkır HY (2020) The effect of breathing exercise on nausea, vomiting and

- functional status in breast cancer patients undergoing chemotherapy. *Complement Ther Clin Pract* 40:. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2020.101213>
- Aydođdu M, ifti B, Firat Gven S, et al (2006) İnterstisyel Akiđer Hastalarında Polisomnografi İle Uyku zelliklerinin Deđerlendirilmesi. *Tuberk Toraks* 54:213–221
- Azuma A, Nukiwa T, Tsuboi E, et al (2005) Double-blind, placebo-controlled trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 171:1040–1047. <https://doi.org/10.1164/rccm.200404-571OC>
- Baker TL, Fuller DD, Zabka AG, Mitchell GS (2001) Respiratory plasticity: Differential actions of continuous and episodic hypoxia and hypercapnia. *Respir Physiol* 129:25–35. [https://doi.org/10.1016/S0034-5687\(01\)00280-8](https://doi.org/10.1016/S0034-5687(01)00280-8)
- Baker TL, Mitchell GS (2000) Episodic but not continuous hypoxia elicits long-term facilitation of phrenic motor output in rats. *J Physiol* 529:215–219. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00215.x>
- Ballanyi K, Onimaru H, Homma I (1999) Respiratory network function in the isolated brainstem-spinal cord of newborn rats. *Prog Neurobiol* 59:583–634. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(99\)00009-X](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(99)00009-X)
- Baraniuk JN, Merck SJ (2009) New concepts of neural regulation in human nasal mucosa. *Acta Clin Croat Suppl* 48:65–73
- Barbas-Filho J V., Ferreira MA, Sesso A, et al (2001) Evidence of type II pneumocyte apoptosis in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)/usual interstitial pneumonia (UIP). *J Clin Pathol* 54:132–138. <https://doi.org/10.1136/jcp.54.2.132>
- Barkauskas CE, Cronce MJ, Rackley CR, et al (2013) Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *J Clin Invest* 123:3025–3036. <https://doi.org/10.1172/JCI68782>
- Bartoli (1975) THE EFFECT OF VARYING TIDAL VOLUME ON THE ASSOCIATED PHRENIC MOTONEURONE 0C:TPC'T: STUDIES OF VAGAL AND CHEMICAL FEEDBACK
- Bathina CS, Rajulapati A, Franzke M, et al (2013) Knockdown of tyrosine hydroxylase in the nucleus of the solitary tract reduces elevated blood pressure during chronic intermittent hypoxia. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 305:. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00260.2013>
- Batool-Anwar S, Goodwin JL, Kushida CA, et al (2016) Impact of continuous positive airway pressure (CPAP) on quality of life in patients with obstructive sleep apnea (OSA). *J Sleep Res* 25:731–738. <https://doi.org/10.1111/jsr.12430>
- Bayazit YA, Yilmaz M, Ciftci T, et al (2006) Association of the -1438G/A polymorphism of the 5-HT_{2A} receptor gene with obstructive sleep apnea syndrome. *Orl* 68:123–128. <https://doi.org/10.1159/000091216>
- Beckman KB, Ames BN (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78:547–581. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.2.547>
- Beeh KM, Beier J, Haas IC, et al (2002) Glutathione deficiency of the lower respiratory tract in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 19:1119–1123. <https://doi.org/10.1183/09031936.02.00262402>
- BelAiba RS, Bonello S, Zähringer C, et al (2007) Diacylglycerol Is Required for the Formation of COPI Vesicles in the Golgi-to-ER Transport Pathway. *Mol Biol Cell* 18:3250–3263.

<https://doi.org/10.1091/mbc.E07>

- Belaidi E, Joyeux-Faure M, Ribuot C, et al (2009) Major Role for Hypoxia Inducible Factor-1 and the Endothelin System in Promoting Myocardial Infarction and Hypertension in an Animal Model of Obstructive Sleep Apnea. *J Am Coll Cardiol* 53:1309–1317. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.12.050>
- Belaidi E, Thomas A, Bourdier G, et al (2016a) Endoplasmic reticulum stress as a novel inducer of hypoxia inducible factor-1 activity: Its role in the susceptibility to myocardial ischemia-reperfusion induced by chronic intermittent hypoxia. *Int J Cardiol* 210:45–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.02.096>
- Belaidi E, Thomas A, Bourdier G, et al (2016b) 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>
- Belibi F, Zafar I, Ravichandran K, et al (2011) Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and autophagy in polycystic kidney disease (PKD). *Am J Physiol - Ren Physiol* 300:1235–1243. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00348.2010>
- Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, et al (2009) Hypoxia-Induced Autophagy Is Mediated through Hypoxia-Inducible Factor Induction of BNIP3 and BNIP3L via Their BH3 Domains. *Mol Cell Biol* 29:2570–2581. <https://doi.org/10.1128/mcb.00166-09>
- Bennett FM, St. John WM (1985) Function in ventilatory control of respiratory neurons at the pontomedullary junction. *Respir Physiol* 61:153–166. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(85\)90122-7](https://doi.org/10.1016/0034-5687(85)90122-7)
- Benson TM (2006) Physiology of oral cavity, pharynx and upper esophageal sphincter. *GI Motil online*
- Berger A., A.J K, Dutton R. (1973) intact recovery from CO₂, breathing in chemodenervated. 35:
- Bernard O, Jeny F, Uzunhan Y, et al (2018) Mesenchymal stem cells reduce hypoxia-induced apoptosis in alveolar epithelial cells by modulating HIF and ROS hypoxic signaling. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 314:L360–L371. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00153.2017>
- Berquin P, Bodineau L, Gros F, Larnicol N (2000) Brainstem and hypothalamic areas involved in respiratory chemoreflexes: A Fos study in adult rats. *Brain Res* 857:30–40. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)02304-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02304-5)
- Berridge MJ (2002) The endoplasmic reticulum: A multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* 32:235–249. <https://doi.org/10.1016/S0143416002001823>
- Bhattacharya J, Westphalen K (2017) Macrophage-epithelial interactions in pulmonary alveoli *Jahar. Physiol Behav* 176:139–148. <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0569-x>. Macrophage-epithelial
- Bianchi AI, Barillot JC (1982) Respiratory neurons in the region of the retrofacial nucleus: pontile, medullary, spinal and vagal projections. *Neurosci Lett* 31:277–282. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(82\)90033-7](https://doi.org/10.1016/0304-3940(82)90033-7)
- Bianchi AL (1971) Localisation et étude des neurones respiratoires bulbaires. *J Physiol* 63:5–40
- Bianchi AL, Denavit-Saubié M, Champagnat J (1995) Central Control of Breathing in Mammals: Neuronal Circuitry, Membrane Properties, and Neurotransmitters. *Am Physiol Soc Cent* 75:. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)19886-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)19886-7)

- Biscoe T., Bradley G., Purves M. (1970) THE RELATION BETWEEN CAROTID BODY CHEMORECEPTOR DISCHARGE, CAROTID SINUS PRESSURE AND CAROTID BODY VENOUS FLOW. *J Physiol* 208:99–120
- Bisgard GE, Neubauer JA (1995) Peripheral and central effects of hypoxia. *Lung Biol Heal Dis* 617–668
- Bitzer M, Von Gersdorff G, Liang D, et al (2000) A mechanism of suppression of TGF- β /SMAD signaling by NF- κ B/RelA. *Genes Dev* 14:187–197. <https://doi.org/10.1101/gad.14.2.187>
- Bixler EO, Vgontzas AN, Have TT, et al (1998) Effects of age on sleep apnea in men. *Pneumologie* 52:467–468. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.157.1.9706079>
- Biya J, Stoclin A, Dury S, et al (2016) Consortium de détection et prise en charge des atteintes pulmonaires induites par la bléomycine. *Bull Cancer* 103:651–661. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2016.04.005>
- Bjoraker JA, Ryu JH, Edwin MK, et al (1998) Prognostic significance of histopathologic subsets in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 157:199–203. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.157.1.9704130>
- Blanchard J-M, Et A, Part TÀ Le proto-oncogène c-fos : un {{ entremetteur ’ ’ moléculaire. 8:
- Bliando K (2021) Alveolar Epithelial Cells Death in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Significance, Mechanisms and Contribution to Disease Progression
- Bodineau L, Cayetanot F, Frugière A (2000a) Possible role of retrotrapezoid nucleus and parapyramidal area in the respiratory response to anoxia: An in vitro study in neonatal rat. *Neurosci Lett* 295:67–69. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)01590-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)01590-1)
- Bodineau L, Frugière A, Marlot D, Wallois F (2000b) Connections between retrotrapezoid nucleus and nucleus tractus solitarii in cat. *Neurosci Lett* 280:111–114. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)00770-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)00770-9)
- Bodineau L, Frugière A, Marlot D, Wallois F (2000c) Effect of hypoxia on the activity of respiratory and non-respiratory modulated retrotrapezoid neurons of the cat. *Auton Neurosci Basic Clin* 86:70–77. [https://doi.org/10.1016/S1566-0702\(00\)00237-X](https://doi.org/10.1016/S1566-0702(00)00237-X)
- Bonello S, Zähringer C, BelAïba RS, et al (2007) Reactive oxygen species activate the HIF-1 α promoter via a functional NF κ B site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:755–761. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000258979.92828.bc>
- Bonetti A, Nicod LP (2010) Exacerbations aiguës au cours. 2228–2231
- Bonham (1991) PULMONARY STRETCH RECEPTOR AFFERENTS ACTIVATE EXCITATORY AMINO ACID RECEPTORS IN THE NUCLEUS TRACTUS SOLITARIII IN RATS. 725–745
- Bonham AC, Coles SK, McCrimmon DR (1993) Pulmonary stretch receptor afferents activate excitatory amino acid receptors in the nucleus tractus solitarii in rats. *J Physiol* 464:725–745. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1993.sp019660>
- Bonnaud P (2005) Mécanismes de la fibrogenèse pulmonaire. 101–105
- Borie R, Crestani B (2009) Prevalence of telomere shortening in familial and sporadic pulmonary fibrosis is increased in men. *Am J Respir Crit Care Med* 179:1073. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.179.11.1073>

- Borzone G, Moreno R, Urrea R, et al (2001) Bleomycin-induced chronic lung damage does not resemble human idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 163:1648–1653. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.7.2006132>
- Bourdier G, Flore P, Sanchez H, et al (2016) High-intensity training reduces intermittent hypoxia-induced ER stress and myocardial infarct size. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 310:H279–H289. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00448.2015>
- Bouvier J, Thoby-Brisson M, Renier N, et al (2010) Hindbrain interneurons and axon guidance signaling critical for breathing. *Nat Neurosci* 13:1066–1074. <https://doi.org/10.1038/nn.2622>
- Bowden DH, Hedgecock C, Adamson IYR (1989) Silica-induced pulmonary fibrosis involves the reaction of particles with interstitial rather than alveolar macrophages. *J Pathol* 158:73–80. <https://doi.org/10.1002/path.1711580114>
- Bradley KH, Kawanami O, Ferrans VJ, Crystal RG Chapter 3 The Fibroblast of H2lmmun Lzlng Alveolar Strzltzrces : A Differentiuted Cell with u Major Role in Lzcnng Strzcture and Fzlncion. 21:
- Bradley TD, Floras JS (2009) Obstructive sleep apnoea and its cardiovascular consequences. *Lancet* 373:82–93. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61622-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61622-0)
- Braun RK, Broytman O, Braun FM, et al (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>
- Bringardner BD, Baran CP, Eubank TD, Marsh CB (2008) The role of inflammation in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Antioxidants Redox Signal* 10:287–301. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1897>
- Brockhaus J, Ballanyi K (1998) Synaptic inhibition in the isolated respiratory network of neonatal rats. *Eur J Neurosci* 10:3823–3839. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00396.x>
- Brody AR, Soler P, Basset F, et al (1981) Epithelial-mesenchymal associations of cells in human pulmonary fibrosis and in BHT-oxygen-induced fibrosis in mice. *Exp Lung Res* 2:207–220. <https://doi.org/10.3109/01902148109052316>
- Bruss D., Sajjad H (2021) Anatomy, Head and Neck, Laryngopharynx. *StatPearls Publ*
- Buchanan GF, Richerson GB (2010) Central serotonin neurons are required for arousal to CO2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:16354–16359. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004587107>
- Buckingham S, Avery ME (1962) Time of appearance of lung surfactant in the foetal mouse. *Nature* 193:688–689. <https://doi.org/10.1038/193688a0>
- Burman A, Kropski JA, Calvi CL, et al (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>
- Burns AR, Smith CW, Walker DC (2003) Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung. *Physiol Rev* 83:309–336. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2002>
- Burtscher M, Haider T, Domej W, et al (2009) Intermittent hypoxia increases exercise tolerance in patients at risk for or with mild COPD. *Respir Physiol Neurobiol* 165:97–103. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2008.10.012>
- Butera RJ, Rinzel J, Smith JC (1999) Models of respiratory rhythm generation in the pre-Botzinger complex. I. Bursting pacemaker neurons. *J Neurophysiol* 82:382–397.

<https://doi.org/10.1152/jn.1999.82.1.382>

- Bye PTP, Issa F, Berthon Jones M, Sullivan CE (1984) Studies of oxygenation during sleep in patients with interstitial lung disease. *Am Rev Respir Dis* 129:27–32. <https://doi.org/10.1164/arrd.1984.129.1.27>
- Byrum CE, Guyenet PG (1987) Afferent and efferent connections of the A5 noradrenergic cell group in the rat. *J Comp Neurol* 261:529–542. <https://doi.org/10.1002/cne.902610406>
- Byrum CE, Stornetta R, Guyenet PG (1984) Electrophysiological properties of spinally-projecting A5 noradrenergic neurons. *Brain Res* 303:15–29. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)90206-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)90206-3)
- Bystrzycka EWAK (1980) AFFERENT PROJECTIONS TO THE DORSAL AND VENTRAL RESPIRATORY NUCLEI IN THE MEDULLA OBLONGATA OF THE CAT STUDIED BY THE HORSERADISH PEROXIDASE TECHNIQUE. 185:59–66
- Calcinotto A, Kohli J, Zagato E, et al (2019) Cellular senescence: Aging, cancer, and injury. *Physiol Rev* 99:1047–1078. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2018>
- Calfon M, Zeng H, Urano F, et al (2002) IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415:92–96. <https://doi.org/10.1038/415092a>
- Camelo A, Dunmore R, Sleeman MA, Clarke DL (2014) The epithelium in idiopathic pulmonary fibrosis: Breaking the barrier. *Front Pharmacol* 4 JAN:1–11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00173>
- Campisi J (2013) Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol* 75:685–705. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183653>
- Campisi J, D'Adda Di Fagagna F (2007) Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:729–740. <https://doi.org/10.1038/nrm2233>
- Cao Y, Fujito Y, Matsuyama K, Aoki M (2006) Effects of electrical stimulation of the medullary raphe nuclei on respiratory movement in rats. *J Comp Physiol A Neuroethol Sensory, Neural, Behav Physiol* 192:497–505. <https://doi.org/10.1007/s00359-005-0087-0>
- Carmeliet P, Dor Y, Herbert J-M, et al (1998) Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 393:763–765. <https://doi.org/10.1038/31647>
- Carpagnano GE, Kharitonov SA, Resta O, et al (2002) Increased 8-isoprostane and interleukin-6 in breath condensate of obstructive sleep apnea patients. *Chest* 122:1162–1167. <https://doi.org/10.1378/chest.122.4.1162>
- Carr MJ, Udem BJ (2003) CELLS OF THE LUNG Bronchopulmonary afferent nerves. *Blackwell Sci* 8:291–301
- Carroll MS, Ramirez JM (2013) Cycle-by-cycle assembly of respiratory network activity is dynamic and stochastic. *J Neurophysiol* 109:296–305. <https://doi.org/10.1152/jn.00830.2011>
- Cavazza A, Rossi G, Carbonelli C, et al (2010) The role of histology in idiopathic pulmonary fibrosis: An update. *Respir Med* 104:S11–S22. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2010.03.013>
- Chan ASL, Sutherland K, Schwab RJ, et al (2010) The effect of mandibular advancement on upper airway structure in obstructive sleep apnoea. *Thorax* 65:726–732. <https://doi.org/10.1136/thx.2009.131094>

- Chen X, Shen J, Prywes R (2002) The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the er to the Golgi. *J Biol Chem* 277:13045–13052. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110636200>
- Chenivesse C, Tsiopoulos A (2018) CCL18 – Beyond chemotaxis. *Cytokine* 109:52–56. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.01.023>
- Cheresh P, Kim SJ, Tulasiram S, Kamp DW (2013) Oxidative stress and pulmonary fibrosis. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1832:1028–1040. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.11.021>
- Chihiro Yamazaki, Jiro Hoshino, Yusuke Hori, Tomoko Sekiguchi, Satoshi Miyauchi SM and KH, Tokyo (1997) Effect of lecithinized-superoxide dismutase on the rat colitis model induced by dextran sulfate sodium. *Jpn J Pharmacol* 74:99–103. <https://doi.org/10.1254/jjp.74.99>
- Chilosi M, Zamò A, Doglioni C, et al (2006) Migratory marker expression in fibroblast foci of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res* 7:1–10. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-7-95>
- Chotinaiwattarakul W, O'Brien LM, Fan L, Chervin RD (2009) Fatigue, tiredness, and lack of energy improve with treatment for OSA. *J Clin Sleep Med* 5:222–227. <https://doi.org/10.5664/jcsm.27490>
- Christensen PJ, Goodman RE, Pastoriza L, et al (1999) Induction of lung fibrosis in the mouse by intratracheal instillation of fluorescein isothiocyanate is not T-cell-dependent. *Am J Pathol* 155:1773–1779. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65493-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65493-4)
- Churg A, Müller NL, Silva CIS, Wright JL (2007) Acute exacerbation (acute lung injury of unknown cause) in UIP and other forms of fibrotic interstitial pneumonias. *Am J Surg Pathol* 31:277–284. <https://doi.org/10.1097/01.pas.0000213341.70852.9d>
- Clark BYFJ, Euler CVON (1972) ON THE REGULATION OF DEPTH AND RATE OF BREATHING. *J Physiol* 222:267–295
- Claussen CA, Long EC (1999) Nucleic acid recognition by metal complexes of bleomycin. *Chem Rev* 99:2797–2816. <https://doi.org/10.1021/cr980449z>
- Clifford P., Coon R., Von colditz JH, et al (1983) Pulmonary denervation in the dog PHILIP. *Am Physiol Soc* 1451–1456
- Coates EL, Li A, Nattie EE (1993) Widespread sites of brain stem ventilatory chemoreceptors. *J Appl Physiol* 75:5–14. <https://doi.org/10.1152/jappl.1993.75.1.5>
- Cohen MI, Feldman JL (1984) Discharge properties of dorsal medullary inspiratory neurons: Relation to pulmonary afferent and phrenic efferent discharge. *J Neurophysiol* 51:753–776. <https://doi.org/10.1152/jn.1984.51.4.753>
- Coleridge JC, Coleridge HM (1984) Afferent vagal C fibre innervation of the lungs and airways and its functional significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 99:1–110. <https://doi.org/10.1007/bfb0027715>
- Collard HR, Moore BB, Flaherty KR, et al (2007) Acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 176:636–643. <https://doi.org/10.1164/rccm.200703-463PP>
- Collard HR, Ryerson CJ, Corte TJ, et al (2016) Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis an international working group report. *Am J Respir Crit Care Med* 194:265–275. <https://doi.org/10.1164/rccm.201604-0801CI>
- Confalonieri M, Buratti E, Grassi G, et al (2017) Keratin14 mRNA expression in human pneumocytes

during quiescence, repair and disease. PLoS One 12:1–15.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172130>

- Contreras RJ, Beckstead RM, Norgren R (1982) The central projections of the trigeminal, facial, glossopharyngeal and vagus nerves: an autoradiographic study in the rat. *J Auton Nerv Syst* 6:303–322. [https://doi.org/10.1016/0165-1838\(82\)90003-0](https://doi.org/10.1016/0165-1838(82)90003-0)
- Cooper G. (2000) “The Endoplasmic Reticulum” *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland Sinauer Assoc
- Coraux C, Hajj R, Lesimple P (2005) Réparation et régénération de l ’ épithélium respiratoire
- Corcoran AE, Hodges MR, Wu Y, et al (2009) Medullary serotonin neurons and central CO₂ chemoreception. *Respir Physiol Neurobiol* 168:49–58. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2009.04.014>
- Corrin B, Dewar A, Rodriguez-Roisin R, Turner-Warwick M (1985) Fine structural changes in cryptogenic fibrosing alveolitis and asbestosis. *J Pathol* 147:107–119. <https://doi.org/10.1002/path.1711470206>
- Cottin V, Crestani B, Cadranel J, et al (2017) RETRAIT: Recommandations pratiques pour le diagnostic et la prise en charge de la fibrose pulmonaire idiopathique—Actualisation 2017. Version longue. *Rev Mal Respir*. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2017.07.018>
- Cottin V, Crestani B, Valeyre D, et al (2014) Recommandations pratiques pour le diagnostic et la prise en charge de la fibrose pulmonaire idiopathique. *Rev Mal Respir* 31:194–195. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2013.09.007>
- Cowan DC, Livingston E (2012) Obstructive Sleep Apnoea Syndrome and Weight Loss: Review. *Sleep Disord* 2012:1–11. <https://doi.org/10.1155/2012/163296>
- Crestani B (2010) Mécanismes physiopathologiques de la fibrose pulmonaire idiopathique. *Bull Acad Natl Med* 194:343–352. [https://doi.org/10.1016/s0001-4079\(19\)32326-x](https://doi.org/10.1016/s0001-4079(19)32326-x)
- Cross BA, Jones PW (1980) THE ROLE OF VAGAL AFFERENT INFORMATION DURING INSPIRATION IN DETERMINING PHRENIC MOTONEURONE OUTPUT BRENDA. i:149–167
- Crystal RG, Bitterman PB, Mossman B, et al (2002) Future research directions in idiopathic pulmonary fibrosis: Summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute Working Group. *Am J Respir Crit Care Med* 166:236–246. <https://doi.org/10.1164/rccm.2201069>
- Cunningham JT, Knight WD, Mifflin SW, Nestler EJ (2012) An essential role for Δ FosB in the median preoptic nucleus in the sustained hypertensive effects of chronic intermittent hypoxia. *Hypertension* 60:179–187. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.193789>
- Da Rosa DP, Forgiarini LF, Baronio D, et al (2012) Simulating sleep apnea by exposure to intermittent hypoxia induces inflammation in the lung and liver. *Mediators Inflamm* 2012:1. <https://doi.org/10.1155/2012/879419>
- Da Silva GSF, Giusti H, Benedetti M, et al (2011) Serotonergic neurons in the nucleus raphe obscurus contribute to interaction between central and peripheral ventilatory responses to hypercapnia. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 462:407–418. <https://doi.org/10.1007/s00424-011-0990-x>
- Dale EA, Ben Mabrouk F, Mitchell GS (2014) Unexpected benefits of intermittent hypoxia: Enhanced respiratory and nonrespiratory motor function. *Physiology* 29:39–48. <https://doi.org/10.1152/physiol.00012.2013>

- Dales R, Blanco-Vidal C, Cakmak S (2020) The Association Between Air Pollution and Hospitalization of Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis in Chile: A Daily Time Series Analysis. *Chest* 158:630–636. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2020.02.017>
- Dallaire A, Chung F (2018) Obstructive sleep apnea. *Preoperative Assess Manag* Third Ed 290:195–200
- Daniil ZD, Papageorgiou E, Koutsokera A, et al (2008) Serum levels of oxidative stress as a marker of disease severity in idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulm Pharmacol Ther* 21:26–31. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2006.10.005>
- Davies BYR, Kubin L (1986) PROJECTION OF PULMONARY RAPIDLY ADAPTING RECEPTORS TO THE MEDULLA OF THE CAT: AN ANTIDROMIC MAPPING STUDY. 63–86
- de Carvalho D, Patrone LGA, Marques DA, et al (2017) Participation of locus coeruleus in breathing control in female rats. *Respir Physiol Neurobiol* 245:29–36. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2017.06.008>
- De Carvalho TBO, Suman M, Molina FD, et al (2013) Relationship of obstructive sleep apnea syndrome with the 5-HT_{2A} receptor gene in Brazilian patients. *Sleep Breath* 17:57–62. <https://doi.org/10.1007/s11325-012-0645-y>
- de Castro D, Lipski J, Kanjhan R (1994) Electrophysiological study of dorsal respiratory neurons in the medulla oblongata of the rat. *Brain Res* 639:49–56. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91763-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91763-9)
- De Vuyst P, Camus P (2000) The past and present of pneumoconioses. *Curr Opin Pulm Med* 6:151–156. <https://doi.org/10.1097/00063198-200003000-00012>
- Degryse AL, Tanjore H, Xu XC, et al (2010) Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 299:442–452. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00026.2010>
- Dejours P (1962) Chemoreflexes in Breathing. *Am Physiol Soc Cent* 42:
- Del Negro CA, Funk GD, Feldman JL (2018) Breathing matters. *Nat Rev Neurosci* 19:351–367. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0003-6>
- Del Negro CA, Morgado-Valle C, Hayes JA, et al (2005) Sodium and calcium current-mediated pacemaker neurons and respiratory rhythm generation. *J Neurosci* 25:446–453. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2237-04.2005>
- Del Rio R, Andrade DC, Lucero C, et al (2016) Carotid Body Ablation Abrogates Hypertension and Autonomic Alterations Induced by Intermittent Hypoxia in Rats. *Hypertension* 68:436–445. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07255>
- Delbrel E, Uzunhan Y, Soumare A, et al (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>
- Delcus C (2011) Le syndrome d'apnées du sommeil. *Aide Soignante* 25:24–25. <https://doi.org/10.4267/10608/1437>
- Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, et al (2014) An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell* 31:722–733.

<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.012>

- Dematteis M, Godin-Ribuot D, Arnaud C, et al (2009) Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: Contribution of animal models to understanding of the human disease. *ILAR J* 50:262–281. <https://doi.org/10.1093/ilar.50.3.262>
- Dempsey JA, Smith CA (2014) Pathophysiology of human ventilatory control JA. *Eur Respir J* 44:495–512. <https://doi.org/10.1183/09031936.00048514.Pathophysiology>
- Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ, O'Donnell CP (2010) Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol Rev* 90:47–112. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2008>
- Dempsey OJ (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>
- Dengler VL, Galbraith MD, Espinosa JM (2014) Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 49:1–15. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.838205>
- DePuy SD, Kanbar R, Coates MB, et al (2011) Control of breathing by raphe obscurus serotonergic neurons in mice. *J Neurosci* 31:1981–1990. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4639-10.2011>
- Dewan NA, Nieto FJ, Somers VK (2015) Intermittent hypoxemia and OSA: Implications for comorbidities. *Chest* 147:266–274. <https://doi.org/10.1378/chest.14-0500>
- Dimbath E, Maddipati V, Stahl J, et al (2021) Implications of microscale lung damage for COVID-19 pulmonary ventilation dynamics: A narrative review. *Life Sci*. 274
- Directors AB of, Committie EE (2000) American Thoracic Society Idiopathic Pulmonary Fibrosis : Diagnosis and Treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 161:646–664. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.2.ats3-00>
- Disayabutr S, Kim EK, Cha SI, et al (2016) MIR-34 MIRNAs regulate cellular senescence in type II alveolar epithelial cells of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One* 11:1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158367>
- Dixon JB, Schachter LM, O'Brien PE, et al (2012) Surgical vs conventional therapy for weight loss treatment of obstructive sleep apnea: A randomized controlled trial. *JAMA - J Am Med Assoc* 308:1142–1149. <https://doi.org/10.1001/2012.jama.11580>
- Dobbins EG, Feldman JL (1994) Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat. *J Comp Neurol* 347:64–86. <https://doi.org/10.1002/cne.903470106>
- Dodig S, Čepelak I, Pavić I (2019) Hallmarks of senescence and aging. *Biochem Medica* 29:1–15. <https://doi.org/10.11613/BM.2019.030501>
- Douglas WW, Ryu JH, Schroeder DR (2000) Idiopathic pulmonary fibrosis: Impact of oxygen and colchicine, prednisone, or no therapy on survival. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1172–1178. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.4.9907002>
- Drakopanagiotakis F, Xifteri A, Polychronopoulos V, Bouros D (2008) Apoptosis in lung injury and fibrosis. *Eur Respir J* 32:1631–1638. <https://doi.org/10.1183/09031936.00176807>
- Dubreuil V, Barhanin J, Goridis C, Brunet JF (2009) Breathing with Phox2b. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 364:2477–2483. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0085>
- Duffin J (2004) Functional organization of respiratory neurones: A brief review of current questions and

- speculations. *Exp Physiol* 89:517–529. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2004.028027>
- Duffin J, Mohan RM, Vasiliou P, et al (2000) A model of the chemoreflex control of breathing in humans: Model parameters measurement. *Respir Physiol* 120:13–26. [https://doi.org/10.1016/S0034-5687\(00\)00095-5](https://doi.org/10.1016/S0034-5687(00)00095-5)
- DURÁN J, ESNAOLA S, RUBIO R, et al (2015) OBSTRUCTIVE SLEEP APNEA SYNDROME : THE EFFECT OF DIABETES AND AUTONOMIC NEUROPA Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) is defined as a repetitive collapse of the upper airways oxygen during are sleep , leading while by to apnea The or hypopnea persists. *Sleep Breath* 33:273–285
- Duru N, Wolfson B, Zhou Q (2016) Mechanisms of the alternative activation of macrophages and non-coding RNAs in the development of radiation-induced lung fibrosis. *World J Biol Chem* 7:231. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v7.i4.231>
- Dutschmann M, Herbert H (2006) The Kölliker-Fuse nucleus gates the postinspiratory phase of the respiratory cycle to control inspiratory off-switch and upper airway resistance in rat. *Eur J Neurosci* 24:1071–1084. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04981.x>
- Eckert DJ, Malhotra A (2008) Pathophysiology of adult obstructive sleep apnea. *Proc Am Thorac Soc* 5:144–153. <https://doi.org/10.1513/pats.200707-114MG>
- Epa AP, Thatcher TH, Pollock SJ, et al (2015) Normal human lung epithelial cells inhibit transforming growth factor- β induced myofibroblast differentiation via prostaglandin E2. *PLoS One* 10:1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135266>
- Epstein ACR, Gleadle JM, McNeill LA, et al (2001) *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107:43–54. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00507-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00507-4)
- Erickson JT, Millhorn DE (1994) Hypoxia and electrical stimulation of the carotid sinus nerve induce fos-like immunoreactivity within catecholaminergic and serotonergic neurons of the rat brainstem. *J Comp Neurol* 348:161–182. <https://doi.org/10.1002/cne.903480202>
- Errchidi BYS, Monteau R, Hilaire G (1991) Noradrenergic modulation of the medullary respiratory rhythm generator in the newborn rat: an in vitro study. 477–498
- Evans MJ, Cabral LJ, Stephens RJ, Freeman G (1975) Transformation of alveolar Type 2 cells to Type 1 cells following exposure to NO₂. *Exp Mol Pathol* 22:142–150. [https://doi.org/10.1016/0014-4800\(75\)90059-3](https://doi.org/10.1016/0014-4800(75)90059-3)
- Ezure K, Tanaka I, Kondo M (2003) Glycine is used as a transmitter by decrementing expiratory neurons of the ventrolateral medulla in the rat. *J Neurosci* 23:8941–8948. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-26-08941.2003>
- F.Higgins D, Kimura K, Haase VH (2013) Hypoxia-inducible factor signaling in the development of tissue fibrosis 變NIH Public Access. *Bone* 23:1–7
- Faner R, Rojas M, MacNee W, Agustí A (2012) Abnormal lung aging in chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 186:306–313. <https://doi.org/10.1164/rccm.201202-0282PP>
- Fattman CL, Chang LY, Termin TA, et al (2003) Enhanced bleomycin-induced pulmonary damage in mice lacking extracellular superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med* 35:763–771. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00402-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00402-7)

- Feldman JL (1986) Neurophysiology of Breathing in Mammals. *Compr Physiol* 463–524. <https://doi.org/10.1002/cphy.cp010409>
- Feldman JL, Del Negro CA (2006) Looking for inspiration: New perspectives on respiratory rhythm. *Nat Rev Neurosci* 7:232–242. <https://doi.org/10.1038/nrn1871>
- Feldman JL, Del Negro CA, Gray PA (2013) Understanding the rhythm of breathing: So near, yet so far. *Annu Rev Physiol* 75:423–452. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-040510-130049>
- Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE (2003) Breathing: Rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. *Annu Rev Neurosci* 26:239–266. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131103>
- Feldman JL, Smith JC (1989) Cellular Mechanisms Underlying Modulation. *Ann N Y Acad Sci* 114–130
- Fietze I, Dingli K, Diefenbach K, et al (2004) Night-to-night variation of the oxygen desaturation index in sleep apnoea syndrome. *Eur Respir J* 24:987–993. <https://doi.org/10.1183/09031936.04.00100203>
- Finley JCW, Katz DM (1992) The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. *Brain Res* 572:108–116. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90458-L](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90458-L)
- Fitzgerald RS, Dehghani GA (1982) Neural responses of the cat carotid and aortic bodies to hypercapnia and hypoxia. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 52:596–601. <https://doi.org/10.1152/jappl.1982.52.3.596>
- Flemons WW, Buysse D, Redline S, et al (1999) Sleep-related breathing disorders in adults: Recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. *Sleep* 22:667–689. <https://doi.org/10.1093/sleep/22.5.667>
- Fletcher EC, Lesske J, Behm R, et al (1992) Carotid chemoreceptors, systemic blood pressure, and chronic episodic hypoxia mimicking sleep apnea. *J Appl Physiol* 72:1978–1984. <https://doi.org/10.1152/jappl.1992.72.5.1978>
- Flint A (1868) A treatise on the principles and practice of medicine : designed for the use of practitioners and students of medicine. Philadelphia Henry C Lea 193
- Flynn C, Forster H V., Pan LG, Bisgard GE (1985) Role of hilar nerve afferents in hyperpnea of exercise. *J Appl Physiol* 59:798–806. <https://doi.org/10.1152/jappl.1985.59.3.798>
- Fogel RB, Trinder J, Malhotra A, et al (2003) Within-breath control of genioglossal muscle activation in humans: Effect of sleep-wake state. *J Physiol* 550:899–910. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.038810>
- Forster H V. (2003) Invited Review: Plasticity in the control of breathing following sensory denervation. *J Appl Physiol* 94:784–794
- Forster H V., Pan LG, Flynn C, Bisgard GE (1990) Attenuated Hering-Breuer inflation reflex 4 years after pulmonary vagal denervation in ponies. *J Appl Physiol* 69:2163–2167. <https://doi.org/10.1152/jappl.1990.69.6.2163>
- Forster H V., Pan LG, Lowry TF, et al (2000) Important role of carotid chemoreceptor afferents in control of breathing of adult and neonatal mammals. *Respir Physiol* 119:199–208. [https://doi.org/10.1016/S0034-5687\(99\)00115-2](https://doi.org/10.1016/S0034-5687(99)00115-2)
- Fortin G, Thoby-Brisson M (2009) Embryonic emergence of the respiratory rhythm generator. *Respir*

- Physiol Neurobiol 168:86–91. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2009.06.013>
- Franco P, Bourdin H, Braun F, et al (2017) Diagnostic du syndrome d'apnée obstructive du sommeil chez l'enfant (2–18 ans) : place de la polysomnographie et de la polygraphie ventilatoire. *Med du Sommeil* 14:77–88. <https://doi.org/10.1016/j.msom.2017.02.004>
- Froese AR, Shimbori C, Bellaye P, Kolb M (2016) Title : Stretch Induced Activation of TGF- β 1 in Pulmonary Fibrosis. 1–41
- FUMEAUX T, ROTHMEIER C, JOLLIET P (2003) Les fibroses pulmonaires en réanimation Pulmonary fibrosis in the intensive care unit. *Réanimation* 12:37–45. [https://doi.org/10.1016/s1624-0693\(02\)00007-5](https://doi.org/10.1016/s1624-0693(02)00007-5)
- Funk GD, Greer JJ (2013) The rhythmic, transverse medullary slice preparation in respiratory neurobiology: Contributions and caveats. *Respir Physiol Neurobiol* 186:236–253. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2013.01.011>
- Futosi K, Fodor S, Mócsai A (2013) Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol* 17:638–650. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.06.034>
- Gabetta (1989) Murine strain differences in pulmonary bleomycin metabolism. *NBER Work Pap Ser* 58:99–104
- Garbi N, Lambrecht BN (2017) Location, function, and ontogeny of pulmonary macrophages during the steady state. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 469:561–572. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-1965-3>
- Gautier H, Bonora M (1992) Ventilatory and metabolic responses to cold and CO-induced hypoxia in awake rats. *Respir Physiol* 97:79–91. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(94\)90013-2](https://doi.org/10.1016/0034-5687(94)90013-2)
- Gautier H, Bonora M (1994) Ventilatory and metabolic responses to cold and CO-induced hypoxia in awake rats. *Respir Physiol* 97:79–91. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(94\)90013-2](https://doi.org/10.1016/0034-5687(94)90013-2)
- Gaytán SP, Pásaro R (1998) Connections of the rostral ventral respiratory neuronal cell group: An anterograde and retrograde tracing study in the rat. *Brain Res Bull* 47:625–642. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(98\)00125-7](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(98)00125-7)
- Gaytán SP, Pásaro R, Coulon P, et al (2002) Identification of central nervous system neurons innervating the respiratory muscles of the mouse: A transneuronal tracing study. *Brain Res Bull* 57:335–339. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(01\)00674-8](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00674-8)
- Gelfand R, Lambertsen CJ (1973) Dynamic respiratory response to abrupt change of inspired CO₂ at normal and high PO₂. *J Appl Physiol* 35:903–913. <https://doi.org/10.1152/jappl.1973.35.6.903>
- Gerst DG, Yokhana SS, Carney LM, et al (2011) The hypoxic ventilatory response and ventilatory long-term facilitation are altered by time of day and repeated daily exposure to intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* 110:15–28. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00524.2010>
- Giacomini MM, Travis MA, Kudo M, Sheppard D (2012) Epithelial cells utilize cortical actin/myosin to activate latent TGF- β through integrin $\alpha\beta$ 6-dependent physical force. *Exp Cell Res* 318:716–722. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.01.020>
- Gille T, Didier M, Boubaya M, et al (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, et al (2018) Intermittent hypoxia increases the severity of bleomycin-induced lung injury in mice. *Oxid Med Cell Longev* 2018:. <https://doi.org/10.1155/2018/1240192>
- Giorgi C, Marchi S, Simoes ICM, et al (2018) Mitochondria and Reactive Oxygen Species in Aging and Age-Related Diseases. *Int Rev Cell Mol Biol* 340:209–344. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.05.006>
- Glasser SW, Witt TL, Senft AP, et al (2009) Surfactant protein C-deficient mice are susceptible to respiratory syncytial virus infection. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 297:64–72. <https://doi.org/10.1152/ajplung.90640.2008>
- Gold AR, Marcus CL, Dipalo F, Gold MS (2002) Upper airway collapsibility during sleep in upper airway resistance syndrome. *Chest* 121:1531–1540. <https://doi.org/10.1378/chest.121.5.1531>
- Golder FJ, Ranganathan L, Satriotomo I, et al (2008) Spinal adenosine A2a receptor activation elicits long-lasting phrenic motor facilitation. *J Neurosci* 28:2033–2042. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3570-07.2008>
- Gonzalez-Rothi EJ, Lee KZ, Dale EA, et al (2015) Intermittent hypoxia and neurorehabilitation. *J Appl Physiol* 119:1455–1465. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00235.2015>
- Gonzalez C, Almaraz L, Obeso A, Rigual R (1994) Carotid body chemoreceptors: From natural stimuli to sensory discharges
- Gonzalez L, Bolano C, Pelissier F (2003) USE OF OXYGEN ELECTRODE IN MEASUREMENTS OF PHOTOSYNTHESIS AND RESPIRATION
- Gordon S, Martinez FO (2010) Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. *Immunity* 32:593–604. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.007>
- Görlach A, Bonello S (2008) The cross-talk between NF-kappaB and HIF-1: further evidence for a significant liaison. *Biochem J* 412:17–19. <https://doi.org/10.1042/bj20080920>
- Gottlieb DJ, Punjabi NM (2020) Diagnosis and Management of Obstructive Sleep Apnea: A Review. *JAMA - J Am Med Assoc* 323:1380–1400. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3514>
- Gozal D, Hakim F, Leila Kherandish-Gozal (2014) Chemoreceptors, Baroreceptors, and Autonomic Deregulation in Children with Obstructive Sleep Apnea. *Bone* 23:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2012.08.019>.Chemoreceptors
- Gray PA, Hayes JA, Ling GY, et al (2010) Developmental origin of preBötzing complex respiratory neurons. *J Neurosci* 30:14883–14895. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4031-10.2010>
- Gray PA, Janczewski WA, Mellen N, et al (2001) Normal breathing requires preBötzing complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons. *Nat Neurosci* 4:927–930. <https://doi.org/10.1038/nn0901-927>
- Gray PA, Rekling JC, Bocchiaro CM, Feldman JL (1999) Modulation of respiratory frequency by peptidergic input to rhythmogenic neurons in the preBotzinger complex. *Science (80-)* 286:1566–1568. <https://doi.org/10.1126/science.286.5444.1566>
- Greenberg HE, Sica A, Batson D, Scharf SM (1999) Chronic intermittent hypoxia increases sympathetic responsiveness to hypoxia and hypercapnia. *J Appl Physiol* 86:298–305. <https://doi.org/10.1152/jappl.1999.86.1.298>
- Greer J, Funk GD (2013) Neuroscience in the 21st century: From basic to clinical

- Gregory AD, Kliment CR, Metz HE, et al (2015) Neutrophil elastase promotes myofibroblast differentiation in lung fibrosis. *J Leukoc Biol* 98:143–152. <https://doi.org/10.1189/jlb.3hi1014-493r>
- Grélot L, Bianchi AL, Iscoe S, Remmers JE (1988) Expiratory neurones of the rostral medulla: Anatomical and functional correlates. *Neurosci Lett* 89:140–145. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(88\)90370-9](https://doi.org/10.1016/0304-3940(88)90370-9)
- Gross T, Gary H (2001) Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 345:517–525
- Grunstein MM, Hazinski TA, Schlueter MA (1981) Respiratory control during hypoxia in newborn rabbits: Implied action of endorphins. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 51:122–130. <https://doi.org/10.1152/japopl.1981.51.1.122>
- Gschwandtner M, Strutzmann E, Teixeira MM, et al (2017) Glycosaminoglycans are important mediators of neutrophilic inflammation in vivo. *Cytokine* 91:65–73. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.12.008>
- Guillot L, Nathan N, Tabary O, et al (2013) Alveolar epithelial cells: Master regulators of lung homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol* 45:2568–2573. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.08.009>
- Guiot J, Corhay JL, Louis R (2014) La fibrose pulmonaire idiopathique. *Rev Med Liege* 69:605–610. [https://doi.org/10.1016/s1877-1203\(10\)70126-9](https://doi.org/10.1016/s1877-1203(10)70126-9)
- Guiot J, Henket M, Corhay JL, et al (2017) Sputum biomarkers in IPF: Evidence for raised gene expression and protein level of IGFBP-2, IL-8 and MMP-7. *PLoS One* 12:1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171344>
- Günther A, Schmidt R, Nix F, et al (1999) Surfactant abnormalities in idiopathic pulmonary fibrosis, hypersensitivity pneumonitis and sarcoidosis. *Eur Respir J* 14:565–573. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.1999.14c14.x>
- Guo X, Chen G (2020) Hypoxia-Inducible Factor Is Critical for Pathogenesis and Regulation of Immune Cell Functions in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol* 11:1–6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01668>
- Gusbin N, Fry S, Mallart A, Wallaert B (2013) Fibrose pulmonaire idiopathique et troubles du sommeil. *Rev Pneumol Clin* 69:41–45. <https://doi.org/10.1016/j.pneumo.2012.11.004>
- Guyenet PG (1984) Baroreceptor-mediated inhibition of A5 noradrenergic neurons. *Brain Res* 303:31–40. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)90207-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)90207-5)
- Guyenet PG, Bayliss DA, Stornetta RL, et al (2016) Proton detection and breathing regulation by the retrotrapezoid nucleus. *J Physiol* 594:1529–1551. <https://doi.org/10.1113/JP271480>
- Guyenet PG, Mulkey DK (2010) Retrotrapezoid nucleus and parafacial respiratory group. *Respir Physiol Neurobiol*. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2010.02.005>. Retrotrapezoid
- Guyenet PG, Stornetta RL, Bayliss DA (2010) Central respiratory chemoreception. *J Comp Neurol* 518:3883–3906. <https://doi.org/10.1002/cne.22435>
- Guyenet PG, Stornetta RL, Bayliss DA (2008) Retrotrapezoid nucleus and central chemoreception. *J Physiol* 586:2043–2048. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.150870>
- Guyenet PG, Wang H (2001) Pre-Bötzinger neurons with preinspiratory discharges “in vivo” express NK1 receptors in the rat. *J Neurophysiol* 86:438–446. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.86.1.438>

- Haddad JJ, Land SC (2001) A non-hypoxic, ROS-sensitive pathway mediates TNF- α -dependent regulation of HIF-1 α . *FEBS Lett* 505:269–274. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02833-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02833-2)
- Hagimoto N, Kuwano K, Miyazaki H, et al (1997) Induction of Apoptosis and Pulmonary Fibrosis in Mice in Response to Ligation of Fas Antigen. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17:272–278. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.17.3.2893>
- Haider T, Casucci G, Linser T, et al (2009) Interval hypoxic training improves autonomic cardiovascular and respiratory control in patients with mild chronic obstructive pulmonary disease. *J Hypertens* 27:1648–1654. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32832c0018>
- Haine L, Bravais J, Yegen C, et al (2021a) Sleep Apnea in Idiopathic Pulmonary Fibrosis : A Molecular Investigation in an Experimental Model of Fibrosis and Intermittent Hypoxia
- Haine L, Yegen CH, Marchant D, et al (2021b) Cytoprotective effects of erythropoietin: What about the lung? *Biomed Pharmacother* 139:111547. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111547>
- Haji A, Takeda R, Okazaki M (2000) Neuropharmacology of control of respiratory rhythm and pattern in mature mammals. *Pharmacol Ther* 86:277–304. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(00\)00059-0](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(00)00059-0)
- Hall MJ, Xie A, Rutherford R, et al (1996) Cycle length of periodic breathing in patients with and without heart failure. *Am J Respir Crit Care Med* 154:376–381. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.154.2.8756809>
- Hamilton RB, Norgren R (1984) Central projections of gustatory nerves in the rat. *J Comp Neurol* 222:560–577. <https://doi.org/10.1002/cne.902220408>
- Hamman L, Rich A. (1944) Acute Diffuse Interstitial Fibrosis of the Lungs. *Bull Johns Hopkins Hosp* 74
- Hanak V, Ryu JH, de Carvalho E, et al (2008) Profusion of fibroblast foci in patients with idiopathic pulmonary fibrosis does not predict outcome. *Respir Med* 102:852–856. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2008.01.012>
- Hanson KM, Hernady EB, Reed CK, et al (2019) Apoptosis Resistance in Fibroblasts Precedes Progressive Scarring in Pulmonary Fibrosis and Is Partially Mediated by Toll-Like Receptor 4 Activation. *Toxicol Sci* 170:489–498. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz103>
- Harari S, Caminati A (2005) Idiopathic pulmonary fibrosis. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 60:421–435. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2005.00719.x>
- Harding HP, Novoa I, Zhang Y, et al (2000) Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells. *Mol Cell* 6:1099–1108
- Harding KG, Moore K, Phillips TJ (2005) Wound chronicity and fibroblast senescence - Implications for treatment. *Int Wound J* 2:364–368. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4801.2005.00149.x>
- Hasnain SZ, Prins JB, McGuckin MA (2016) Oxidative and endoplasmic reticulum stress in β -cell dysfunction in diabetes. *J Mol Endocrinol* 56:R33–R54. <https://doi.org/10.1530/JME-15-0232>
- Haxhiu MA, Yung K, Erokwu B, Cherniack NS (1996) CO₂-induced c-fos expression in the CNS catecholaminergic neurons. *Respir Physiol* 105:35–45. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(96\)00034-5](https://doi.org/10.1016/0034-5687(96)00034-5)
- Hayashi F, Fukuda Y (2000) Neuronal mechanisms mediating the integration of respiratory responses

- to hypoxia. *Jpn J Physiol* 50:15–24. <https://doi.org/10.2170/jjphysiol.50.15>
- Hayden MS, Ghosh S (2004) Signaling to NF- κ B. *Cell* 117:275–292. [https://doi.org/10.1101/gad.1228704.bone](https://doi.org/10.1016/j.gad.1228704.bone)
- Haze K, Yoshida H, Yanagi H, et al (1999) Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 10:3787–3799. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.11.3787>
- Hecker L, Logsdon NJ, Kurundkar D, et al (2015) Reversal of Persistent Fibrosis in Aging by Targeting Nox4-Nrf2 Redox Imbalance. *6*. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008182.Reversal>
- Hérard AL, Pierrot D, Hinnrasky J, et al (1996) Fibronectin and its α 5 β 1-integrin receptor are involved in the wound-repair process of airway epithelium. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 271:. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1996.271.5.1726>
- Hilaire G (2006) Endogenous noradrenaline affects the maturation and function of the respiratory network: Possible implication for SIDS. *Auton Neurosci Basic Clin* 126–127:320–331. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2006.01.021>
- Hilaire G, Monteau R, Errchidi S (1989) Possible modulation of the medullary respiratory rhythm generator by the noradrenergic A5 area: an in vitro study in the newborn rat. *Brain Res* 485:325–332. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)90577-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90577-5)
- Hilaire G, Viemari JC, Coulon P, et al (2004) Modulation of the respiratory rhythm generator by the pontine noradrenergic A5 and A6 groups in rodents. *Respir Physiol Neurobiol* 143:187–197. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2004.04.016>
- Hodges MR, Richerson GB (2010) The role of medullary serotonin (5-HT) neurons in respiratory control: Contributions to eupneic ventilation, CO₂ chemoreception, and thermoregulation. *J Appl Physiol* 108:1425–1432. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01270.2009>
- Hodges MR, Wehner M, Aungst J, et al (2009) Transgenic mice lacking serotonin neurons have severe apnea and high mortality during development. *J Neurosci* 29:10341–10349. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1963-09.2009>
- Hoffman MS, Mitchell GS (2011) Spinal 5-HT₇ receptor activation induces long-lasting phrenic motor facilitation. *J Physiol* 589:1397–1407. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.201657>
- Holtman JR, Anastasi NC, Norman WP, Dretchen KL (1986) Effect of electric and chemical stimulation of the raphe obscurus on phrenic nerve activity in the cat. *Brain Res* 362:214–220. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)90446-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)90446-4)
- Holty JEC, Guilleminault C (2010) Surgical Options for the Treatment of Obstructive Sleep Apnea. *Med Clin North Am* 94:479–515. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2010.02.001>
- Hope-Gill BDM, Hilldrup S, Davies C, et al (2003) A Study of the Cough Reflex in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 168:995–1002. <https://doi.org/10.1164/rccm.200304-597OC>
- Horner RL, Innes JA, Holden HB, Guz A (1991) Afferent pathway(s) for pharyngeal dilator reflex to negative pressure in man: a study using upper airway anaesthesia. *J Physiol* 436:31–44. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1991.sp018537>
- Hsia CCW, Hyde DM, Weibel ER (2016) Lung structure and the intrinsic challenges of gas exchange. *Compr Physiol* 6:827–895. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150028>

- Hsu H, Liu C, Lin J, et al (2017) Involvement of ER stress , PI3K / AKT activation , and lung fibroblast proliferation in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Sci Rep* 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14612-5>
- Huang J, Lusina S, Xie T, et al (2009) Sympathetic response to chemostimulation in conscious rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol* 166:102–106. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2009.02.010>
- Hunninghake GW, Gadek JE, Lawley TJ, Crystal RG (1981) Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 68:259–269. <https://doi.org/10.1172/JCI110242>
- Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M, Tsukita S (2003) Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: Direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci* 116:1959–1967. <https://doi.org/10.1242/jcs.00389>
- Im J, Kim K, Hergert P, Nho RS (2016) Idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts become resistant to Fas ligand-dependent apoptosis via the alteration of decoy receptor 3. *J Pathol* 240:25–37. <https://doi.org/10.1002/path.4749>
- International S, Consensus M (2002) American Thoracic Society American Thoracic Society / European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. 165:277–304
- Ionescu (2013) The Human Respiratory System. 19–44. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4488-2_2
- Izbicki G, Segel MJ, Christensen TG, et al (2002) Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int J Exp Pathol* 83:111–119. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.2002.00220.x>
- Jacobs BL, Martín-Cora FJ, Fornal CA (2002) Activity of medullary serotonergic neurons in freely moving animals. *Brain Res Rev* 40:45–52. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(02\)00187-X](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(02)00187-X)
- Janczewski WA, Tashima A, Hsu P, et al (2013) Role of inhibition in respiratory pattern generation. *J Neurosci* 33:5454–5465. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1595-12.2013>
- Janick-Buckner D, Ranges GE, Hacker MP (1989) Alteration of bronchoalveolar lavage cell populations following bleomycin treatment in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 100:465–473. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(89\)90294-9](https://doi.org/10.1016/0041-008X(89)90294-9)
- Javaheri S, Sicilian L (1992) Lung function, breathing pattern, and gas exchange in interstitial lung disease. *Bmj* 47:93–97
- Jaynes DB, Rogowski AS (1983) Applicability of Fick's Law to Gas Diffusion. *Soil Sci Soc Am J* 47:425–430. <https://doi.org/10.2136/sssaj1983.03615995004700030007x>
- Jean A (1991) Aspects neuroanatomiques , neurochimiques
- Jiang BH, Rue E, Wang GL, et al (1996) Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271:17771–17778. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.30.17771>
- Johansson KA (2018) Air pollution exposure and IPF: Prevention when there is no cure. *Thorax* 73:103–104. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2017-210808>
- Johnson SM, Smith JC, Funk GD, Feldman JL (1994) Pacemaker behavior of respiratory neurons in medullary slices from neonatal rat. *J Neurophysiol* 72:2598–2608.

<https://doi.org/10.1152/jn.1994.72.6.2598>

- Jonkman AH, De Vries HJ, Heunks LMA (2020) Physiology of the Respiratory Drive in ICU Patients: Implications for Diagnosis and Treatment. *Crit Care* 24:. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-2776-z>
- Jordana M, Sarnstrand B, Sime PJ, Ramis I (1994) Immune-inflammatory functions of fibroblasts. *Eur Respir J* 7:2212–2222. <https://doi.org/10.1183/09031936.94.07122212>
- Jun JC, Chopra S, Schwartz AR (2016) Sleep apnoea. *Eur Respir Rev* 25:12–18. <https://doi.org/10.1183/16000617.0077-2015>
- Jyothi I, Renuka Prasad K, Rajalakshmi R, et al (2019) Obstructive Sleep Apnea: A Pathophysiology and Pharmacotherapy Approach. *Noninvasive Vent Med - Recent Updat*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.77981>
- Kaelin WG, Ratcliffe PJ (2008) Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway. *Mol Cell* 30:393–402. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.04.009>
- Kage H, Borok Z (2012) EMT and interstitial lung disease: A mysterious relationship. *Curr Opin Pulm Med* 18:517–523. <https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e3283566721>
- Kalia M, Mesulam M -M (1980a) Brain stem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat: II. Laryngeal, tracheobronchial, pulmonary, cardiac, and gastrointestinal branches. *J Comp Neurol* 193:467–508. <https://doi.org/10.1002/cne.901930211>
- Kalia M, Mesulam M -M (1980b) Brain stem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat: I. The cervical vagus and nodose ganglion. *J Comp Neurol* 193:435–465. <https://doi.org/10.1002/cne.901930210>
- Kalia M, Sullivan JM (1982) Brainstem projections of sensory and motor components of the vagus nerve in the rat. *J Comp Neurol* 211:248–264. <https://doi.org/10.1002/cne.902110304>
- KANG HH, KIM S, LEE SH (2018) Chronic Intermittent Hypoxia Exacerbates Lung Fibrosis in Bleomycin-Induced Lung Injury Mouse Model. *Chest* 154:1091A. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.08.987>
- Kapur VK, Baldwin CM, Resnick HE, et al (2005) Sleepiness in patients with moderate to severe sleep-disordered breathing. *Sleep* 28:472–477. <https://doi.org/10.1093/sleep/28.4.472>
- Kasahara Y, Tuder RM, Cool CD, et al (2001) Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 163:737–744. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.3.2002117>
- Kasai H, Allen JT, Mason RM, et al (2005) TGF- β 1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir Res* 6:1–15. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-6-56>
- Keogh B., Crystal RG (1982) Alveolitis: the key to the interstitial lung disorders. *Thorax* 1–10
- Kim DS, Park JH, Park BK, et al (2006) Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: Frequency and clinical features. *Eur Respir J* 27:143–150. <https://doi.org/10.1183/09031936.06.00114004>
- Kim S, Ip HS, Lu MM, et al (1997) A serum response factor-dependent transcriptional regulatory program identifies distinct smooth muscle cell sublineages. *Mol Cell Biol* 17:2266–2278. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.4.2266>

- Kimoff RJ (1996) Sleep fragmentation in obstructive sleep apnea. *Sleep* 19:. https://doi.org/10.1093/sleep/19.suppl_9.s61
- King TE, Behr J, Brown KK, et al (2008) BUILD-1: A randomized placebo-controlled trial of bosentan in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 177:75–81. <https://doi.org/10.1164/rccm.200705-732OC>
- King TE, Bradford WZ, Castro-Bernardini S, et al (2014) A Phase 3 Trial of Pirfenidone in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med* 370:2083–2092. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1402582>
- King TE, Pardo A, Selman M (2011) Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 378:1949–1961. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60052-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60052-4)
- King TE, Schwarz MI, Brown K, et al (2001) Idiopathic pulmonary fibrosis: Relationship between histopathologic features and mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 164:1025–1032. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.6.2001056>
- Kliment CR, Oury TD (2010) Oxidative stress, extracellular matrix targets, and idiopathic pulmonary fibrosis. *Free Radic Biol Med* 49:707–717. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.036>
- Knight WD, Little JT, Carreno FR, et al (2011) Chronic intermittent hypoxia increases blood pressure and expression of FosB/ Δ FosB in central autonomic regions. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 301:131–139. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00830.2010>
- Knudsen L, Ochs M (2018) The micromechanics of lung alveoli: structure and function of surfactant and tissue components. *Histochem Cell Biol* 150:661–676. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1747-9>
- Knuppel L, Ishikawa Y, Aichler M, et al (2017) A novel antifibrotic mechanism of nintedanib and pirfenidone inhibition of collagen fibril assembly. *Am J Respir Cell Mol Biol* 57:77–90. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0217OC>
- Koen EJ, Collier AB (2010) Particle-in-cell simulations of a beam driven plasma. *Phys Plasmas To be* subm:1420–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104.1420>
- Kohansal R, Martinez-Camblor P, Agustí A, et al (2009) The natural history of chronic airflow obstruction revisited: An analysis of the Framingham Offspring Cohort. *Am J Respir Crit Care Med* 180:3–10. <https://doi.org/10.1164/rccm.200901-0047OC>
- Kohler M, Stradling JR (2012) CrossTalk proposal: Most of the cardiovascular consequences of OSA are due to increased sympathetic activity. *J Physiol* 590:2813–2815. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.229633>
- Kolb M, Margetts PJ, Anthony DC, et al (2001) Transient IL-1b induces ALI and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 107:1501–1502
- Kondoh Y, Taniguchi H, Kawabata Y, et al (1993) Acute exacerbation in idiopathic pulmonary fibrosis: Analysis of clinical and pathologic findings in three cases. *Chest* 103:1808–1812. <https://doi.org/10.1378/chest.103.6.1808>
- Konecny T, Kara T, Somers VK (2014) Obstructive sleep apnea and hypertension: An update. *Hypertension* 63:203–209. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.00613>
- Koos BJ, Mason BA, Punla O, Adinolfi AM (1994) Hypoxic inhibition of breathing in fetal sheep: Relationship to brain adenosine concentrations. *J Appl Physiol* 77:2734–2739.

<https://doi.org/10.1152/jappl.1994.77.6.2734>

- Korfei M, Ruppert C, Mahavadi P, et al (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>
- Koritzinsky M, Levitin F, Van Den Beucken T, et al (2013) Two phases of disulfide bond formation have differing requirements for oxygen. *J Cell Biol* 203:615–627. <https://doi.org/10.1083/jcb.201307185>
- Korthagen NM, Nagtegaal MM, Van Moorsel CHM, et al (2010) MRP14 is elevated in the bronchoalveolar lavage fluid of fibrosing interstitial lung diseases. *Clin Exp Immunol* 161:342–347. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04181.x>
- Koshiya N, Smith JC (1999) Neuronal pacemaker for breathing visualized in vitro. *Nature* 400:360–363. <https://doi.org/10.1038/22540>
- Kramer MS, Cutler N, Feighner J, et al (1998) Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science* (80-) 281:1640–1645. <https://doi.org/10.1126/science.281.5383.1640>
- Krishnan V, McCormack MC, Mathai SC, et al (2008) Sleep quality and health-related quality of life in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 134:693–698. <https://doi.org/10.1378/chest.08-0173>
- Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, et al (2008) Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. *Cell* 134:657–667. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.049>
- Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, et al (2001) Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12072–12077. <https://doi.org/10.1073/pnas.211053698>
- Kuhn C, Boldt J, King TE, et al (1989) An immunohistochemical study of architectural remodeling and connective tissue synthesis in pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 140:1693–1703. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/140.6.1693>
- Kusko RL, Brothers JF, Tedrow J, et al (2016) Integrated genomics reveals convergent transcriptomic networks underlying chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 194:948–960. <https://doi.org/10.1164/rccm.201510-2026OC>
- Kuwana SI, Tsunekawa N, Yanagawa Y, et al (2006) Electrophysiological and morphological characteristics of GABAergic respiratory neurons in the mouse pre-Bötzing complex. *Eur J Neurosci* 23:667–674. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04591.x>
- Lahiri S, DeLaney R. (1975) Relationship between carotid chemoreceptor activity and ventilation in the cat. *Respir Physiol* 267–286
- Lahiri S, Forster RE (2003) CO₂/H⁺ sensing: Peripheral and central chemoreception. *Int J Biochem Cell Biol* 35:1413–1435. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00050-5](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00050-5)
- Lalley PM (1986) Responses of phrenic motoneurons of the cat to stimulation of medullary raphe nuclei. *J Physiol* 380:349–371. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1986.sp016290>
- Lamouille S, Xu J, Derynck R (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:178–196. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>
- Lancaster LH, Mason WR, Parnell JA, et al (2009a) Obstructive sleep apnea is common in idiopathic

- pulmonary fibrosis. *Chest* 136:772–778. <https://doi.org/10.1378/chest.08-2776>
- Lancaster LH, Mason WR, Parnell JA, et al (2009b) Obstructive sleep apnea is common in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 136:772–778. <https://doi.org/10.1378/chest.08-2776>
- Larnicol N, Wallois F, Berquin P, et al (1994) C-Fos-Like Immunoreactivity in the Cat's Neuraxis Following Moderate Hypoxia or Hypercapnia. *J Physiol - Paris* 88:81–88. [https://doi.org/10.1016/0928-4257\(94\)90094-9](https://doi.org/10.1016/0928-4257(94)90094-9)
- Launois S, Clergue F, Medrano G, et al (1991) The control of respiration in pulmonary fibrosis. The effect of O₂ and CO₂. *Rev Mal Respir* 8:67–73
- Lavie L (2015) Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia - Revisited - The bad ugly and good: Implications to the heart and brain. *Sleep Med Rev* 20:27–45. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2014.07.003>
- Lavie L, Lavie P (2012) *J Physiol* 590.12 (2012). 12:2817–2819. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4585.C>
- Lavie L, Vishnevsky A, Lavie P (2004) Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. *Sleep* 27:123–128. <https://doi.org/10.1093/sleep/27.1.123>
- Lawson WE, Cheng DS, Degryse AL, et al (2011) Endoplasmic reticulum stress enhances fibrotic remodeling in the lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:10562–10567. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107559108>
- Lawson WE, Crossno PF, Polosukhin V V., et al (2008) Endoplasmic reticulum stress in alveolar epithelial cells is prominent in IPF: Association with altered surfactant protein processing and herpesvirus infection. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 294:1119–1126. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00382.2007>
- Lazarenko RM, Milner TA, Depuy SD, et al (2009) Acid sensitivity and ultrastructure of the retrotrapezoid nucleus in Phox2b-EGFP transgenic mice. *J Comp Neurol* 517:69–86. <https://doi.org/10.1002/cne.22136>
- Leach JP, Morrissey EE (2018) Repairing the lungs one breath at a time: How dedicated or facultative are you? *Genes Dev* 32:1461–1471. <https://doi.org/10.1101/gad.319418.118>
- Lebeaupin C, Vallée D, Hazari Y, et al (2018) Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 69:927–947. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.06.008>
- Lebke J, Fletcher EC, Bao G, Unger T (1997) Hypertension caused by chronic intermittent hypoxia - Influence of chemoreceptors and sympathetic nervous system. *J Hypertens* 15:1593–1603. <https://doi.org/10.1097/00004872-199715120-00060>
- Lee CG, Cho SJ, Kang MJ, et al (2004) Early growth response gene 1-mediated apoptosis is essential for transforming growth factor β 1-induced pulmonary fibrosis. *J Exp Med* 200:377–389. <https://doi.org/10.1084/jem.20040104>
- Lee HM, Kang JH, Shin JM, et al (2017) Chemical Chaperone of Endoplasmic Reticulum Stress Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by TGF- β 1 in Airway Epithelium via the c-Src Pathway. *Mediators Inflamm* 2017:. <https://doi.org/10.1155/2017/8123281>
- Lee YJ, Moon C, Lee SH, et al (2012) Apoptotic cell instillation after bleomycin attenuates lung injury through hepatocyte growth factor induction. *Eur Respir J* 40:424–435.

<https://doi.org/10.1183/09031936.00096711>

- Lehmann M, Korfei M, Mutze K, et al (2017) Senolytic drugs target alveolar epithelial cell function and attenuate experimental lung fibrosis ex vivo. *Eur Respir J* 50:. <https://doi.org/10.1183/13993003.02367-2016>
- Leigh S (2000) The importance of breast cancer research from a patient's view: the voices and visions of advocates. *Breast Cancer Res* 2:. <https://doi.org/10.1186/bcr127>
- Leusen IR (1953) Chemosensitivity of the Respiratory Center Influence of CO₂ in the Cerebral Ventricles on respiration. 61:1247–1257
- Lieske SP, Thoby-Brisson M, Telgkamp P, Ramirez JM (2000) Reconfiguration of the neural network controlling multiple breathing patterns: Eupnea, sighs and gasps. *Nat Neurosci* 3:600–607. <https://doi.org/10.1038/75776>
- Lim MCC, Maubach G, Zhuo L (2009) TGF- β 1 down-regulates connexin 43 expression and gap junction intercellular communication in rat hepatic stellate cells. *Eur J Cell Biol* 88:719–730. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2009.08.003>
- Lindsey B., Rybak IA, Smith JC (2013) Computational Models and Emergent Properties of Respiratory Neural Networks. *Compr Physiol* 2:1619–1670. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110016>
- Liu M, Ning X, Li R, et al (2017) Signalling pathways involved in hypoxia-induced renal fibrosis. *J Cell Mol Med* 21:1248–1259. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13060>
- Liu RM, Liu G (2020) Cell senescence and fibrotic lung diseases. *Exp Gerontol* 132:. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.110836>
- Loewy AD, Burton H (1978) Nuclei of the solitary tract: Efferent projections to the lower brain stem and spinal cord of the cat. *J Comp Neurol* 181:421–449. <https://doi.org/10.1002/cne.901810211>
- Lok SS, Haider Y, Howell D, et al (2002) Murine gammaherpes virus as a cofactor in the development of pulmonary fibrosis in bleomycin resistant mice. *Eur Respir J* 20:1228–1232. <https://doi.org/10.1183/09031936.02.00272902>
- López-Hernández B, Ceña V, Posadas I (2015) The endoplasmic reticulum stress and the HIF-1 signalling pathways are involved in the neuronal damage caused by chemical hypoxia. *Br J Pharmacol* 172:2838–2851. <https://doi.org/10.1111/bph.13095>
- Loreto C, La Rocca G, Anzalone R, et al (2014) The role of intrinsic pathway in apoptosis activation and progression in Peyronie's disease. *Biomed Res Int* 2014:. <https://doi.org/10.1155/2014/616149>
- Lorraine B (2000) The acute respiratory distress syndrome
- Lovett-Barr MR, Mitchell GS, Satriotomo I, Johnson SM (2006) Serotonin-induced in vitro long-term facilitation exhibits differential pattern sensitivity in cervical and thoracic inspiratory motor output. *Neuroscience* 142:885–892. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.06.036>
- Lugliani (1971) Effects of bilateral carotid body resection on ventilatory control at rest and during exercise in man. *N Engl J Med* 295:1117–1120
- Lutfi MF (2017) The physiological basis and clinical significance of lung volume measurements. *Multidiscip Respir Med* 12:1–12. <https://doi.org/10.1186/s40248-017-0084-5>

- Lynn R, Martin T (1997) Gender differences in extraversion, neuroticism, and psychoticism in 37 nations. *J Soc Psychol* 137:369–373. <https://doi.org/10.1080/00224549709595447>
- Macfarlane RJ, Donnelly TD, Khan Y, et al (2014) Clinical outcome and wound healing following carpal tunnel decompression: A comparison of two common suture materials. *Biomed Res Int* 2014:. <https://doi.org/10.1155/2014/270137>
- MacNee W, Rahman I (1995) Oxidants/antioxidants in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 50:. https://doi.org/10.1136/thx.50.Suppl_1.S53
- Maeyama T, Kuwano K, Kawasaki M, et al (2001) Upregulation of Fas-signalling molecules in lung epithelial cells from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 17:180–189. <https://doi.org/10.1183/09031936.01.17201800>
- Maina JN (2002) Structure, function and evolution of the gas exchangers: Comparative perspectives. *J Anat* 201:281–304. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2002.00099.x>
- Malik MT, Peng YJ, Kline DD, et al (2005) Impaired ventilatory acclimatization to hypoxia in mice lacking the immediate early gene fos B. *Respir Physiol Neurobiol* 145:23–31. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2004.08.009>
- Mannarino MR, Di Filippo F, Pirro M (2012) Obstructive sleep apnea syndrome. *Eur J Intern Med* 23:586–593. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2012.05.013>
- Manoury B, Nennan S, Leclerc O, et al (2005) The absence of reactive oxygen species production protects mice against bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Respir Res* 6:1–12. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-6-11>
- Marchal-Sommé J, Uzunhan Y, Marchand-Adam S, et al (2007) Dendritic cells accumulate in human fibrotic interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 176:1007–1014. <https://doi.org/10.1164/rccm.200609-1347OC>
- Marchenko V, Koizumi H, Mosher B, et al (2016) Perturbations of respiratory rhythm and pattern by disrupting synaptic inhibition within pre-Bötzing and Bötzing complexes. *eNeuro* 3:3033–3046. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0011-16.2016>
- Mariani TJ, Roby JD, Mechem RP, et al (1996) Localization of type I procollagen gene expression in silica-induced granulomatous lung disease and implication of transforming growth factor- β as a mediator of fibrosis. *Am J Pathol* 148:151–164
- Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, Agustí AGN (2005) Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: An observational study. *Lancet* 365:1046–1053. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)74229-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)74229-X)
- Markart P, Ruppert C, Wygrecka M, et al (2007) Surfactant protein C mutations in sporadic forms of idiopathic interstitial pneumonias. *Eur Respir J* 29:134–137. <https://doi.org/10.1183/09031936.00034406>
- Marmai C, Sutherland RE, Kim KK, et al (2011) Alveolar epithelial cells express mesenchymal proteins in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 301:71–78. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00212.2010>
- Martin SE, Engleman HM, Kingshott RN, Douglas NJ (1997) Microarousals in patients with sleep apnoea/hypopnoea syndrome. *J Sleep Res* 6:276–280. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2869.1997.00276.x>

- Martinez FJ, Safrin S, Weycker D, et al (2005) The clinical course of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann Intern Med* 142:963–968. https://doi.org/10.7326/0003-4819-142-12_part_1-200506210-00005
- Mateika JH, Syed Z (2013) Intermittent hypoxia, respiratory plasticity and sleep apnea in humans: Present knowledge and future investigations. *Respir Physiol Neurobiol* 188:289–300. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2013.04.010>
- Mathew O, Ghosh T. (1995) Role of airway afferents on upper airway muscle activity. *Lung Biol Heal Dis* 79:511–542
- Matsuo K, Palmer JB (2008) Anatomy and Physiology of Feeding and Swallowing: Normal and Abnormal. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 19:691–707. <https://doi.org/10.1016/j.pmr.2008.06.001>
- Matsuzawa Y, Kawashima T, Kuwabara R, et al (2015) Change in serum marker of oxidative stress in the progression of idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulm Pharmacol Ther* 32:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2015.03.005>
- Maurits D, Juergen B (2004) High-Dose Acetylcysteine in Idiopathic Pulmonary Fibrosis _ Enhanced Reader.pdf
- Maxová H, Vizek M (2001) Biphasic ventilatory response to hypoxia in unanesthetized rats. *Physiol Res* 50:91–96
- Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA (2014) The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 9:181–218. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020712-164023>
- McCrimmon DR, Alheid GF, Jiang M, et al (2004) Converging functional and anatomical evidence for novel brainstem respiratory compartments in the rat. *Adv Exp Med Biol* 551:101–105. https://doi.org/10.1007/0-387-27023-x_16
- McGuire M, Ling L (2005) Ventilatory long-term facilitation is greater in 1- vs. 2-mo-old awake rats. *J Appl Physiol* 98:1195–1201. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00996.2004>
- McKay LC, Janczewski WA, Feldman JL (2005) Sleep-disordered breathing after targeted ablation of preBötzing complex neurons. *Nat Neurosci* 8:1142–1144. <https://doi.org/10.1038/nn1517>
- McSharry DG, Saboisky JP, DeYoung P, et al (2014) Physiological mechanisms of upper airway hypotonia during REM sleep. *Sleep* 37:561–569. <https://doi.org/10.5665/sleep.3498>
- Mehrtash M, Bakker JP, Ayas N (2019) Predictors of Continuous Positive Airway Pressure Adherence in Patients with Obstructive Sleep Apnea. *Lung* 197:115–121. <https://doi.org/10.1007/s00408-018-00193-1>
- Mellen NM, Janczewski WA, Bocchiaro CM, Feldman JL (2003) Opioid-induced quantal slowing reveals dual networks for respiratory rhythm generation. *Neuron* 37:821–826. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00092-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00092-8)
- Mendez M V., Stanley A, Park HY, et al (1998) Fibroblasts cultured from venous ulcers display cellular characteristics of senescence. *J Vasc Surg* 28:876–883. [https://doi.org/10.1016/S0741-5214\(98\)70064-3](https://doi.org/10.1016/S0741-5214(98)70064-3)
- Mermigkis C, Bouloukaki I, Antoniou K, et al (2015) Obstructive sleep apnea should be treated in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Sleep Breath* 19:385–391. <https://doi.org/10.1007/s11325-014-1033-6>

- Mermigkis C, Bouloukaki I, Antoniou KM, et al (2013) CPAP therapy in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and obstructive sleep apnea: Does it offer a better quality of life and sleep? *Sleep Breath* 17:1137–1143. <https://doi.org/10.1007/s11325-013-0813-8>
- Mermigkis C, Bouloukaki I, Schiza SE (2017) Sleep as a New Target for Improving Outcomes in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Chest* 152:1327–1338. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.07.019>
- Mermigkis C, Chapman J, Golish J, et al (2007) Sleep-related breathing disorders in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Lung* 185:173–178. <https://doi.org/10.1007/s00408-007-9004-3>
- Merrill EG, Lipski J, Kubin L, Fedorko L (1983) Origin of the expiratory inhibition of nucleus tractus solitarius inspiratory neurones. *Brain Res* 263:43–50. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)91198-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)91198-8)
- Mezzanotte WS, Tangel DJ, White DP (1992) Waking genioglossal electromyogram in sleep apnea patients versus normal controls (a neuromuscular compensatory mechanism). *J Clin Invest* 89:1571–1579. <https://doi.org/10.1172/JCI115751>
- Mezzanotte WS, Tangel DJ, White DP (1996) Influence of sleep onset on upper-airway muscle activity in apnea patients versus normal controls. *Am J Respir Crit Care Med* 153:1880–1887. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.153.6.8665050>
- Miles LE, Buschek GD, McClintock DP, et al (1993) Development and application of automatic nasal CPAP calibration procedures for use in the unsupervised home environment. *Sleep* 16:. https://doi.org/10.1093/sleep/16.suppl_8.s118
- Mills CD (2012) M1 and M2 macrophages: Oracles of health and disease. *Crit Rev Immunol* 32:463–488. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v32.i6.10>
- Minagawa S, Araya J, Numata T, et al (2011) Accelerated epithelial cell senescence in IPF and the inhibitory role of SIRT6 in TGF- β -induced senescence of human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 300:391–401. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00097.2010>
- Miravittles M, Soriano JB, García-Río F, et al (2009) Prevalence of COPD in Spain: Impact of undiagnosed COPD on quality of life and daily life activities. *Thorax* 64:863–868. <https://doi.org/10.1136/thx.2009.115725>
- Mitchell GS (2004) Back to the future: Carbon dioxide chemoreceptors in the mammalian brain. *Nat Neurosci* 7:1288–1290. <https://doi.org/10.1038/nn1204-1288>
- Mitchell GS, Baker TL, Nanda SA, et al (2018) Invited Review: Intermittent hypoxia and respiratory plasticity GORDON. 2466–2475
- Mitchell GS, Stephen M. (2003) Invited Review: Neuroplasticity in respiratory motor control. *J Appl Physiol* 90:1593–1599
- Mitchell RA, Loeschcke HH, Massion WH, Severinghaus JW (1963) Respiratory responses mediated through superficial chemosensitive areas on the medulla. *J Appl Physiol* 18:523–533. <https://doi.org/10.1152/jappl.1963.18.3.523>
- Mittal V (2018) Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 13:395–412. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043854>
- Miyazaki Y, Araki K, Vesin C, et al (1996) Expression of a tumor necrosis factor- α transgene in murine lung causes lymphocytic and fibrosing alveolitis. a mouse model of progressive pulmonary fibrosis. *Pneumologie* 50:572

- Molkov YI, Abdala APL, Bacak BJ, et al (2010) Late-expiratory activity: Emergence and interactions with the respiratory CPG. *J Neurophysiol* 104:2713–2729. <https://doi.org/10.1152/jn.00334.2010>
- Moore BB, Hogaboam CM (2008) Murine models of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 294:152–160. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00313.2007>
- Moore BB, Peters-Golden M, Christensen PJ, et al (2003) Alveolar epithelial cell inhibition of fibroblast proliferation is regulated by MCP-1/CCR2 and mediated by PGE2. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 284:342–349. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00168.2002>
- Morgado-Valle C, Baca SM, Feldman JL (2010) Glycinergic pacemaker neurons in preBötzing complex of neonatal mouse. *J Neurosci* 30:3634–3639. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3040-09.2010>
- Morgan BJ, Adrian R, Wang ZY, et al (2016) Chronic intermittent hypoxia alters ventilatory and metabolic responses to acute hypoxia in rats. *J Appl Physiol* 120:1186–1195. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00015.2016>
- Mortola JP (2005) Influence of temperature on metabolism and breathing during mammalian ontogenesis. *Respir Physiol Neurobiol* 149:155–164. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2005.01.012>
- Moya EA, Arias P, Varela C, et al (2016) Intermittent Hypoxia-Induced Carotid Body Chemosensory Potentiation and Hypertension Are Critically Dependent on Peroxynitrite Formation. *Oxid Med Cell Longev* 2016:12–14. <https://doi.org/10.1155/2016/9802136>
- Mueller L, Goumas FA, Affeldt M, et al (2007) Stromal fibroblasts in colorectal liver metastases originate from resident fibroblasts and generate an inflammatory microenvironment. *Am J Pathol* 171:1608–1618. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060661>
- Mukae H, Iiboshi H, Nakazato M, et al (2002) Raised plasma concentrations of α -defensins in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 57:623–628. <https://doi.org/10.1136/thorax.57.7.623>
- Mulkey DK, Rosin DL, West G, et al (2007) Serotonergic neurons activate chemosensitive retrotrapezoid nucleus neurons by a pH-independent mechanism. *J Neurosci* 27:14128–14138. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4167-07.2007>
- Mulkey DK, Stornetta RL, Weston MC, et al (2004) Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nat Neurosci* 7:1360–1369. <https://doi.org/10.1038/nn1357>
- Müller R (1986) Cellular and viral fos genes: structure, regulation of expression and biological properties of their encoded products. *BBA - Rev Cancer* 823:207–225. [https://doi.org/10.1016/0304-419X\(86\)90003-X](https://doi.org/10.1016/0304-419X(86)90003-X)
- Mullier A, Cottin V, Richard JC, Guérin C (2013) Fibrose pulmonaire: dans quels cas et sur quels critères envisager une admission en réanimation? *Reanimation* 22:45–53. <https://doi.org/10.1007/s13546-012-0642-y>
- Mulugeta S, Maguire JA, Newitt JL, et al (2007) Misfolded BRICHOS SP-C mutant proteins induce apoptosis via caspase-4- and cytochrome c-related mechanisms. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 293:. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00025.2007>
- Muñoz-Espín D, Serrano M (2014) Cellular senescence: From physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:482–496. <https://doi.org/10.1038/nrm3823>
- Murrell GAC, Francis MJO, Bromley L (1990) Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem J* 265:659–665. <https://doi.org/10.1042/bj2650659>

- Myers JL, Katzenstein ALA (1988) Epithelial necrosis and alveolar collapse in the pathogenesis of usual interstitial pneumonia. *Chest* 94:1309–1311. <https://doi.org/10.1378/chest.94.6.1309>
- Nabhan AN, Brownfield DG, Harbury PB, et al (2018) Single-cell Wnt signaling niches maintain stemness of alveolar type 2 cells. *Science* (80-) 359:1118–1123. <https://doi.org/10.1126/science.aam6603>
- Nalysnyk L, Cid-Ruzafa J, Rotella P, Esser D (2012) Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: Review of the literature. *Eur Respir Rev* 21:355–361. <https://doi.org/10.1183/09059180.00002512>
- Nanduri J, Yuan G, Kumar GK, et al (2008) Transcriptional responses to intermittent hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol* 164:277–281. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2008.07.006>
- Nattie E (1999) CO₂, brainstem chemoreceptors and breathing. *Prog Neurobiol* 59:299–331. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(99\)00008-8](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(99)00008-8)
- Nattie E (2000) Multiple sites for central chemoreception: Their roles in response sensitivity and in sleep and wakefulness. *Respir Physiol* 122:223–235. [https://doi.org/10.1016/S0034-5687\(00\)00161-4](https://doi.org/10.1016/S0034-5687(00)00161-4)
- Nattie E, Li A (2012) Central chemoreceptors: Locations and functions. *Compr Physiol* 2:221–254. <https://doi.org/10.1002/cphy.c100083>
- Nattie E, Li A (2009) Central chemoreception is a complex system function that involves multiple brain stem sites. *J Appl Physiol* 106:1464–1466. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00112.2008>
- Nattie EE, Li A (2002) Substance P-saporin lesion of neurons with NK1 receptors in one chemoreceptor site in rats decreases ventilation and chemosensitivity. *J Physiol* 544:603–616. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.020032>
- Navarrete-Opazo A, Mitchell GS (2014) Therapeutic potential of intermittent hypoxia: A matter of dose. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 307:R1181–R1197. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00208.2014>
- Nestler EJ (2008) Transcriptional mechanisms of addiction: Role of Δ FosB. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 363:3245–3255. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0067>
- Neubauer J (2001a) Invited review: Physiological and pathophysiological responses to intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* 90:1593–1599
- Neubauer J (2001b) Physiological consequences of intermittent hypoxia: systemic blood pressure. *J Appl Physiol* 90:1593–1599
- Nho RS, Hergert P, Kahm J, et al (2011) Pathological alteration of FoxO3a activity promotes idiopathic pulmonary fibrosis fibroblast proliferation on type I collagen matrix. *Am J Pathol* 179:2420–2430. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.07.020>
- Niederschlags P (1851) Ueber Diffusion;
- Noble PW, Homer RJ (2005) Back to the future: Historical perspective on the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33:113–120. <https://doi.org/10.1165/rcmb.F301>
- Noren Hooten N, Evans MK (2017) Techniques to induce and quantify cellular senescence. *J Vis Exp* 2017:1–14. <https://doi.org/10.3791/55533>

- Norgren R (1978) Projections from the nucleus of the solitary tract in the rat. *Neuroscience* 3:207–218. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(78\)90102-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(78)90102-1)
- Novais EJ, Choi H, Madhu V, et al (2021) Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factor-1 α Regulate Endoplasmic Reticulum Stress in Nucleus Pulposus Cells: Implications of Endoplasmic Reticulum Stress for Extracellular Matrix Secretion. *Am J Pathol* 191:487–502. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.11.012>
- Ochs M, Hegermann J, Lopez-Rodriguez E, et al (2020) On top of the alveolar epithelium: Surfactant and the glycocalyx. *Int J Mol Sci* 21:.. <https://doi.org/10.3390/ijms21093075>
- Ohashi K, Sequist L., Arcila M., et al (2013) Characteristics of Lung Cancers Harboring NRAS Mutations Kadoaki. *Bone* 23:1–7. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3173.Characteristics>
- Ohga E, Tomita T, Wada H, et al (2003) Effects of obstructive sleep apnea on circulating ICAM-1, IL-8, and MCP-1. *J Appl Physiol* 94:179–184. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00177.2002>
- Okada Y, Chen Z, Jiang W, et al (2002) Anatomical arrangement of hypercapnia-activated cells in the superficial ventral medulla of rats. *J Appl Physiol* 93:427–439. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00620.2000>
- Olson EB, Bohne CJ, Dwinell MR, et al (2001) Ventilatory long-term facilitation in unanesthetized rats. *J Appl Physiol* 91:709–716. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.2001.91.2.709>
- Olukogbon KL, Thomas P, Colasanti R, et al (2016) Breathing pattern and breathlessness in idiopathic pulmonary fibrosis: An observational study. *Respirology* 21:344–349. <https://doi.org/10.1111/resp.12686>
- Onimaru H, Arata A, Homma I (1989) Firing properties of respiratory rhythm generating neurons in the absence of synaptic transmission in rat medulla in vitro. *Exp Brain Res* 76:530–536. <https://doi.org/10.1007/BF00248909>
- Onimaru H, Arata A, Homma I (1995) Intrinsic burst generation of preinspiratory neurons in the medulla of brainstem-spinal cord preparations isolated from newborn rats. *Exp Brain Res* 106:57–68. <https://doi.org/10.1007/BF00241356>
- Onimaru H, Ballanyi K, Homma I (2003) Contribution of Ca²⁺-dependent conductances to membrane potential fluctuations of medullary respiratory neurons of newborn rats in vitro. *J Physiol* 552:727–741. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049312>
- Onimaru H, Homma I (2003) A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla. *J Neurosci* 23:1478–1486. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-04-01478.2003>
- Onimaru H, Ikeda K, Kawakami K (2008) CO₂-sensitive preinspiratory neurons of the parafacial respiratory group express Phox2b in the neonatal rat. *J Neurosci* 28:12845–12850. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3625-08.2008>
- Orr WC, Sohal RS (1994) Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* (80-) 263:1128–1130. <https://doi.org/10.1126/science.8108730>
- Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, et al (2003) Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8407–8411. <https://doi.org/10.1073/pnas.1432929100>

- Otake K, Nakamura Y, Ezure K (1993) Projections from the commissural subnucleus of the solitary tract onto catecholamine cell groups of the ventrolateral medulla. *Neurosci Lett* 149:213–216. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(93\)90774-F](https://doi.org/10.1016/0304-3940(93)90774-F)
- Oyamada Y, Andrzejewski M, Mückenhoff K, et al (1999) Locus coeruleus neurones in vitro: pH-sensitive oscillations of membrane potential in an electrically coupled network. *Respir Physiol* 118:131–147. [https://doi.org/10.1016/S0034-5687\(99\)00088-2](https://doi.org/10.1016/S0034-5687(99)00088-2)
- Oyamada Y, Ballantyne D, Mückenhoff K, Scheid P (1998) Respiration-modulated membrane potential and chemosensitivity of locus coeruleus neurones in the in vitro brainstem-spinal cord of the neonatal rat. *J Physiol* 513:381–398. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.381bb.x>
- Pack A. (1981) sensory inputs to the medulla
- Pagliardini S, Janczewski WA, Tan W, et al (2011) Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats. *J Neurosci* 31:2895–2905. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5338-10.2011>
- Paintal AS (1973) Vagal sensory receptors and their reflex effects. *Physiol Rev* 53:159–227. <https://doi.org/10.1152/physrev.1973.53.1.159>
- Palade BYGE, Porter ADKEITHR, Ph D (1954) STUDIES ON THE ENDOPLASMIC RETICULUM * (From The Laboratories of The Rockefeller Institute for Medical Research) PLATES 55 TO 62 (Received for publication , July 26 , 1954) In 1945 , Porter , Claude , and Fullam (1) noticed the presence of a " lace-
- Palade G (1975) Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis. *Science* (80-) 1975–1975
- Palazon A, Goldrath A, Nizet V, et al (2015) HIF Transcription Factors, Inflammation , and Immunity. 41:518–528. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.09.008.HIF>
- Palazon A, Goldrath AW, Nizet V, Johnson RS (2014) HIF Transcription Factors, Inflammation, and Immunity. *Immunity* 41:518–528. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.09.008>
- Pamenter ME, Powell FL (2016) Time Domains of the Hypoxic Ventilatory Response and Their Molecular Basis. *Compr Physiol* 6:1345–1385. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150026>
- Panos RJ, Mortenson RL, Niccoli SA, King TE (1990) Clinical deterioration in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: Causes and assessment. *Am J Med* 88:396–404. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(90\)90495-Y](https://doi.org/10.1016/0002-9343(90)90495-Y)
- Panos RJ, Rubin JS, Aaronson SA, Mason RJ (1993) Keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor/scatter factor are heparin-binding growth factors for alveolar type II cells in fibroblast-conditioned medium. *J Clin Invest* 92:969–977. <https://doi.org/10.1172/JCI116673>
- Parambil JG, Myers JL, Ryu JH (2005) Histopathologic features and outcome of patients with acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis undergoing surgical lung biopsy. *Chest* 128:3310–3315. <https://doi.org/10.1378/chest.128.5.3310>
- Paris AJ, Liu Y, Mei J, et al (2016) Neutrophils promote alveolar epithelial regeneration by enhancing type ii pneumocyte proliferation in a model of acid-induced acute lung injury. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 311:L1062–L1075. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00327.2016>
- Park AM, Nagase H, Kumar SV, Suzuki YJ (2007) Effects of intermittent hypoxia on the heart. *Antioxidants Redox Signal* 9:723–729. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1460>

- Park AM, Suzuki YJ (2007) Effects of intermittent hypoxia on oxidative stress-induced myocardial damage in mice. *J Appl Physiol* 102:1806–1814. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01291.2006>
- Park J, Jung J, Yoon SH, et al (2018) Inspiratory Lung Expansion in Patients with Interstitial Lung Disease: CT Histogram Analyses. *Sci Rep* 8:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33638-x>
- Pascual O, Morin-Surun MP, Barna B, et al (2002) Progesterone reverses the neuronal responses to hypoxia in rat nucleus tractus solitarius in vitro. *J Physiol* 544:511–520. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.023994>
- Passos JF, Nelson G, Wang C, et al (2010) Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol Syst Biol* 6:1–14. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.5>
- Patel AS, Lin L, Geyer A, et al (2012) Autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One* 7:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041394>
- Patwa A, Shah A (2015) Anatomy and physiology of respiratory system relevant to anaesthesia. *Indian J Anaesth* 59:533–541. <https://doi.org/10.4103/0019-5049.165849>
- Pearce RA, Stornetta RL, Guyenet PG (1989) Retrotrapezoid nucleus in the rat. *Neurosci Lett* 101:138–142. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(89\)90520-X](https://doi.org/10.1016/0304-3940(89)90520-X)
- Peña F, Parkis MA, Tryba AK, Ramirez JM (2004) Differential contribution of pacemaker properties to the generation of respiratory rhythms during normoxia and hypoxia. *Neuron* 43:105–117. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.06.023>
- Peng YJ, Overholt JL, Kline D, et al (2003) Induction of sensory long-term facilitation in the carotid body by intermittent hypoxia: Implications for recurrent apneas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10073–10078. <https://doi.org/10.1073/pnas.1734109100>
- Peng YJ, Prabhakar NR (2004) Effect of two paradigms of chronic intermittent hypoxia on carotid body sensory activity. *J Appl Physiol* 96:1236–1242. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00820.2003>
- Peng YJ, Prabhakar NR (2003) Reactive oxygen species in the plasticity of respiratory behavior elicited by chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* 94:2342–2349. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00613.2002>
- Perez-Padilla R, West P, Lertzman M, Kryger MH (1985) Breathing during sleep in patients with interstitial lung disease. *Am Rev Respir Dis* 132:224–229. <https://doi.org/10.1164/arrd.1985.132.2.224>
- Perrin-Terrin AS, Jeton F, Pichon A, et al (2016) The c-FOS protein immunohistological detection: A useful tool as a marker of central pathways involved in specific physiological responses in vivo and ex vivo. *J Vis Exp* 2016:1–9. <https://doi.org/10.3791/53613>
- PETIT JM, MILIC-EMILI G, DELHEZ L (1960) Role of the diaphragm in breathing in conscious normal man: an electromyographic study. *J Appl Physiol* 15:1101–1106. <https://doi.org/10.1152/jappl.1960.15.6.1101>
- Petitpierre N, Beigelman C, Letovanec I, et al (2014) Fibrose pulmonaire idiopathique : Nouveautés diagnostiques et thérapeutiques. *Rev Med Suisse* 10:2208–2213
- Pialoux V, Hanly PJ, Foster GE, et al (2009) Effects of exposure to intermittent hypoxia on oxidative stress and acute hypoxic ventilatory response in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 180:1002–1009. <https://doi.org/10.1164/rccm.200905-0671OC>

- Pihtili A, Bingol Z, Kiyan E, et al (2013) Obstructive sleep apnea is common in patients with interstitial lung disease. *Sleep Breath* 17:1281–1288. <https://doi.org/10.1007/s11325-013-0834-3>
- Plantier L, Cazes A, Dinh-Xuan AT, et al (2018) Physiology of the lung in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir Rev* 27:1–14. <https://doi.org/10.1183/16000617.0062-2017>
- Plataki M, Koutsopoulos A V., Darivianaki K, et al (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>
- Polak J, Shimoda LA, Drager LF, et al (2013) Intermittent hypoxia impairs glucose homeostasis in C57BL6/J mice: Partial improvement with Cessation of the exposure. *Sleep* 36:1483–1490. <https://doi.org/10.5665/sleep.3040>
- Polonis K, Becari C, Chahal CAA, et al (2020) Chronic Intermittent Hypoxia Triggers a Senescence-like Phenotype in Human White Preadipocytes. *Sci Rep* 10:1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63761-7>
- Porter J., Win T, Erlandsson K, et al (2021) Measurement of hypoxia in the lung IPF: an F-MISO PET CT study. *Eur Respir J*. <https://doi.org/10.1183/13993003.04584-2020>
- Porter Keith R, Albert C, Fullam E (1944) A STUDY OF TISSUE CULTURE CELLS BY ELECTRON MICROSCOPY
- Powell FL, Milsom WK, Mitchell GS (1998) Time domains of the hypoxic ventilatory response. *Respir Physiol* 112:123–134. [https://doi.org/10.1016/S0034-5687\(98\)00026-7](https://doi.org/10.1016/S0034-5687(98)00026-7)
- Prabhakar NR (2001) Physiological and Genomic Consequences of Intermittent Hypoxia. Oxygen sensing during intermittent hypoxia: cellular and molecular mechanisms. *J Appl Physiol* 90:1593–1599
- Prabhakar NR, Kumar GK, Nanduri J, Semenza GL (2007) ROS signaling in systemic and cellular responses to chronic intermittent hypoxia. *Antioxidants Redox Signal* 9:1397–1403. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1732>
- Prabhakar NR, Peng Y-J, Nanduri J (2020) Hypoxia-inducible factors and obstructive sleep apnea *The Journal of Clinical Investigation* 5 0 4 2. *J Clin Invest* 130:5042–5051
- Prostko CR, Brostrom MA, Brostrom CO (1993) Reversible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 α in response to endoplasmic reticular signaling. *Mol Cell Biochem* 127–128:255–265. <https://doi.org/10.1007/BF01076776>
- Ptak K, Yamanishi T, Aungst J, et al (2009) Raphe neurons stimulate respiratory circuit activity by multiple mechanisms via endogenously released serotonin and substance p. *J Neurosci* 29:3720–3737. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5271-08.2009>
- Punjabi NM (2008) The epidemiology of adult obstructive sleep apnea. *Proc Am Thorac Soc* 5:136–143. <https://doi.org/10.1513/pats.200709-155MG>
- Purvis LK, Smith JC, Koizumi H, Butera RJ (2007) Intrinsic bursters increase the robustness of rhythm generation in an excitatory network. *J Neurophysiol* 97:1515–1526. <https://doi.org/10.1152/jn.00908.2006>
- Raghu G (2011) Idiopathic pulmonary fibrosis: Guidelines for diagnosis and clinical management have advanced from consensus-based in 2000 to evidence-based in 2011. *Eur Respir J* 37:743–746. <https://doi.org/10.1183/09031936.00017711>

- Raghu G, Anstrom K., King TE, et al (2012) Prednisone, Azathioprine, and N-Acetylcysteine for Pulmonary Fibrosis. 1968–1977
- Raghu G, Collard HR, Egan JJ, et al (2011) An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: Idiopathic pulmonary fibrosis: Evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 183:788–824. <https://doi.org/10.1164/rccm.2009-040GL>
- Raghu G, Freudenberger TD, Yang S, et al (2006) High prevalence of abnormal acid gastro-oesophageal reflux in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 27:136–142. <https://doi.org/10.1183/09031936.06.00037005>
- Raghu Kalluri RAW (2010) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Phys Plasmas To be subm*:1420–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104.1420>
- Rahman I, Skwarska E, Henry M, et al (1999) Systemic and pulmonary oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Free Radic Biol Med* 27:60–68. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00035-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00035-0)
- Rakel RE (2009) Clinical and societal consequences of obstructive sleep apnea and excessive daytime sleepiness. *Postgrad Med* 121:86–95. <https://doi.org/10.3810/pgm.2009.01.1957>
- Raleigh JA, Calkins-Adams DP, Rinker LH, et al (1998) Hypoxia and vascular endothelial growth factor expression in human squamous cell carcinomas using pimonidazole as a hypoxia marker. *Cancer Res* 58:3765–3768
- Ramirez JM, Anderson TM (2017) Respiratory rhythm generation: Triple oscillator hypothesis. *F1000Research* 6:1–10. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10193.1>
- Ramirez JM, Doi A, Garcia AJ, et al (2012) The Cellular Building Blocks of Breathing. *Compr Physiol* 2:2683–2731. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110033>
- Ramirez JM, Koch H, Garcia AJ, et al (2011) The role of spiking and bursting pacemakers in the neuronal control of breathing. *J Biol Phys* 37:241–261. <https://doi.org/10.1007/s10867-011-9214-z>
- Rannels SR, Fisher CS, Heuser LJ, Rannels DE (1987) Culture of type II pneumocytes on a type II cell-derived fibronectin-rich matrix. *Am J Physiol - Cell Physiol* 253:. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1987.253.6.c759>
- Rashid NHA, Zaghi S, Scapuccin M, et al (2021) The Value of Oxygen Desaturation Index for Diagnosing Obstructive Sleep Apnea: A Systematic Review. *Laryngoscope* 131:440–447. <https://doi.org/10.1002/lary.28663>
- Raux M, Fiamma MN, Similowski T, Straus C (2007) Contrôle de la ventilation : physiologie et exploration en réanimation. *Reanimation* 16:511–520. <https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2007.09.008>
- Ray R, Corcoran AE, Rachael B, et al (2011) Impaired Respiratory and Body Temperature Control Upon Acute Serotonergic Neuron Inhibition Russell. 44:735–745. <https://doi.org/10.1126/science.1205295.Impaired>
- Redente EF, Black BP, Backos DS, et al (2021) Persistent, progressive pulmonary fibrosis and epithelial remodeling in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 64:669–676. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2020-0542MA>
- Redente EF, Keith RC, Janssen W, et al (2014) Tumor necrosis factor- α accelerates the resolution of

- established pulmonary fibrosis in mice by targeting profibrotic lung macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 50:825–837. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0386OC>
- Reed NI, Jo H, Chen C, et al (2015) The $\alpha\text{v}\beta\text{1}$ integrin plays a critical in vivo role in tissue fibrosis. *Sci Transl Med* 7:. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa5094>
- Reichmuth KJ, Austin D, Skatrud JB, Young T (2005) Association of sleep apnea and type II diabetes: A population-based study. *Am J Respir Crit Care Med* 172:1590–1595. <https://doi.org/10.1164/rccm.200504-637OC>
- Rekling JC, Feldman JL (1998) Prebotzinger complex and pacemaker neurons: Hypothesized site and kernel for respiratory rhythm generation. *Annu Rev Physiol* 60:385–405. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.385>
- Remmers JE, DeGroot WJ, Sauerland EK, Anch AM (1978) Pathogenesis of upper airway occlusion during sleep. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 44:931–938. <https://doi.org/10.1152/jappl.1978.44.6.931>
- Renzoni E, Srihari V, Sestini P (2014) Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis: Review of recent findings. *F1000Prime Rep* 6:1–10. <https://doi.org/10.12703/P6-69>
- Reynolds HY, Fulmer JD, Kazmierowski JA, et al (1977) Analysis of cellular and protein content of broncho alveolar lavage fluid from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and chronic hypersensitivity pneumonitis. *J Clin Invest* 59:165–175. <https://doi.org/10.1172/JCI108615>
- Rhoads GG, Brody JS (1969) Idiopathic alveolar hypoventilation: clinical spectrum. *Ann Intern Med* 71:271–278. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-71-2-271>
- Rice AJ, Wells AU, Bouros D, et al (2003) Terminal diffuse alveolar damage in relation to interstitial pneumonias: An autopsy study. *Am J Clin Pathol* 119:709–714. <https://doi.org/10.1309/UVARMDY8FE9FJDKU>
- Richeldi L, Collard HR, Jones MG (2017) Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 389:1941–1952. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30866-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30866-8)
- Richerson GB (2004) Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. *Nat Rev Neurosci* 5:449–461. <https://doi.org/10.1038/nrn1409>
- Richter DW (2001) GENERATION AND MAINTENANCE OF THE RESPIRATORY RHYTHM. *Eur J Neurosci* 14:1727–1738. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816X.2001.01794.x>
- Richter DW, Ballantyne D (1983) A Three Phase Theory About the Basic Respiratory Pattern Generator. 164–174. https://doi.org/10.1007/978-3-642-68657-3_22
- Richter DW, Ballanyi K, Schwarzacher S (1992) Mechanisms of respiratory rhythm generation. *Curr Opin Neurobiol* 2:788–793. [https://doi.org/10.1016/0959-4388\(92\)90135-8](https://doi.org/10.1016/0959-4388(92)90135-8)
- Richter DW, Ballanyi K, Schwarzacher SW, et al (2003) Brainstem and hypothalamic areas involved in respiratory chemoreflexes: a Fos study in adult rats. *Am J Respir Crit Care Med* 176:139–148. https://doi.org/10.1007/978-3-642-68657-3_22
- Richter DW, Schmidt-Garcon P, Pierrefiche O, et al (1999) Neurotransmitters and neuromodulators controlling the hypoxic respiratory response in anaesthetised cats. *J Physiol* 514:567–578. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.567ae.x>
- Richter DW, Spyer KM (2001) Studying rhythmogenesis of breathing: Comparison of in vivo and in

- vitro models. *Trends Neurosci* 24:464–472. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01867-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01867-1)
- Rock JR, Barkauskas CE, Cronce MJ, et al (2011) Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117988108>
- Rodman JR, Curran AK, Henderson KS, et al (2021) Carotid body denervation in dogs : eupnea and the ventilatory response to hyperoxic hypercapnia. 328–335
- Rojas M, Xu J, Woods CR, et al (2005) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33:145–152. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2004-0330OC>
- Roncoroni AJ, Figueroa Casas J., Puy RJ., et al (1975) Idiopathic Interstitial Pulmonary Fibrosis with Hypercapnia. 32:
- Rosa AC, Pini A, Lucarini L, et al (2014) Prevention of bleomycin-induced lung inflammation and fibrosis in mice by naproxen and JNJ7777120 treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 351:308–316. <https://doi.org/10.1124/jpet.114.215152>
- Rossi GA, Hunninghake GW, Kawanami O, et al (1985) Motheaten mice - An animal model with an inherited form of interstitial lung disease. *Am Rev Respir Dis* 131:150–158. <https://doi.org/10.1164/arrd.1985.131.1.150>
- Rozen-Zvi B, Hayashida T, Hubchak SC, et al (2013) TGF- β /Smad3 activates mammalian target of rapamycin complex-1 to promote collagen production by increasing HIF-1 α expression. *Am J Physiol - Ren Physiol* 305:. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00215.2013>
- Sabatakos G, Rowe GC, Kveiborg M, et al (2008) Doubly truncated FosB isoform ($\Delta 2\Delta$ FosB) induces osteosclerosis in transgenic mice and modulates expression and phosphorylation of Smads in osteoblasts independent of intrinsic AP-1 activity. *J Bone Miner Res* 23:584–595. <https://doi.org/10.1359/jbmr.080110>
- Sakata R, Ueno T, Nakamura T, et al (2004) Mechanical stretch induces TGF- β synthesis in hepatic stellate cells. *Eur J Clin Invest* 34:129–136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2004.01302.x>
- Salton F, Volpe MC, Confalonieri M (2019) Epithelial-mesenchymal transition in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Med* 55:1–8. <https://doi.org/10.3390/medicina55040083>
- Sandhu MS, Dougherty BJ, Lane MA, et al (2009) Respiratory recovery following high cervical hemisection. *Respir Physiol Neurobiol* 169:94–101. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2009.06.014>
- Sarrazy V, Koehler A, Chow ML, et al (2014) Integrins $\alpha v\beta 5$ and $\alpha v\beta 3$ promote latent TGF- $\beta 1$ activation by human cardiac fibroblast contraction. *Cardiovasc Res* 102:407–417. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu053>
- Sateia MJ (2014) International classification of sleep disorders-third edition highlights and modifications. *Chest* 146:1387–1394. <https://doi.org/10.1378/chest.14-0970>
- Sato A, Toyoshima M, Yoshitomi A, et al (1994) Dyskeratosis Congenita Showing Usual Interstitial Pneumonia. *Intern Med* 33:226–230. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.33.226>
- Schaefer E, Wu W, Mark C, et al (2017) Intermittent hypoxia is a proinflammatory stimulus resulting in IL-6 expression and M1 macrophage polarization. *Hepato Comm* 1:326–337. <https://doi.org/10.1002/hep4.1045>
- Schafer MJ, White TA, Iijima K, et al (2017) Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease.

- Schelegle ES, Walby WF, Mansoor JK, Chen AT (2001) Lung vagal afferent activity in rats with bleomycin-induced lung fibrosis. *Respir Physiol* 126:9–27. [https://doi.org/10.1016/S0034-5687\(00\)00228-0](https://doi.org/10.1016/S0034-5687(00)00228-0)
- Schiza S, Mermigkis C, Margaritopoulos GA, et al (2015) Idiopathic pulmonary fibrosis and sleep disorders: No longer strangers in the night. *Eur Respir Rev* 24:327–339. <https://doi.org/10.1183/16000617.00009114>
- Schlaefke ME, See WR, Loeschcke HH (1970) Ventilatory response to alterations of H⁺ ion concentration in small areas of the ventral medullary surface. *Respir Physiol* 10:198–212. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(70\)90083-6](https://doi.org/10.1016/0034-5687(70)90083-6)
- Schmidt R, Meier U, Markart P, et al (2002) Altered fatty acid composition of lung surfactant phospholipids in interstitial lung disease. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 283:1079–1085. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00484.2001>
- Schneider JP, Wrede C, Hegermann J, et al (2019) On the topological complexity of human alveolar epithelial type 1 cells. *Am J Respir Crit Care Med* 199:1153–1156. <https://doi.org/10.1164/rccm.201810-1866LE>
- Schraufstatter IU, Zhao M, Khaldoyanidi SK, Discipio RG (2012) The chemokine CCL18 causes maturation of cultured monocytes to macrophages in the M2 spectrum. *Immunology* 135:287–298. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03541.x>
- Schröder M, Kaufman RJ (2005) The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 74:739–789. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134>
- Schupp JC, Binder H, Jäger B, et al (2015) Macrophage activation in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One* 10:1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116775>
- Schwab RJ, Geftter WB, Hoffman EA, et al (1993) Dynamic upper airway imaging during awake respiration in normal subjects and patients with sleep disordered breathing. *Am Rev Respir Dis* 148:1385–1400. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/148.5.1385>
- Schwab RJ, Gupta KB, Geftter WB, et al (1995) Upper Airway and Soft Tissue Anatomy in Normal Subjects and Patients with Sleep-Disordered Breathing. *Am J Respir Crit Care Med* 152:1673–1689
- Schwartz DA (2006) The importance of gene-environment interactions and exposure assessment in understanding human diseases. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 16:474–476. <https://doi.org/10.1038/sj.jes.7500531>
- Schwarz DS, Blower MD (2016) The endoplasmic reticulum: Structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci* 73:79–94. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2052-6>
- Schwarzacher SW, Rüb U, Deller T (2011) Neuroanatomical characteristics of the human pre-Bötzing complex and its involvement in neurodegenerative brainstem diseases. *Brain* 134:24–35. <https://doi.org/10.1093/brain/awq327>
- Secourgeon JF (2012) Hypoxaemia, peripheral chemoreceptors and fetal heart rate. *J Gynecol Obstet Biol la Reprod* 41:26–40. <https://doi.org/10.1016/j.jgyn.2011.06.005>
- Selman M (2004) Idiopathic Pulmonary Fibrosis Pathogenesis and Therapeutic Approaches. *Pract Nurse* 48:405–430

- Selman M, Pardo A (2002) Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder *Moisés*. 8:1–8
- Semenza GL (2010) Oxygen homeostasis. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2:336–361. <https://doi.org/10.1002/wsbm.69>
- Semenza GL (2012) Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 148:399–408. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021>
- Semenza GL (2008) REVIEWS Regulation of Oxygen Homeostasis by HIF1. *Physiology* 24:97–106
- Sériès F (2006) De l'oxymétrie à la polysomnographie : quel enregistrement pour le diagnostic de SAS ? *Rev Mal Respir* 23:20–23. [https://doi.org/10.1016/s0761-8425\(06\)72477-9](https://doi.org/10.1016/s0761-8425(06)72477-9)
- Sesé L, Nunes H, Cottin V, et al (2018) Role of atmospheric pollution on the natural history of idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 73:145–150. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2017-209967>
- Severinghaus JW (1998) Hans Loeschcke, Robert Mitchell and the medullary CO₂ chemoreceptors: A brief historical review. *Respir Physiol* 114:17–24. [https://doi.org/10.1016/S0034-5687\(98\)00075-9](https://doi.org/10.1016/S0034-5687(98)00075-9)
- Shamsuzzaman ASM, Winnicki M, Lanfranchi P, et al (2002) Elevated C-reactive protein in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation* 105:2462–2464. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000018948.95175.03>
- Shao XM, Feldman JL (1997) Respiratory rhythm generation and synaptic inhibition of expiratory neurons in pre-Botzinger complex: Differential roles of glycinergic and GABAergic neural transmission. *J Neurophysiol* 77:1853–1860. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.77.4.1853>
- Shi Z, Xu L, Xie H, et al (2020) Attenuation of intermittent hypoxia-induced apoptosis and fibrosis in pulmonary tissues via suppression of ER stress activation. *BMC Pulm Med* 20:1–11. <https://doi.org/10.1186/s12890-020-1123-0>
- Shi ZH, Jonkman A, de Vries H, et al (2019) Expiratory muscle dysfunction in critically ill patients: towards improved understanding. *Intensive Care Med* 45:1061–1071. <https://doi.org/10.1007/s00134-019-05664-4>
- Shkoukani M, Babcock MA, Badr MS (2002) Effect of episodic hypoxia on upper airway mechanics in humans during NREM sleep. *J Appl Physiol* 92:2565–2570. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00938.2001>
- Shoeb M, Mustafa GM, Joseph P, et al (2019) Initiation of Pulmonary Fibrosis after Silica Inhalation in Rats is linked with Dysfunctional Shelterin Complex and DNA Damage Response. *Sci Rep* 9:1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36712-6>
- Shukla A, Ramos-Nino M, Mossman B (2003) Cell signaling and transcription factor activation by asbestos in lung injury and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 35:1198–1209. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00315-1](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00315-1)
- Sime PJ, Xing Z, Graham FL, et al (1997) Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor- β 1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J Clin Invest* 100:768–776. <https://doi.org/10.1172/JCI119590>
- Sleijfer, Pasquet F (2008) Un effet secondaire rare de la bléomycine. À propos d'un cas. *La Rev Médecine Interne* 29:S122–S123. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2008.03.223>

- Smith CA, Blain GM, Henderson KS, Dempsey JA (2015) Peripheral chemoreceptors determine the respiratory sensitivity of central chemoreceptors to CO₂: Role of carotid body CO₂. *J Physiol* 593:4225–4243. <https://doi.org/10.1113/JP270114>
- Smith JC, Abdala APL, Borgmann A, et al (2013) Brainstem respiratory networks: Building blocks and microcircuits. *Trends Neurosci* 36:152–162. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.11.004>
- Smith JC, Abdala APL, Koizumi H, et al (2007) Spatial and functional architecture of the mammalian brain stem respiratory network: A hierarchy of three oscillatory mechanisms. *J Neurophysiol* 98:3370–3387. <https://doi.org/10.1152/jn.00985.2007>
- Smith JC, Abdala APL, Rybak IA, Paton JFR (2009) Structural and functional architecture of respiratory networks in the mammalian brainstem. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 364:2577–2587. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0081>
- Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, et al (1991) Pre-Bötzinger complex: A brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* (80-) 254:726–729. <https://doi.org/10.1126/science.1683005>
- Smith JC, Greer JJ, Liu G, Feldman JL (1990) Neural mechanisms generating respiratory pattern in mammalian brain stem-spinal cord in vitro. I. Spatiotemporal patterns of motor and medullary neuron activity. *J Neurophysiol* 64:1149–1169. <https://doi.org/10.1152/jn.1990.64.4.1149>
- Smith JC, Morrison DE, Ellenberger HH, et al (1989) Brainstem projections to the major respiratory neuron populations in the medulla of the cat. *J Comp Neurol* 281:69–96. <https://doi.org/10.1002/cne.902810107>
- Smith PR, Baig MA, Brito V, et al (2010) Postoperative pulmonary complications after laparotomy. *Respiration* 80:269–274. <https://doi.org/10.1159/000253881>
- Solin P, Kaye DM, Little PJ, et al (2003) Impact of sleep apnea on sympathetic nervous system activity in heart failure. *Chest* 123:1119–1126. <https://doi.org/10.1378/chest.123.4.1119>
- Solomon IC, Edelman NH, Neubauer JA (2000) Pre-Botzinger complex functions as a central hypoxia chemosensor for respiration in vivo. *J Neurophysiol* 83:2854–2868. <https://doi.org/10.1152/jn.2000.83.5.2854>
- Somers VK, Abboud FM (1993a) Implications for Sleep Apnea. 30–34
- Somers VK, Abboud FM (1993b) Chemoreflexes - Responses, Interactions and Implications for Sleep Apnea. 30–34
- Somers VK, Dyken ME, Clary MP, Abboud FM (1995) Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep apnea. *J Clin Invest* 96:1897–1904. <https://doi.org/10.1172/JCI118235>
- Song S, Tan J, Miao Y, et al (2019) Intermittent-hypoxia-induced autophagy activation through the ER-Stress-Related PERK/eIF2 α /ATF4 pathway is a protective response to pancreatic β -cell apoptosis. *Cell Physiol Biochem* 51:2955–2971. <https://doi.org/10.1159/000496047>
- Stornetta RL, Moreira TS, Takakura AC, et al (2006) Expression of Phox2b by brainstem neurons involved in chemosensory integration in the adult rat. *J Neurosci* 26:10305–10314. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2917-06.2006>
- Strohl KP, Butler JP, Malhotra A (2012) Mechanical properties of the upper airway. *Compr Physiol* 2:1853–1872. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110053>

- Strollo PJ, Soose RJ, Maurer JT, et al (2014) Upper-Airway Stimulation for Obstructive Sleep Apnea. *N Engl J Med* 370:139–149. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1308659>
- Sun QJ, Goodchild AK, Chalmers JP, Pilowsky PM (1998) The pre-Botzinger complex and phase-spanning neurons in the adult rat. *Brain Res* 809:204–213. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)00872-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)00872-5)
- Suzue T (1984) 73 With 1 plate and 4 text-figure8 RESPIRATORY RHYTHM GENERATION IN THE IN VITRO BRAIN STEM-SPINAL CORD PREPARATION OF THE NEONATAL RAT. *J Physiol* 354:173–183
- Swigris JJ, Brown KK (2006) Acute interstitial pneumonia and acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med* 27:659–667. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957337>
- Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A (2006) Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 7:880–885. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400779>
- Takakura ACT, Santos Moreira T, Colombari E, et al (2006) Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats. *J Physiol* 572:503–523. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.103788>
- Takemasa A, Ishii Y, Fukuda T (2012) A neutrophil elastase inhibitor prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Eur Respir J* 40:1475–1482. <https://doi.org/10.1183/09031936.00127011>
- Tamisier R, Pepin JL, Wuyam B, et al (2004) Expiratory changes in pressure: Flow ratio during sleep in patients with sleep-disordered breathing. *Sleep* 27:240–248. <https://doi.org/10.1093/sleep/27.2.240>
- Tan W, Pagliardini S, Yang P, et al (2010) Projections of prebotzinger complex neurons in adult rats. *J Comp Neurol* 518:1862–1878. <https://doi.org/10.1002/cne.22308>
- Tang YW, Johnson JE, Browning PJ, et al (2003) Herpesvirus DNA is consistently detected in lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Microbiol* 41:2633–2640. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2633-2640.2003>
- Tanjore H, Blackwell TS, Lawson WE (2012) Emerging evidence for endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 302:. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00410.2011>
- Tanjore H, Cheng DS, Degryse AL, et al (2011a) 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, Cheng DS, Degryse AL, et al (2011b) 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>
- Tashiro J, Rubio GA, Limper AH, et al (2017) Exploring animal models that resemble idiopathic pulmonary fibrosis. *Front Med* 4:1–11. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00118>
- Taveira KVM, Kuntze MM, Berretta F, et al (2018) Association between obstructive sleep apnea and alcohol, caffeine and tobacco: A meta-analysis. *J Oral Rehabil* 45:890–902. <https://doi.org/10.1111/joor.12686>

- Tenney SM, Ou LC (1977) Ventilatory response of decorticate and decerebrate cats to hypoxia and CO₂. *Respir Physiol* 29:81–92. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(77\)90119-0](https://doi.org/10.1016/0034-5687(77)90119-0)
- Teppema LJ, Dahan A (2010) The ventilatory response to hypoxia in mammals: Mechanisms, measurement, and analysis. *Physiol Rev* 90:675–754. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2009>
- Teramoto, S. et al. (1995) Superoxide anion formation and glutathione metabolism of blood in patients with idiopathic pulmonary fibrosis.pdf
- Thoby-Brisson M, Karlén M, Wu N, et al (2009) Genetic identification of an embryonic parafacial oscillator coupling to the preBötzing complex. *Nat Neurosci* 12:1028–1035. <https://doi.org/10.1038/nn.2354>
- Thoby-Brisson M, Ramirez JM (2001) Identification of two types of inspiratory pacemaker neurons in the isolated respiratory neural network of mice. *J Neurophysiol* 86:104–112. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.86.1.104>
- Thorley AJ, Ford PA, Giembycz MA, et al (2007) Differential Regulation of Cytokine Release and Leukocyte Migration by Lipopolysaccharide-Stimulated Primary Human Lung Alveolar Type II Epithelial Cells and Macrophages. *J Immunol* 178:463–473. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.1.463>
- Thorp MJ (2012) Classification of Sleep Disorders. *Neurotherapeutics* 9:687–701. <https://doi.org/10.1007/s13311-012-0145-6>
- Tian M, Liu W, Li X, et al (2021) HIF-1 α promotes SARS-CoV-2 infection and aggravates inflammatory responses to COVID-19. *Signal Transduct Target Ther* 6:1–13. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00726-w>
- TIANJU L, Gonzalez, de los santos, Sem HP (2017) The Bleomycin Model of Pulmonary Fibrosis. Immunotoxicity Test Methods Protoc Methods Mol Biol 1803:465–497. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8>
- Toffoli S, Roegiers A, Feron O, et al (2009) Intermittent hypoxia is an angiogenic inducer for endothelial cells: Role of HIF-1. *Angiogenesis* 12:47–67. <https://doi.org/10.1007/s10456-009-9131-y>
- Torrealba F, Claps A (1988) The carotid sinus connections: a WGA-HRP study in the cat. *Brain Res* 455:134–143. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90122-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90122-9)
- Troy LK (2014) Sleep disordered breathing in interstitial lung disease: A review. *World J Clin Cases* 2:828. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v2.i12.828>
- Tuleta I, Stöckigt F, Juergens UR, et al (2016) Intermittent Hypoxia Contributes to the Lung Damage by Increased Oxidative Stress, Inflammation, and Disbalance in Protease/Antiprotease System. *Lung* 194:1015–1020. <https://doi.org/10.1007/s00408-016-9946-4>
- Tzouvelekis A, Harokopos V, Paparountas T, et al (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>
- Uhal BD (2008) The role of apoptosis in pulmonary fibrosis. *Eur Respir Rev* 17:138–144. <https://doi.org/10.1183/09059180.00010906>
- Uhal BD, Joshi I, Hughes WF, et al (1998) Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 275:1192–1199. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1998.275.6.1192>

- Umeda A, Miyagawa K, Mochida A, et al (2020) Intermittent hypoxia, energy expenditure, and visceral adipocyte recovery. *Respir Physiol Neurobiol* 273:103332. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2019.103332>
- Umezawa H, Ishizuka M, Maeda K, Takeuchi T (1967) Studies on bleomycin. *Cancer* 20:891–895. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(1967\)20:5<891::AID-CNCR2820200550>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1097-0142(1967)20:5<891::AID-CNCR2820200550>3.0.CO;2-V)
- Unnikrishnan D, Jun J, Polotsky V (2015) Inflammation in sleep apnea: An update. *Rev Endocr Metab Disord* 16:25–34. <https://doi.org/10.1007/s11154-014-9304-x>
- Uzunhan Y, Bernard O, Marchant D, et al (2016) Mesenchymal stem cells protect from hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 310:L439–L451. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00117.2015>
- Van Der Goes A, Brouwer J, Hoekstra K, et al (1998) Reactive oxygen species are required for the phagocytosis of myelin by macrophages. *J Neuroimmunol* 92:67–75. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(98\)00175-1](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(98)00175-1)
- Viemari JC, Bévangut M, Burnet H, et al (2004) Phox2a Gene, A6 Neurons, and Noradrenaline Are Essential for Development of Normal Respiratory Rhythm in Mice. *J Neurosci* 24:928–937. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3065-03.2004>
- Viemari JC, Burnet H, Bévangut M, Hilaire G (2003) Perinatal maturation of the mouse respiratory rhythm-generator: In vivo and in vitro studies. *Eur J Neurosci* 17:1233–1244. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02561.x>
- Viemari JC, Menuet C, Hilaire G (2013) Complexe de pré-Bötzinger et automatisme respiratoire Identification lectrophysiologique, molculaire et gntique dune structure cruciale pour la respiration. *Medecine/Sciences* 29:875–882. <https://doi.org/10.1051/medsci/20132910015>
- Vinit S, Windelborn J., Mitchell GS (2011) LIPOPOLYSACCHARIDE ATTENUATES PHRENIC LONG-TERM FACILITATION FOLLOWING ACUTE INTERMITTENT HYPOXIA. *Respir Physiol Neurobiol* 176:130–135. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2011.02.008.LIPOPOLYSACCHARIDE>
- Vizek M, Pickett CK, Weil J V. (1987) Increased carotid body hypoxic sensitivity during acclimatization to hypobaric hypoxia. *J Appl Physiol* 63:2403–2410. <https://doi.org/10.1152/jappl.1987.63.6.2403>
- Voituron N, Frugière A, Champagnat J, Bodineau L (2006) Hypoxia-sensing properties of the newborn rat ventral medullary surface in vitro. *J Physiol* 577:55–68. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.111765>
- Vuorio EI, Makela JK, Vuorio TK, et al (1989) Characterization of excessive collagen production during development of pulmonary fibrosis induced by chronic silica inhalation in rats. *Br J Exp Pathol* 70:305–315
- Wade ; C. Philip Larson; Robert F. Hickey; William K. Ehrenfeld and John G. (1970) Effect of carotid endarterectomy on carotid chemoreceptor and baroreceptor function in man. *N Engl J Med* 295:1117–1120
- Waghray M, Cui Z, Horowitz JC, et al (2005) Hydrogen peroxide is a diffusible paracrine signal for the induction of epithelial cell death by activated myofibroblasts. *FASEB J* 19:1–16. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2882fje>
- Wagner EF, Eferl R (2005) Fos/AP-A proteins in bone and the immune system. *Bone Dis Organ Transplant* 208:91–109. <https://doi.org/10.1016/B978-012183502-6/50007-9>

- Wakai J, Takamura D, Morinaga R, et al (2015) Differences in respiratory changes and Fos expression in the ventrolateral medulla of rats exposed to hypoxia, hypercapnia, and hypercapnic hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol* 215:64–72. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2015.05.008>
- Waldrop TG (1991) Posterior hypothalamic modulation of the respiratory response to CO₂ in cats. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 418:7–13. <https://doi.org/10.1007/BF00370445>
- Walmsley SR, Print C, Farahi N, et al (2005) Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 α -dependent NF- κ B activity. *J Exp Med* 201:105–115. <https://doi.org/10.1084/jem.20040624>
- Wang J, Wang S, Manzer R, et al (2006) Ozone induces oxidative stress in rat alveolar type II and type I-like cells. *Free Radic Biol Med* 40:1914–1928. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.01.017>
- Wang LW, Fu XL, Clough R, et al (2000) Can angiotensin-converting enzyme inhibitors protect against symptomatic radiation pneumonitis? *Radiat Res* 153:405–410. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2000\)153\[0405:CACEIP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2000)153[0405:CACEIP]2.0.CO;2)
- Wang X, Ribeiro M, Iracheta-vellve A, et al (2020) Macrophage-specific HIF-1 α contributes to impaired autophagic flux in non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 69:545–563. <https://doi.org/10.1002/hep.30215.Macrophage-specific>
- Waters DW (2018) Fibroblast senescence in the pathology of idiopathic pulmonary fibrosis. *Comput Ind Eng* 2:6
- Watts ER, Walmsley SR (2019) Inflammation and Hypoxia: HIF and PHD Isoform Selectivity. *Trends Mol Med* 25:33–46. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.10.006>
- Weibel ER (2009) What makes a good lung? The morphometric basis of lung function. *Swiss Med Wkly* 139:375–386
- Weibel ER, Sapoval B, Filoche M (2005) Design of peripheral airways for efficient gas exchange. *Respir Physiol Neurobiol* 148:3–21. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2005.03.005>
- Wendt MK, Allington TM, Schiemann WP (2009) Mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition by TGF- β . *Futur Oncol* 5:1145–1168. <https://doi.org/10.2217/fon.09.90>
- Weng T, Poth JM, Karmouty-Quintana H, et al (2014) Hypoxia-induced deoxycytidine kinase contributes to epithelial proliferation in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 190:1402–1412. <https://doi.org/10.1164/rccm.201404-0744OC>
- Weston MC, Stornetta RL, Guyenet PG (2004) Glutamatergic Neuronal Projections from the Marginal Layer of the Rostral Ventral Medulla to the Respiratory Centers in Rats. *J Comp Neurol* 473:73–85. <https://doi.org/10.1002/cne.20076>
- White DP (2005) Pathogenesis of obstructive and central sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 172:1363–1370. <https://doi.org/10.1164/rccm.200412-1631SO>
- Whitehead MC (1988) Neuronal architecture of the nucleus of the solitary tract in the hamster. *J Comp Neurol* 276:547–572. <https://doi.org/10.1002/cne.902760409>
- Wickström R, Hökfelt T, Lagercrantz H (2002) Development of co₂-response in the early newborn period in rat. *Respir Physiol Neurobiol* 132:145–158. [https://doi.org/10.1016/S1569-9048\(02\)00076-9](https://doi.org/10.1016/S1569-9048(02)00076-9)
- Widdicombe G (1981) Nervous receptors in the respiratory tract and lungs. *Lung Biol Heal Dis* 17:41–

- Widdicombe J (2003) Functional morphology and physiology of pulmonary rapidly adapting receptors (RARs). *Anat Rec - Part A Discov Mol Cell Evol Biol* 270:2–10. <https://doi.org/10.1002/ar.a.10003>
- Williamson JD, Sadofsky LR, Hart SP (2015) The pathogenesis of bleomycin-induced lung injury in animals and its applicability to human idiopathic pulmonary fibrosis. *Exp Lung Res* 41:57–73. <https://doi.org/10.3109/01902148.2014.979516>
- Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, et al (2005) Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor- β 1: 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)
- Winter SM, Fresemann J, Schnell C, et al (2009) Glycinergic interneurons are functionally integrated into the inspiratory network of mouse medullary slices. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 458:459–469. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0647-1>
- Wipff PJ, Rifkin DB, Meister JJ, Hinz B (2007) Myofibroblast contraction activates latent TGF- β 1 from the extracellular matrix. *J Cell Biol* 179:1311–1323. <https://doi.org/10.1083/jcb.200704042>
- Wolk R, Shamsuzzaman ASM, Somers VK (2003) Obesity, Sleep Apnea, and Hypertension. *Hypertension* 42:1067–1074. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000101686.98973.A3>
- Wollin L, Wex E, Pautsch A, et al (2015) Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 45:1434–1445. <https://doi.org/10.1183/09031936.00174914>
- Woodruff ML, Baisden RH, Whittington DL, Kelly JE (1986) Inputs to the pontine A5 noradrenergic cell group: A horseradish peroxidase study. *Exp Neurol* 94:782–787. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(86\)90256-6](https://doi.org/10.1016/0014-4886(86)90256-6)
- Wynn TA, Chawla A, Pollard JW (2013) Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496:445–455. <https://doi.org/10.1038/nature12034>
- Xia H, Khalil W, Kahm J, et al (2010) Pathologic caveolin-1 regulation of PTEN in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 176:2626–2637. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.091117>
- Xiong M, Zhao Y, Mo H, et al (2021) Intermittent hypoxia increases ROS/HIF-1 α related oxidative stress and inflammation and worsens bleomycin-induced pulmonary fibrosis in adult male C57BL/6J mice. *Int Immunopharmacol* 100:108165. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108165>
- Yaggi H, Mohsenin V (2001) Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: Cross-sectional results of the sleep heart health study. *Am J Respir Crit Care Med* 163:19–25. [https://doi.org/10.1016/S0272-5231\(03\)00027-3](https://doi.org/10.1016/S0272-5231(03)00027-3)
- Yamauchi M, Nakano H, Maekawa J, et al (2005) Oxidative stress in obstructive sleep apnea. *Chest* 127:1674–1679. <https://doi.org/10.1378/chest.127.5.1674>
- Yang D, Gao L, Wang T, et al (2014) Hypoxia triggers endothelial endoplasmic reticulum stress and apoptosis via induction of VLDL receptor. *FEBS Lett* 588:4448–4456. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.09.046>
- Yegen CH, Haine L, Marchant D, et al (2020) Characterisation of the protective role of erythropoietin in a murine model of acute lung injury. *Rev Mal Respir* 37:193–196. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2020.02.005>

- Yilmaz M, Bayazit YA, Ciftci TU, et al (2005) Association of serotonin transporter gene polymorphism with obstructive sleep apnea syndrome. *Laryngoscope* 115:832–836. <https://doi.org/10.1097/01.MLG.0000157334.88700.E6>
- Yokohori N, Aoshiba K, Nagai A, Kuriyama T (2004) Increased Levels of Cell Death and Proliferation in Alveolar Wall Cells in Patients with Pulmonary Emphysema. *Chest* 125:626–632. <https://doi.org/10.1378/chest.125.2.626>
- Yoshida H, Matsui T, Hosokawa N, et al (2003) A Time-Dependent Phase Shift in the Mammalian Unfolded Protein Response to decrease the load in the ER; these processes are collectively termed the unfolded protein response Patil. *Dev Cell* 4:265–271
- Yoshida K, Kuwano K, Hagimoto N, et al (2002) MAP kinase activation and apoptosis in lung tissues from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Pathol* 198:388–396. <https://doi.org/10.1002/path.1208>
- Young T, Finn L, Peppard PE, et al (2008) UNDERSTANDING THE HEALTH BURDEN OF SLEEP DISORDERED BREATHING (SDB), A HIGHLY PREVALENT CONDITION OF FREQUENT, INTERMITTENT breathing pauses during Sleep Disordered Breathing and Mortality: Eighteen-Year Follow-up of the Wisconsin Sleep Cohort. *Sleep* 31:1071–1078
- Young T, Peppard PE, Gottlieb DJ (2002a) Epidemiology of obstructive sleep apnea: A population health perspective. *Am J Respir Crit Care Med* 165:1217–1239. <https://doi.org/10.1164/rccm.2109080>
- Young T, Shahar E, Nieto J, et al (2002b) Predictors of sleep-disordered breathing in community-dwelling adults. *Arch Intern Med* 162:893–900
- Yu SY, Wang GM, Wang H, et al (2011) Raphe pallidus modulates Böttinger complex-induced inhibition of the phrenic nerve activity in rats. *Eur J Neurosci* 34:1113–1120. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07837.x>
- Yue W, Liu H, Zhang J, et al (2008) Association study of serotonin transporter gene polymorphisms with obstructive sleep apnea syndrome in Chinese han population. *Sleep* 31:1535–1541. <https://doi.org/10.1093/sleep/31.11.1535>
- Zeng L, Yang X tao, Li H sheng, et al (2016) The cellular kinetics of lung alveolar epithelial cells and its relationship with lung tissue repair after acute lung injury. *Respir Res* 17:1–10. <https://doi.org/10.1186/s12931-016-0480-y>
- Zhang P, Summer WR, Bagby GJ, Nelson S (2000) Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunol Rev* 173:39–51. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2000.917306.x>
- Zhang XF, Huang HP, Ding WX, et al (2013) Adiponectin protects the genioglossus of rats against chronic intermittent hypoxia-induced injury via inhibition of endoplasmic reticulum stress. *Chin Med J (Engl)* 126:3270–3275. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.20131660>
- Zhao ZQ, Scott M, Chiechio S, et al (2006) Lmx1b is required for maintenance of central serotonergic neurons and mice lacking central serotonergic system exhibit normal locomotor activity. *J Neurosci* 26:12781–12788. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4143-06.2006>
- Zhong Q, Zhou B, Ann DK, et al (2011) Role of endoplasmic reticulum stress in epithelial-mesenchymal transition of alveolar epithelial cells: Effects of misfolded surfactant protein. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45:498–509. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2010-0347OC>
- Zhu Y, Armstrong JL, Tchkonina T, Kirkland JL (2014) Cellular senescence and the senescent secretory

phenotype in age-related chronic diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 17:324–328. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000065>

Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, et al (1999) Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest* 103:779–788. <https://doi.org/10.1172/JCI5909>

Zimna A, Kurpisz M (2015) Hypoxia-Inducible factor-1 in physiological and pathophysiological angiogenesis: Applications and therapies. *Biomed Res Int* 2015:. <https://doi.org/10.1155/2015/549412>

(2012) sleep deprivation, sleep apnea. *Hypertension* 2007–2021

Annexes

Modèle murin de fibrose pulmonaire

Des souris C57BL6/JR ont été instillées avec de la bléomycine (groupe BLM) à 0,8UI/g ou du PBS (groupe PBS) toutes les deux semaines durant 12 semaines, soit 6 instillations intratrachéales. Afin d'induire une exacerbation aiguë, les souris ont reçu une dose de BLM à 1,6UI/g lors de la 6^e instillation IT.

Le jour du sacrifice, les poumons ont été séparés pour différentes études (protéiques, moléculaires et histologiques). Pour la partie histologie, les tissus sont fixés, un nœud au niveau du hile est réalisé afin de séparer le poumon droit du gauche. Une fois le poumon droit isolé à l'aide d'un fil de ligature, le poumon gauche est fixé par perfusion transcardiaque avec du paraformaldéhyde (PFA) 4%. Le PFA permet une fixation de l'organe, en arrêtant le métabolisme cellulaire, inactivant les enzymes lysosomiales, les RNases endogènes, tout en conservant la morphologie cellulaire et l'intégrité des acides nucléiques.

Prélèvements et préparation des échantillons

- Perfusion et prélèvement des organes

A la fin du protocole expérimental, les souris sont anesthésiées par un mélange de Kétamine (100 mg/kg) - Xylazine (20 mg/kg), les poumons ainsi que les cerveaux sont lavés par injection de PBS au niveau du ventricule gauche du cœur pendant 10 minutes. Ensuite, un nœud est réalisé au niveau de l'hile du poumon afin de fixer seulement le poumon gauche et le cerveau par perfusion transcardiaque de PFA 4% (paraformaldéhyde, Chem Cruz, SC-253236B). Une fois prélevés, les poumons et cerveaux sont conservés dans du PFA 4% durant 24 heures pour permettre post- fixation optimale.

- Préparation et coupe de poumon

Les différents lobes du poumon peuvent servir à différentes études. Dans le cas de ma thèse, ce sont les lobes supérieurs gauches des poumons des souris qui ont été utilisés afin de réaliser des marquages immunohistochimiques.

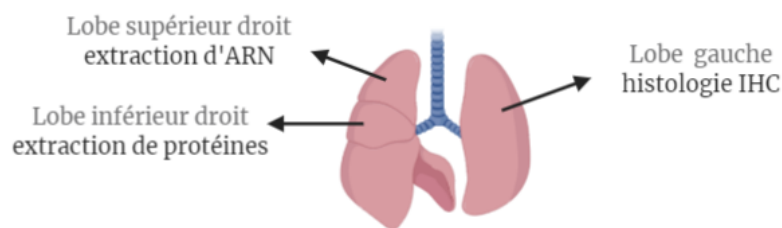


Figure 1 : Schéma reprenant le devenir des différents lobes de poumon après extraction. Les marquages IHC et/ou les colorations histologiques sont réalisées sur le lobe gauche. Les études protéiques sont réalisées sur le lobe inférieur droit. L'extraction des ARN se fait à partir d'un broyat du lobe supérieur droit.

Comme cité ci-dessus, les structures tridimensionnelles des organes extraits sont immobilisées par du PFA 4% qui est un agent fixateur ayant une pénétration intracellulaire rapide et homogène en créant des liaisons covalentes.

Ensuite, les échantillons sont déshydratés dans des bains successifs de concentration croissante d'éthanol de 35 à 100% (VWR, 20820362). Ensuite, ils sont plongés dans du xylène (Carlo Erba, 392602) qui est un solvant miscible avec la paraffine et qui remplace l'éthanol.

Les échantillons sont déposés dans des moules et ensuite inclus en paraffine (Klinipath paraclean, 2079A). Cette substance liquéfiée entre 54-56°C est chimiquement neutre et permet de solidifier les prélèvements en durcissant à 4°C sur une plaque froide. Les organes à présent durcis sont mis en cassettes et sont prêts à être découpé.

Des coupes de 5 microns d'épaisseur sont réalisées au microtome, puis déposées sur lames Superfrost® Plus (J1800AMNZ, Thermo Scientific) et sont laissées sécher 24h avant de réaliser différents traitements.

- Préparation et coupe de cerveau

Après l'incubation des cerveaux pendant 24 heures dans du PFA 4%, ils sont conservés dans une solution cryoprotectrice contenant du sucrose à 30% (Sigma, 59378-1KG) et 0.1% d'azide de sodium (antibiotique, Sigma, 58032) dilué dans du PBS.

Lors de la coupe, les cerveaux sont enrobés dans du gel OCT (Optimal cutting temperature compound, VWR Chemicals, mounting medium for cryotomy 361603E) qui durcit à -10°C et les solidifient ainsi pour faciliter la coupe au cryostat (Leica CM 1850 UV). L'OCT fond au

moment de la coupe et pour cela, un aérosol de congélation est pulvérisé (Labonard cryolab, 005-28200). Des coupes coronales sériées de 40µm sont réalisées et sont conservées dans un cryoprotecteur composé de polyvinyl pyrrolidone (Sigma, PVP360-100G), d'éthylène glycol (Sigma, 324558-1L) et de sucrose dilué dans du PBS.

Coloration à l'Hématoxyline Éosine (HE)

La coloration des tissus est initiée par un traitement à l'hématoxyline de Harris (Sigma, MHS16) durant 10 minutes. Cette coloration est fixée par un lavage continu dans de l'eau du robinet durant 5 minutes. Le surplus de colorant est rincé par deux bains successifs de 5 minutes dans de l'eau déionisée. Par la suite, les cytoplasmes et les éléments cellulaires basiques intracellulaires sont colorés par de l'éosine aqueuse (Merck, Art.1144) pendant 2 minutes. L'excès d'éosine est rincé par trois bains successifs d'eau déionisée. Déshydratation et Montage La conservation des tissus nécessite un processus de déshydratation de celui-ci qui se fait par des bains à des concentrations croissantes d'éthanol (70%, 95% et 100%) pendant 5 minutes. Deux bains de 10 minutes dans le xylène sont réalisés afin d'éclaircir le tissu.

Pour le montage lames-lamelles, une colle hydrophobe et miscible au xylène (VWR, H157-475NL) est déposée sur la lamelle, qui est ensuite retournée délicatement sur la lame.

Coloration au Trichrome de Masson

Les noyaux sont colorés dans de l'hématoxyline de fer (ou de Weigert) (Roth, X907.1) pendant 10 minutes, cette coloration est fixée durant 5 minutes sous un filet d'eau du robinet en continu. Les tissus sont ensuite placés 5 minutes dans de l'eau déionisée avant une coloration de 5 minutes dans de la fuschine (Merck, CI 42685). La fuschine est un colorant acide qui colore le cytoplasme en rose. Les tissus sont ensuite rincés 5 minutes dans de l'eau déionisée avant d'être fixé grâce à un mélange d'acides (acide phosphotungstique (Roth, NR 26352) à 5% et acide phosphomolybdique (VWR, 20616184) à 5%) pendant 5 minutes. Les fibres de collagènes I et III de nos tissus sont ensuite colorées grâce à de l'aniline bleue (VWR, 34015182) pendant 5 minutes. L'excès de colorant est ensuite éliminé avec de l'acide acétique à 0,7% (Fisher BioReagents, BP 1185-500) durant 2 minutes, il est nécessaire de laver à l'eau déionisée pour arrêter l'effet de l'acide acétique.

Coloration au Rouge Sirius/Fast Green

Les noyaux sont colorés dans de l'hématoxyline de fer (ou de Weigert) (Roth, X907.1) pendant 8 minutes, cette coloration est fixée durant 5 minutes sous un filet d'eau du robinet en continu. Le collagène est coloré par du 0,1% de Rouge Sirius durant 30 minutes. Après deux rinçages avec de l'eau acidifiée, une contre-coloration est réalisée par 0,1% de FastGreen. Le surplus de colorant est rincé par de l'eau désionisée.

Immunohistomarquage des coupes pulmonaires

Les sites antigéniques sont démasqués en condition acide. Pour ceci, les lames, immergées dans une solution de citrate (Sigma Aldrich, S4641-500G) à pH 6, sont chauffées au micro-onde 7 minutes à 800W puis 15 minutes à 450W. Ces deux propriétés permettent le changement de conformation des protéines qui vont alors exposer leurs sites antigéniques. Par la suite, les lames sont gardées à température ambiante avant d'être rincées avec de l'eau déionisée pendant 5 minutes. L'inhibition des peroxydases est nécessaire pour avoir un marquage spécifique aux peroxydases de Raifort associées aux anticorps secondaires. Cette étape est réalisée par une solution de méthanol (MERK Lichrosolv) avec 3% de H₂O₂ (peroxyde d'hydrogène, Fischer BioReagents, BP2633-500) pendant 10 minutes. Les lames sont ensuite placées dans une jarre avec du tampon phosphate salin (phosphate buffer saline, PBS) préparé en amont. Le PBS est une solution tampon physiologique contenant du chlorure de sodium (NaCl), du chlorure de potassium (KCl), du phosphate disodique et du phosphate monopotassique. Pour empêcher un marquage aspécifique de l'anticorps primaire, on effectue un blocage des sites antigéniques aspécifiques. En effet, ces sites sont saturés avec une solution riche en protéines préparée dans du PBS et composée de 5% de sérum de cheval fœtal (Vector, S-2000) durant 1 heure à température ambiante. Par la suite, les tissus vont-être marqués avec un anticorps primaire (voir tableau en annexe) préparés dans du PBS contenant 5% de sérum de cheval fœtal 4°C pendant la nuit. Le lendemain, le surplus d'anticorps primaire non fixé est lavé trois fois durant 5 minutes avec du PBS. La révélation du marquage est initiée par la fixation de la peroxydase de Raifort à l'anticorps secondaire par l'intermédiaire d'un complexe avidine-biotine. Ce dernier a été préparé dans du PBS Tween 0.1% par l'utilisation d'un kit (Thermo Scientific, TA-015-BB) contenant l'avidine d'une part et le complexe biotine-peroxydase d'autre part. 100µL de ce mélange sont déposés sur les tissus pendant 30 minutes. Les lames sont ensuite rincées avec du PBS, 3 fois pendant 5 minutes, pour enlever le surplus d'avidine-biotineperoxydase n'ayant pas été lié à l'anticorps secondaire. Par la suite, les lames

sont rincées 5 minutes dans une solution de Tris Acétate 1X à pH 6. Les substrats de la peroxydase de Raifort sont la DAB (ROTH, CN75.3), qui est un substrat chromogène, et l'H₂O₂. L'oxydation de la DAB aboutie à la formation d'un précipité coloré (renforcé par la suite grâce au nickel) visible en microscopie photonique. Le substrat de la peroxydase est préparé dans une solution contenant 0,0164% Tris Acétate (Roth, Nr.0188.4) 0,4% de NaCl (Fisher, S/3160/60), 0,5% de Nickel (Alfa Aesar, 12519) et 0,024% DAB (Roth, CN75.3), cette première est ajustée à pH 6, pH optimal pour l'activité catalytique de ces enzymes. La solution filtrée est activée grâce à l'ajout de 12,5 µL de H₂O₂ avant d'y déposer les lames pendant 4 minutes. Les tissus sont lavés avec une solution de Tris Saline (0,0141% de Tris et 0,0045% de NaCl dissous dans de l'eau déionisée) à pH 7,4 pendant 2 minutes et placés 4 minutes dans du Tris Cobalt filtré (0,7% de Tris et 0,5% de Cobalt Chloride (Sigma, C2644) dans de l'eau déionisée à pH 7,2). Ce colorant sert à intensifier la couleur brune obtenue après la réaction enzyme-substrat. Les lames sont rincées à l'eau déionisée. Une contre-coloration est ensuite réalisée dans du Nuclear Fast Red (Sigma, 60700-5G) filtré pendant 2 minutes. Le Nuclear Fast Red va colorer les cytoplasmes en rose et les noyaux en fuchsia. Un lavage de 5 minutes dans de l'eau déionisée est fait pour retirer l'excès de colorant et permettre la déshydratation des tissus et le montage des lames comme décrit précédemment.

Immunohistomarquage sur coupes flottantes

De la même manière que pour les poumons, le marquage immunohistochimique se base sur la méthode immuno-enzymatique indirecte avec des anticorps II (secondaires) biotinylés anti-anticorps I (primaires), qui vont être couplés à la HRP. La révélation se fait également au Nickel / DAB. (Cf figure annexe 2).

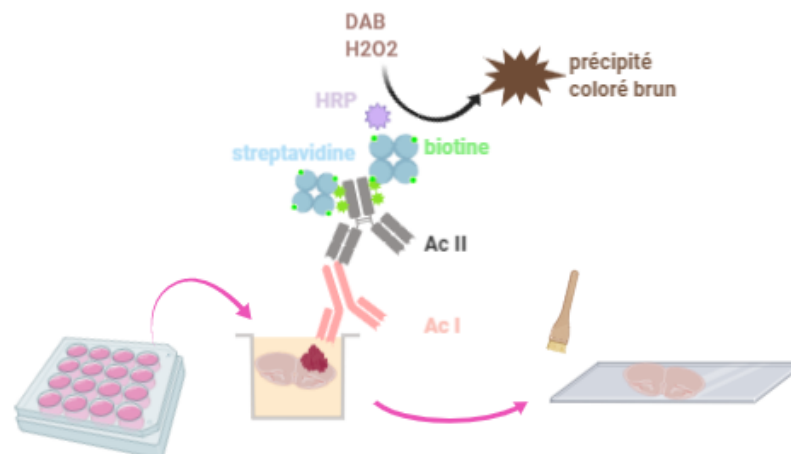


Figure 2 : Schéma récapitulant la réaction enzymatique lors d'un marquage immunohistochimique dans le cerveau. L'avidine possède 4 sites de fixation pour la biotine. La biotine se fixe elle-même à la peroxydase de Raifort, HRP, ce qui forme le complexe Avidine-Biotine-HRP. Cet ensemble se lie alors aux anticorps secondaires biotinylés. Une fois ce complexe immuno-enzymatique formé, la peroxydase catalyse la réaction dont les substrats sont le chromogène oxydable DAB et le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ qui sont ajoutés, pour former un précipité brun stable, localisé au voisinage des sites antigéniques.

Les coupes flottantes sont déposées dans des filtres (Corning™ Inserts Costar, Netwell 3477) sur des plaques à 12 puits contenant du tampon salin. Trois lavages successifs au PBS de 10 minutes chacun sont réalisés, afin d'éliminer les résidus de sucrose. Afin d'inhiber toutes les peroxydases endogènes, les échantillons sont incubés dans de l'H₂O₂ à 3%, qui est un substrat de la peroxydase, dilué dans du PBS.

Par la suite, afin de faciliter l'accès aux antigènes cibles, les membranes cellulaires sont perméabilisées par 2 rinçages de 10 minutes avec solution détergente à base de Triton (t-Octylphenoxy-poly-éthoxyéthanol) à 0.3% (Sigma, X-100) diluée dans du PBS. Les sites aspécifiques sont saturés avec de la BSA à 1% (Sigma, A7030-100G) préparée dans du PBST pendant 1 heure. Les coupes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire monoclonal anti-FosB/ΔFosB produit chez la souris et (F-7, Sc-398595 Santa Cruz), dilué dans du BSA 1% PBST au 1 : 2000^e pendant 48h à 4°C.

48 heures après, les coupes sont rincées 3 fois pendant 10 minutes au PBS afin d'éliminer les résidus d'anticorps. Ensuite, l'anticorps secondaire biotinylé anti-Ig de souris préparée chez le cheval (Vector Laboratories BA200), dilué dans du BSA 1% PBST au 1 : 1000^e est ajouté pour 2 heures d'incubation à température ambiante. Après 3 lavages au PBS, une solution contenant un complexe avidine-biotine (VECTASTAIN, Elit PK-100 standard, ZE0622) est ajoutée afin d'amplifier le signal de l'anticorps primaire. (Cf Annexe 3).

Après une autre étape de 3 lavages successifs, une solution contenant 0.015 % de DAB, 0.4 % de Nickel et 0.006% d'H₂O₂ préparée dans de l'eau déionisée est ajoutée. La réaction est arrêtée par trois lavages successifs avec du PBS une fois qu'une coloration brune est visible, qui témoigne d'un marquage achevé, tout en évitant un éventuel bruit de fond.

Enfin, les coupes sont étalées sur des lames Superfrost® Plus (J1800AMNZ, Thermo Scientific) à l'aide de pinceaux fins selon l'axe rostral-caudal.

Déshydratation et montage :

Cinq heures après avoir laissé les lames à température ambiante, sous une hotte chimique, les tissus sur les lames sont déshydratés par 2 bains successifs d'éthanol absolu pendant 15 secondes chacun. Ensuite, elles sont mises dans 2 bains de xylène pendant 10 minutes pour éclaircir les coupes. Enfin, les lamelles (24 x 60 mm, Menzel-Gläser, VWR) sont montées avec de la colle de montage en chassant toute bulle d'air. Les lames sont laissées à sécher 5 heures avant observation.

Analyse & quantification des lames :

Afin de quantifier le marquage obtenu, il est nécessaire de se référer à un atlas de coupes de cerveau de souris en suivant l'axe rostro-caudal. Les coupes sont observées une à une en déterminant à quel niveau anatomique ils correspondent. Une fois la zone d'intérêt détectée, le comptage se fait manuellement en jouant sur la vis micrométrique. (Cf figure annexe 3). Alors que les marquages dans le cNTS sont comptés sur la totalité de la structure ; les marquages au niveau des structures bilatérales sont comptés que d'un seul côté (côté droit) puisqu'il s'agit de structures bilatérales et médianes. Par la suite, une moyenne de neurones positifs au marquage est faite de toutes les coupes pour une souris. Les données sont ensuite traitées avec des tests statistiques sur le logiciel Prism.

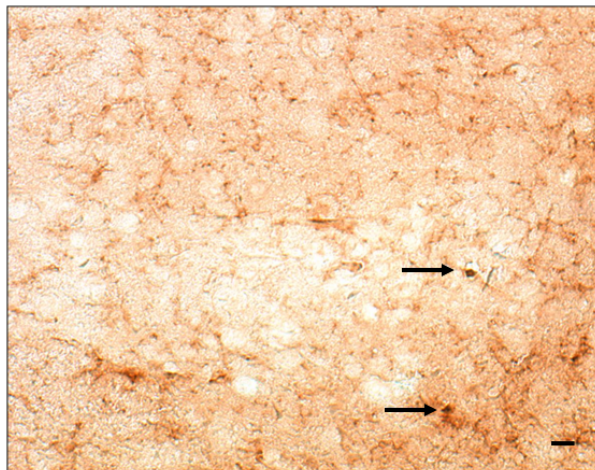


Figure 3 : Photographie montrant des marquages positifs au FosB/ Δ FosB sur une coupe de cerveau. Photographie obtenue par microscope optique au grossissement x200. Echelle 10 microns.

Quantification du collagène par la méthode du Sircoll

Cette étape est réalisée pour toutes les conditions sur le lobe 3 c'est-à-dire le lobe accessoire et particulièrement la pyramide.

Jour 1 : Digestion par la pepsine

Afin d'accéder aux protéines de collagène situées au niveau des bronches et des vaisseaux, une endoprotéase, la pepsine, est utilisée pour faciliter la digestion des tissus. Pour ceci, les tissus sont broyés à vitesse moyenne avec 0,1mg/mL pepsine (EMD Milipore, 516360-500MG) puis placés sur une plaque tournante pendant 24 heures à 4°C.

Jour 2 : Concentration du collagène

Le lendemain, la digestion par la pepsine est arrêtée par une solution neutralisante Acid neutralising Reagent. Ensuite, le collagène est isolé et concentré avec du « Collagen Isolation and Concentration Reagent ». Les tubes sont homogénéisés puis laissés 24 heures sur une plaque tournante à 4°C.

Jour 3 : Quantification du collagène

Le troisième jour, les tubes sont centrifugés à 7 rpm pendant 5 minutes à 4°C pour enlever la partie insoluble qui se retrouvera alors dans le culot. Une gamme de concentration de collagène (Sigma, C7661-5MG) est préparée à partir de 1 mg/mL. Un volume de 1 mL de Sircol collagen assay - Dye reagent ref est ajouté dans tous les surnageant récupérés puis laissé sur un agitateur pendant 30 minutes à température ambiante. La solution Acid Salt Wash est diluée au 1/5ème dans de l'eau déionisée, et placée 30 minutes à 4°C. Les tubes sont ensuite centrifugés à 12 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est lavé avec une solution « Acid Salt Wash », afin de retirer le surplus de « Sircol collagen assay - Dye reagent ». Les tubes sont centrifugés à 13 rpm pendant 10 minutes à 4°C et le surnageant est une nouvelle fois éliminé par retournement. Le culot obtenu en condition acide est re-suspendu avec de l'« Alkali reagent » qui est une solution d'ammoniac très concentrée. La gamme et les échantillons sont déposés sur une plaque 96 puits transparentes à fond plat. La lecture est faite au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 570 nm.

Dosage des cytokines pro-inflammatoires par ELISA

Tout d'abord, la plaque (R&D Systems, DY990) coatée avec un anticorps de capture dilué dans du PBS (Tableau 3) puis conservé toute la nuit à 4°C. Le lendemain, les anticorps non fixés sont rincés trois fois avec un tampon de lavage (Wash Buffer, R&D Systems, WA126). La plaque est ensuite saturée avec une solution contenant 1% de Sérum Albumine Bovine (BSA) préparée dans du PBS (Reagent Diluent, R&D Systems, DY995). En parallèle, une gamme est préparée avec le standard (cf tableau 3). La gamme et 50µg d'échantillons protéiques, déterminés par condition expérimentale, sont déposées sur la plaque durant 2 heures à température ambiante sous agitation. Les protéines non fixées sont rincées trois fois avec le tampon de lavage. Les protéines fixées à l'anticorps de capture sont 23 associées à un anticorps de détection (préparé selon le tableau 3), la plaque est incubée 2 heures sur agitation à température ambiante. Le surplus d'anticorps de détection est lavé trois fois avec le tampon de lavage. La révélation se fait par de la Streptavidine-HRP préparée selon les dilutions indiquées dans le tableau 3. La plaque est recouverte de papier aluminium afin d'éviter l'activation de la streptavidine grâce à la lumière, puis placées sous agitation durant 30 minutes. Le substrat de la HRP (R&D Systems, DY999) est déposé dans chaque puits, la coloration est observée entre 2 à 20 minutes afin d'être arrêté par la solution stop (R&D Systems, DY 994). La plaque est lue au spectrophotomètre à 450 nm

Mesure de l'activité des caspase 3 et 7 par le CaspaseGlo[®]

Cette technique permet de mesurer l'activité des caspases effectrices de l'apoptose, les caspases 3 et 7 par luminescence. Les caspases 3 et 7 actives présentes au sein des échantillons clivent leur substrat luminogène couplé à une luciférase, par la suite, est produit un signal luminescent. Ainsi, l'activité des enzymes est proportionnelle à la luminescence dosée. b. Protocole Les molécules d'intérêts, ici les caspases sont rendues accessibles en fragilisant les structures membranaires par un tampon de lyse (RIPA ou un cocktail d'inhibiteurs de protéases sans anti-caspases). Par la suite, 5 µg de protéines et le contrôle sont préparés (avec la Caspase Glo[®] seule), et sont déposés dans une plaque 96 puits blancs à fond plats. Après ajout de la Caspase Glo[®], la plaque est incubée à 37°C et la lecture de celle-ci est faite au luminomètre au bout de 30 minutes.