



**HAL**  
open science

# Réponses des cellules épithéliales alvéolaires à l'hypoxie et l'hypoxie intermittente

Thomas Gille

► **To cite this version:**

Thomas Gille. Réponses des cellules épithéliales alvéolaires à l'hypoxie et l'hypoxie intermittente. Biologie moléculaire. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT : 2018USPCD053 . tel-03360797

**HAL Id: tel-03360797**

**<https://theses.hal.science/tel-03360797>**

Submitted on 1 Oct 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITÉ PARIS 13 - ECOLE DOCTORALE GALILÉE**

UFR SANTÉ MÉDECINE BIOLOGIE HUMAINE

n° attribué par la bibliothèque

**THÈSE DE DOCTORAT DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE**

Présentée et soutenue publiquement le mardi 26 juin 2018 par

**Thomas GILLE**

**RÉPONSES DES CELLULES ÉPITHÉLIALES ALVÉOLAIRES  
À L'HYPOXIE ET À L'HYPOXIE INTERMITTENTE**

Directrice de thèse :

**Pr Carole Planès**

**Composition du jury :**

Dr Sophie Lanone (DR INSERM), rapportrice

Pr Laurent Plantier (PU-PH), rapporteur

Pr Renaud Tamisier (PU-PH), examinateur

Pr Nathalie Charnaux (PU-PH), examinatrice

Pr Dominique Valeyre (PU-PH), président du jury

Pr Carole Planès (PU-PH), directrice de thèse

Au Pr Carole Planès,

Au Pr Dominique Valeyre,

Je leur suis extrêmement reconnaissant de m'avoir accordé leur confiance et d'avoir guidé mes pas aussi bien « au lit du patient » que dans la recherche clinique et fondamentale ;

Au Dr Sophie Lanone,

Au Pr Laurent Plantier,

Au Pr Renaud Tamisier,

Au Pr Nathalie Charnaux,

Je les remercie vivement d'avoir accepté d'évaluer ce travail et de faire partie de mon jury ;

À toute l'équipe de l'EA 2363 : Valérie, Nicolas, Emilie, Nicolas, Dominique, Patricia, le Pr Jean-Paul Richalet ; Aurélien et Nadia, à jamais membres honoraires. Aux autres doctorants et étudiants en master qui ont partagé ces quelques années, et tout particulièrement Florence, Morgane, Cécile, Olivier, Florine, Eva, Nathan. Merci pour votre implication et votre aide quotidienne, ce travail est évidemment aussi le vôtre ;

À Baptiste et Adèle ; à Flo et Léonie ;

À toute l'équipe des explorations fonctionnelles : Christine, François, Camille, Guillaume, Sophie, Florence, Murielle, Anabel, Yousra, Sédi, Didier, Isabelle, Maryanna, Anna, Delphine, Paula, Marie-France, Corinne, Myriam, Isabelle...

Aux crevettes en cours de fabrication ;

À toute l'équipe de pneumologie, passée et présente : Hilario, Yurdagül, Olivia, Diane, Lucile, Aurélie, Boris, Julie, Camille, Flora, Alexandre, Cécile, Etienne, Zohra, Danielle, mes anciens internes...

Au Pr Jean-François Bernaudin, qui n'est pas dans le jury cette fois ;

À toute l'équipe de réanimation, même si je ne viens plus aux soirées ;

Aux dermatologues qui m'acceptent à leur table en salle de garde ;

Merci à tous d'avoir supporté mon rythme chronobiologique avec beaucoup de bienveillance, et plus généralement de maintenir une ambiance de travail aussi sérieuse et exigeante que « familiale » ;

(et ça c'est très important pour la santé du cigare)

À Robin, mon petit marcassin, dont le courage, la détermination, la résilience, la curiosité et le regard rieur sont une inspiration quotidienne. À ses pneumocytes ;

À Julie, qui est bien plus forte qu'elle ne l'imagine, merci pour notre petite merveille et merci pour ces 8 ans ½ de vie commune (dont environ 3 années cumulées passées sur mon ordinateur ou mon téléphone, et l'équivalent de 15 jours de charge mentale, pardon) ;

À mes parents, pour leur amour et leur soutien inconditionnels, pour la complicité que nous partageons, pour l'exemple qu'ils ont été et restent. C'était déjà la dédicace de l'autre thèse, elle n'a pas vieilli (mais vous un peu) ;

À Monique, à Annie. Au souvenir attendri de Janine, Jean, Robert et Liliane ;

À Julien, Élodie et Anna ; à Jean, à Jacques (mon filleul préféré), à Pascal et Nanou ;

À Pierre-Olivier et Juliette, à Chloé et Yann, à Antoine ;

À Brigitte, ma marraine préférée, à Lionnel ;

À Martine, qui aurait aimé, qui aurait dû, être présente. À Francis, mon parrain préféré, avec tout mon amour. Vos carrières ont inspiré ma vocation ;

À ma famille ;

À Benoît et Léa, à mes beaux-parents, à ma belle-famille, merci de m'avoir si bien accueilli parmi vous ;

Au Consortium<sup>TM</sup> et à la vieille garde, à la descendance : Bullet, Fred, Léo, Colin, la Radio Libre et les Joyeux Drilles ; Capitaine Gwen, Karine, Lily, Cerise (ma filleule préférée), Zoé et Rose ; Dan, Mirvari, Mathis et Elisa ; Jay, Cindy, Olivia, Romane et Jonas ; Laetitia, Eric et Paul ; Benj, Anne-Sophie et Victoire (dans la première version tu t'appelais Boba) ; Maguy, Charles et Angelina ; Piotr ; Noémie. J'ai l'impression de n'avoir jamais vécu sans vous, merci pour tout ce chemin. On a un peu morflé mais ça va encore ;

À Marina (1F), experte multi-domaine (écoute empathique, réconfort, rétroplanning, prématurité, jeûne intermittent, santé capillaire... liste non exhaustive), gérante du meilleur salon de thé de la région. À Erik, Eliott et Théotime ;

Au reste de la troupe : Benoît (1G), Delphine et Daphné ; Alice et Rémi (en croisant les doigts) ; Hélène ; Marie, Aliénor et Roxanne ; Laure, Guillaume et Camille ; Juliette ; Lori, Pierrot, Azad et TsoLinée ; Emilie, Julien, Lily et Charlotte ; Elodie et Arnaud ; Maeva, Thomas, Théophile et Anatole ; Romain, Aurore et Plug ; Nicolas et Carine. À tous les autres. Merci pour les rires, merci pour les bras quand c'était la tempête (comme l'a à peu près chanté Bob Dylan) ;

Je dédie cette thèse.

Je tiens également à remercier :

L'équipe de l'animalerie de l'UFR SMBH à Bobigny, le personnel des autres équipes de recherche, ainsi que celui de la scolarité, pour leur aide ponctuelle ou répétée (intermittente ou chronique, pour rester dans le thème :-)

Les équipes des services d'anatomie pathologie et d'hématologie biologique à l'hôpital Avicenne et du service de biochimie à l'hôpital Jean Verdier pour leur assistance technique ;

L'équipe INSERM U773 du CRB3 à Bichat qui m'a accueilli au cours de mon Master 2, notamment Mme Françoise Cluzeaud et le Dr Evelyne Ferrary pour leur aide précieuse ;

Nicolas, Jean-Patrick et Yann pour leur travail de mise en forme de la bibliographie ;

L'Université Paris 13, la COMUE Université Sorbonne Paris Cité, la Chancellerie des Universités de Paris (Fondation du Legs Poix), l'Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, qui ont financé ces travaux.

*"I tried so hard to reach the other side, but I lost consciousness  
'Cause I don't know how to breathe when my lungs are filled with water"*

Michael "JJ" V. Wahntraum, Harakiri for the Sky

(© 2012 Art of Propaganda Records)

## AVANT-PROPOS

Les cellules épithéliales alvéolaires (CEA) de type I et de type II possèdent un grand nombre de fonctions. En premier lieu, elles jouent le rôle de barrière physique entre milieu intérieur et milieu extérieur, et participent aux échanges gazeux alvéolo-capillaires puisque c'est essentiellement à travers les CEA de type I que le dioxygène ( $O_2$ ) et le dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) diffusent. Elles participent également à la régulation des échanges liquidiens entre les compartiments microvasculaire pulmonaire, interstitiel et alvéolaire, notamment en réabsorbant activement des ions et du fluide de l'alvéole vers l'interstitium. Les CEA de type II produisent le surfactant pulmonaire, liquide aux propriétés tensioactives tapissant les alvéoles dont les différents effets participent globalement à diminuer le travail respiratoire. Enfin, les CEA de type II sont progénitrices des CEA de type I et vont, grâce à leur interaction avec les fibroblastes, assurer une cicatrisation harmonieuse en cas de lésion alvéolaire.

L'hypoxie est définie par la baisse de disponibilité en  $O_2$  (au niveau d'une cellule, d'un tissu voire de l'organisme en entier). Lorsqu'elles se trouvent dans une atmosphère hypoxique, les cellules vont développer des réponses visant à se défendre des effets de l'hypoxie et à survivre malgré une déviation des voies métaboliques. Toutefois, ces réponses peuvent être plus ou moins adaptées. Concernant les CEA, l'hypoxie alvéolaire est un phénomène fréquent, par exemple lors de la montée en haute altitude ou potentiellement au cours de la majeure partie des maladies respiratoires. Notre objectif dans ce travail a été d'étudier dans quelle mesure et par quels mécanismes l'exposition des CEA à l'hypoxie pouvait altérer leurs grandes fonctions.

Dans une première partie, nous avons étudié *in vivo* et *in vitro* un modèle d'hypoxie aiguë, qui peut notamment survenir au cours d'un œdème alvéolaire. Nous avons cherché à comprendre comment l'hypoxie induisait une réduction du transport transépithélial d'ions et d'eau.

Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés à la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI), qui s'accompagne fréquemment d'une hypoxie chronique, qu'elle soit continue et/ou intermittente. Chez des souris traitées par bléomycine pour induire une fibrose pulmonaire, notre hypothèse était que l'exposition à une hypoxie intermittente chronique (HIC) pourrait avoir un effet délétère sur les phénomènes de fibrogenèse pulmonaire.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>AVANT-PROPOS</b> .....	8
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	10
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	13
<b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX</b> .....	16
<b>INTRODUCTION</b> .....	17
<b>I. Les cellules épithéliales alvéolaires et leurs principales fonctions</b> .....	17
A. Structure de l'épithélium alvéolaire.....	17
1. Cellules épithéliales alvéolaires de type I.....	17
2. Cellules épithéliales alvéolaires de type II.....	19
3. Cloisons interalvéolaires.....	20
B. Homéostasie liquidienne des alvéoles pulmonaires .....	20
1. Contrôle des flux liquidiens dans la zone des échanges gazeux .....	20
2. Réabsorption transépithéliale d'ions et d'eau .....	21
<i>i. Transporteurs membranaires des cellules épithéliales alvéolaires</i> .....	21
<i>ii. Transport vectoriel transépithélial d'ions et d'eau</i> .....	21
<i>iii. Méthodes de calcul de la réabsorption transépithéliale d'ions et d'eau</i> .....	23
3. Structure du canal sodique épithélial dans l'alvéole.....	24
4. Régulation de l'activité du canal sodique épithélial dans l'alvéole.....	25
<i>i. Transcription du canal sodique épithélial</i> .....	25
<i>ii. Expression à la membrane apicale du canal sodique épithélial</i> .....	26
<i>iii. Probabilité d'ouverture du canal sodique épithélial</i> .....	27
C. Production du surfactant pulmonaire .....	28
D. Réparation épithéliale .....	29
1. Inflammation alvéolaire et recrutement des fibroblastes .....	29
2. Prolifération des cellules épithéliales alvéolaires de type II .....	30
3. Restauration de l'épithélium alvéolaire .....	30
<b>II. Voies de signalisation de l'hypoxie dans les cellules épithéliales alvéolaires</b> .....	32
A. Facteurs de transcription induits par l'hypoxie.....	33
1. Structure et rôles des facteurs de transcription induits par l'hypoxie.....	33
2. Régulations de l'activité des facteurs de transcription induits par l'hypoxie .....	36
<i>i. Régulation de la stabilité de HIF-<math>\alpha</math> par prolyl-hydroxylation</i> .....	36

ii.	<i>Régulation de la fonction transactivatrice par asparaginyloxydation</i>	38
iii.	<i>Régulations non canoniques</i>	39
B.	Implication des dérivés réactifs de l'oxygène dans la réponse cellulaire à l'hypoxie	40
1.	Production des dérivés réactifs de l'oxygène	40
i.	<i>Sources de production des dérivés réactifs de l'oxygène</i>	40
ii.	<i>Production exagérée de dérivés réactifs de l'oxygène en hypoxie</i>	42
2.	Défenses antioxydantes	43
3.	Interactions entre des dérivés réactifs de l'oxygène et les facteurs de transcription induits par l'hypoxie	44
C.	Particularités de l'hypoxie intermittente	46
1.	Paradoxe de l'hypoxie intermittente	46
2.	Régulation des facteurs induits par l'hypoxie en hypoxie intermittente	49
<b>III.</b>	<b>Exemples de pathologies du poumon profond avec hypoxie alvéolaire impliquant les cellules épithéliales alvéolaires</b>	<b>51</b>
A.	Œdème pulmonaire	51
1.	Constitution d'un œdème pulmonaire	51
2.	Les deux types d'œdème pulmonaire	52
i.	<i>Œdème pulmonaire de perfusion (et mécanismes de défense)</i>	53
ii.	<i>Œdème pulmonaire de perméabilité</i>	54
3.	Résolution de l'œdème alvéolaire	55
4.	Modification de l'homéostasie liquidienne alvéolaire en réponse à l'hypoxie	57
B.	Fibrose pulmonaire idiopathique	58
1.	Données générales	59
i.	<i>Epidémiologie</i>	59
ii.	<i>Diagnostic positif</i>	60
iii.	<i>Histoire naturelle</i>	62
iv.	<i>Facteurs de risque et comorbidités</i>	62
v.	<i>Traitements</i>	65
2.	Physiopathologie de la fibrose pulmonaire idiopathique	65
i.	<i>Vue d'ensemble</i>	66
ii.	<i>Implication des cellules épithéliales alvéolaires</i>	69
iii.	<i>Rôles potentiels de l'hypoxie et de l'hypoxie intermittente chronique</i>	69
	<b>OBJECTIFS GÉNÉRAUX DU TRAVAIL DE THÈSE</b>	<b>74</b>
	<b>TRAVAIL EXPÉRIMENTAL</b>	<b>75</b>
I.	<b>Mécanismes d'inhibition de la réabsorption alvéolaire d'ions et d'eau par l'hypoxie</b>	<b>75</b>

A.	Hypothèse de travail et objectifs .....	75
B.	Article .....	77
C.	Déroulement de l'étude .....	97
D.	Résumé des résultats .....	98
E.	Discussion .....	99
1.	Avantages et limites des modèles utilisés.....	99
i.	<i>Lignée murine <math>\beta</math>-Liddle</i> .....	99
ii.	<i>Cultures primaires de cellules épithéliales alvéolaires de rat</i> .....	99
iii.	<i>Exposition des animaux et des cellules épithéliales alvéolaires à l'hypoxie</i> .....	101
iv.	<i>Mesure de la clairance du fluide alvéolaire in situ sur poumon non ventilé</i> .....	101
v.	<i>Mesures électrophysiologiques par équivalent du courant de court-circuit</i> .....	102
2.	Maintien de la clairance du fluide alvéolaire en hypoxie chez les souris $\beta$ -Liddle.....	103
3.	Effet-dose post-translationnel de l'hypoxie sur le transport transépithélial de Na <sup>+</sup> .....	103
4.	Diminution de l'expression de surface du canal sodique épithélial dépendante de son ubiquitinylation induite par l'hypoxie .....	104
5.	Rôle protecteur des anti-oxydants .....	105
<b>II.</b>	<b>Effets de l'hypoxie intermittente chronique sur la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris</b> .....	<b>107</b>
A.	Hypothèse de travail et objectifs .....	107
B.	Article .....	109
C.	Déroulement de l'étude .....	122
D.	Résumé des résultats .....	122
E.	Discussion .....	123
1.	Avantages et limites des modèles utilisés.....	123
i.	<i>Modèle d'hypoxie intermittente</i> .....	123
ii.	<i>Modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine</i> .....	124
2.	Majoration de l'inflammation pulmonaire.....	126
3.	Déséquilibre redox dans le poumon .....	126
4.	Majoration de l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires.....	128
5.	Majoration de la fibrose pulmonaire et de la mortalité .....	129
	<b>CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>131</b>
	<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>136</b>
	<b>ANNEXES</b> .....	<b>147</b>
	<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>173</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

**AI** : air intermittent.

**ADN** : acide désoxyribonucléique.

**AQP5** : aquaporine 5.

**AML** : amiloride.

**AMP** : adénosine monophosphate.

**AMPc** : AMP cyclique.

**AMPK** : *AMP-activated protein kinase* (kinase activée par l'AMP).

**ARN** : acide ribonucléique.

**ARNm** : ARN messager.

**ARNT** : *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (HIF-1 $\beta$ ).

**ATP** : adenosine triphosphate.

**ASIC** : *acid-sensing ion channel*.

**$\alpha$ -SMA** :  *$\alpha$  smooth muscle actin* ( $\alpha$  actine du muscle lisse).

**Bnip-3L** : *BCL2 interacting protein 3 like*.

**Ca<sup>2+</sup>** : ion calcium.

**CaMK** : calcium / calmoduline kinase.

**CAP** : *channel-activating proteases* (protéases activatrices de canaux).

**CBP** : *CREB-binding protein*.

**CEA** : cellule épithéliale alvéolaire.

**CFA** : clairance du fluide alvéolaire.

**CFTR** : *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*.

**CHIP** : *Hsc70-interacting protein*.

**CHOP** : *CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein*.

**Cl<sup>-</sup>** : ion chlorure.

**CNG** : *cyclic nucleotide-gated channel* (canal cationique contrôlé par les nucléotides cycliques).

**Co<sup>2+</sup>** : ion cobalt.

**CO** : monoxyde de carbone.

**CO<sub>2</sub>** : dioxyde de carbone.

**COX** : cyclo-oxygénase.

**CSM** : cellules souches mésenchymateuses.

**CSMh** : cellules souches mésenchymateuses humaines.

**CTGF** : *connective tissue growth factor*.

**Cu<sup>2+</sup>** : ion cuivre.

**CV** : capacité vitale.

**ddp** : différence de potentiel.

**DLCO** : diffusion pulmonaire du monoxyde de carbone.

**EA** : exacerbation aiguë (de fibrose pulmonaire idiopathique)

**EFR** : explorations fonctionnelles respiratoires.

**EGF** : *epithelial growth factor* (facteur de croissance épithélial).

**ENaC** : *epithelial sodium channel* (canal sodique épithélial).

**EPAS-1** : *endothelial PAS domain protein 1* (HIF-2 $\alpha$ ).

**EPHX-1** : époxyde hydrolase 1.

**Fe<sup>2+</sup>** : ion ferreux.

**Fe<sup>3+</sup>** : ion ferrique.

**FFJ** : foyer fibroblastique jeune

**FIH-1** : *factor inhibiting HIF 1* (facteur inhibiteur de HIF 1).

**FiO<sub>2</sub>** : fraction inspirée en oxygène.

**FPI** : fibrose pulmonaire idiopathique.

**GAPDH** : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase.

**GPx** : glutathion peroxydase.

**GR** : glutathion réductase.

**GSH** : glutathion réduit.

**GS-SG** : disulfure de glutathion oxydé.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : peroxyde d'hydrogène.

**H<sub>2</sub>S** : sulfure d'hydrogène.

**HAF** : *hypoxia-associated factor*.

**HGF** : *hepatocyte growth factor* (facteur de croissance hépatocytaire).

**HI** : hypoxie intermittente.

**HIC** : hypoxie intermittente chronique.

**HIF** : *hypoxia inducible factor* (facteur de transcription induit par l'hypoxie).

**HO-1** : hème oxygénase 1.

**HPH** : *HIF prolyl-hydroxylase*.

**HRE** : *hypoxia response element*.

**HSC** : *highly sodium-selective cation channel* (canal cationique hautement sélectif pour le sodium).

**HSP70** : *heat shock protein 70*.

**HTA** : hypertension artérielle systémique.

**IAH** : index apnées / hypopnées.

**ICAM-1** : *intercellular adhesion molecule 1*.

**I<sub>eq</sub>** : équivalent de courant de court-circuit.

**IL** : interleukine.

**I<sub>sc</sub>** : courant de court-circuit.

**K<sup>+</sup>** : ion potassium.

**KCC** : *potassium-chloride cotransporter* (cotransporteur potassium-chlorure).

**K<sub>f</sub>** : conductance aqueuse de la barrière endothéliale.

**KGF** : *keratinocyte growth factor* (facteur de croissance kératinocytaire).

**LBA** : lavage broncho-alvéolaire.

**LDHA** : lactate déshydrogénase A.

**MAPK** : *mitogen-activated protein kinases*.

**MCP-1** : *monocyte chemoattractant protein 1*.

**MEC** : matrice extracellulaire.

**MMP** : *matrix metalloproteinase* (métalloprotéase de la matrice extracellulaire).

**Mn<sup>2+</sup>** : ion manganèse.

**MPO** : myéloperoxydase.

**mTOR** : *mammalian target of rapamycin*.

**N<sub>2</sub>** : diazote.

**Na<sup>+</sup>** : ion sodium.

**Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase** : sodium-potassium adénosine triphosphatase.

**NAC** : N-acétyl-cystéine.

**NADPH** : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

**NASH** : *non-alcoholic steatohepatitis* (stéatose hépatique non alcoolique)

**Nedd4-2** : *neural precursor cell-expressed developmentally downregulated 4-2*.

**NF-κB** : *nuclear factor kappa B* (facteur nucléaire kappa B).

**NO<sup>•</sup>** : monoxyde d'azote radicalaire.

**Nox** : NADPH oxydase.

**NQO-1** : NADPH quinone oxydoréductase 1.

**Nrf2** : *nuclear factor erythroid-2-related factor 2*.

**NSC** : *non selective cation channel* (canal cationique non sélectif).

**O<sub>2</sub>** : dioxygène.

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** : anion superoxyde.

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>** : oxygène singulet.

**OAP** : œdème aigu du poumon.

**ODI** : *oxygen desaturation index* (index de désaturation en oxygène).

**OH<sup>•</sup>** : radical hydroxyle.

**8-OHdG** : 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine.

**ONO<sub>2</sub><sup>•</sup>** : peroxydinitrite.

**PAI-1** : *plasminogen activator inhibitor 1* (inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1).

**PAO<sub>2</sub>** : pression partielle alvéolaire en dioxygène.

**PaO<sub>2</sub>** : pression partielle artérielle en dioxygène.

**PARP** : poly(ADP-ribose) polymerase.

**PAS** : Per-ARNT-Sim.

**PDGF** : *platelet-derived growth factor* (facteur de croissance plaquettaire).

**PK1** : pyruvate déshydrogénase kinase.

**PHD2** : *prolyl hydroxylase domain-containing protein 2*.

**PGE2** : prostaglandine E2.

**PGK** : phosphoglycérate kinase.

**PI3K** : phosphatidylinositol 3-kinase.

**PID** : pneumopathie interstitielle diffuse.

**PII** : pneumopathie interstitielle idiopathique.

**PINS** : pneumopathie interstitielle non spécifique.

**P<sub>int</sub>** : pression hydrostatique interstitielle.

**π<sub>int</sub>** : pression oncotique interstitielle.

**PKA** : protéine kinase A.

**PKC** : protéine kinase C.

**P<sub>mv</sub>** : pression hydrostatique microvasculaire.

**π<sub>mv</sub>** : pression oncotique microvasculaire.

**PHRC** : programme hospitalier de recherche clinique.

**PNN** : polynucléaire neutrophile.

**P<sub>o</sub>** : probabilité d'ouverture.

**PO<sub>2</sub>** : pression partielle en dioxygène.

**POR** : cytochrome P450 réductase.

**PPC** : pression positive continue.

**pVHL** : *von Hippel-Lindau tumor suppressor protein*.

**Q̇<sub>H<sub>2</sub>O</sub>** : débit aqueux (sortant des capillaires pulmonaires).

**RAGE** : *receptor for advanced glycation end product*.

**RE** : réticulum endoplasmique.

**ROS** : *reactive oxygen species* (dérivés réactifs de l'oxygène).

**R<sub>te</sub>** : résistance transépithéliale.

**σ** : coefficient de réflexion des protéines de la barrière endothéliale.

**SAOS** : syndrome d'apnées obstructives du sommeil.

**SDRA** : syndrome de détresse respiratoire aiguë.

**SGK-1** : *serum and glucocorticoid-induced kinase 1* (kinase régulée par les glucocorticoïdes du sérum humain).

**SGLT1** : *sodium-glucose cotransporter 1* (cotransporteur sodium-glucose 1).

**Sim** : *Single-minded homolog 1*.

**SOD** : superoxyde dismutase.

**SP** : *surfactant protein* (SP-A, SP-B, SP-C, SP-D).

**TDM** : tomodensitométrie.

**TEM** : transition épithélio-mésenchymateuse.

**TERC** : *telomerase RNA component*.

**TERT** : *telomerase reverse transcriptase*.

**TGF** : *transforming growth factor* (facteur de croissance transformant).

**TNF-α** : *tumor necrosis factor alpha* (facteur de nécrose tumorale alpha).

**TUBEs** : *tandem ubiquitin-binding entities*.

**TUNEL** : *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*.

**VCAM-1** : *vascular cell adhesion molecule 1*.

**VEGF** : *vascular endothelial growth factor* (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire).

**XO** : xanthine oxydase.

**Zn<sup>2+</sup>** : ion zinc.

## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Vues microscopiques du poumon profond. ....	18
Figure 2 : Représentation schématique d'un alvéole pulmonaire. ....	19
Figure 3 : Principaux transporteurs membranaires de l'épithélium alvéolaire. ....	22
Figure 4 : Synthèse et <i>trafficking</i> du canal sodique épithélial dans les pneumocytes.....	27
Figure 5 : Représentation simplifiée de la réparation alvéolaire après lésion épithéliale.....	31
Figure 6 : Structure des facteurs de transcription induits par l'hypoxie HIF-1 et HIF-2.....	34
Figure 7 : Exemples représentatifs de protéines codées par des cibles transcriptionnelles directes des facteurs de transcription induits par l'hypoxie.....	35
Figure 8 : Double régulation de l'activité de la sous-unité HIF- $\alpha$ par prolyl- et asparaginyloxydation. ....	37
Figure 9 : Génération des dérivés réactifs de l'oxygène et principaux mécanismes de défense antioxydants.....	41
Figure 10 : Exemples d'interactions entre les différentes voies de l' <i>oxygen-sensing</i> .....	46
Figure 11 : Réponses adaptée et inadaptée à l'hypoxie intermittente.....	48
Figure 12 : Régulation différentielle de HIF-1 $\alpha$ et HIF-2 $\alpha$ en hypoxie intermittente.....	50
Figure 13 : Images représentatives d'un œdème pulmonaire hydrostatique (œdème aigu du poumon). ....	52
Figure 14 : Représentations schématiques de la physiopathologie de l'œdème pulmonaire.....	56
Figure 15 : Images représentatives d'une fibrose pulmonaire idiopathique.....	61
Figure 16 : Représentation schématique de la physiopathologie de la fibrose pulmonaire idiopathique.....	68
Figure 17: Schéma du protocole expérimental du premier travail. ....	97
Figure 18 : Schéma du protocole expérimental du second travail.....	122
---	
Tableau 1. Comparaison des deux principales formes du canal sodique épithélial. ....	25
Tableau 2. Pressions partielles en O <sub>2</sub> mesurées dans le milieu de culture à différents temps d'exposition en fonction de la FiO <sub>2</sub> .....	101

### I. Les cellules épithéliales alvéolaires et leurs principales fonctions

Le rôle premier de l'appareil respiratoire est d'assurer l'hématose, correspondant à l'enrichissement du sang en oxygène ( $O_2$ ) nécessaire à la respiration cellulaire, et son appauvrissement en dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) produit par le métabolisme. Le gaz alvéolaire est renouvelé grâce à la ventilation, et les échanges gazeux entre l'alvéole et le capillaire pulmonaire sont réalisés par simple diffusion à travers l'épithélium alvéolaire.

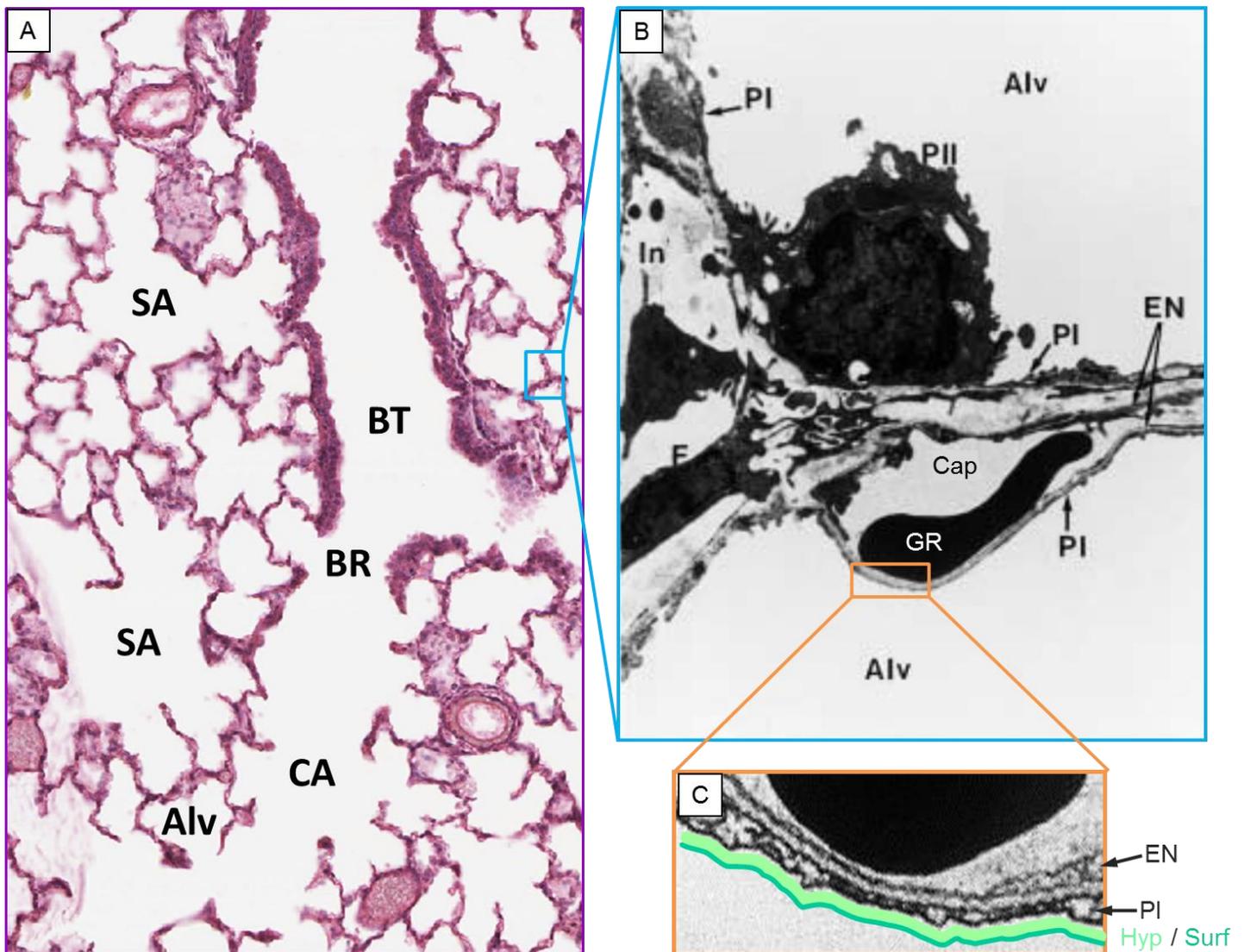
#### A. Structure de l'épithélium alvéolaire

Le poumon d'un sujet adulte sain peut comprendre jusqu'à 500 millions d'alvéoles, présentant une surface d'échange totale très étendue comprise entre 50 et 150 m<sup>2</sup>. Quatre-vingt-dix-neuf pour cent de cette surface d'échange est composée des cellules épithéliales alvéolaires (CEA), également appelées pneumocytes, organisées en monocouche de cellules jointives assurant une fonction de barrière physique entre le milieu intérieur et le milieu extérieur. Elles représentent quasiment 25 % de la totalité des cellules pulmonaires, et peuvent présenter deux phénotypes différents ([Crapo 1982](#), [West 2015](#)).

##### 1. Cellules épithéliales alvéolaires de type I

Les pneumocytes de type I sont des cellules épithéliales pavimenteuses de faible épaisseur (0,1 à 0,3  $\mu\text{m}$ ), pourvues de prolongements cytoplasmiques fins et ramifiés, et présentant une forme large et aplatie, si bien qu'elles recouvrent environ 95 % de la surface alvéolaire alors qu'elles ne représentent que 33 à 40 % du nombre total des CEA. Elles sont pauvres en organelles cytoplasmiques et reposent sur une membrane basale partagée au niveau de la barrière air-sang par

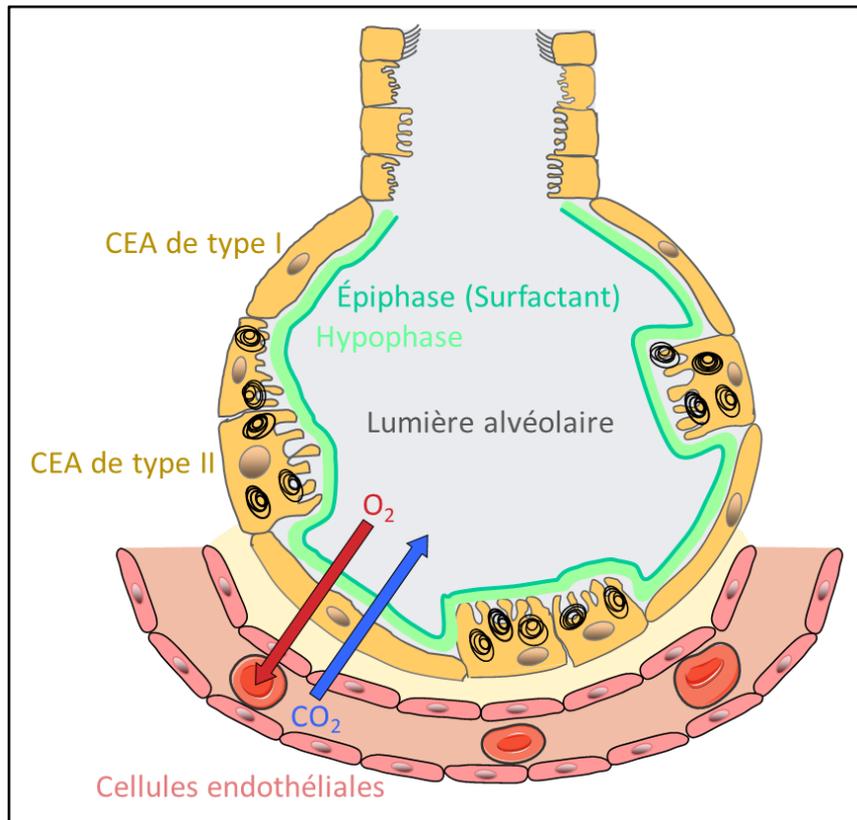
les cellules endothéliales des capillaires pulmonaires. Leur finesse, leur étendue, leurs prolongements cytoplasmiques et leur proximité avec les cellules endothéliales expliquent qu'elles sont l'acteur préférentiel des échanges gazeux et liquidiens entre le secteur alvéolaire et le secteur vasculaire. Ces particularités les rendent également particulièrement exposées aux agressions : en cas de lésion épithéliale, les CEA de type I sont incapables de se multiplier, ce sont les CEA de type II qui jouent le rôle de progéniteurs ([Crapo 1982](#), [Stone 1992](#), [West 2015](#)) (figures 1 et 2).



**Figure 1 : Vues microscopiques du poumon profond.**

**A :** Histologie du poumon profond en microscopie optique ; coloration hématoxyline éosine, x 100 (aimablement fournie par le Pr C. Prost-Squarcioni). **B :** Cloison interalvéolaire en microscopie électronique à transmission (tirée de [Saumon 1999](#)). **C :** Détail de la barrière alvéolo-capillaire en microscopie électronique à transmission (aimablement fournie par le Pr P. Soler).

Alv : alvéole ; BR : bronchiole respiratoire ; BT : bronchiole terminale ; CA : canal alvéolaire ; Cap : capillaire pulmonaire ; EN : cellule endothéliale ; F : fibroblaste ; GR : globule rouge ; Hyp : hypophase ; In : interstitium ; PI : pneumocyte de type I ; PII : pneumocyte de type II ; SA : sac alvéolaire ; Surf : surfactant pulmonaire.



**Figure 2 : Représentation schématique d'un alvéole pulmonaire.**

Les cellules épithéliales alvéolaires (CEA), également appelées pneumocytes, sont recouvertes à leur pôle apical d'une fine couche liquidienne contenant des électrolytes appelée hypophase, et dont la partie superficielle (épiphase), au contact du gaz alvéolaire, comporte du surfactant. L'oxygène (O<sub>2</sub>) est majoritairement transporté sous forme liée à l'hémoglobine des hématies, il diffuse librement à travers la barrière alvéolo-capillaire (pneumocyte, interstitium et cellule endothéliale) et pénètre dans l'hématie pour se fixer à l'hémoglobine. Quant au dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), il effectue le trajet inverse puis sera expiré au cours des cycles ventilatoires.

## 2. Cellules épithéliales alvéolaires de type II

Les pneumocytes de type II sont des cellules épithéliales cubiques caractérisées par la présence de granulations correspondant à des corps lamellaires, grains de sécrétion et de stockage contenant les éléments du surfactant pulmonaire. Plus nombreuses que les CEA de type I, bien que beaucoup moins étendues du fait de leur forme, elles représentent 60 à 67 % du nombre total de CEA. Outre la production du surfactant, elles possèdent des fonctions variées : elles assurent le renouvellement de l'épithélium alvéolaire, en particulier en cas d'agression et de lésions des CEA de type I ; elles participent à la formation de la matrice extracellulaire (MEC) en sécrétant de la fibronectine, du procollagène de type IV et de la laminine ; elles jouent un rôle dans la réponse immune ([Carrington 1970](#), [Crapo 1982](#), [Stone 1992](#), [West 2015](#)).

Les CEA coopèrent avec les cellules dont elles sont à proximité : cellules de l'immunité (notamment les macrophages alvéolaires), cellules endothéliales et fibroblastes situés dans les cloisons interalvéolaires.

### 3. Cloisons interalvéolaires

La zone des échanges gazeux comprend également les cloisons interalvéolaires dans lesquelles cheminent les capillaires de la microcirculation pulmonaire, associés au tissu conjonctif de l'interstitium alvéolaire comprenant de nombreux fibroblastes. Les fibroblastes constituent 30 à 40 % de l'ensemble des cellules du poumon profond et contribuent à la production de sa fine charpente matricielle (notamment via la synthèse de collagène I). Le dialogue entre CEA et fibroblastes est capital dans la morphogénèse pulmonaire et dans les phénomènes de réparation épithéliale après agression ([Crapo 1982](#), [Adamson 1990](#)).

## B. Homéostasie liquidienne des alvéoles pulmonaires

### 1. Contrôle des flux liquidiens dans la zone des échanges gazeux

Afin que les échanges gazeux alvéolo-capillaires soient efficaces, il est primordial que les alvéoles soient bien aérées avec un volume minimal de liquide présent dans la lumière alvéolaire, et dans une moindre mesure que l'interstitium ne soit pas gorgé de fluide. Le mouvement de l'eau entre les capillaires pulmonaires, l'interstitium et les alvéoles est ainsi étroitement contrôlé. En effet, en conditions physiologiques, le débit d'eau sortant des capillaires pulmonaires, à travers les cellules endothéliales pourvues d'aquaporines 1 (AQP1) ou en paracellulaire, est principalement régulé par les forces de Starling dépendant des différences de pression hydrostatique et de pression oncotique entre le compartiment microvasculaire et le compartiment interstitiel. Par la suite, le flux sortant est drainé par l'interstitium interalvéolaire vers les lymphatiques dont le réseau capillaire ne débute qu'au niveau des bronchioles respiratoires, des cloisons interlobulaires ou du réseau sous-pleural. *In*

*fine*, les CEA jouent le rôle de dernier rempart vis-à-vis de l'œdème alvéolaire : elles possèdent une imperméabilité à l'eau et aux solutés de bas poids moléculaire 100 fois supérieure à celle des cellules endothéliales (grâce à des jonctions intercellulaires plus efficaces et au rôle protecteur du surfactant pulmonaire), et régulent finement l'épaisseur du film liquidien de revêtement appelé hypophase qui recouvre les alvéoles et noie les aspérités épithéliales ([Matthay 2002](#), [Murray 2011](#)).

## 2. Réabsorption transépithéliale d'ions et d'eau

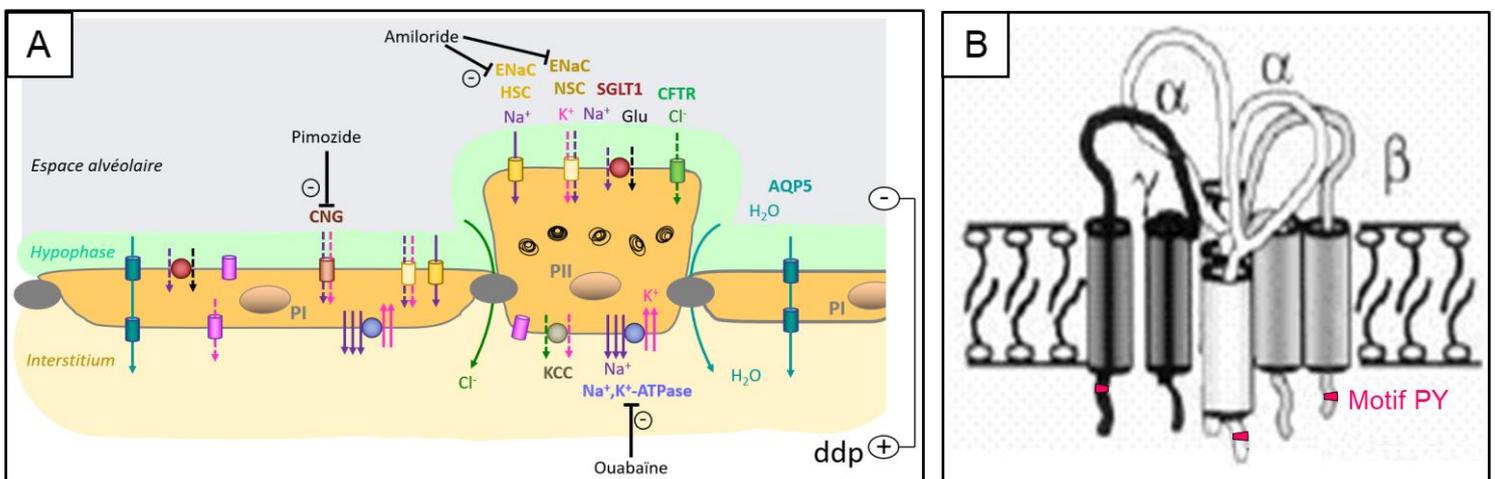
### *i. Transporteurs membranaires des cellules épithéliales alvéolaires*

Les CEA sont recouvertes à leur pôle apical de l'hypophase, fine couche liquidienne d'environ 200 nm d'épaisseur contenant des électrolytes, notamment des ions sodium ( $\text{Na}^+$ ) et chlorure ( $\text{Cl}^-$ ), et dont la partie supérieure appelée épiphase comporte du surfactant pulmonaire. L'origine de l'hypophase est mal connue. Les CEA possèdent de nombreux canaux et pompes ioniques, dont la répartition dépend du phénotype cellulaire, afin de réguler le volume de l'hypophase : la membrane apicale peut notamment porter le canal sodique épithélial sensible à l'amiloride (ENaC), le canal cationique contrôlé par les nucléotides cycliques (CNG), le co-transporteur sodium-glucose 1 (SGLT1), le *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) ; la membrane basolatérale peut contenir la sodium-potassium adénosine triphosphatase ( $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase), le cotransporteur potassium-chlorure (KCC) ou un canal potassium simple. Les CEA de type I présentent également l'aquaporine 5 (AQP5) à leurs deux pôles cellulaires ([Johnson 2006](#), [Eaton 2009](#), [Bodega 2010](#)) (*figure 3A*).

### *ii. Transport vectoriel transépithélial d'ions et d'eau*

La réabsorption transépithéliale est appelée clairance du fluide alvéolaire (CFA). Elle est amorcée par un transport vectoriel actif d'ions  $\text{Na}^+$  de l'hypophase vers l'interstitium pulmonaire ([Matthay 1982](#), [Basset 1987a](#), [Basset 1987b](#), [Fukuda 2000](#)), couplé secondairement à un passage

passif essentiellement paracellulaire d'ions  $\text{Cl}^-$  (gradient électrochimique favorable) et à une réabsorption d'eau (gradient osmotique créé par les mouvements ioniques). Les ions  $\text{Na}^+$  pénètrent passivement au pôle apical des CEA de type I et de type II principalement par les canaux ENaC, et dans une moindre mesure les CNG et les SGLT1. Ils sont ensuite activement extrudés vers l'interstitium par les pompes  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPases basolatérales. La réabsorption des  $\text{Cl}^-$  peut être facilitée par les canaux CFTR, notamment en conditions de stress sous l'effet des catécholamines. Les mouvements d'eau secondaires au transport transépithélial de  $\text{Na}^+$  sont réalisés en paracellulaire et via les AQP5. Ils constituent le principal mécanisme de réabsorption du fluide alvéolaire et jouent un rôle essentiel notamment à la naissance ou en cas d'œdème alvéolaire pathologique, à condition toutefois que l'intégrité structurale et fonctionnelle de l'épithélium soit préservée (Saumon 1998, Matthay 2002, Eaton 2009, Murray 2011). Chez les patients de réanimation présentant un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) avec œdème pulmonaire, le maintien de la capacité à réabsorber le fluide alvéolaire est associé à un meilleur pronostic vital (Ware 2001).



**Figure 3 : Principaux transporteurs membranaires de l'épithélium alvéolaire.**

**A :** Représentation simplifiée des mouvements vectoriels transépithéliaux d'électrolytes et de fluide, et des principaux canaux et transporteurs impliqués (d'après Johnson 2006 et Eaton 2009). Les canaux ENaC sont inhibés par l'amiloride, les CNG par le pimozide, et les  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPases par l'ouabaine. **B :** Stœchiométrie supposée en hétérotétramère du canal sodique épithélial (d'après Firsov 1998 et Staub 2006). Chaque sous-unité comprend deux domaines transmembranaires, une large boucle extracellulaire et de courtes extrémités C- et N-terminales intracytoplasmiques. L'extrémité C-terminale porte un motif PY.

AQP5 : aquaporine 5 ; CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* ;  $\text{Cl}^-$  : ion chlorure ; CNG : *cyclic nucleotide-gated channel* ; ddp : différence de potentiel ; ENaC : *epithelial sodium channel* ; HSC : *highly sodium-selective cation channel* ; Glu : glucose ;  $\text{H}_2\text{O}$  : eau ;  $\text{K}^+$  : ion potassium ; KCC : *potassium-chloride cotransporter* ;  $\text{Na}^+$  : ion sodium ;  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase : sodium-potassium adénosine triphosphatase ; NSC : *non selective cation channel* ; PI : pneumocyte de type I ; PII : pneumocyte de type II ; SGLT1 : *sodium-glucose cotransporter 1*.

L'entrée d'ions  $\text{Na}^+$  au pôle apical des CEA via ENaC représente l'étape limitante de la CFA. Ainsi, les souris invalidées pour le gène *SCNN1A* meurent de détresse respiratoire aiguë quelques heures après la naissance par impossibilité de réabsorber le liquide normalement présent dans les alvéoles pendant la vie fœtale ([Hummler 1996](#)). A l'inverse, les souris de la lignée  $\beta$ -Liddle qui présentent une activation constitutive d'ENaC possèdent une CFA plus importante que les témoins sauvages et sont protégées de l'œdème alvéolaire induit par surcharge hydrostatique ([Randrianarison-Pellan 2007](#)).

### iii. Méthodes de calcul de la réabsorption transépithéliale d'ions et d'eau

La CFA, exprimée en pourcentage de fluide alvéolaire réabsorbé par unité de temps, peut être mesurée *in vivo* (y compris chez le patient intubé) en utilisant l'évolution de la concentration de protéines du fluide alvéolaire comme traceur de son volume selon la formule :  $\text{CFA} = (1 - C_i / C_f) \cdot 100$  où  $C_i$  représente la concentration initiale et  $C_f$  la concentration finale ([Matthay 1982](#)). En expérimentation animale, des modèles *ex vivo*, *in vivo* sur poumons ventilés et *in vivo* sur poumons non ventilés ont été développés. L'instillation par une sonde de trachéotomie d'une solution isotonique contenant de l'albumine radiomarquée à l'iode 125 est fréquemment utilisée, c'est le comptage de la radioactivité qui permet alors de mesurer la CFA selon le même principe ([Fukuda 2000](#)).

*In vitro*, les CEA cultivées sur support semi-perméable de type filtres Snapwell® peuvent être placées en chambre d'Ussing afin de mesurer directement les flux nets d'ions transépithéliaux par le courant de court-circuit ( $I_{sc}$ ) ([Ussing 1951](#)). Une alternative plus simple existe qui consiste à calculer le courant équivalent de court-circuit ( $I_{eq}$ ) sur des CEA cultivées sur filtres semi-perméables Transwell® à l'aide des deux électrodes (l'une au niveau du compartiment apical, l'autre en basolatéral) reliées à un voltmètre / ohmmètre : on peut mesurer la différence de potentiel (ddp) créée par le passage d'ions du pôle apical au pôle basolatéral, proportionnelle à l'activité des

transporteurs membranaires, ainsi que la résistance électrique transépithéliale ( $R_{te}$ ) renseignant sur le caractère serré des jonctions intercellulaires. L' $I_{eq}$  est calculé par la loi d'Ohm, tel que :  $I_{eq} = ddp / R_{te}$ . Par convention, un  $I_{eq}$  positif correspond à un flux de charges positives du compartiment apical vers le compartiment basolatéral ([Moran 2008](#), [Gondzik 2011](#)) Afin de calculer l' $I_{eq}$  sensible à l'amiloride (AML) représentant uniquement le flux de  $Na^+$  ayant pénétré au pôle apical à travers ENaC, on soustrait l' $I_{eq}$  mesuré en présence d'AML ( $I_{eq}$  AML-résistant) à  $I_{eq}$  total mesuré initialement.

### 3. Structure du canal sodique épithélial dans l'alvéole

ENaC est un canal multimérique pouvant être composé de différentes combinaisons de quatre sous-unités chez l'Homme : les trois sous-unités « canoniques »  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , ainsi que la sous-unité  $\delta$  identifiée plus récemment. Les gènes codant pour ces sous-unités, présentant 40 % d'homologie entre eux, sont dénommés respectivement : *SCNN1A*, *SCNN1B*, *SCNN1G* et *SCNN1D* ([Canessa 1993](#), [Canessa 1994](#)). La réabsorption de fluide dirigée par le sodium est un mécanisme commun à de nombreux épithéliums, dans lesquels ENaC est largement exprimé. Schématiquement, deux formes sont majoritairement fonctionnelles dans le poumon et le rein : le canal classique dit hautement sélectif pour le sodium (HSC) est composé des trois sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  ([Canessa 1993](#), [Canessa 1994](#), [Johnson 2006](#)), sa stœchiométrie supposée étant un assemblage en hétérotétramère comprenant 2 sous-unités  $\alpha$ , 1 sous-unité  $\beta$  et 1 sous-unité  $\gamma$  ([Firsov 1998](#)) ; le canal non sélectif (NSC) comprenant une seule sous-unité  $\alpha$ -ENaC probablement associée à un ou plusieurs *acid-sensing ion channels* (ASIC) appartenant à la même superfamille des dégénérines ([Canessa 1993](#), [Canessa 1994](#), [Johnson 2006](#), [Trac 2017](#)) (*figure 3B*) (*tableau I*). Dans d'autres organes tels que les gonades, le cerveau, le cœur, le foie, le pancréas, l'œsophage, le muscle squelettique et le thymus, la sous-unité  $\delta$ -ENaC joue probablement un rôle approchant de celui d' $\alpha$ -ENaC, pouvant former des canaux seule ou en association avec les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  ; toutefois les régulations de  $\delta$ -ENaC sont différentes d' $\alpha$ -ENaC. Le rôle de  $\delta$ -ENaC dans le poumon est encore mal connu et probablement marginal. De multiples combinaisons sont théoriquement possibles, l'interaction des différentes

sous-unités entre elles modifiant les propriétés d'ENaC. Enfin, notons qu'une sous-unité  $\epsilon$  a été identifiée chez le Xénope, également nommée «  $\delta$ -like » et codée par le gène *SCNN1D.L* ([Giraldez 2012](#)).

**Tableau 1. Comparaison des deux principales formes du canal sodique épithélial.**

(tiré d'[Eaton 2009](#))

<b>Propriétés</b>	<b>Type de canal</b>	
	<i>Canal hautement sélectif pour le sodium (HSC)</i>	<i>Canal non sélectif pour le sodium (NSC)</i>
<i>Sélectivité (<math>Na^+ / K^+</math>)</i>	Forte (> 40)	Faible (1,1)
<i>Conductance</i>	6 pS	2,1 pS
<i>Temps d'ouverture moyen</i>	2 s	0,1 s
<i>Temps de fermeture moyen</i>	3 s	0,3 s
<i>Constante d'inhibition (<math>K_i</math>) amiloride</i>	38 nM	1800 nM

#### 4. Régulation de l'activité du canal sodique épithélial dans l'alvéole

Les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de la régulation d'ENaC sont complexes et encore mal élucidés. Ils sont tissus-spécifiques et peuvent agir au niveau génomique en contrôlant la synthèse des canaux (transcription et traduction) ou au niveau post-traductionnel en modifiant leur activité, produit de l'expression à la membrane et de la probabilité d'ouverture ( $P_o$ ).

##### *i. Transcription du canal sodique épithélial*

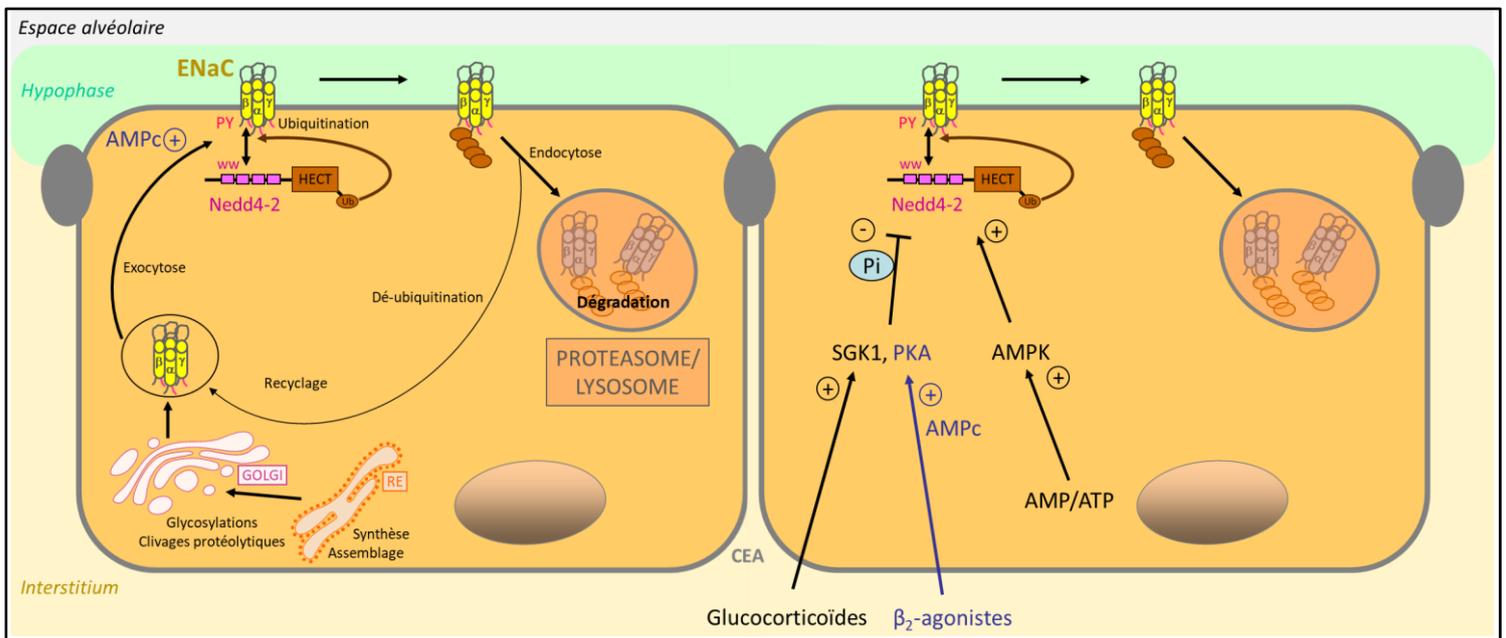
Dans le rein, et dans d'autres épithéliums impliqués dans la réabsorption de  $Na^+$ , la synthèse d'ENaC est sous la dépendance de l'aldostérone (qui stimule également la transcription de la pompe  $Na^+, K^+$ -ATPase et possède donc une action globale favorisant la rétention hydrosodée). En revanche, les CEA ne sont pas réellement des cellules cibles de l'aldostérone (ou uniquement de manière

marginal): dans l'alvéole, la synthèse d'ENaC est principalement stimulée par les hormones glucocorticoïdes, qui vont également favoriser l'assemblage des sous-unités afin de former préférentiellement des canaux HSC aux dépens des canaux NSC. Dans une moindre mesure, la synthèse d'ENaC peut être stimulée dans les CEA par l'*epithelial growth factor* (EGF) ([Matthay 2002](#), [Eaton 2009](#)).

#### ii. Expression à la membrane apicale du canal sodique épithélial

L'expression de surface d'ENaC dépend de son *trafficking* cellulaire et notamment de la balance entre son adressage et sa dégradation. Les agonistes des  $\beta_2$ -récepteurs, tels que les catécholamines endogènes sécrétées en situation de stress ou les médicaments  $\beta_2$ -stimulants comme la terbutaline, stimulent l'adressage d'ENaC à la membrane ([Minakata 1998](#), [Snyder 2000](#), [Chen 2002](#), [Planès 2002](#)). C'est aussi le cas des hormones thyroïdiennes et de la dopamine, dans des proportions plus faibles toutefois. Le KGF possède également une action stimulatrice d'ENaC mais qui dépend par ailleurs de l'hyperplasie des CEA de type II qu'il favorise ([Matthay 2002](#), [Eaton 2009](#)).

La demi-vie membranaire des sous-unités d'ENaC est courte (quelques dizaines de minutes) avant leur internalisation dans le cytoplasme. L'ubiquitine-protéine ligase Nedd4-2 (*neural precursor cell-expressed developmentally downregulated 4-2*) est un acteur-clef du *trafficking* d'ENaC : ses domaines ww peuvent lier le motif PY contenu dans l'extrémité C-terminale intracellulaire de la sous-unité  $\beta$ , ce qui initie la fixation de plusieurs molécules d'ubiquitine (poly-ubiquitylation) sur la sous-unité  $\alpha$  et induit l'endocytose du complexe ENaC. Une partie des canaux internalisés peut être recyclée, la majeure partie sera dégradée par le protéasome et/ou le lysosome, selon les conditions et le type cellulaire. Dans les CEA, la protéine kinase A (PKA) stimulée par les  $\beta_2$ -agonistes et la kinase SGK-1 induite par les glucocorticoïdes du sérum (*serum and glucocorticoid-induced kinase 1*) phosphorylent et inactivent Nedd4-2, ce qui inhibe sa fixation à ENaC et aboutit *in fine* à une augmentation de l'expression de surface du canal ([Weisz 2003](#), [Staub 2006](#), [Eaton 2010](#), [Rotin 2011](#)) (*figure 4*).



**Figure 4 : Synthèse et trafficking du canal sodique épithélial dans les pneumocytes.**

Les sous-unités  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -ENaC sont synthétisées et assemblées dans le réticulum endoplasmique. Leur maturation consiste en plusieurs N-glycosylations successives ; puis les sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$  subissent des clivages protéolytiques par des sérine-protéases, directement dans l'appareil de Golgi par la furine ou à la membrane par les CAP si elles avaient initialement été adressées sous forme inactive. Les complexes ENaC sont adressés à la surface apicale des cellules épithéliales alvéolaires par exocytose à partir d'un pool de vésicules de stockage sous-membranaires. L'adressage est stimulé par des agents qui augmentent l'AMPc (tels que les catécholamines et les  $\beta_2$ -agonistes), il est inhibé par la bréféldine A. L'endocytose d'ENaC, prémices de sa dégradation, est quant à elle principalement déterminée par l'activité de la protéine ubiquitine ligase Nedd4-2, elle-même régulée par plusieurs kinases : la PKA et la SGK1 phosphorylent Nedd4-2 en 3 sites distincts, ce qui favorise sa liaison à la protéine 14-3-3 et inhibe sa fixation à ENaC ; au contraire l'AMPK, un senseur énergétique de la cellule activé par une augmentation du ratio AMP/ATP, stimule l'ubiquitinylation d'ENaC par Nedd4-2 par un mécanisme encore mal compris, entraînant une diminution de l'expression de surface du canal sodique (d'après [Snyder 2005](#) et [Staub 2006](#)).

AMP : adénosine monophosphate ; AMPc : AMP cyclique ; AMPK : AMP-activated protein kinase ; ATP : adénosine triphosphate ; CAP : channel-activating proteases ; CEA : cellule épithéliale alvéolaire ; ENaC : epithelial sodium channel ; Nedd4-2 : neural precursor cell-expressed developmentally downregulated 4-2 ; PKA : protéine kinase A ; RE : réticulum endoplasmique ; SGK1 : serum and glucocorticoid-induced kinase 1.

### iii. Probabilité d'ouverture du canal sodique épithélial

La plupart des substances allongeant la demi-vie membranaire d'ENaC peuvent également augmenter sa  $P_o$ . Par ailleurs, la  $P_o$  dépend également du mode d'assemblage des sous-unités, de la concentration extracellulaire en  $\text{Na}^+$ , d'un éventuel stress de cisaillement, et de l'action d'enzymes protéolytiques appartenant à la famille des sérine-protéases qui vont activer les canaux ([Shi 2013](#)). Parmi ces protéases, les plus importantes sont la furine qui intervient dans le cytoplasme des CEA, et les channel-activating proteases (CAP) qui agissent en extracellulaire au niveau de la membrane apicale lorsque les canaux ont été adressés sous forme inactive. Bien que les sites d'action des furines et des CAP sur ENaC soient légèrement différents, le mécanisme général consiste en des clivages protéolytiques des sous-unités  $\alpha$ - et  $\gamma$ -ENaC, ce qui en modifie la conformation et augmente

considérablement leur Po. Trois CAP ont été décrites et sont présentes dans les CEA : CAP1 ou prostatine, CAP2, et CAP3 ou matriptase ([Vallet 1997](#), [Shi 2013](#)). L'inhibition pharmacologique des CAP par l'aprotinine, de même que l'inactivation ciblée de CAP1 dans les CEA de souris, réduit l'activité d'ENaC et la CFA, et aggrave la sévérité de l'œdème alvéolaire induit par surcharge hydrosodée ([Planès 2005](#), [Planès 2010](#)).

### C. Production du surfactant pulmonaire

Les CEA de type II synthétisent, sécrètent et recyclent les constituants du surfactant pulmonaire. Ce matériel tensioactif complexe est composé de lipides (principalement des phospholipides) en grande majorité, de 10 % de protéines dont les 4 apoprotéines spécifiques du surfactant (SP-A, SP-B, SP-C et SP-D) à hauteur de 3 %, et de 2 % de glucides. Les corps lamellaires jouent le rôle de granules de stockage dans le cytoplasme des CEA de type II, ils peuvent converger et s'ouvrir au pôle apical de la cellule pour libérer les différents constituants du surfactant. Dans la lumière alvéolaire, les phospholipides se réorganisent morphologiquement pour former les tubules myéliniques dans l'hypophase hydrophile, puis s'adsorbent secondairement dans l'épiphase lipidique qui constitue l'interface avec l'air. Le surfactant est rapidement inactivé par la répétition des cycles ventilatoires et doit être renouvelé en permanence : il est recapté à 90 % et recyclé par les CEA de type II (la portion restante étant phagocytée par les macrophages alvéolaires) ([Kapanci 1972](#), [Wright 1987](#), [West 2015](#), [Olmeda 2017](#)).

La composition du surfactant, comprenant des phospholipides associés aux lipoprotéines SP-B et SP-C, peu abondantes mais possédant un rôle fonctionnel majeur, lui confère un caractère amphiphile et des propriétés tensioactives. La fonction principale du surfactant est de diminuer la tension superficielle régnant à l'interface gaz-eau qui s'oppose à l'ouverture des alvéoles et diminue la compliance pulmonaire. Ses propriétés tensioactives lui permettent également de lutter contre le collapsus des alvéoles et des voies aériennes distales (effet de stabilisation anti-atélectasie). Enfin, il permet de maintenir la pression hydrostatique interstitielle péri-alvéolaire et de lutter ainsi contre

l'extravasation de liquide et la constitution d'un œdème alvéolaire. L'ensemble de ces effets concourent à diminuer le travail inspiratoire. Au contraire, dans les modèles expérimentaux avec déficit acquis de surfactant, ou chez les nouveau-nés prématurés avec carence secondaire à l'immaturation pulmonaire, on observe un œdème pulmonaire sévère de type lésionnel avec des atélectasies ([Rugonyi 2008](#), [West 2015](#), [Olmeda 2017](#)). Le surfactant possède également un rôle immunorégulateur par l'intermédiaire des collectines SP-A et SP-D impliquées dans l'opsonisation et l'élimination des pathogènes ([Wright 2005](#), [West 2015](#)).

#### D. Réparation épithéliale

Les CEA de type I sont fragiles et particulièrement exposées à des agressions de natures diverses : infectieuses, inflammatoires, toxiques, microparticulaires, mécaniques... En cas de lésions de l'épithélium alvéolaire, la CFA et éventuellement la production de surfactant peuvent être altérées, ce qui favorise la constitution d'un œdème alvéolaire et éventuellement de collapsus associés des espaces aériens, pouvant compromettre gravement les échanges gazeux. Par ailleurs, la perte d'intégrité épithéliale constitue une porte d'entrée pour les pathogènes. Il est donc primordial que l'épithélium alvéolaire soit rapidement régénéré. Cette reconstitution épithéliale se déroule en trois étapes.

##### 1. Inflammation alvéolaire et recrutement des fibroblastes

Alors que la dénudation de la membrane basale facilite l'entrée de liquide plasmatique dans l'alvéole, les CEA sécrètent des chimiokines et cytokines pro-inflammatoires qui facilitent le recrutement de macrophages activés et de polynucléaires neutrophiles (PNN), notamment la *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1), le *tumor necrosis factor* (TNF- $\alpha$ ) et les interleukines IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4 et IL-13. Les CEA libèrent également d'autres facteurs chimiotactiques qui stimulent le recrutement et la prolifération des fibroblastes et leur différenciation en myofibroblastes, parmi lesquels le *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), et le *platelet-derived growth factor* (PDGF). Les

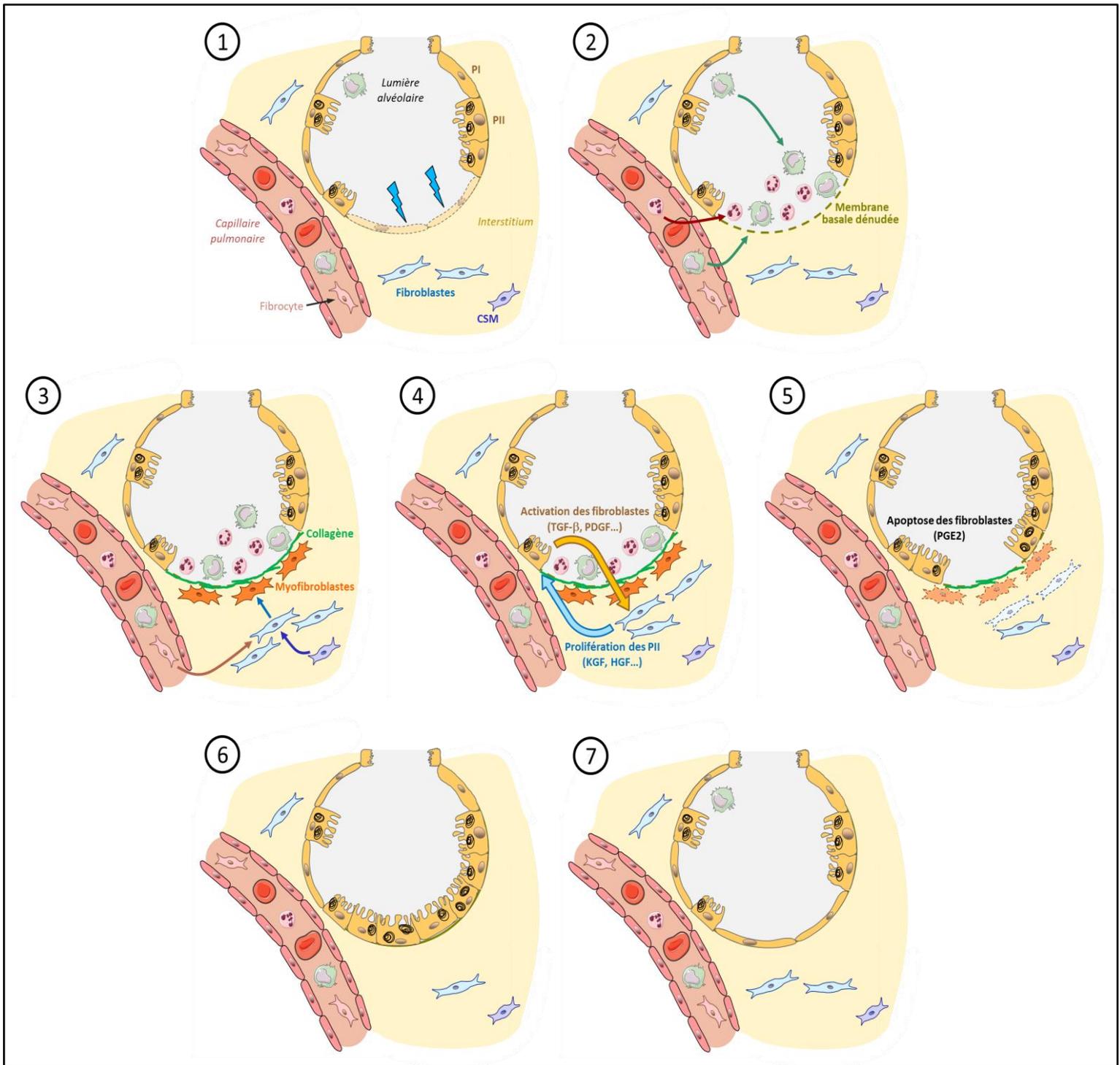
fibroblastes ont des origines multiples : fibroblastes résidents de l'interstitium pulmonaire, cellules souches mésenchymateuses (CSM) et fibrocytes circulants. Les myofibroblastes ainsi que les cellules adjacentes (CEA, cellules endothéliales) synthétisent des constituants de la matrice extracellulaire (MEC) (collagène, fibronectine...) qui recouvrent la membrane basale dénudée et guident la migration des CEA de type II ([Crosby 2010](#), [Beers 2011](#)) (*figure 5*).

## 2. Prolifération des cellules épithéliales alvéolaires de type II

En conditions physiologiques, la prolifération des CEA de type II est inhibée par les jonctions serrées reliant les CEA. En cas de lésion, la disjonction épithéliale entraîne une perte de cette inhibition de contact et la prolifération des CEA de type II. Différents facteurs de croissance jouent un rôle protecteur vis-à-vis des CEA de type II et stimulent leur prolifération : le *keratinocyte growth factor* (KGF) et l'*hepatocyte growth factor* (HGF) sécrétés par les fibroblastes, ainsi que le TGF- $\alpha$  et l'EGF dont l'origine est mal connue. La réépithélialisation est par ailleurs favorisée par l'action de diverses métalloprotéases (MMP-1, MMP-7, MMP-9) permettant de dégrader les liaisons entre les CEA de type II et la MEC. Dans le même temps, les CEA de type II répriment la prolifération des fibroblastes et induisent leur apoptose en augmentant la sécrétion de la prostaglandine E2 (PGE2) ([Crosby 2010](#), [Beers 2011](#), [McClatchey 2012](#), [Hendrix 2017](#)).

## 3. Restauration de l'épithélium alvéolaire

La membrane basale est recouverte par une métaplasie cubique de CEA de type II, dont la plus grande partie va ensuite se transdifférencier sous l'action du TGF- $\beta$  et des composants de la MEC : les inclusions lamellaires disparaissent, les cellules s'allongent et acquièrent un phénotype de CEA de type I, stade de différenciation terminal. Le rôle du TGF- $\beta$  dans la réparation alvéolaire est très complexe, car une activation dérégulée de ce facteur de croissance est un mécanisme pivot de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et de la fibrogenèse au cours de la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) ([Bhaskaran 2007](#), [Crosby 2010](#), [Beers 2011](#)).



**Figure 5 : Représentation simplifiée de la réparation alvéolaire après lésion épithéliale.**

La lésion de l'épithélium alvéolaire et la réponse inflammatoire consécutive entraînent la sécrétion d'une grande variété de facteurs de croissances, cytokines, chimiokines, interleukines, prostaglandines et composants de la MEC ; générant des interactions multiples avec les différentes voies de signalisation intracellulaires. Ces facteurs solubles proviennent des CEA lésées elles-mêmes, des CEA environnantes, des fibroblastes, des macrophages, des cellules endothéliales, de la MEC et de l'exsudat plasmatique ; toutefois leurs origines et leurs régulations spatiales et temporelles précises restent mal connues *in vivo*. **(1)** Lésion épithéliale ; **(2)** Recrutement de macrophages et de PNN ; **(3)** Origine des myofibroblastes ; **(4)** Crosstalk entre les PII et les fibroblastes ; **(5)** Hyperexpression de la PGE2 ; **(6)** Métaplasie cubique ; **(7)** Restauration épithéliale (d'après Crosby 2010 et Beers 2011).

CEA : cellule épithéliale alvéolaire ; CSM : cellule souche mésenchymateuse ; HGF : *hepatocyte growth factor* ; KGF : *keratinocyte growth factor* ; MEC : matrice extracellulaire ; PDGF : *platelet-derived growth factor* ; PGE2 : prostaglandine E2 ; PNN : polynucléaire neutrophile ; PI : pneumocyte de type I ; PII : pneumocyte de type II ; TGF- $\beta$  : *transforming growth factor  $\beta$* .

## II. Voies de signalisation de l'hypoxie dans les cellules épithéliales alvéolaires

Les CEA sont habituellement bien oxygénées puisqu'elles sont directement en contact avec le gaz alvéolaire présentant une pression partielle en dioxygène (PAO<sub>2</sub>) moyenne de 100 mmHg, variant entre les bases pulmonaires et les apex. Une hypoxie alvéolaire peut néanmoins survenir dans certaines conditions environnementales ou au cours de nombreuses situations physiopathologiques. L'hypoxie peut être aiguë (ascension en haute altitude, œdème pulmonaire...) ou prolongée (vie en haute altitude, maladie respiratoire chronique comme par exemple la fibrose pulmonaire idiopathique). Le niveau de FiO<sub>2</sub> peut être constant ou variable (hypoxie intermittente) comme c'est le cas dans le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS). Quelles que soit les modalités, l'hypoxie entraîne une diminution, parfois très importante, de la disponibilité en O<sub>2</sub>. Alors que la phosphorylation oxydative mitochondriale est limitée dans ces conditions, les CEA possèdent la capacité de maintenir un contenu cellulaire adéquat en adénosine triphosphate (ATP). Cette adaptation passe par des réponses immédiates visant à limiter les processus utilisant l'ATP (diminution de la synthèse protéique et de la protéolyse, inhibition post-transcriptionnelle des Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPases) ; et si l'hypoxie se prolonge par des réponses retardées consistant en une régulation de la synthèse protéique (expression de gènes impliqués dans le métabolisme anaérobie, répression des gènes codant pour des protéines consommatrices d'ATP). La modification de l'expression génique des CEA en conditions d'hypoxie est principalement médiée par la voie des facteurs de transcription induits par l'hypoxie, ou *hypoxia-inducible factors* (HIF) ([Hochachka 1996](#), [Clerici 2009](#)).

Les dérivés réactifs de l'oxygène, ou *reactive oxygen species* (ROS), produits notamment par la mitochondrie en situation d'hypoxie, constituent l'autre messenger important de la signalisation hypoxique cellulaire, mais peuvent également être à l'origine d'un stress oxydant délétère pour les tissus ([Görlach 2015](#)).

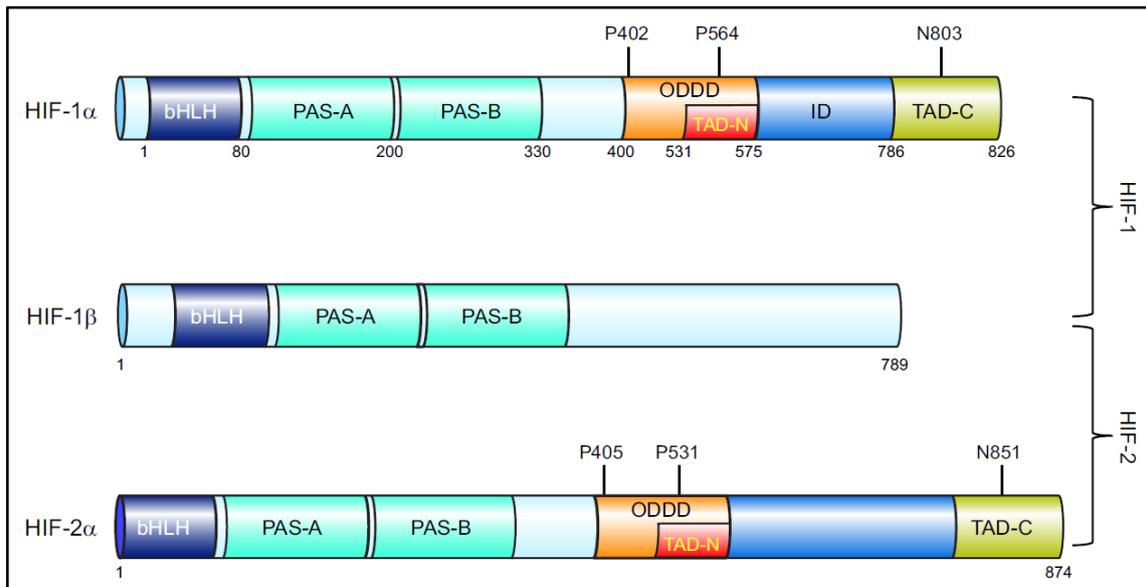
## A. Facteurs de transcription induits par l'hypoxie

### 1. Structure et rôles des facteurs de transcription induits par l'hypoxie

Les facteurs HIF appartiennent à la famille des *PAS domain proteins* portant un domaine Per-ARNT-Sim (protéine PER / *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* / *Single-minded homolog 1*). Ce sont des hétérodimères associant une sous-unité HIF- $\alpha$  cytoplasmique dont la translocation dans le noyau est régulée par la  $PO_2$ , et une sous-unité HIF-1 $\beta$  nucléaire constitutionnelle ([Semenza 1992](#), [Wang 1995](#), [Jiang 1996](#)). Trois isoformes de HIF- $\alpha$  ont été décrites : HIF-1 $\alpha$  codé par le gène *HIF1A* sur le chromosome 14, HIF-2 $\alpha$  (ou EPAS-1, *endothelial PAS domain protein 1*) codé par le gène *EPAS1* sur le chromosome 2, et plus récemment HIF-3 $\alpha$  codé par le gène *HIF3A* sur le chromosome 19. HIF-1 $\alpha$  est ubiquitaire, exprimé dans toutes les cellules, y compris chez les invertébrés. HIF-2 $\alpha$  n'est exprimé que dans certaines populations cellulaires, uniquement chez les vertébrés : cellules épithéliales alvéolaires, cellules endothéliales, fibroblastes rénaux, hépatocytes, myocytes cardiaques... HIF-1 $\beta$  est identique à ARNT, c'est une protéine commune à plusieurs facteurs de transcription hétérodimériques, dont le gène est porté par le chromosome 1. Ainsi, le complexe HIF-1 est défini par la liaison intranucléaire de HIF-1 $\alpha$  avec HIF-1 $\beta$ /ARNT, tandis que le complexe HIF-2 associe HIF-2 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$ /ARNT (*figure 6*). HIF-3 $\alpha$  peut se lier à HIF-1 et inhiber son action transcriptionnelle, or l'expression de HIF-3 $\alpha$  est induite par HIF-1 dans les cellules hypoxiques et semble donc correspondre à un rétrocontrôle négatif de l'activité de HIF-1 en cas d'hypoxie prolongée. Les trois isoformes de HIF- $\alpha$  sont exprimés dans les CEA ([Clerici 2009](#), [Prabhakar 2012](#)).

Les facteurs HIF sont des régulateurs-clefs de l'homéostasie de l' $O_2$  au niveau transcriptionnel, en contrôlant son apport et sa consommation par les cellules. Dans n'importe quelle cellule de l'organisme en conditions hypoxiques, ils peuvent directement stimuler la transcription de plus d'un millier de gènes portant la séquence consensus 5'-(A/G)CGTG-3' localisée au niveau des motifs *hypoxia response element* (HRE) (*figure 7*). D'autres gènes peuvent au contraire être réprimés par HIF. L'*upregulation* ou la *downregulation* induites par HIF peuvent également être indirectes : en

transactivant des gènes codant pour des répresseurs ou des micro-ARN, ou par une action épigénétique en transactivant des gènes codant pour des enzymes modifiant la chromatine telles que des histone déméthylases et des histone désacétylases. Au total, plus de 3500 protéines peuvent être affectées de façon variable selon le site et la durée de l'hypoxie. HIF-1 et HIF-2 partagent un grand nombre de cibles communes ([Schofield 2004](#), [Prabhakar 2012](#), [Khurana 2013](#), [Bishop 2014](#)).



**Figure 6 : Structure des facteurs de transcription induits par l'hypoxie HIF-1 et HIF-2.**

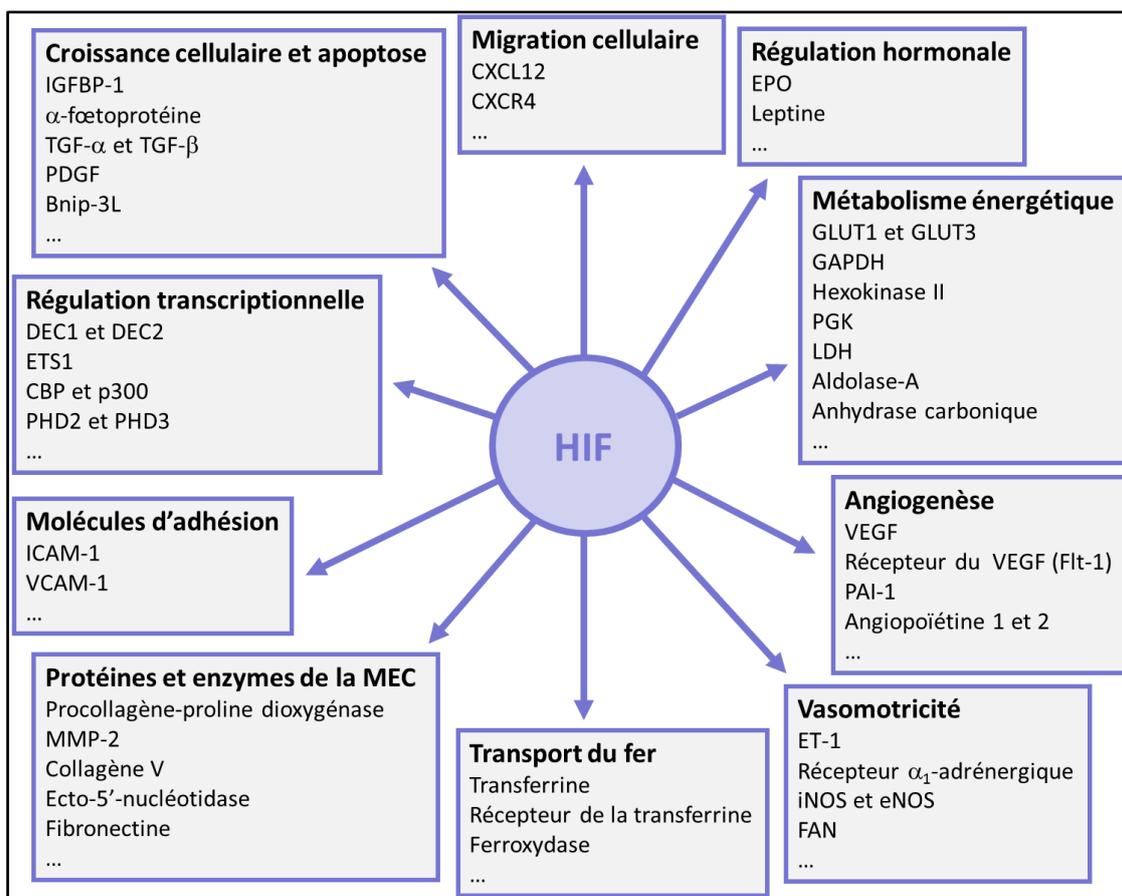
HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  présentent 48 % d'homologie globale chez l'Homme, avec 70 % d'homologie pour les domaines PAS et 85 % pour les domaines bHLH (nécessaires pour l'hétérodimérisation et la liaison à l'ADN sur une séquence HRE). Les nombres sous les protéines se rapportent au nombre d'acides aminés que comportent chaque sous-unité et chaque domaine, les nombres précédés d'un P (proline) ou d'un N (asparagine) indiquent les sites d'hydroxylation (tiré de [Prabhakar 2012](#)).

bHLH : *basic helix-loop-helix domain* ; ID : *inhibitory domain* ; HRE : *hypoxia response element* ; ODDD : *O<sub>2</sub>-dependant degradation domain* ; PAS : *Per-ARNT-Sim* ; TAD-C : *C-terminal transactivation domain* ; TAD-N : *N-terminal transactivation domain*.

Dans les CEA, les cibles préférentielles sont de plusieurs types : *upregulation* du transporteur de glucose GLUT1, d'enzymes de la glycolyse (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase GAPDH, hexokinase II, phosphoglycérate kinase PGK), du *vascular endothelial growth factor* (VEGF), de certaines molécules d'adhésion (*intercellular adhesion molecule 1* ICAM-1, *vascular cell adhesion molecule 1* VCAM-1), de la protéine pro-apoptotique *BCL2 interacting protein 3 like* (Bnip-3L) ; *downregulation* de protéines de transport du sodium (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase et sous-unités  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -ENaC).

En outre, les facteurs HIF-1 et HIF-2 sont surexprimés dans le poumon foetal des mammifères, qui présente de faibles concentrations d'oxygène. Ils sont essentiels à la morphogenèse des espaces aériens et de la vascularisation pulmonaire, notamment via la surexpression de VEGF ([Clerici 2009](#)).

De manière marginale, les facteurs HIF peuvent également interagir directement avec des séquences nucléotidiques de l'ADN, sans formation intermédiaire d'un hétérodimère ([Prabhakar 2012](#), [Bishop 2014](#)).



**Figure 7 : Exemples représentatifs de protéines codées par des cibles transcriptionnelles directes des facteurs de transcription induits par l'hypoxie.**

D'autres protéines interagissant avec la production de ROS figurent également parmi les cibles de HIF (Nox2 et Nox4, Bnip-3, COX4-2, PDK1) ainsi que les micro-ARN miR-210. Les différences partielles de cibles entre HIF-1 et HIF-2 ne sont pas précisées sur ce schéma (d'après [Schofield 2004](#) et [Semenza 2004](#)).

Bnip-3 : *BCL2 interacting protein 3* ; Bnip-3L : *BCL2 interacting protein 3 like* ; CBP : *CREB-binding protein* ; COX : cyclo-oxygénase ; DEC : *differentiated embryo chondrocyte* ; EPO : érythropoïétine ; ET-1 : endothéline 1 ; ETS1 : *avian erythroblastosis virus E26 homolog 1* ; FAN : facteur atrial natriurétique ; GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ; ICAM-1 : *intercellular adhesion molecule 1* ; IGFBP-1 : *insuline-like growth-factor-binding protein 1* ; LDH : lactate déshydrogénase ; MMP-2 : *matrix metalloproteinase* ; NOS : oxyde nitrique synthase ; Nox : NADPH oxydase ; PAI-1 : *plasminogen activator inhibitor 1* ; PDGF : *platelet-derived growth factor* ; PDK1 : pyruvate déshydrogénase kinase 1 ; PGK : phosphoglycérate kinase ; PHD3 : *prolyl hydroxylase domain-containing protein 3* ; TGF : *transforming growth factor* ; VCAM-1 : *vascular cell adhesion molecule* ; VEGF :

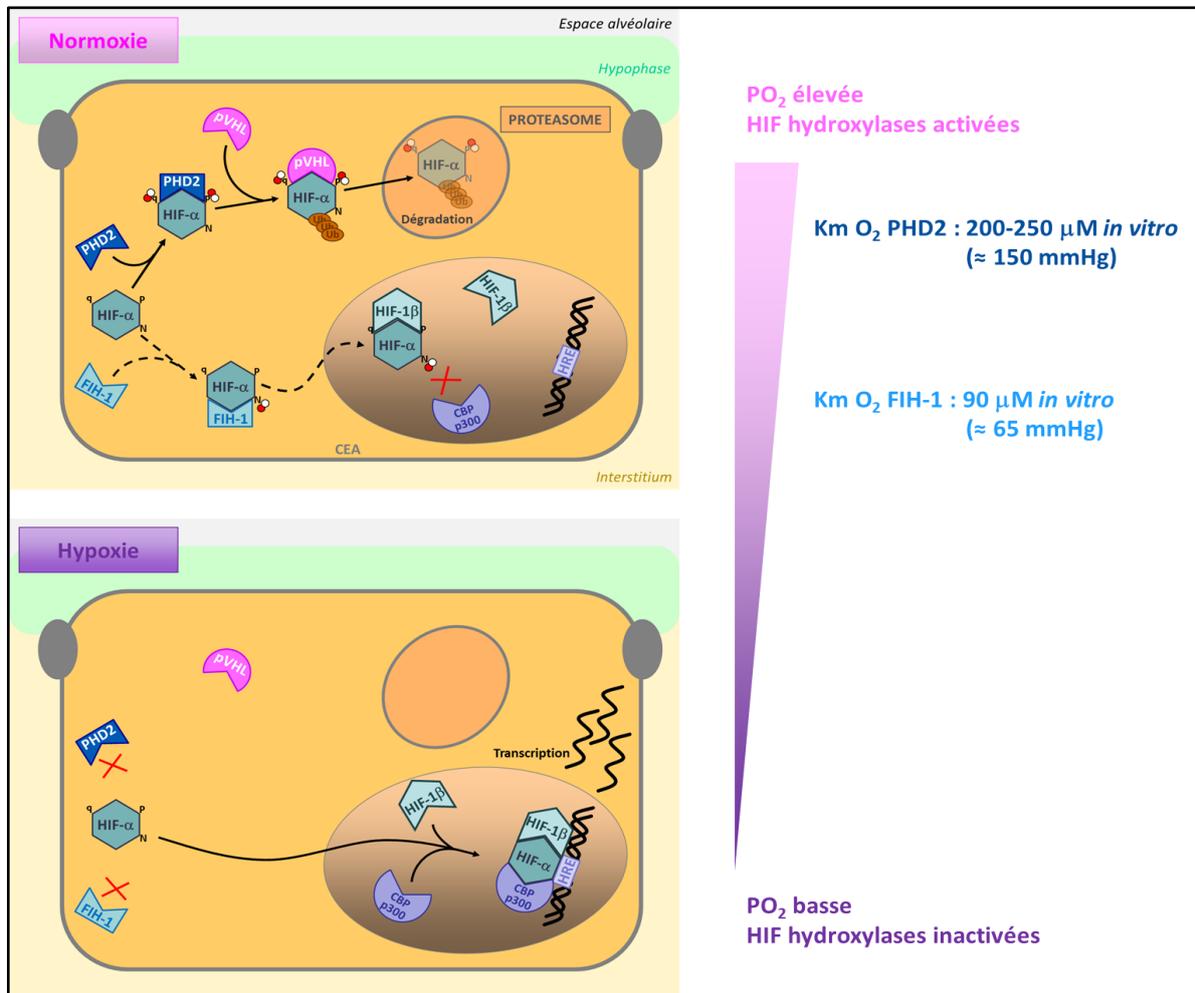
## 2. Régulations de l'activité des facteurs de transcription induits par l'hypoxie

Les facteurs HIF sont soumis à des régulations multiples et parfois redondantes. Le mécanisme le plus important en hypoxie aiguë est post-traductionnel et dépend de l'activité d'hydroxylases cytoplasmiques en fonction de la  $PO_2$  : les prolyl-hydroxylases (PHD) en première ligne (également appelées HPH pour *HIF prolyl-hydroxylases*), puis l'asparaginyl-hydroxylase dénommée *factor inhibiting HIF 1* (FIH-1). Elles appartiennent à la superfamille des dioxygénases dépendantes du fer et du 2-oxoglutarate, et utilisent l' $O_2$  comme cosubstrat.

### *i. Régulation de la stabilité de HIF- $\alpha$ par prolyl-hydroxylation*

HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  sont synthétisés en permanence dans les CEA, toutefois en conditions normoxiques la majeure partie des sous-unités HIF- $\alpha$  sont très rapidement dégradées dans le protéasome après ubiquitinylation par le complexe ubiquitine ligase E3 contenant la protéine von Hippel-Lindau (pVHL) codée par le gène suppresseur de tumeur *VHL*. Cette étape est conditionnée par l'hydroxylation préalable de deux résidus proline par une PHD (prolines 564 et 402 pour HIF-1 $\alpha$ , 531 et 405 pour HIF-2 $\alpha$ ). Trois PHD ont été décrites : PHD1, PHD2 et PHD3, codées respectivement par les gènes *EGLN2*, *EGLN1* et *EGLN3*. PHD2 et PHD3 sont exprimées dans le poumon et notamment dans les CEA, PHD2 semble être la plus importante fonctionnellement pour contrôler la stabilité de HIF- $\alpha$  dans le cytoplasme ([Bruick 2001](#), [Huang 2002](#), [Berra 2003](#), [Bruick 2003](#)). Il est intéressant de noter qu'*EGLN1* est un gène cible de HIF-1 $\alpha$ , ce qui correspond probablement à un rétrocontrôle négatif en cas d'hypoxie prolongée. Les PHD utilisent l' $O_2$  comme substrat, et possèdent un ion ferreux  $Fe^{2+}$  dans leur centre catalytique. En hypoxie, les PHD et notamment PHD2 sont inactivées : directement par la diminution de la disponibilité en  $O_2$ , mais également via la production par les mitochondries hypoxiques de ROS responsables de l'oxydation du  $Fe^{2+}$  en ion ferrique  $Fe^{3+}$ . Ceci aboutit à une stabilisation et une activation de HIF- $\alpha$ , avec une induction exponentielle pour des concentrations d' $O_2$  décroissantes à partir de 10 % ([Jiang 1996](#)). HIF- $\alpha$  peut alors se transloquer dans

le noyau et se dimériser avec HIF-1 $\beta$ . Un co-activateur est ensuite recruté dans le noyau, la protéine p300 ou la CREB-binding protein (CBP) principalement, permettant au complexe d'orchestrer la transactivation de ses gènes cibles portant la séquence HRE (figure 8).



**Figure 8 : Double régulation de l'activité de la sous-unité HIF- $\alpha$  par prolyl- et asparaginyl-hydroxylation.**

En normoxie, la demi-vie des sous-unités HIF- $\alpha$  est de quelques minutes seulement : PHD2 hydroxyle HIF- $\alpha$  sur deux résidus proline, ce qui permet à pVHL de se fixer sur le domaine ODDD et d'initier l'ubiquitinylation de HIF- $\alpha$  et sa dégradation dans le protéasome. L'activité enzymatique de PHD2 nécessite des concentrations cytoplasmiques suffisantes d'O<sub>2</sub> et d'acide ascorbique, qui réduit les ions ferriques Fe<sup>3+</sup> en ions ferreux Fe<sup>2+</sup> au niveau du centre catalytique. Son Km semble nettement inférieur lorsqu'il est mesuré *in vivo* (Clanton 2013). Par ailleurs, le FIH-1 intervient probablement en deuxième ligne en hydroxylant une asparagine sur les sous-unités n'ayant pas été reconnues par PHD2. Cette hydroxylation bloque, par encombrement stérique, la liaison intranucléaire avec des co-activateurs transcriptionnels (essentiellement p300 ou CBP) et inhibe ainsi la transactivation de la plupart des gènes cibles.

En hypoxie, HIF- $\alpha$  s'accumule dans le cytoplasme, se transloque dans le noyau et se lie à HIF-1 $\beta$ . Les domaines TAD de HIF- $\alpha$  permettent de recruter un co-activateur et vont réguler l'activité transcriptionnelle une fois que le complexe HIF se sera lié, via les domaines bHLH, à une séquence HRE de l'ADN. La transactivation des gènes cibles est un mécanisme rapide, apparaissant dans les premières heures d'hypoxie.

ADN : acide désoxyribonucléique ; bHLH : basic helix-loop-helix domain ; CBP : CREB-binding protein ; FIH-1 : factor inhibiting HIF 1 ; HIF : hypoxia inducible factor ; HRE : hypoxia response element ; Km : constante de Michaëlis ; N : asparagine ; O<sub>2</sub> : dioxygène ; ODDD : O<sub>2</sub>-dependant degradation domain ; PHD2 : prolyl hydroxylase domain-containing protein 2 ; P : proline ; pVHL : von Hippel-Lindau tumor suppressor protein ; TAD : terminal transactivation domain.

La voie de signalisation HIF peut être activée chimiquement en normoxie en inhibant l'activité enzymatique hydroxylase : en présence d'ions métalliques comme le cobalt ( $\text{Co}^{2+}$ ), jouant notamment le rôle d'inhibiteur compétitif du  $\text{Fe}^{2+}$  de PHD2, ou par un chélateur du fer comme la desferrioxamine. Toutefois cette procédure ne mime qu'une partie des effets de l'hypoxie. Par ailleurs, d'autres protéines peuvent ubiquitinyler HIF-1 $\alpha$  en conditions hypoxiques, comme le complexe *heat shock protein 70 / Hsc70-interacting protein* (HSP70/CHIP) et l'*hypoxia-associated factor* (HAF) (Clerici 2009, Prabhakar 2012, Bishop 2104).

ii. *Régulation de la fonction transactivatrice par asparaginylation*

L'activité de HIF- $\alpha$  est également régulée indépendamment de sa stabilité, par l'hydroxylation d'une asparagine (en position 803 pour HIF-1 $\alpha$  et 851 pour HIF-2 $\alpha$ ) par le FIH-1. Tout comme PHD2, l'activité enzymatique du FIH-1 est proportionnelle à la concentration cytoplasmique en  $\text{O}_2$  et nécessite des ions  $\text{Fe}^{2+}$ . Elle est également inhibée par les ROS. En conditions normoxiques, les sous-unités HIF- $\alpha$  qui n'ont pas été dégradées par la voie PHD2/pVHL sont hydroxylées par le FIH-1. Cette hydroxylation ne bloque pas la translocation et la liaison à HIF-1 $\beta$ , mais inhibe le recrutement d'un co-activateur et la liaison à l'ADN, ce qui empêche *in fine* la transactivation de la plupart des gènes cibles. En hypoxie, l'activité du FIH-1 est inhibée, le recrutement d'un cofacteur par l'hétérodimère HIF- $\alpha$ /HIF-1 $\beta$  devient alors possible (Clerici 2009, Prabhakar 2012, Bishop 2014).

Au-delà de ces mécanismes généraux, il apparaît que la régulation peut être légèrement différente selon les isoformes : alors que toutes les sous-unités HIF- $\alpha$  sont stabilisées en hypoxie aiguë, l'expression de HIF-1 $\alpha$  tend à diminuer durant les hypoxies prolongées. Ceci pourrait être expliqué au moins en partie par l'existence d'une transrégulation entre HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  : il a été suggéré que HIF-2 $\alpha$  puisse être impliqué dans la déstabilisation des ARNm de HIF-1 $\alpha$ . Par ailleurs, HIF-2 $\alpha$  n'est pas ubiquitinylé par HSP70/CHIP ni par HAF, au contraire de HIF-1 $\alpha$  (Uchida 2004, Prabhakar 2012, Bishop 2014).

### iii. Régulations non canoniques

D'autres régulations de l'expression et de la stabilité de HIF existent, dépendantes ou non de l'O<sub>2</sub>. Elles ont essentiellement été étudiées pour HIF-1α. Par exemple, l'expression des ARNm de HIF-1α semble augmentée en hypoxie *in vivo*, mais le mécanisme est encore mal élucidé (majoration de la transcription et/ou diminution de la dégradation). Par ailleurs, la stimulation de l'expression de HIF par l'exposition aiguë à un certain nombre de cytokines, facteurs de croissance ou autres composés, a été décrite indépendamment de l'hypoxie, principalement dans des travaux ayant étudié les réponses de cellules cancéreuses : on peut citer non exhaustivement l'EGF, le *fibroblast growth factor 2* (FGF2), les *insulin-like growth factors* (IGF) 1 et 2, le monoxyde d'azote (NO), la PGE2, le lactate, le fumarate, le succinate. Les mécanismes impliqués ne sont pas connus précisément, ils pourraient impliquer l'activation des voies de signalisation de la phosphatidylinositol 3-kinase / *mammalian target of rapamycin* (PI3K/mTOR) et des *mitogen-activated protein* (MAP) kinases ([Prabhakar 2012](#), [Hancock 2015](#)). Il a également été montré qu'HIF est un gène cible de la voie du facteur nucléaire kappa B (NF-κB), elle-même activée par l'hypoxie ou par les ROS ([Görlach 2008](#)). Enfin, d'autres ubiquitine ligases ou certaines désubiquitinases peuvent interagir avec HIF et réguler sa stabilité, indépendamment de l'hypoxie ([Günther 2017](#)).

Au final, la multiplicité et la redondance de ces voies de régulation expliquent que les cellules développent des réponses à l'hypoxie même pour des niveaux d'hypoxie relativement modérés, avec un effet dose-réponse, ayant la plupart du temps pour finalité de réguler l'homéostasie de l'O<sub>2</sub> en favorisant sa délivrance tissulaire et en diminuant sa consommation ([Clerici 2009](#), [Prabhakar 2012](#), [Bishop 2014](#)). L'O<sub>2</sub>-sensing fait intervenir de nombreux autres mécanismes (statut redox de la cellule, senseurs énergétiques comme l'AMPK, canaux ioniques notamment calciques, gaz tels que le sulfure d'hydrogène H<sub>2</sub>S, le monoxyde de carbone CO ou le NO...), parmi lesquels la mitochondrie joue un rôle central, via sa production de ROS ([Clanton 2013](#)).

## B. Implication des dérivés réactifs de l'oxygène dans la réponse cellulaire à l'hypoxie

Les ROS comprennent essentiellement l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ), l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ). Ils sont produits de manière physiologique et agissent dans la cellule comme seconds messagers, en intervenant dans la régulation de phénomènes très variés : prolifération, différenciation, apoptose, immunité non spécifique...

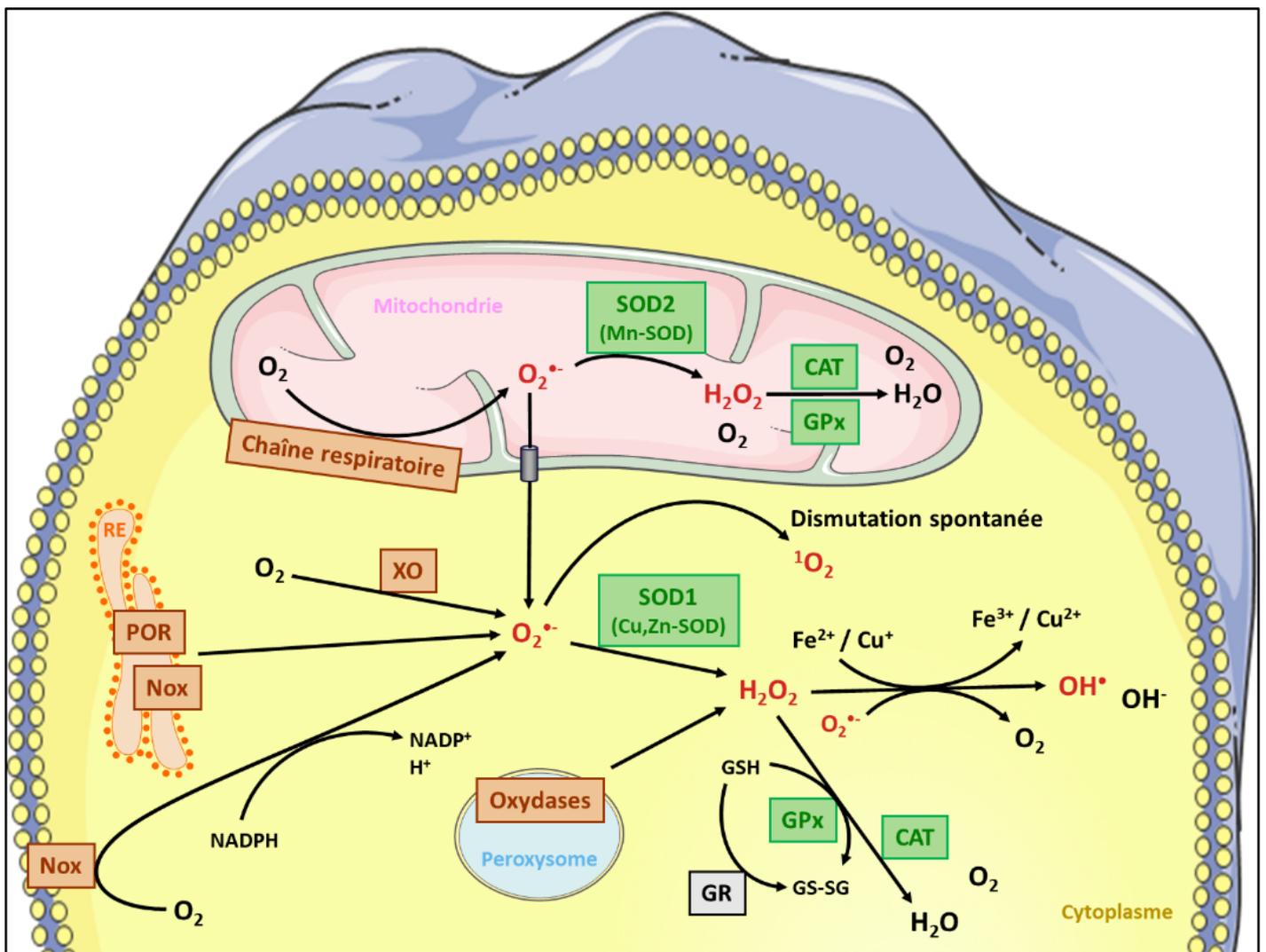
### 1. Production des dérivés réactifs de l'oxygène

#### *i. Sources de production des dérivés réactifs de l'oxygène*

Le lieu de production principal est la mitochondrie, organelle intracytoplasmique responsable de la respiration cellulaire. Cette dernière consiste en une succession de processus d'oxydoréduction survenant au niveau de la chaîne respiratoire, constituée de transporteurs d'électrons organisés en quatre complexes respiratoires (numérotés de I à IV) situés dans la membrane interne de la mitochondrie. Elle permet, en présence d' $O_2$ , de produire de l'ATP nécessaire aux réactions métaboliques dans l'organisme (38 molécules d'ATP pour 1 molécule d' $O_2$ ). De manière physiologique, un petit pourcentage des électrons transportés dans les complexes respiratoires mitochondriaux réagit de manière non enzymatique avec l' $O_2$  et forme des  $O_2^{\bullet-}$ . Ils sont ensuite rapidement transformés (dismutés) en  $H_2O_2$  grâce à l'action d'une superoxyde dismutase (SOD). Le  $H_2O_2$  peut traverser librement les membranes biologiques (ce qui n'est pas le cas des  $O_2^{\bullet-}$ ). Dans le cytoplasme, il réagit avec un ion métallique ( $Fe^{2+}$  ou cuivre  $Cu^{2+}$ ) capable de catalyser la formation des radicaux  $OH^{\bullet}$  suivant la réaction de Fenton :  $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^{\bullet} + OH^- + Fe^{3+}$ . Il peut également générer des  $OH^{\bullet}$  en réagissant avec des  $O_2^{\bullet-}$  :  $H_2O_2 + O_2^{\bullet-} \rightarrow OH^{\bullet} + OH^- + O_2$  (réaction d'Haber-Weiss).

D'autres enzymes intracellulaires peuvent également produire des  $O_2^{\bullet-}$ , en plus petite quantité. Il s'agit notamment des NADPH oxydases (Nox), dont il existe 7 isoenzymes chez l'Homme, localisées selon le type cellulaire au niveau de la membrane plasmique, du réticulum endoplasmique (RE), des endosomes, du noyau ou des zones périnucléaires. De fait, le ratio entre la forme réduite et

la forme oxydée du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH/NADP<sup>+</sup>) est un indicateur du statut redox de la cellule. La xanthine oxydase (XO) localisée dans le cytoplasme et la cytochrome P450 réductase (POR) du RE sont également capables de synthétiser des O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Les oxydases des peroxysomes, quant à elles, peuvent produire directement du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Matés 2000, Clanton 2013, Chuong Nguyen 2015, Görlach 2015) (figure 9).



**Figure 9 : Génération des dérivés réactifs de l'oxygène et principaux mécanismes de défense antioxydants.**

Au cours de l'hypoxie, les anions superoxydes générés peuvent être dégradés par la SOD2 dans la mitochondrie et la SOD1 dans le cytoplasme (d'après Matés 2000 et Görlach 2015).

CAT : catalase ; Cu<sup>+</sup> : ion cuivre ; Fe<sup>2+</sup> : ion ferreux ; Fe<sup>3+</sup> : ion ferrique ; GPx : glutathion peroxydase ; GSH : glutathion réduit ; GS-SG : disulfure de glutathion oxydé ; GR : glutathion réductase ; H<sup>+</sup> : ion hydrogène ; H<sub>2</sub>O : eau ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène ; NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; Nox : NADPH oxydase ; O<sub>2</sub> : dioxygène ; O<sub>2</sub><sup>•-</sup> : anion superoxyde ; <sup>1</sup>O<sub>2</sub> : oxygène singulet ; OH<sup>-</sup> : ion hydroxyde ; OH<sup>•</sup> : radical hydroxyle ; POR : cytochrome P450 réductase ; RE : réticulum endoplasmique ; SOD : superoxyde dismutase ; XO : xanthine oxydase.

Enfin, dans les phagocytes, on peut citer la myéloperoxydase (MPO) qui génère des  $^1\text{O}_2$  à partir du  $\text{H}_2\text{O}_2$ , et les oxyde nitrique synthases (NOS) qui permettent la formation de dérivés réactifs de l'azote : le monoxyde d'azote sous sa forme radicalaire ( $\text{NO}^\bullet$ ) et de peroxynitrite ( $\text{ONO}_2^\bullet$ ), essentiels dans les réactions inflammatoires. Des dialogues peuvent s'établir entre les différents systèmes enzymatiques impliqués dans la synthèse de ROS : enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale, Nox, XO, NOS... ([Matés 2000](#))

#### *ii. Production exagérée de dérivés réactifs de l'oxygène en hypoxie*

Une production anormale de ROS peut être induite par l'hyperoxie, mais également de manière paradoxale par l'hypoxie. Dans ce deuxième cas, la surproduction de ROS est proportionnelle au degré d'hypoxie ([Chandel 1998](#), [Duranteau 1998](#)). Elle concerne initialement les  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , vraisemblablement produits en majorité dans l'espace intermembranaire mitochondrial par la semiquinone du complexe III de la chaîne respiratoire, par des mécanismes encore mal élucidés. Les  $\text{O}_2^{\bullet-}$  sont ensuite libérés dans le cytoplasme ([Guzy 2006](#), [Waypa 2010](#), [Clanton 2013](#)). Ils peuvent également être produits, en plus petite quantité, par les Nox (essentiellement Nox2 et Nox4 au niveau des CEA) ([Schumacker 2011](#), [Clanton 2013](#)). Certaines données expérimentales semblent indiquer que la production de ROS est importante en début d'exposition hypoxique et décroît pour une hypoxie chronique, mais des résultats contradictoires ont été rapportés ([Duranteau 1998](#), [Bell 2007](#), [Almendros 2014](#)). En tout état de cause, la production de ROS est maximale en cas d'exposition à une hypoxie intermittente chronique (HIC) ([Pialoux 2009](#), [Almendros 2014](#), [Lavie 2015](#)).

L'accumulation de ROS, notamment des radicaux  $\text{OH}^\bullet$  qui sont les plus délétères, est pourvoyeuse d'une toxicité cellulaire importante : peroxydations lipidiques, dommages oxydatifs de l'ADN avec formation de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), carbonylation des protéines et stress du RE avec altération de la capacité d'assemblage des protéines (*unfolded protein response*,

UPR). Ce stress oxydant peut aboutir à des dysfonctions cellulaires, voire induire une mutagenèse ou une apoptose. Il stimule également une réponse pro-inflammatoire, notamment par l'activation de la voie du NF- $\kappa$ B qui est sensible au statut redox des cellules. Ces mécanismes sont impliqués dans la physiopathologie d'un grand nombre de maladies cardio-respiratoires ([Matés 2000](#), [Santos 2009](#)). Afin de se prémunir d'une accumulation anormale de ROS, la cellule possède un système complexe de défenses antioxydantes.

## 2. Défenses antioxydantes

La plupart des molécules qui participent à la détoxification sont des enzymes pouvant neutraliser rapidement les ROS, dont certaines sont exprimées sous la dépendance du facteur de transcription *nuclear factor erythroid-2-related factor 2* (Nrf2). La première famille est représentée par les SOD, appartenant aux métalloprotéines, et dont il existe trois formes chez l'Homme : SOD1 (ou Cu,Zn-SOD) présente dans le cytoplasme et ayant pour cofacteurs les ions  $\text{Cu}^{2+}$  et zinc  $\text{Zn}^{2+}$ , SOD2 (ou Mn-SOD) se liant au manganèse  $\text{Mn}^{2+}$  dans la mitochondrie, et SOD3 (ou EC-SOD) qui est sécrétée dans le milieu extracellulaire et nécessite  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ . SOD1 et SOD2 sont présentes dans les CEA. Les SOD agissent en première ligne en dismutant les  $\text{O}_2^{\bullet -}$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  :  $\text{O}_2^{\bullet -} + \text{O}_2^{\bullet -} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ .

Les glutathion peroxydases (GPx) peuvent transformer le  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$ , et elles protègent également les cellules contre les peroxydations lipidiques en ayant pour substrat des peroxydes et des hydroperoxydes (portant un groupement ROOH). Il existe huit isoformes de GPx, tous n'étant pas exprimés dans les CEA. Ces réactions enzymatiques de détoxification nécessitent un glutathion réduit (GSH) qui est transformé en disulfure de glutathion oxydé (GS-SG) par une glutathion réductase (GR) :  $\text{ROOH} + 2 \text{GSH} \rightarrow \text{GS-SG} + \text{H}_2\text{O} + \text{ROH}$ . Ainsi, le rapport GSH/GS-SG est un indicateur de l'état d'oxydation de la cellule. D'autres enzymes appartenant à la même famille des thiol peroxydases, ont des mécanismes d'action assez proches : peroxyrédoxines, thiorédoxines et thiorédoxines réductases (comme la flavine).

La catalase, localisée dans le cytoplasme et dans les peroxysomes, détoxifie l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau en présence de ses cofacteurs (fer, cuivre et possiblement le manganèse) :  $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ .

Les enzymes séquestrant des ions métalliques catalysant la réaction de Fenton (transferrine, ferritine et lactoferrine pour Fe<sup>2+</sup>, céruléoplasmine pour Cu<sup>2+</sup>) inhibent la formation d'OH<sup>•</sup>, ainsi que les peroxydations lipidiques qui nécessitent elles aussi des ions métalliques. La céruléoplasmine possède également une activité ferroxidase, catalysant l'oxydation des Fe<sup>2+</sup> en Fe<sup>3+</sup>. D'autres enzymes de phase II ont également des propriétés antioxydantes : la NADPH quinone oxydoréductase 1 (NQO-1), l'époxyde hydrolase 1 (EPHX-1), l'hème oxygénase 1 (HO-1).

Enfin, les cellules possèdent également des défenses antioxydantes non enzymatiques. Le GSH notamment possède une activité antioxydante propre grâce à son radical thiol R-SH. La N-acétylcystéine (NAC), acide aminé non essentiel, est un précurseur du glutathion permettant de maintenir un *pool* de GSH élevé dans la cellule, ou peut aussi réagir directement avec les ROS du fait de son radical thiol. D'autres molécules participent à la détoxification en captant le radical des ROS, qu'elles soient endogènes (acide urique, bilirubine, acide lipoïde, ubiquinones -dont le coenzyme Q<sub>10</sub>-, NADPH, cytochrome C...) ou apportées par l'alimentation (vitamines A, C et E, caroténoïdes, polyphénols, flavonoïdes). Enfin, certaines protéines comme l'albumine et les métallothionéines peuvent fixer des ions métalliques, notamment Cu<sup>2+</sup> ([Matés 2000](#), [Boutten 2011](#)).

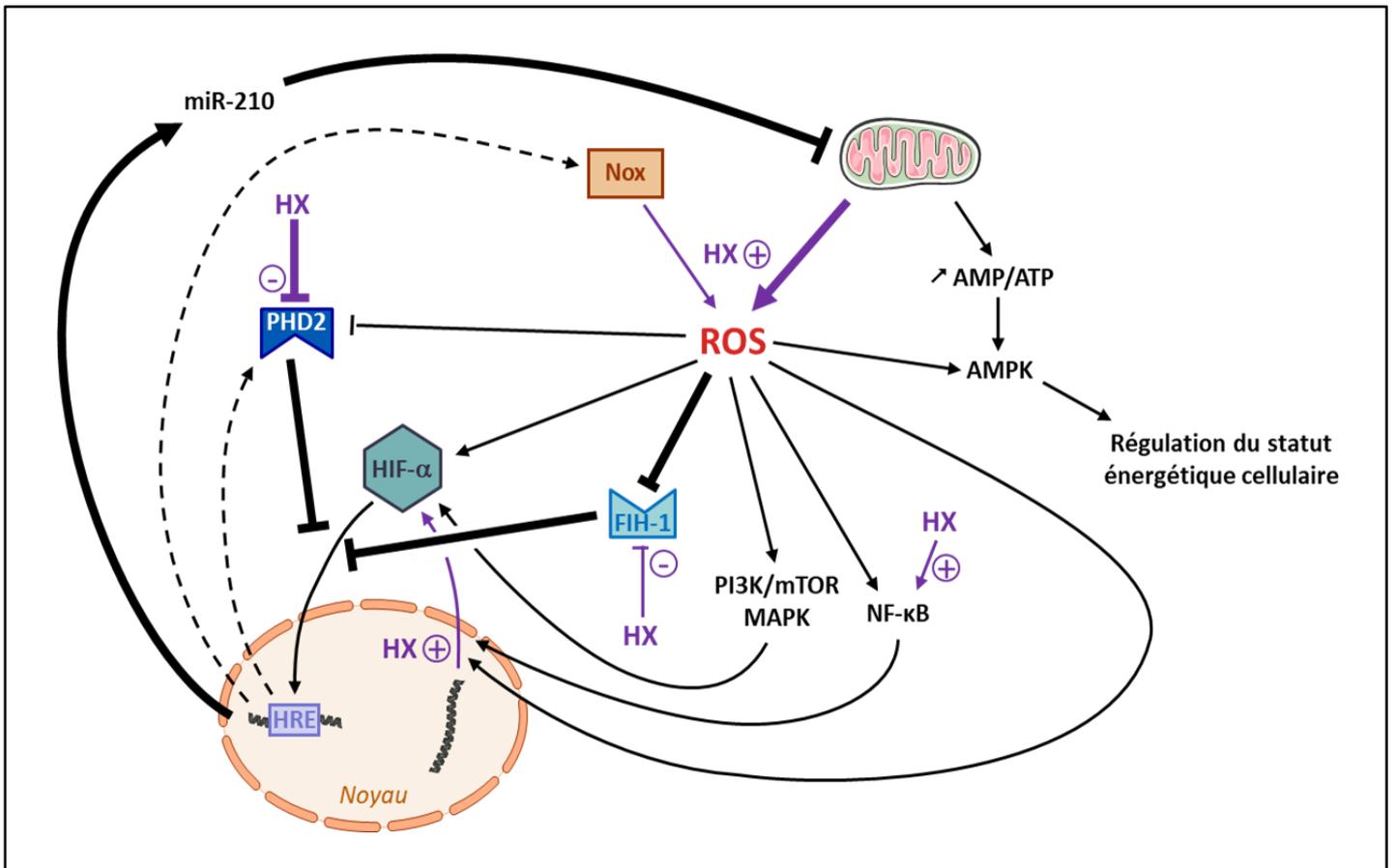
### 3. Interactions entre des dérivés réactifs de l'oxygène et les facteurs de transcription induits par l'hypoxie

Comme évoqué précédemment, les ROS générés en hypoxie interviennent dans la stabilisation de HIF- $\alpha$  en inactivant PHD2, par transformation du Fe<sup>2+</sup> nécessaire à leur activité enzymatique en Fe<sup>3+</sup>. Ce *crossstalk* entre les deux grandes voies de réponse à l'hypoxie a initialement été mis en évidence pour PHD2, sur des cellules A549 ne présentant pas de mitochondries ou par utilisation d'inhibiteurs des ROS mitochondriaux. Cet effet stabilisateur des ROS disparaissait

toutefois en anoxie complète ([Schroedl 2002](#), [Uchida 2004](#)). Il a par ailleurs été montré que les ROS stimulent la transcription et la traduction de HIF- $\alpha$  ([Bonello 2007](#)). Les ROS inhibent également l'activité enzymatique du FIH-1, mais alors que les PHD sont plus sensibles au niveau d'hypoxie que le FIH-1, l'inverse est observé quant à la réponse au stress oxydant ([Tian 2011](#), [Masson 2012](#)). Ceci montre que malgré leurs similitudes, les mécanismes des deux principaux régulateurs de la stabilité de HIF ne se chevauchent pas totalement. Une autre manière par laquelle les ROS pourraient activer la signalisation HIF est l'activation des voies PI3K/mTOR ou MAPK. De manière contradictoire, le stress oxydant pourrait en revanche inhiber le recrutement de p300 ou CBP et diminuer la liaison de HIF à l'ADN ([Görlach 2015](#)) (*figure 10*).

En retour, HIF-1 $\alpha$  exerce également une action sur la génération des ROS. Bien que Nox2 et Nox4 soient des cibles transcriptionnelles de HIF-1 $\alpha$ , l'action globale aboutit à terme à une diminution de la production de ROS ([Wheaton 2011](#), [Semenza 2011](#)). Les mécanismes sont multiples et encore incomplètement élucidés. Parmi ceux-ci, HIF-1 $\alpha$  active la transcription des micro-ARN miR-210 qui vont inhiber la production de ROS mitochondriaux ([Chan 2009](#)). HIF-1 $\alpha$  possède d'autres cibles transcriptionnelles qui vont diminuer la production de ROS : Bnip-3 qui active l'autophagie des mitochondries, la lactate déshydrogénase A (LDHA), la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK1) et la cyclo-oxygénase 4-2 (COX4-2) qui vont perturber le fonctionnement mitochondrial ([Semenza 2011](#)).

Au total, le mécanisme principal par lequel les mitochondries participent à l'*O<sub>2</sub>-sensing* n'est pas l'inhibition de la phosphorylation oxydative survenant pour des hypoxies profondes, mais plutôt les modifications du statut redox de la chaîne de transport des électrons induisant la production de ROS pour des diminutions plus modérées de la disponibilité en O<sub>2</sub>. Quant à HIF- $\alpha$ , son rôle ne serait pas tant d'induire la glycolyse anaérobie pour maintenir la production d'ATP, que d'inhiber le fonctionnement mitochondrial afin d'éviter une production exagérée de ROS en hypoxie très délétère pour la cellule ([Schumacker 2011](#), [Wheaton 2011](#), [Semenza 2011](#)).



**Figure 10 : Exemples d'interactions entre les différentes voies de l'*oxygen-sensing*.**

Les mécanismes principaux sont représentés en gras, ceux dépendant directement de l'hypoxie (HX) sont représentés en violet (d'après [Chandel 2010](#), [Wheaton 2011](#) et [Semenza 2011](#)).

AMP : adénosine monophosphate ; AMPK : *AMP-activated protein kinase* ; ATP : adénosine triphosphate ; FIH-1 : *factor inhibiting HIF 1* ; PHD2 : *prolyl hydroxylase domain-containing protein 2* ; HIF- $\alpha$  : *hypoxia inducible factor  $\alpha$*  ; HRE : *hypoxia response element* ; HX : hypoxie ; MAPK : *mitogen-activated protein kinases* ; mTOR : *mammalian target of rapamycin* ; Nox : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase ; PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase ; ROS : dérivés réactifs de l'oxygène.

### C. Particularités de l'hypoxie intermittente

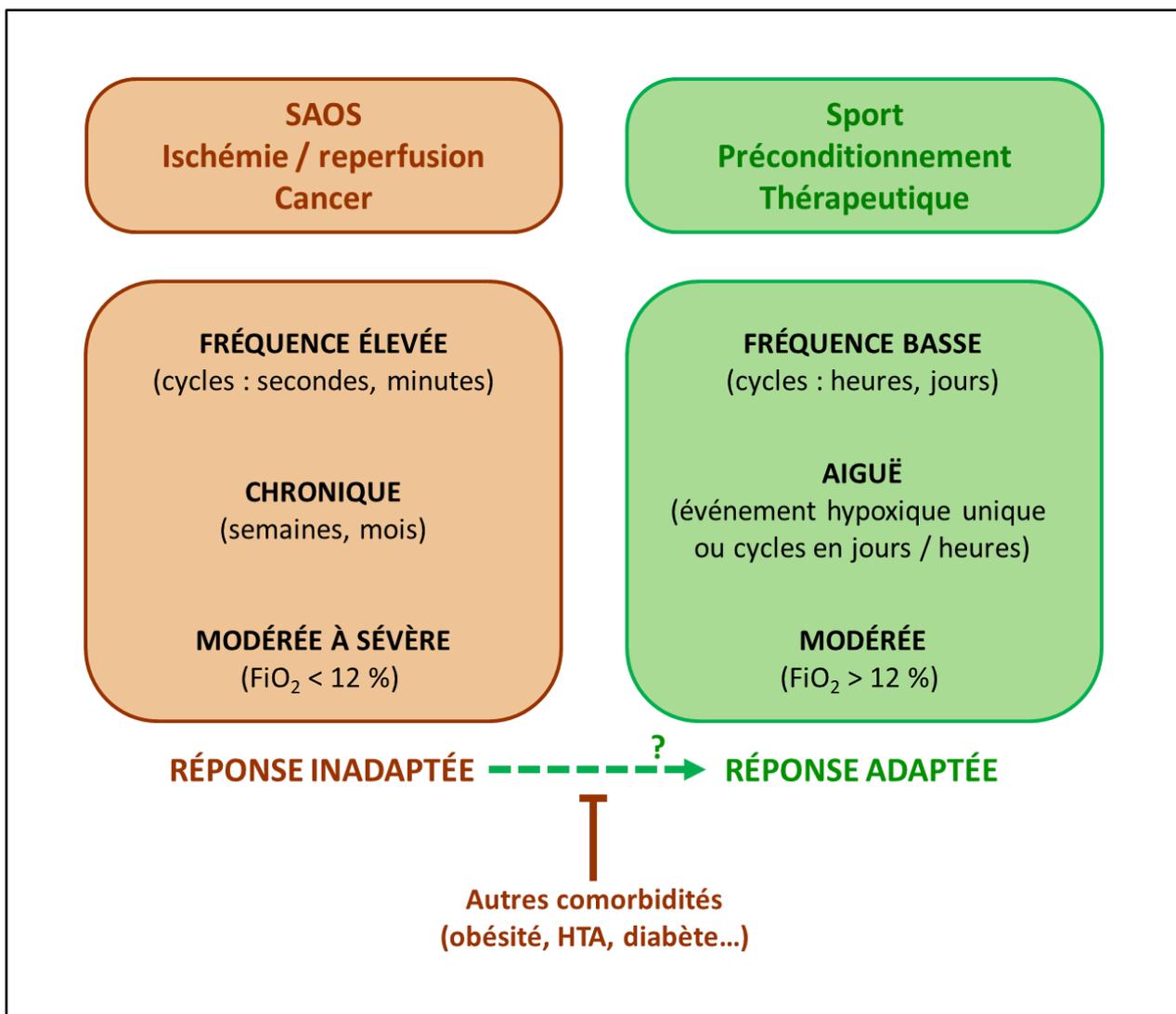
#### 1. Paradoxe de l'hypoxie intermittente

Les épisodes répétés d'hypoxie / réoxygénation au cours de l'hypoxie intermittente (HI) ont des conséquences très différentes de l'exposition à une hypoxie continue. Ils ont été largement étudiés dans le cadre du SAOS au cours duquel l'obstruction des voies aériennes supérieures par les tissus mous du pharynx pendant le sommeil entraîne une diminution (hypopnée) ou un arrêt de la ventilation (apnée) pendant des épisodes pouvant durer entre 10 et 40 secondes. Le SAOS est donc

responsable de désaturations parfois profondes et fréquentes, suivies d'une réoxygénation. D'autres phénomènes se produisent du fait des apnées : une hypercapnie intermittente (concomitante des apnées ou hypopnées), des efforts respiratoires (afin de restaurer un débit ventilatoire) générant des contraintes mécaniques thoraco-abdominales et des éveils ou micro-éveils qui fragmentent le sommeil ([Lévy 2015](#)). Le SAOS est pourvoyeur d'effets délétères sur les plans cardiovasculaire (hypertension artérielle systémique, arythmie, athérosclérose), métabolique (insulinorésistance, obésité) et cognitif (sommolence, troubles de la mémoire et des fonctions supérieures, dépression). Le stress oxydant généré par les épisodes d'hypoxie / réoxygénation occupe une part prépondérante dans la pathogénie des manifestations cardiovasculaires et métaboliques ([Prabhakar 2012](#), [Almendros 2014](#), [Lévy 2015](#), [Lavie 2015](#)). L'HI est également rencontrée lors des phénomènes d'ischémie / reperfusion au cours desquels la circulation est interrompue dans des tissus irrigués par une artère terminale (artériopathie, spasme artériel, arrêt cardio-respiratoire...) ou au cours de la tumorigenèse. La production de ROS dans ces conditions est également très importante ([Almendros 2014](#)).

En fait, au cours des maladies cardio-respiratoires, les patients sont plus souvent soumis à des hypoxies de niveaux variables qu'à des hypoxies profondes et chroniques ; à l'inverse l'HI ne semble pas correspondre à un stimulus physiologique. Pour autant, l'HI peut présenter des effets bénéfiques, qui sont notamment utilisés dans le sport et dans la prévention ou le traitement de certaines maladies cardiovasculaires ou neurologiques (préconditionnement et post-conditionnement). La balance entre effets bénéfiques et délétères dépend essentiellement de la capacité de l'organisme à développer des mécanismes d'adaptation à l'HI, selon le type d'exposition elle-même (fréquence, sévérité, durée) et selon le terrain sous-jacent (âge, sexe, prédispositions génétiques, comorbidités). Ainsi, les effets bénéfiques sont généralement expliqués par une réponse dite adaptée, consécutive à une HI de sévérité modérée, de durée limitée et de faible fréquence ([Prabhakar 2012](#), [Almendros 2014](#), [Lavie 2015](#)) (*figure 11*). Par exemple, l'exposition de souris à un préconditionnement hypoxique intermittent de courte durée et de faible sévérité (8 % O<sub>2</sub> pendant 10

min / 21 % O<sub>2</sub> pendant 10 min ; répété sur 6 cycles) permettait d'allonger leur survie par rapport aux souris témoins lorsqu'elles étaient secondairement exposées à une hypoxie létale. Cet effet bénéfique du préconditionnement passait notamment par un rôle protecteur vis-à-vis des CEA de type I avec une meilleure préservation de l'imperméabilité de l'épithélium alvéolaire et, consécutivement, une protection contre l'œdème alvéolaire ([Zhang 2004](#), [Zhang 2009](#)).



**Figure 11 : Réponses adaptée et inadaptée à l'hypoxie intermittente.**

Une hypoxie intermittente modérée, de fréquence basse et de courte durée peut générer des adaptations protectrices spécifiques à certaines cellules, certains tissus ou certains organes. Des mécanismes adaptatifs bénéfiques ont été décrits pour des hypoxies intermittentes de *pattern* péjoratif (hypoxie sévère, haute fréquence, de longue durée) (d'après [Almendros 2014](#)).

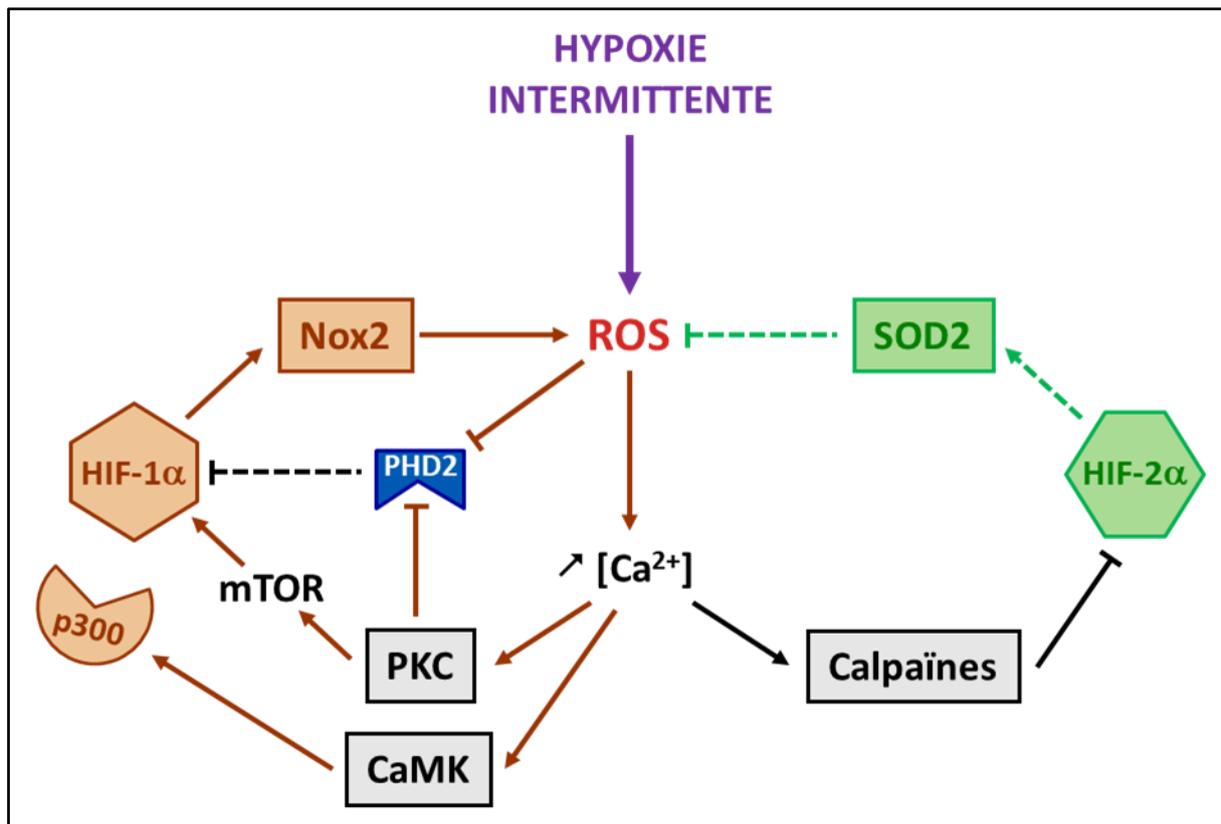
FiO<sub>2</sub> : fraction inspirée en oxygène ; HTA : hypertension artérielle systémique ; SAOS : syndrome d'apnées obstructives du sommeil.

## 2. Régulation des facteurs induits par l'hypoxie en hypoxie intermittente

Aux niveaux cellulaire et moléculaire, les effets délétères causés par l'HI sont consécutifs à la génération d'un stress oxydant important et l'activation de réponses inflammatoires, notamment par la voie du NF- $\kappa$ B. En effet, les oscillations de la disponibilité tissulaire en O<sub>2</sub> produisent des ROS en grande quantité et sont responsables d'une modification du profil d'expression de HIF- $\alpha$  ([Görlach 2008](#), [Prabhakar 2012](#), [Almendros 2014](#), [Lavie 2015](#)).

Contrairement à l'hypoxie continue ([Wang 1995](#)), on observe au cours de l'HI une *downregulation* de HIF-2 $\alpha$  et une *upregulation* de HIF-1 $\alpha$ , sans disparition lors du retour à la normoxie. L'exposition de cellules de phéochromocytome de rat à une HI profonde (nadir à 1,5% O<sub>2</sub>) et prolongée activait une surexpression de HIF-1 $\alpha$  par plusieurs voies : hyperproduction de ROS par le biais d'une hyperactivité de Nox2, activation de la protéine kinase C (PKC) permettant d'inhiber directement PHD2 et d'induire la voie mTOR, activation d'une calcium / calmoduline kinase (CaMK) favorisant le recrutement de p300 ([Yuan 2005](#), [Yuan 2008](#), [Yuan 2011](#)). *In vivo* chez des souris sauvages exposées à l'HI, l'utilisation d'un inhibiteur des ROS prévenait la surexpression de HIF-1 $\alpha$  ; à l'inverse la même exposition chez des souris partiellement déficientes en HIF-1 $\alpha$  prévenait l'augmentation des ROS, confirmant la présence d'une boucle d'amplification entre Nox2 et HIF-1 $\alpha$  expliquant au moins en partie la présence d'un stress oxydant persistant en HIC ([Peng 2006](#), [Yuan 2011](#)). Par ailleurs, dans plusieurs types cellulaires, l'HI aboutissait à une répression de l'expression de HIF-2 $\alpha$  dépendante des calpaïnes, des protéases activées par le calcium (Ca<sup>2+</sup>), et indépendante des PHD. Cette répression de HIF-2 $\alpha$  était associée à une diminution de la SOD2 ([Nanduri 2009](#)).

Ainsi, l'HI entraîne un déséquilibre avec production d'un stress oxydant par la voie HIF-1 $\alpha$ , contrairement à ce qui est observé en hypoxie continue, et répression de l'action antioxydante de la voie HIF-2 $\alpha$ . Ces effets dépendent de la signalisation calcique intracellulaire (*figure 12*). Ce profil transcriptionnel pro-oxydant est également favorisé en HIC par des méthylations de l'ADN ([Nanduri 2017](#)).



**Figure 12 : Régulation différentielle de HIF-1α et HIF-2α en hypoxie intermittente.**

HIF-2α est dégradé par des protéases activées par l'augmentation de la concentration de calcium intracytoplasmique, alors que d'autres enzymes calcium-dépendantes favorisent la synthèse, la stabilisation et l'activité de HIF-1α. En outre, les ROS inhibent directement l'activité enzymatique de PHD2 (d'après [Prabhakar 2012](#)).

[Ca<sup>2+</sup>] : concentration intracytoplasmique en ion calcium ; CaMK : calcium / calmoduline kinase ; HIF : facteur de transcription induit par l'hypoxie ; mTOR : *mammalian target of rapamycin* ; Nox2 : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase 2 ; PKC : protéine kinase C ; PHD2 : *prolyl hydroxylase domain-containing protein 2* ; ROS : dérivés réactifs de l'oxygène ; SOD2 : superoxyde dismutase 2.

L'ensemble des réponses à l'hypoxie impliquent donc un grand nombre de voies de signalisation, parmi lesquelles HIF et son répertoire traductionnel, ainsi que la production de ROS, jouent des rôles prépondérants. De multiples interactions et boucles de régulation peuvent être mises en jeu, selon le contexte et le type cellulaire.

### III. Exemples de pathologies du poumon profond avec hypoxie alvéolaire impliquant les cellules épithéliales alvéolaires

Par proximité anatomique, les pathologies du poumon profond ont des répercussions sur le fonctionnement normal des CEA : par l'hypoxie alvéolaire qu'elles génèrent, la fréquente inflammation locale, l'éventuel stress mécanique, etc. A l'inverse, le dysfonctionnement des CEA fait partie intégrante de la physiopathologie d'un œdème alvéolaire ou d'une FPI. En effet, l'œdème alvéolaire représente un modèle d'hypoxie aiguë au cours duquel l'altération de la fonction des CEA participe à la pérennisation du processus par mauvaise résorption du fluide alvéolaire. Par ailleurs, les CEA semblent être le point de départ de la FPI, au cours de laquelle elles sont exposées à une hypoxie chronique ± une hypoxie intermittente (notamment en cas d'association fréquente avec un SAOS).

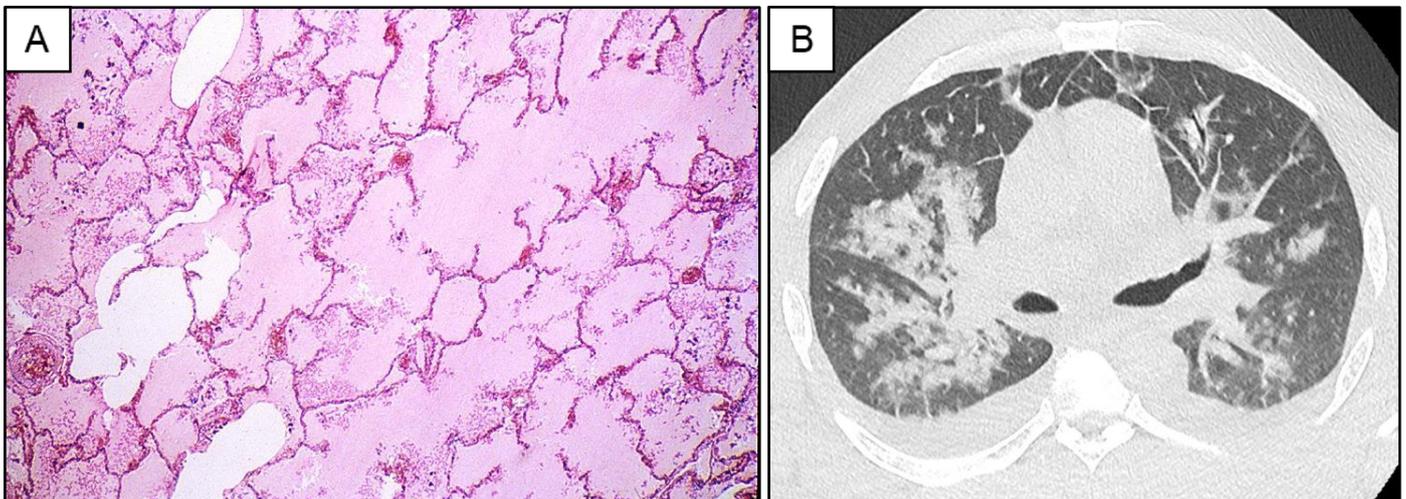
#### A. Œdème pulmonaire

L'œdème pulmonaire est une complication fréquente de certains états pathologiques (notamment la défaillance cardiaque gauche et le syndrome de détresse respiratoire aiguë, SDRA) ou de certaines conditions environnementales (montée en haute altitude, inhalation de gaz toxiques). Il est caractérisé par une fuite de liquide hors des espaces microvasculaires pulmonaires qui s'accumule dans le tissu interstitiel puis peut, au stade ultime, inonder l'alvéole, compromettant ainsi très sévèrement les échanges gazeux et mettant en jeu le pronostic vital. Naturellement, l'organisme possède des mécanismes de défense contre la constitution d'un œdème alvéolaire (*figure 13*).

##### 1. Constitution d'un œdème pulmonaire

D'un point de vue physiopathologique, on considère trois compartiments juxtaposés : les espaces microvasculaires représentés par les capillaires pulmonaires, les espaces extravasculaires interstitiels, et les espaces alvéolaires ; chaque compartiment étant caractérisé par sa pression

hydrostatique ( $P$ ) et sa pression oncotique ( $\pi$ ). L'œdème pulmonaire est en premier lieu la conséquence d'anomalies d'échanges liquidiens entre les deux premiers, avec une majoration du flux sortant aboutissant à l'augmentation du volume de l'interstitium pulmonaire. Les mouvements liquidiens à travers la paroi capillaire sont régis par l'équation de Starling, stipulant que le flux sortant des vaisseaux (noté  $\dot{Q}_{H_2O}$ ) dépend des différences de pression hydrostatique et de pression oncotique entre le capillaire pulmonaire et l'interstitium :  $\dot{Q}_{H_2O} = K_f \cdot [(P_{mv} - P_{int}) - \sigma (\pi_{mv} - \pi_{int})]$  où  $K_f$  est le coefficient de filtration (la conductance aqueuse de la barrière endothéliale ou perméabilité hydraulique, dépendant de sa perméabilité et de sa surface), et  $\sigma$  le coefficient de réflexion des protéines ([Saumon 1999](#), [Murray 2011](#), [West 2017](#)) (figure 14).



**Figure 13 : Images représentatives d'un œdème pulmonaire hydrostatique (œdème aigu du poumon).**

**A :** Vue histologique en microscopie optique à moyen grossissement montrant des alvéoles remplies d'un matériel rose homogène correspondant à l'œdème, et des capillaires septaux engorgés de sang ; coloration hématoxyline éosine (propriété de l'[Université de Duke](#)). **B :** Vue tomodensitométrique montrant des opacités alvéolaires péri-hilaires en ailes de papillon, un épaissement des septa alvéolaires, et des épanchements pleuraux bilatéraux (aimablement fournie par le Pr PY. Brillet).

## 2. Les deux types d'œdème pulmonaire

L'augmentation du flux sortant des microvaisseaux pulmonaires est soit la résultante d'une majoration de la pression hydrostatique ( $P_{mv}$ ), générant un œdème dit de perfusion ; soit la conséquence d'une diminution du pouvoir de restriction de la barrière endothéliale au passage des protéines ( $\sigma$ ), responsable d'un œdème de perméabilité ou œdème lésionnel.

*i. Œdème pulmonaire de perfusion (et mécanismes de défense)*

Un œdème de perfusion ou œdème hydrostatique peut survenir lorsque  $P_{mv}$  devient très supérieure à  $P_{int}$  (augmentation importante du gradient de pression  $\Delta P$ ) en situation d'hypertension pulmonaire post-capillaire : augmentation de la pression veineuse en cas d'insuffisance cardiaque gauche (œdème aigu du poumon, OAP) ou plus rarement de maladie veino-occlusive pulmonaire. Moins fréquemment, il peut s'agir d'une obstruction du réseau lymphatique, par exemple par une tumeur, responsable d'une accumulation de liquide dans l'espace interstitiel. A l'inverse, la diminution de  $\pi_{mv}$  lors d'une hypoalbuminémie profonde (consécutives à un syndrome néphrotique, une entéropathie exsudative ou une dénutrition extrême), pourtant responsable d'une diminution du gradient  $\Delta\pi$  favorisant l'augmentation de la filtration, ne génère pas d'œdème pulmonaire alors qu'elle peut être responsable d'un tableau d'anasarque avec épanchements pleuraux, ascite et œdèmes périphériques. Cette différence tient à la valeur relativement élevée de la  $\pi_{int}$  intrapulmonaire, alors qu'elle est quasiment nulle dans les tissus périphériques. En revanche, cette augmentation de filtration consécutive à une diminution de  $\Delta\pi$  sensibilise la survenue d'un œdème en cas de majoration concomitante de la pression veineuse. Dans tous les cas, le fluide accumulé dans l'interstitium ( $\pm$  les alvéoles) est un transsudat, c'est-à-dire faible en protéines, car le coefficient de réflexion de la barrière endothéliale est normal.

Dans le cas d'un œdème hydrostatique consécutif à une défaillance cardiaque, plusieurs mécanismes de défense sont disponibles pour préserver la zone des échanges gazeux. Premièrement, la sortie importante d'un fluide pauvre en protéine majeure  $\pi_{mv}$ , créant une augmentation de  $\Delta\pi$  qui contrecarre environ pour moitié celle de  $\Delta P$  et limite le flux net sortant. Cet excès de fluide dans l'interstitium peut, jusqu'à un certain point, être drainé par le réseau lymphatique qui a la capacité de multiplier son débit par un facteur 10 à 20. Par ailleurs, le compartiment interstitiel est très compliant et peut majorer son volume de 30 à 50 % sans que la  $P_{int}$  n'augmente. Tous ces mécanismes peuvent prévenir ou diminuer la constitution d'un œdème

interstitiel. S'ils sont débordés, les CEA constituent le dernier rempart contre l'inondation alvéolaire, qui fait toute la sévérité de l'œdème pulmonaire. L'épithélium alvéolaire est environ 100 fois moins perméable que la barrière endothéliale, du fait notamment de la grande surface couverte par chaque CEA de type I qui raréfie les jonctions intercellulaires, et grâce aux propriétés du surfactant qui maintient la  $P_{int}$  dans les zones péri-alvéolaires (par rapport au reste du compartiment interstitiel) ([Saumon 1999](#), [Murray 2011](#), [West 2017](#)).

## ii. Œdème pulmonaire de perméabilité

Au cours d'un œdème de perméabilité (œdème lésionnel), le *primum movens* est une augmentation importante de la perméabilité endothéliale, se traduisant par une augmentation du  $K_f$  et une diminution du  $\sigma$ , et aboutissant à la fuite d'un exsudat riche en protéines (et en cellules de l'immunité) dans l'interstitium. Lorsque cet œdème est sévère, il constitue l'entité clinique dénommée SDRA, présentant un taux de mortalité de 22 %. Cette augmentation de la perméabilité endothéliale peut être secondaire à une toxicité directe (inhalation de liquide gastrique ou d'un gaz toxique, hyperoxie), ou indirecte, en réponse à un processus inflammatoire pulmonaire ou systémique avec accumulation de PNN dans les capillaires pulmonaires (pneumopathie infectieuse bactérienne ou virale, sepsis, pancréatite, polytraumatisme, phénomènes d'ischémie / reperfusion après une transplantation pulmonaire...)

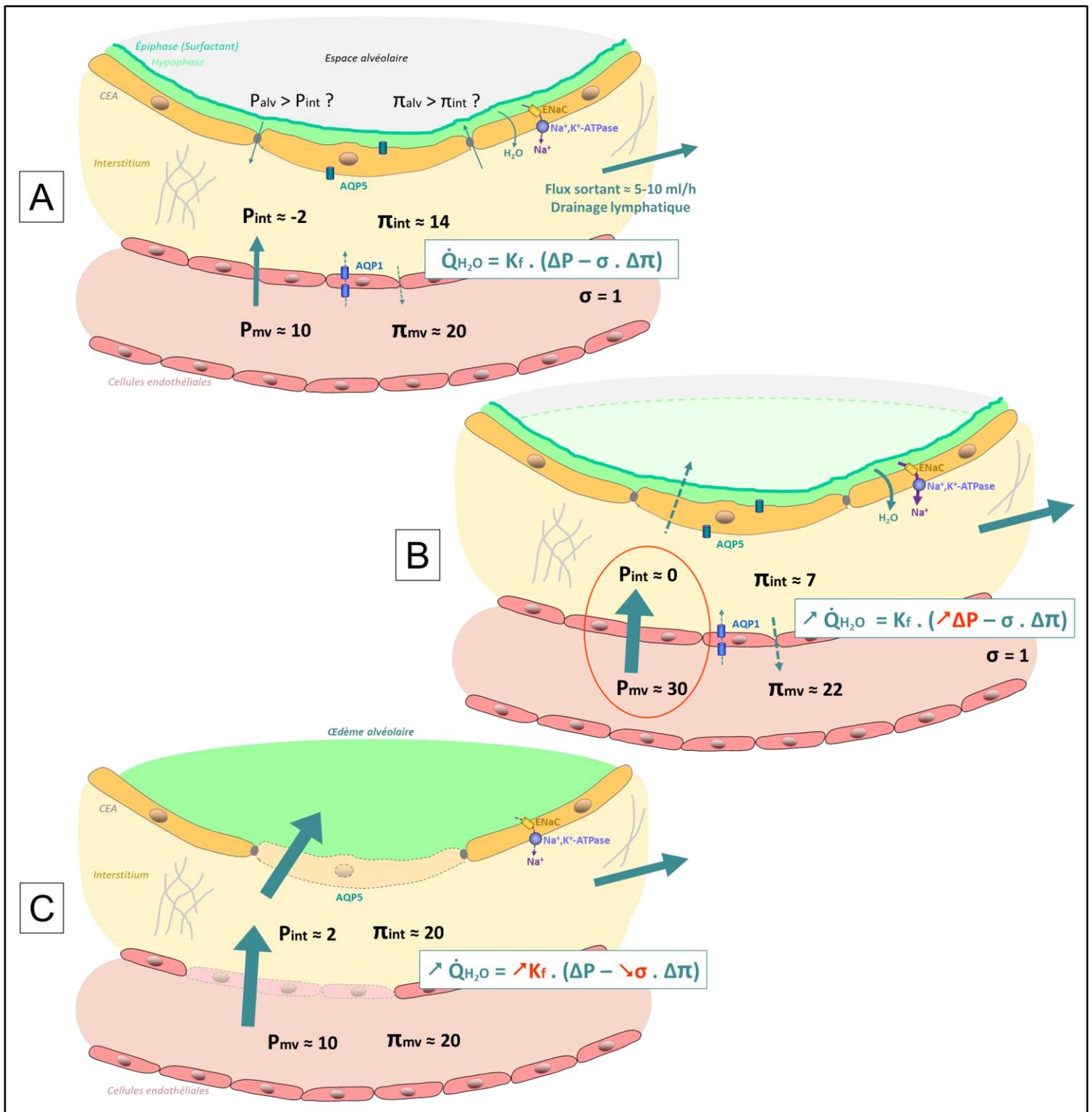
Le système respiratoire est moins bien protégé de l'œdème dans ce cas de figure : il n'y a pas en théorie de modification de la compliance du compartiment interstitiel ni des capacités de drainage du réseau lymphatique, mais la barrière endothéliale laissant passer du plasma pur ou quasiment pur, le  $\Delta\pi$  qui inhibe habituellement la sortie de liquide est fortement diminué voire aboli. Surtout, l'épithélium alvéolaire peut être également lésé, notamment les CEA de type I, ce qui augmente dramatiquement sa perméabilité et favorise grandement l'inondation alvéolaire ([Montaner 1986](#)). L'œdème alvéolaire est très inflammatoire, caractérisé par une entité

anatomopathologique dénommée dommage alvéolaire diffus, avec dépôts intra-alvéolaires fibrineux (membranes hyalines). Ceci explique la gravité du SDRA, au cours duquel les échanges gazeux sont très altérés, et qui nécessite une prise en charge réanimatoire avec ventilation mécanique du patient par une sonde d'intubation, à hauts niveaux de fraction inspirée en oxygène ( $FiO_2$ ). Le rapport  $PaO_2 / FiO_2$ , correspondant à la  $PaO_2$  obtenue sur les gaz du sang en fonction de la quantité d' $O_2$  fournie au patient, est un marqueur de sévérité du SDRA. Après cette phase initiale exsudative, le SDRA peut cicatriser en deux étapes appelées phase proliférative (prolifération de CEA de type II et de fibroblastes) et phase résolutive, pouvant laisser des séquelles fibrosantes avec dépôts de collagène ([Saumon 1999](#), [Murray 2011](#), [Matthay 2012](#), [West 2017](#)).

Parallèlement, le système respiratoire présente également une altération des capacités de résorption en cas d'œdème lésionnel, par rapport à un œdème hydrostatique.

### 3. Résolution de l'œdème alvéolaire

En cas d'œdème alvéolaire constitué, le principal mécanisme de résorption est initié par la réabsorption transépithéliale active de sodium, essentiellement via les canaux ENaC et les pompes  $Na^+,K^+$ -ATPases, suivie d'une réabsorption passive de  $Cl^-$  et d'eau. Ce mécanisme est stimulé par la sécrétion de catécholamines endogènes en réponse à l'œdème et au stress ([Pittet 1994](#)). Toutefois, l'efficacité de ce transport vectoriel d'ions et d'eau suppose que la barrière épithéliale alvéolaire soit intacte, ce qui n'est généralement pas le cas dans l'œdème lésionnel. En effet, la CFA était maintenue chez 75 % de 65 patients hospitalisés en réanimation et ventilés mécaniquement pour un OAP ([Verghese 1999](#)), alors que ce chiffre n'était que de 44 % chez 79 patients pris en charge dans des conditions similaires pour un SDRA ([Ware 2001](#)). La moitié des OAP avec CFA conservée présentaient même une CFA considérée comme maximale (c'est-à-dire  $\geq 14$  %/h), soit 38 % des 65 patients au total, contre seulement 13 % en cas de SDRA. Dans tous les cas, la préservation de la CFA était associée à un meilleur pronostic en termes de survie et de durée de ventilation mécanique.



**Figure 14 : Représentations schématiques de la physiopathologie de l'œdème pulmonaire.**

**A** : En conditions physiologiques, il existe une filtration de fluide continue des capillaires pulmonaires vers l'interstitium, due au gradient de pression hydrostatique entre ces deux compartiments. L'excès de fluide interstitiel est pris en charge par le réseau lymphatique (cheminant en aval le long des axes péri-bronchovasculaires). Le volume de l'hypophase est régulé par la réabsorption active de  $\text{Na}^+$  de l'alvéole vers l'interstitium. Les valeurs de pression sont indicatives (unité : mmHg). **B** : Lors d'un œdème hydrostatique cardiogénique secondaire à une défaillance cardiaque gauche, l'augmentation de  $P_{mv}$  augmente le flux net sortant. Lorsque le réseau lymphatique ne peut plus assurer le drainage du fluide interstitiel en excès, une inondation alvéolaire est possible. **C** : Lors d'un œdème lésionnel, la perméabilité endothéliale au fluide et aux protéines est très augmentée, et de manière fréquente la perméabilité épithéliale alvéolaire également, augmentant grandement le risque d'œdème alvéolaire (d'après Murray 2011).

AQP : aquaporine ; CEA : cellule épithéliale alvéolaire ; ENaC : canal sodique épithélial ;  $\text{H}_2\text{O}$  : eau ;  $K_f$  : conductance aqueuse de la barrière endothéliale ;  $\text{Na}^+$  : ion sodium ;  $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$  : sodium-potassium adénosine triphosphatase ;  $P_{alv}$  : pression hydrostatique alvéolaire ;  $\pi_{alv}$  : pression oncotique alvéolaire ;  $P_{int}$  : pression hydrostatique interstitielle ;  $\pi_{int}$  : pression oncotique interstitielle ;  $P_{mv}$  : pression hydrostatique microvasculaire ;  $\pi_{mv}$  : pression oncotique microvasculaire ;  $\dot{Q}_{\text{H}_2\text{O}}$  : débit aqueux sortant des capillaires pulmonaires ;  $\sigma$  : coefficient de réflexion des protéines de la barrière endothéliale

Mise à part l'intégrité de l'épithélium alvéolaire, d'autres facteurs peuvent expliquer une altération plus importante de la CFA dans le SDRA. Premièrement, il s'agit d'un œdème riche en leucocytes, sécrétant une grande quantité de ROS et de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-8, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ...) qui vont inhiber l'expression et l'activité des canaux ENaC et des pompes Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPases. Par ailleurs, la toux avec expectoration de liquide alvéolaire représente un moyen annexe de résorption de l'œdème, ce qui est impossible chez un patient sédaté et ventilé. Enfin, l'hypoxie alvéolaire est généralement plus marquée dans le SDRA, et elle inhibe également le transport transépithélial de Na<sup>+</sup> ([Matthay 2012](#)).

#### 4. Modification de l'homéostasie liquidienne alvéolaire en réponse à l'hypoxie

Les effets de l'hypoxie sur le transport de Na<sup>+</sup> ont été évalués sur des modèles variés. *In vivo*, les travaux de plusieurs équipes ont montré que l'exposition de rats à une hypoxie modérée (8 % O<sub>2</sub> pendant 6 à 24 h) induisait une diminution progressive de la CFA, réversible après 24 h de réoxygénation ([Vivona 2001](#), [Litvan 2006](#)). Cette inhibition fonctionnelle était post-transcriptionnelle, elle concernait la portion AML-sensible du transport de Na<sup>+</sup>, c'est-à-dire médiée par ENaC, et était totalement réversible par les  $\beta_2$ -agonistes ([Vivona 2001](#)). Dans un autre travail, il avait été montré que l'altération de la CFA s'accompagnait d'une diminution de l'expression de la Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase à la membrane basolatérale, avec restauration de cette expression après traitement par la terbutaline ([Litvan 2006](#)). Ces données ont été corroborées chez l'Homme, dans une étude randomisée chez 37 sujets exposés à l'hypoxie en haute altitude qui a montré que l'inhalation prophylactique d'agonistes  $\beta_2$ -adrénergiques limitait le risque de développer un œdème pulmonaire chez des sujets prédisposés au mal aigu des montagnes ([Sartori 2002](#)).

L'activité et l'expression d'ENaC et de la Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase ont également été évaluées dans des cultures primaires de pneumocytes de rat ou des lignées cellulaires d'origine humaine. Ces modèles *in vitro* reproduisaient les résultats obtenus *in vivo* avec une inhibition du transport transépithélial de

Na<sup>+</sup> globalement proportionnelle à la durée et à la sévérité de l'hypoxie ([Planès 1996](#)). Lors d'expositions prolongées à une hypoxie sévère (0-1 % O<sub>2</sub> pendant 12 h ou plus), la transcription des sous-unités d'ENaC et de la Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase pouvait être affectée ([Planès 1997](#)). Toutefois, la réoxygénation des cellules permettait de restaurer le transport transépithélial ([Mairbäurl 1997](#)). Dans les expositions hypoxiques de courte durée (maintenues moins de 12 h) ou de sévérité modérée, cette altération du transport de Na<sup>+</sup> était due à une altération de l'activité de ces transporteurs membranaires sans modification significative de leur quantité cellulaire totale, mais secondaire à une réduction de leur expression de surface. ([Planès 2002](#)). Les mécanismes précis impliqués dans la diminution d'expression membranaire ont été mieux étudiés pour la Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase et semblent secondaires à une majoration de son endocytose, sous la dépendance de la production de ROS mitochondriaux. En effet, des travaux expérimentaux ont montré que les ROS étaient capables d'activer l'AMPK, qui elle-même recrutait la PKCζ nécessaire pour initier le signal de l'endocytose des pompes. Cette voie de signalisation était inhibée par des enzymes antioxydantes telle que SOD2 ou la catalase ([Dada 2003](#), [Comellas 2006](#), [Litvan 2006](#), [Gusarova 2009](#)). Concernant ENaC, l'effet de l'hypoxie pourrait passer, entre autres, par une désorganisation du cytosquelette ([Bouvry 2006](#)), toutefois les mécanismes impliqués sont encore mal connus. Cette question a fait l'objet de la première partie de ce travail de thèse.

## B. Fibrose pulmonaire idiopathique

La FPI appartient au groupe des pneumopathies interstitielles diffuses (PID) chroniques, un ensemble de plus de 200 maladies rares, caractérisées par l'infiltration diffuse de la charpente conjonctive du poumon, fréquemment associée à des anomalies du revêtement épithélial alvéolaire adjacent. Elles peuvent également concerner les voies aériennes et/ou les vaisseaux pulmonaires. L'infiltrat peut initialement être constitué de cellules inflammatoires, et de lésions de fibrose avec ou sans distorsion de l'architecture des zones d'échanges gazeux alvéolo-capillaires. Les PID sont séparées en 4 grandes catégories : PID de causes connues (médicaments, connectivites / vascularites,

expositions environnementales ou professionnelles...), pneumopathies interstitielles idiopathiques (PII), granulomatoses épithélioïdes et géantocellulaires, et le groupe des PID particulières (comportant entre autres l'histiocytose à cellules de Langherans, la lymphangioléiomyomatose, la pneumopathie chronique à éosinophiles). Les affections les plus fréquentes sont représentées par la sarcoïdose (prototype de la granulomatose), les pneumopathies de connectivites / vascularites, et la FPI ([ATS/ERS 2002](#), [Travis 2013](#)).

## 1. Données générales

La FPI est la plus fréquente des PII et la plus sévère des PID. C'est une maladie chronique, apparaissant quasi-constamment après 50 ans, limitée au poumon, responsable d'une altération progressive et irréversible de la fonction respiratoire menant à l'insuffisance respiratoire chronique et habituellement au décès du patient. Malgré des progrès notables réalisés durant la dernière décennie, le pronostic reste sombre avec une médiane de survie actuellement comprise entre 3 et 5 ans.

### *i. Épidémiologie*

La FPI est une maladie de la seconde moitié de la vie. L'âge médian au diagnostic est de 66 ans, la plupart des patients étant diagnostiqués entre 55 et 75 ans. Elle est plus fréquente chez les hommes, avec un *sex ratio* estimé à 1,7 pour 1. Elle est le plus souvent sporadique, mais des formes familiales existent. Certains auteurs estiment que l'incidence de la FPI est en augmentation, au moins en partie du fait d'une meilleure reconnaissance de la pathologie et d'un diagnostic plus précoce, mais sans qu'on puisse éliminer d'autres raisons génétiques ou épigénétiques ; toutefois ce sujet reste débattu. En revanche, la prévalence a augmenté de manière certaine entre 2001 et 2011 du fait de l'allongement de l'espérance de vie après le diagnostic ([Valeyre 2010](#), [Raghu 2011](#)).

Selon le mode de comptabilité (registres déclaratifs ou diagnostics confirmés en réunion de concertation multidisciplinaire) et la région du globe, l'incidence estimée est comprise entre 2,76 et 9

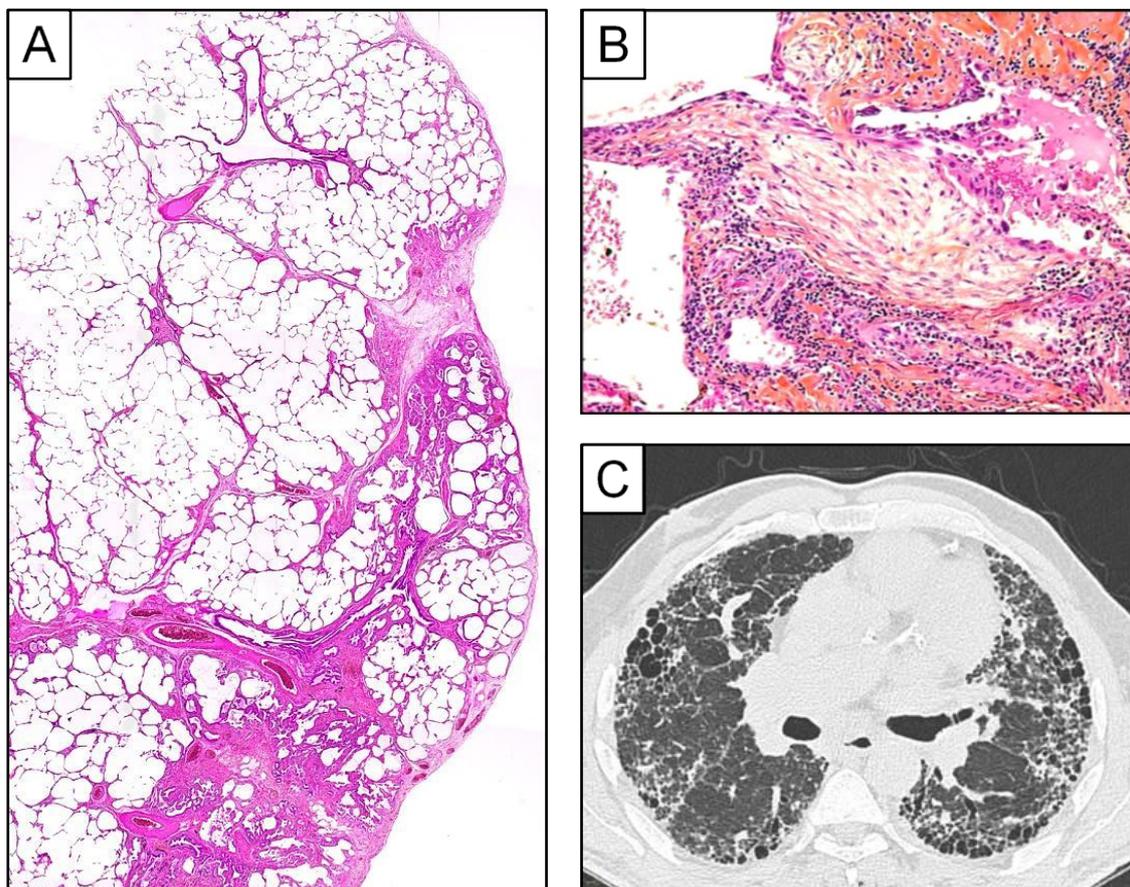
nouveaux cas / 100.000 habitants / an. La prévalence rapportée peut varier de 8,2 à 25,6 / 100.000 habitants dans la population globale. Si on s'intéresse uniquement aux classes d'âge susceptibles de développer la maladie, l'incidence de la FPI au-delà de 50 ans monte à 7,5 - 8,8 nouveaux cas / 100.000 habitants / an, et à 16 - 31,1 nouveaux cas / 100.000 habitants / an pour les individus de plus de 65 ans. Les chiffres pour la prévalence sont respectivement de 21,4 – 27,9 et 39 – 145,7 / 100.000 habitants après 50 ans et 65 ans ([Valeyre 2010](#), [Raghu 2011](#), [Raghu 2014](#), [Duchemann 2017](#)).

## *ii. Diagnostic positif*

La FPI se révèle habituellement par une dyspnée d'effort d'installation progressive, progressivement croissante, volontiers associée à une toux sèche, chez un patient âgé de plus de 60 ans. Cliniquement, des crépitations inspiratoires secs avec un bruit de « velcro » sont entendus à l'auscultation pulmonaire. L'hippocratisme digital, qui consiste en un bombement en « baguette de tambour » des extrémités des doigts, peut être observé chez 40 % des patients. Les explorations fonctionnelles respiratoires (EFR) de repos montrent le plus souvent un déficit restrictif (défini par une diminution des volumes) s'accompagnant d'une altération des capacités de transfert des gaz pulmonaires ([Raghu 2011](#)). L'évolution de la capacité vitale (CV) et de la diffusion pulmonaire du monoxyde de carbone (DLCO) sont des indices pronostiques majeurs au cours du suivi de la maladie ([Collard 2003](#)). Les explorations à l'effort révèlent quasi-constamment une limitation des capacités d'exercice, qui peut devenir majeure. Les échanges gazeux sont généralement conservés au repos jusqu'à un stade très avancé. En revanche, la FPI est caractérisée par des désaturations à la marche, proportionnelles à l'intensité de l'effort, pouvant exposer le patient à des variations itératives de sa pression partielle artérielle en oxygène (PaO<sub>2</sub>) ([Raghu 2011](#)). Cette HI ne concerne cependant que les cellules des tissus périphériques et pas les CEA.

Le diagnostic de FPI nécessite une approche multidisciplinaire impliquant le pneumologue, le radiologue et, le cas échéant, l'anatomopathologiste ; idéalement expérimentés dans le champ des

PID. La tomodensitométrie (TDM) thoracique constitue l'examen pivot. Chez un patient pour qui une PID secondaire a été éliminée, une présentation tomodensitométrique typique permet de confirmer le diagnostic de FPI et de surseoir à la réalisation d'une biopsie pulmonaire chirurgicale. Si un prélèvement histologique est réalisé, les lésions anatomopathologiques de FPI sont caractérisées par leur hétérogénéité temporelle et spatiale, préservant entre elles des zones de poumon sain. Les zones de rayon de miel peuvent arborer des CEA de type II hyperplasiques, ainsi que des foyers fibroblastiques jeunes (FFJ) avec dépôts de collagène ([Raghu 2011](#)). Ces foyers fibroblastiques forment en fait une structure tridimensionnelle à base sous-pleurale ([Cool 2006](#)).



**Figure 15 : Images représentatives d'une fibrose pulmonaire idiopathique.**

**A :** Vue histologique en microscopie optique montrant des lésions hétérogènes avec fibrose mutilante prédominante en sous-pleural, préservant des zones de poumon sain ; coloration hématoxyline éosine, x20. **B :** Vue histologique en microscopie optique d'un foyer fibroblastique jeune, et des dépôts de collagène colorés en orange ; coloration hématoxyline éosine safran, x200 (images aimablement fournies par le Dr M. Kambouchner). **C :** Vue tomodensitométrique montrant une présentation typique associant des réticulations et du rayon de miel diffus à prédominance sous-pleurale, associés à des bronchectasies par traction (aimablement fournie par le Pr PY. Brillet).

### *iii. Histoire naturelle*

L'histoire naturelle de la FPI est très variable d'un patient à l'autre, et la sévérité de la médiane de survie correspond en fait à des évolutions très hétérogènes. L'évolution habituelle consiste en une lente dégradation de la fonction respiratoire et des capacités à l'effort, ainsi le délai entre l'apparition des premiers symptômes et le diagnostic de FPI est souvent prolongé, de plusieurs mois à plusieurs années. Certains patients, plus fréquemment fumeurs et de sexe masculin, présentent cependant un phénotype « progressateur rapide » avec un déclin fonctionnel plus rapide et une espérance de vie raccourcie, et ce de manière imprévisible avec au moment du diagnostic des EFR, une présentation TDM et des images histologiques comparables aux autres patients ([Raghu 2011](#), [King 2011](#)). Les déterminants de ce phénotype inhabituel sont encore inconnus, toutefois il semblerait que ces patients présentent des profils d'expression génique particuliers ([Selman 2007](#), [Boon 2009](#)). Le cours de la FPI peut par ailleurs être émaillé d'épisodes d'exacerbation aiguë (EA) inflammatoire, partageant avec le SDRA la caractéristique physiopathologique d'un dommage alvéolaire diffus à l'examen anatomo-pathologique. Une EA peut survenir à n'importe quel moment de la maladie (y compris d'emblée et faisant porter le diagnostic), sans qu'on ait pu identifier de facteur prédictif précis, notamment sur le profil évolutif de la fonction respiratoire. Cependant, un élément déclencheur est souvent identifié : infection, procédure invasive (lavage broncho-alvéolaire LBA, chirurgie), inhalation de liquide gastrique... L'incidence annuelle de cette complication est estimée à 5 - 15 %, son pronostic est sombre avec une mortalité à court terme supérieure à 50 % et pour les survivants une dégradation fonctionnelle séquellaire parfois importante ([Ryerson 2015](#)).

### *iv. Facteurs de risque et comorbidités*

Comme évoqué précédemment, le risque de développer une FPI augmente proportionnellement à l'âge ([Fell 2010](#)), et les patients sont plus souvent de sexe masculin. Le tabagisme constitue également un facteur de risque, qu'il soit actif ou sevré, y compris dans les

formes familiales. Dans un récent travail de notre équipe s'intéressant au rôle de la pollution, la survenue d'EA était associée à une exposition préalable à l'ozone, et la mortalité était corrélée au niveau d'exposition aux particules en suspensions PM<sub>10</sub> et PM<sub>2,5</sub> ([Sesé 2018](#)). D'autres expositions environnementales peuvent jouer un rôle délétère, comme les poussières minérales, les poussières de bois ou les particules métalliques. Le reflux gastro-œsophagien (RGO) et les micro-inhalations qu'il provoque sont incriminés dans la pathogénie. Enfin, certaines comorbidités comme l'obésité, le diabète et la coronaropathie sont fréquemment associées à la FPI ([Raghu 2011](#), [King 2011](#)).

La FPI est généralement sporadique, mais des formes familiales existent. Dans la cohorte nationale prospective COFI regroupant 244 FPI incidentes, coordonnée par les Pr Dominique Valeyre et Hilario Nunes (Hôpitaux Universitaires de Paris Seine-Saint-Denis, Université Paris 13), 8,1 % des patients présentaient une fibrose pulmonaire familiale ([Valeyre 2010](#)), mais la fréquence des formes familiales pourrait être encore plus importante et concerner jusqu'à 20 % des cas ([García-Sancho 2011](#)). Parmi les gènes qui ont été identifiés, deux sont liés aux processus de sénescence cellulaire par modification de la longueur des télomères : *TERT* codant pour la *telomerase reverse transcriptase* et *TERC* codant pour le *telomerase RNA component*, un ARN non codant composant des télomérases. De manière intéressante, un travail concernant la longueur des télomères dans les CEA de patients porteurs de PII retrouvait des télomères courts chez 97 % d'entre eux par rapport à ceux de sujets sains contrôles appariés sur l'âge, et la présence de télomères courts était un facteur de risque de FPI ([Alder 2008](#)). Des mutations des protéines SP-A et SP-C du surfactant, ainsi que le polymorphisme du gène *MUC5B* codant pour une mucine également exprimée dans les CEA, ont eux aussi été identifiés. Le variant rs35705950 de *MUC5B* pourrait être le facteur de risque le plus important et rendre compte d'au moins 30 % du risque de développer une FPI. Étonnamment, les patients d'une même famille peuvent développer des PII de différentes formes, qui ne sont pas toutes des FPI ([Uzunhan 2012](#)).

La coexistence d'un emphysème avec la fibrose est fréquente, et semblerait prédisposer au développement d'une hypertension pulmonaire ([Cottin 2005](#)). Même en l'absence d'emphysème, la

FPI prédispose de toute manière à la survenue d'une hypertension pulmonaire ([Nunes 2012](#)) ou d'un cancer broncho-pulmonaire, ces deux événements étant associés à une aggravation du pronostic ([Raghu 2011](#)).

Le SAOS est une autre comorbidité fréquente, et pourrait même constituer un facteur de risque de FPI. En effet, l'âge est un facteur de risque reconnu de SAOS : dans la population générale âgée de plus de 60 ans, la prévalence d'un SAOS modéré à sévère, défini par un index apnées / hypopnées (IAH) supérieur ou égal à 15 événements /h, est évaluée à environ 20 % ([Netzer 2016](#)). Mais plusieurs travaux récents ont retrouvé une prévalence plus importante de SAOS dans la FPI ([Mermigkis 2007](#), [Lancaster 2009](#), [Mermigkis 2010](#), [Pihtili 2013](#)). Dans une de ces études notamment, une polysomnographie nocturne avait été réalisée chez 50 patients atteints de FPI et retrouvait un IAH > 15 /h chez 68 % d'entre eux. Néanmoins les patients avaient été enrôlés à des stades d'évolution divers de la FPI, ainsi il est possible qu'en cas de fibrose avancée la traction exercée par le parenchyme pulmonaire sur les voies aériennes puisse faciliter la fermeture de la filière pharyngo-laryngée ([Sériès 1988](#), [Sériès 1989](#), [Heinzer 2005](#)). C'est la raison pour laquelle notre centre a coordonné une étude ancillaire de la cohorte COFI au cours de laquelle 45 FPI incidentes ont été enregistrées prospectivement par polysomnographie nocturne (âge moyen : 68,8 ans ; index de masse corporelle moyen : 28,1 kg/m<sup>2</sup>). Ils présentaient une diminution peu sévère des volumes respiratoires, avec une CV moyenne à 72,8 % de la valeur théorique. Les résultats ont confirmé la très forte prévalence du SAOS dans cette population puisque 62 % des patients avaient un IAH ≥ 15 /h, et 40 % des patients présentaient un SAOS sévère défini par un IAH ≥ 30 /h. Dans ce groupe, l'IAH moyen était de 61,4 /h. Il n'existait pas de différence d'IMC, d'âge, de fonction respiratoire entre les groupes avec ou sans SAOS. Sur le plan biologique, nous avons observé chez les patients FPI avec IAH ≥ 30 /h des taux sériques significativement plus élevés d'ICAM-1 (cible transcriptionnelle de HIF, proposée comme marqueur d'agression endothéliale) et de MMP-7 (marqueur d'activation des CEA), ainsi qu'une tendance à la limite de la significativité à un stress oxydant systémique plus élevé (mesuré par le dosage de 8-OHdG dans le sérum) ([Gille 2017](#)) (*annexe 1*). La forte prévalence du

SAOS dans des FPI récemment diagnostiquées et présentant des volumes respiratoires relativement conservés laisse supposer que le SAOS pourrait préexister à la FPI, partageant avec celle-ci un ou des facteurs de risque commun(s), ou pouvant jouer un rôle actif dans la fibrogenèse pulmonaire.

#### v. *Traitements*

Deux molécules sont actuellement disponibles, mais elles n'ont pas d'effet curatif et n'ont qu'un effet suspensif uniquement partiel : elles ont montré qu'elles ralentissent le déclin de la fonction respiratoire, et diminuent peut-être la fréquence de survenue des EA. La première est la pirfénidone, qui possède des propriétés anti-fibrosantes et anti-oxydantes, bien que son mode d'action soit mal connu. Dans des modèles murins de fibrose pulmonaire, elle semble diminuer la production de certains facteurs pro-fibrosants (comme le TGF- $\beta$ ) et le recrutement des fibrocytes. L'autre produit ayant obtenu l'autorisation de mise sur le marché est le nintédanib, un inhibiteur de tyrosine-kinases intervenant dans les voies de signalisation des récepteurs du PDGF, du FGF et du VEGF. Son action concerne essentiellement la migration et la prolifération des fibroblastes. D'autres molécules sont en développement, ciblant par exemple la voie du TGF- $\beta$  ou certains composants de la MEC impliqués dans la perpétuation et la progression des processus fibrosants. L'administration thérapeutique de CSM est également à l'étude. Enfin, en dernier recours, une transplantation pulmonaire peut-être proposée aux patients ayant dégradé sévèrement leur fonction respiratoire, selon leur âge et leurs comorbidités ([Uzunhan 2011](#)).

## 2. Physiopathologie de la fibrose pulmonaire idiopathique

Dans la plupart des PID, l'inflammation tient une place prépondérante dans la pathogénie de la maladie : l'infiltrat interstitiel est constitué de leucocytes et peut, s'il persiste, évoluer vers une fibrose séquellaire. C'est le cas dans la sarcoïdose, ou dans la pneumopathie interstitielle non spécifique (PINS), principal diagnostic différentiel de la FPI au sein des PII. Bien que certains mécanismes immuns soient mis en jeu dans la FPI, ils ne sont pas au cœur de la physiopathologie de

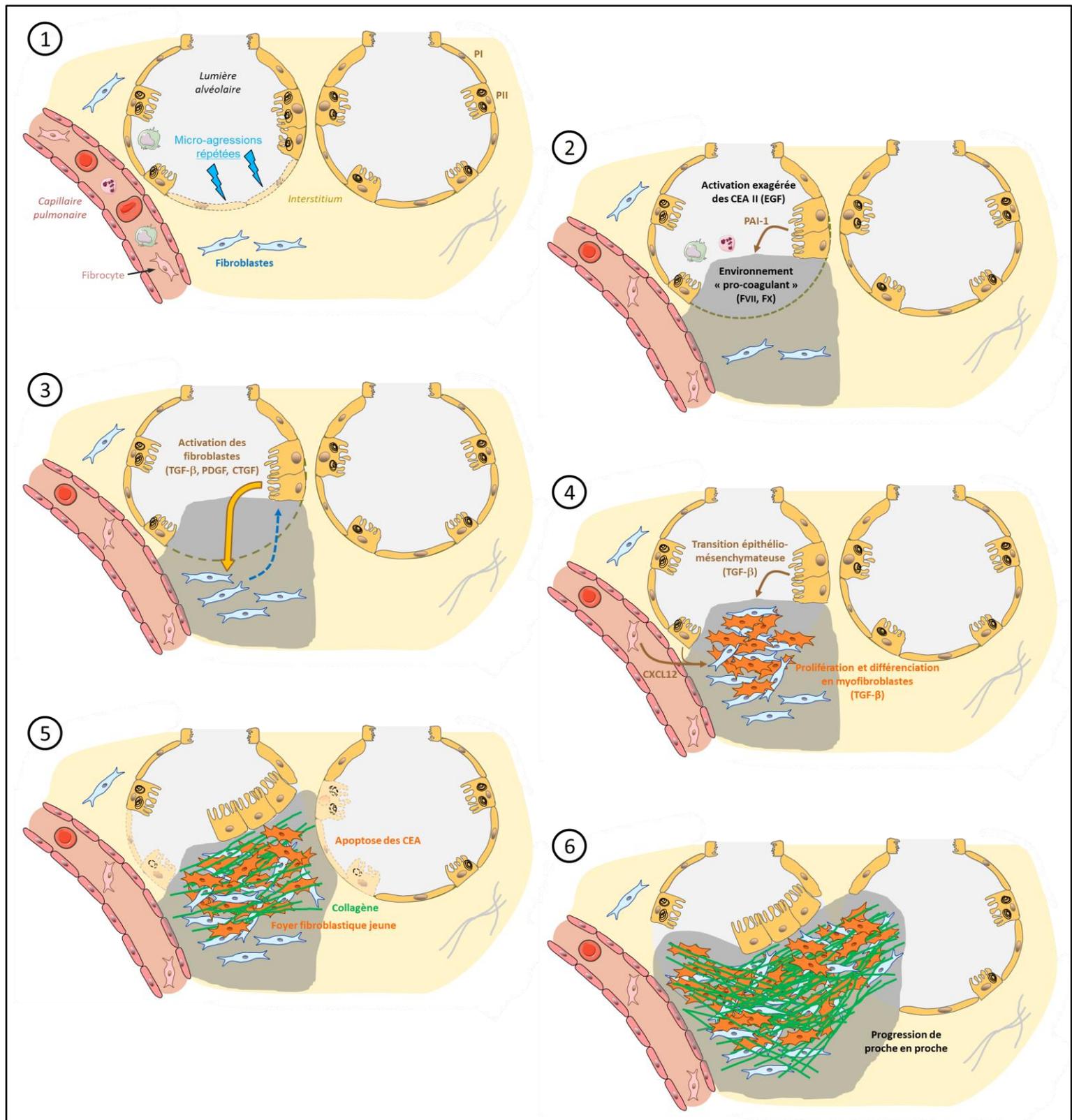
la maladie, qui est désormais plutôt considérée comme un défaut de réparation épithéliale alvéolaire après lésion, aboutissant à une activation fibroblastique génératrice d'une destruction architecturale du poumon et d'altérations sévères de sa fonction. Les traitements immunosuppresseurs n'ont d'ailleurs pas d'effet dans la FPI, alors qu'ils sont généralement efficaces dans les autres PID.

*i. Vue d'ensemble*

Le point de départ de la FPI semble être une succession d'agressions épithéliales alvéolaires, dont la répétition chez un patient génétiquement prédisposé pourrait aboutir à une dérégulation du dialogue entre CEA et fibroblastes, garant en temps normal d'une réparation harmonieuse. Ces agressions sont de plusieurs natures : fumée de cigarette, particules minérales, polluants, micro-inhalations chroniques en lien avec un RGO, infections (notamment virales)... L'apoptose des CEA et la dégradation de la membrane basale par MMP-2 et MMP-9 augmentent la perméabilité à certaines protéines telles que le fibrinogène et la fibronectine, entraînant la formation d'un caillot fibrineux dans la lumière alvéolaire, comportant des composants de la MEC. S'ensuit une migration de cellules bronchiolaires (bronchiolisation) et de CEA, sous la dépendance de MMP-1 et MMP-7. La sécrétion d'EGF entraîne une activation exagérée des CEA, certaines deviennent hyperplasiques et prolifèrent, initiant une réparation épithéliale aberrante et incomplète. Elles vont également stimuler le recrutement et la prolifération de fibroblastes résidents et de fibrocytes circulants, puis leur différenciation en myofibroblastes sous l'action du TGF- $\beta$ 1. Les myofibroblastes possèdent des propriétés contractiles grâce à l'expression d'actine du muscle lisse ( $\alpha$ -SMA), et un pouvoir fibrosant plus important. La répression du gène suppresseur de tumeur *phosphatase and tensin homolog (PTEN)* et la sécrétion de TGF- $\beta$ 1 inhibent conjointement l'apoptose des fibroblastes et myofibroblastes, par activation de la voie PI3K. Enfin, TGF- $\beta$ 1 induit également la TEM, au cours de laquelle des CEA se différencient en fibroblastes. Les (myo)fibroblastes proviennent donc de plusieurs origines. Consécutivement à leur activation, ils forment des FFJ qui sécrètent des grandes quantités de MEC (principalement du collagène I et de la fibronectine), du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de

l'angiotensinogène, entraînant l'apoptose de CEA au voisinage, ainsi que MMP-2 et MMP-9 qui dégradent la membrane basale, ce qui permet l'extension du phénomène de proche en proche. Les forces mécaniques, et la sécrétion de certaines enzymes telle que la MMP-1, favorisent l'apparition de rayon de miel. On observe par ailleurs une activation des facteurs VII et X de la coagulation, et la sécrétion par les CEA du *plasminogen activator inhibitor 1* (PAI-1), ces protéines préviennent la dégradation du caillot fibrineux qui participe à la pérennisation de l'environnement pro-fibrosant local : il possède notamment la capacité de stimuler la TEM et la transformation des fibroblastes en myofibroblastes ([King 2011](#)) (*figure 16*).

D'autres mécanismes semblent jouer un rôle important dans le FPI. Les prédispositions génétiques concernant les protéines du surfactant SP-A et SP-C pourraient favoriser la lésion épithéliale alvéolaire initiale et le collapsus alvéolaire, alors que les atteintes des voies de signalisation de la sénescence cellulaire avec télomères courts pourraient faciliter l'apoptose des CEA, et compromettre le potentiel de réplication des CEA de type II et d'autres cellules progénitrices pulmonaires impliquées dans la cicatrisation. Les agressions alvéolaires répétées induisent un stress du RE, lié à l'activation des voies de signalisation en réponse à une altération des capacités d'assemblage des protéines. Lorsqu'il est intense et prolongé, il peut induire une TEM, ou une apoptose des CEA en favorisant ainsi un *turnover* exagéré et une sénescence accélérée de l'épithélium alvéolaire. Par ailleurs, les lésions prédominent dans les zones basales et sous-pleurales, qui sont soumises à des forces de tractions plus importantes au cours de la ventilation. Il a été proposé que ces forces de traction pourraient générer un stress mécanique récurrent à l'origine de la maladie chez des individus âgés et génétiquement prédisposés, notamment en favorisant la TEM. Ce stress mécanique serait d'autant plus important en cas de SAOS, du fait des amples mouvements thoraco-abdominaux présentés au cours des apnées obstructives. Les trajectoires de ces forces de traction pourraient également diriger la progression des FFJ, dont l'organisation est tridimensionnelle avec une extension de proche en proche à partir d'une base sous-pleurale. ([Cool 2006](#), [Leslie 2012](#), [Wolters 2018](#)).



**Figure 16 : Représentation schématique de la physiopathologie de la fibrose pulmonaire idiopathique.**

**(1)** Micro-agressions répétées ; **(2)** Caillot fibrineux intra-alvéolaire ; **(3)** Perturbation du dialogue entre CEA et fibroblastes ; **(4)** Trois principales sources de (myo)fibroblastes ; **(5)** Echec de réparation par les CEA hyperplasiques ; **(6)** Progression de la fibrose de proche en proche (d'après [King 2011](#) et [Knudsen 2017](#)).

CEA : cellule épithéliale alvéolaire ; CTGF : *connective tissue growth factor* ; EGF : *epithelial growth factor* ; FVII : facteur de la coagulation VII ; FX : facteur de la coagulation X ; PDGF : *platelet-derived growth factor* ; PI : pneumocyte de type I ; PII : pneumocyte de type II ; PAI-1 : *plasminogen activator inhibitor 1* ; TGF- $\beta$  : *transforming growth factor  $\beta$* .

### *ii. Implication des cellules épithéliales alvéolaires*

L'importance des CEA dans les processus de fibrogenèse est mise en exergue par certains modèles murins de fibrose pulmonaire. En effet, dans le modèle induit par la bléomycine, l'inhibition de l'apoptose des CEA prévient l'apparition de la fibrose ([Kuwano 1999](#)). A l'inverse, l'agression ciblée des CEA de type II par la toxine diphtérique génère une fibrose pulmonaire ([Sisson 2010](#)). Chez l'Homme au cours de la FPI, les CEA subissent des modifications morphologiques et fonctionnelles participant à la fibrogenèse. Plusieurs phénotypes coexistent dans le poumon de FPI : CEA hyperplasiques exagérément activées, CEA en phase de TEM, CEA sénescents, et CEA apoptotiques (notamment au contact des FFJ). Les CEA sont essentielles dans le recrutement, l'activation et la prolifération des fibroblastes. Elles sécrètent en effet de nombreux facteurs de croissance à destination des fibroblastes résidents (PDGF, TNF- $\alpha$ , endothéline 1, *connective tissue growth factor* CTGF), ainsi que CXCL12, facteur chimiotactique permettant de recruter des fibrocytes circulants via leur récepteur CXCR4. Elles activent le TGF- $\beta$ 1, sécrété par les CEA elles-mêmes ou présent dans le poumon sous forme latente, acteur majeur de la différenciation en myofibroblastes et de la TEM. Elles sécrètent le PAI-1, pro-coagulant et pro-fibrosant, et certaines MMP nécessaires au remodelage de la MEC. A l'inverse, l'apoptose des CEA lésées induit une diminution de l'expression de molécules anti-fibrosantes : la cavéoline 1 et le *receptor for advanced glycation end product* (RAGE) qui sont naturellement exprimés par les CEA, et la PGE2 dont l'origine est mal définie mais dont l'activation dépend de la cyclo-oxygénase 2 des CEA ([King 2011](#), [Chapman 2011](#), [Knudsen 2017](#)).

### *iii. Rôles potentiels de l'hypoxie et de l'hypoxie intermittente chronique*

Les CEA sont soumises à une hypoxie chronique au cours de la FPI, ce d'autant plus que la maladie est sévère. De plus, du fait de la forte prévalence du SAOS, une HIC est fréquente, et pourrait même précéder l'apparition de la fibrose. Un certain nombre de données laissent penser que la surexpression de HIF-1 $\alpha$  et la production de ROS dans ce contexte d'hypoxie chronique

et/ou d'HIC pourraient favoriser la fibrogenèse pulmonaire. De fait, dans plusieurs travaux, HIF-1 $\alpha$  était surexprimé dans les CEA de souris exposées à la bléomycine et dans les CEA de patients atteints de FPI ([Tzouveleakis 2007](#), [Kusko 2016](#) et [Delbrel 2016](#) : *données du laboratoire présentées au congrès de l'American Thoracic Society, article soumis auquel j'ai participé, voir annexe 2*). Dans une autre étude animale utilisant le pimonidazole, molécule jouant le rôle de « sonde à hypoxie » en s'accumulant dans les régions hypoxiques, l'immunomarquage révélait que ces zones étaient représentées par les CEA et les zones de fibrose ([Weng 2014](#)). Pour autant, HIF-1 $\alpha$  n'est pas présent dans les FFJ, qui sont riches en pVHL ([Zhou 2011](#)). Il est d'ailleurs possible qu'HIF-1 $\alpha$  soit également activé dans les CEA par d'autres voies dans ce contexte (NF- $\kappa$ B...) et pas uniquement par l'hypoxie. Enfin, dans un modèle d'inactivation spécifique du gène HIF1A dans les CEA, les souris déficientes en HIF-1 $\alpha$  au niveau de l'épithélium alvéolaire étaient protégées des effets de la bléomycine ([Weng 2014](#)).

Le rôle pro-fibrosant de l'hypoxie cellulaire et de l'activation de la voie HIF-1 $\alpha$  a été montré dans d'autres organes. Par exemple dans le rein, l'exposition de cultures primaires de cellules épithéliales tubulaires proximales à l'hypoxie induisait la production de CTGF, facteur de croissance pro-fibrosant de la voie du TGF- $\beta$ . Cette production de CTGF était prévenue par l'inactivation de HIF-1 $\alpha$  ([Higgins 2004](#)). Dans un modèle *in vivo* d'uropathie obstructive unilatérale, le rein controlatéral hypoxique était le siège d'une TEM et d'une fibrose plus sévère chez les souris sauvages que chez celles invalidées pour HIF-1 $\alpha$  dans les cellules épithéliales tubulaires proximales ([Higgins 2007](#)). A l'inverse, dans un modèle murin de fibrose rénale, l'expression stable de HIF-1 $\alpha$  par inhibition de pVHL dans les cellules épithéliales tubulaires rénales aggravait la fibrose ; cet effet était prévenu par inhibition de HIF-1 $\alpha$  ([Kimura 2008](#)). Des constatations concordantes ont été faites dans la peau, la prostate, les fosses nasales ([Haase 2009](#), [Shin 2012](#)), et dans le foie où l'inactivation conditionnelle de HIF-1 $\alpha$  dans les hépatocytes réduisait la fibrose hépatique dans un modèle murin de ligature des canaux biliaires ([Moon 2009](#)).

Des effets pro-fibrosants ont également été observés pour des expositions intermittentes à l'hypoxie. Dans un modèle murin de stéatose hépatique non alcoolique (NASH), l'exposition à l'HIC (nadir à 5 % O<sub>2</sub> ; cycles de 30 s) était responsable d'une inflammation et d'une fibrose hépatique, alors que les souris témoins présentaient uniquement des dépôts graisseux. Cet effet de l'HIC était médié par une hyperproduction de ROS avec peroxydations lipidiques. L'expression de HIF-1 $\alpha$  n'avait pas été recherchée ([Savransky 2007](#)). Chez l'Homme, l'index de désaturation en oxygène (ODI) a été mesuré par oxymétrie nocturne avant chirurgie bariatrique chez 101 patients obèses et non traités par pression positive continue (PPC) : les lésions hépatiques histologiques, notamment la fibrose, étaient associées de manière indépendante à l'ODI (et donc à l'intensité de l'HIC), après ajustement sur l'âge, l'IMC et le niveau d'insulinorésistance ([Aron-Wisnewsky 2012](#)). Dans le cœur, les souris exposées à une HIC (5 % O<sub>2</sub> ; cycles de 30 s ; 8 h/j) développaient des remaniements fibreux du myocarde avec une augmentation de la production d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, de l'expression des ARNm du TNF- $\alpha$  et du TGF- $\beta$ , et de l'activité NF- $\kappa$ B. Les souris déficientes en Nox étaient protégées des effets délétères de l'HIC ([Hayashi 2008](#)). Les effets de l'HIC ont également été étudiés au niveau vasculaire : *in vivo*, une exposition prolongée (5 % O<sub>2</sub> pendant 20 s / 21 % O<sub>2</sub> pendant 40 s ; 8 h/j pendant 3 mois) entraînait une expression de HIF-1 $\alpha$  et l'apparition d'une fibrose périvasculaire avec transition endothélio-mésenchymateuse, alors que les souris surexprimant PHD3 étaient protégées ; *in vitro*, la transition endothélio-mésenchymateuse était inhibée par la surexpression de PHD3 dans des cultures de cellules endothéliales de veine ombilicale ([Zhang 2017](#)). De manière intéressante, une équipe a comparé les effets d'une HI de courte durée à ceux d'une HIC sur le rein. Les souris étaient exposées à une HI (8 % O<sub>2</sub> pendant 20 s / 21 % O<sub>2</sub> pendant 100 s ; 12 h/j) pendant des durées courtes (3 à 7 jours) ou prolongées (8 semaines). A 8 semaines, une fibrose rénale était observée, avec une apoptose des cellules rénales augmentées et une surexpression de HIF-1 $\alpha$ , de CTGF et de VCAM-1 par rapport aux souris contrôles laissées en air intermittent à 21 % de FiO<sub>2</sub> ; alors que les souris exposées à une HI courte ne présentaient aucune de ces anomalies ([Sun 2013](#)).

Concernant le poumon, certains des processus importants impliqués dans la FPI peuvent être induits par l'hypoxie chronique continue. Notamment, dans un travail de notre laboratoire auquel j'ai participé, l'exposition de CEA de rat en culture primaire à une hypoxie de 1,5 % de  $\text{FiO}_2$  maintenue pendant 12 jours induisait une TEM avec production de TGF- $\beta$  et de CTGF. Les CEA en coculture avec des CSM humaines, ou cultivées seules en présence de KGF, étaient protégées ([Uzunhan 2015](#)) (*annexe 3*). Une autre équipe a montré que la TEM induite par l'hypoxie dans des CEA de plusieurs origines était dépendante de l'activation de HIF-1 $\alpha$  en réponse à la surproduction de ROS mitochondriaux, et impliquait la voie du TGF- $\beta$  ([Zhou 2009](#)). Des travaux récents de notre laboratoire ont confirmé que l'hypoxie pouvait générer l'apoptose des CEA, et montré qu'elle pouvait induire un stress du RE. L'exposition de CEA de rat en culture primaire à une hypoxie aiguë de 1,5 % de  $\text{FiO}_2$  pendant 24 h induisait une stabilisation de HIF-1 $\alpha$  partiellement dépendante de l'accumulation de ROS mitochondriaux, et une apoptose des CEA avec expression de deux protéines pro-apoptotiques : Bnip-3, cible transcriptionnelle de HIF-1 $\alpha$ , et *CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein* (CHOP) qui est plutôt dépendante des ROS et dont l'expression est stimulée par la voie du stress du RE. Le traitement des CEA exposées à l'hypoxie par un inhibiteur de HIF, par la NAC aux propriétés antioxydantes, ou par du milieu conditionné de CSM humaines, inhibait l'expression de Bnip-3 et de CHOP, et prévenait partiellement l'apoptose. Les CSM diminuaient l'expression de HIF-1 $\alpha$  et des ROS, et majoraient l'activité d'enzymes antioxydantes (SOD, GPx, catalase). L'effet protecteur des CSM était dû au moins en partie à la sécrétion de KGF et HGF ([Bernard 2017](#)). Par ailleurs, les CEA exposées à l'hypoxie activaient les trois voies de l'UPR (stress du RE) sous la dépendance de HIF-1 $\alpha$ . *In vivo*, les trois voies de l'UPR étaient activées dans les CEA de rats exposés à l'hypoxie hypobarique simulant une  $\text{FiO}_2$  de 8 % pendant 16 à 72 h. HIF-1 $\alpha$  et CHOP étaient co-exprimés dans les CEA de rats exposés à l'hypoxie ou traités par la bléomycine, et dans les CEA de patients atteints de FPI ([Delbrel 2016](#)).

Chez l'Homme, l'exposition à une HI entraîne un stress oxydant important ([Pialoux 2009](#)).

Les effets directs de l'HI dans la FPI ont été très peu étudiés jusqu'à présent, mais l'implication des ROS dans la pathogénie a été démontrée. Plusieurs études ont montré un déséquilibre sévère de l'état redox des CEA en cas de FPI, avec des niveaux élevés d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de MPO, de dérivés réactifs de l'azote et de produits de peroxydation des lipides ([Cantin 1987](#), [Kuwano 2003](#), [Waghray 2005](#)), alors que les molécules antioxydantes comme le glutathion et la SOD2 étaient diminuées dans les lésions de fibrose. Ce stress oxydant est notamment impliqué dans les processus de sénescence cellulaire, le stress du RE, l'apoptose des CEA, la TEM, l'activation des fibroblastes et leur différenciation en myofibroblastes, le remodelage de la MEC impliquant l'activation des MMP et l'inactivation d'inhibiteurs de protéases ([Walters 2008](#), [Boutten 2011](#)). Une étude sur un modèle de fibrose induite par la bléomycine chez le rat a récemment été publiée : les rats traités par bléomycine et exposés à une HI (nadir à 10 % de FiO<sub>2</sub> ; 30 cycles/h ; 10 h/j pendant 30 jours) présentaient une tendance à développer une fibrose pulmonaire plus sévère que ceux laissés en air ambiant, avec une augmentation de l'expression des ARNm des collagènes I et V et du CTGF, une majoration de la quantité protéique d'hydroxyproline, et une diminution de la compliance pulmonaire ([Braun 2017](#)). L'objet du second article de ce travail de thèse était de tester l'hypothèse que l'HIC pourrait aggraver la fibrose pulmonaire dans un modèle murin de *challenge* à la bléomycine.

## OBJECTIFS GÉNÉRAUX DU TRAVAIL DE THÈSE

Une hypoxie alvéolaire peut survenir dans des situations diverses, dans la plupart des pathologies cardio-respiratoires ou lors d'une ascension en haute altitude. Qu'elle soit aiguë ou chronique, continue ou intermittente, elle peut donner lieu à des réponses adaptées, mais aussi perturber de nombreuses fonctions des CEA. En outre, la mise en jeu des voies de signalisation de l'hypoxie pourrait jouer un rôle physiopathologique dans de nombreuses maladies respiratoires. Toutefois, les mécanismes par lesquels le signal hypoxique est transmis sont encore mal compris. Ainsi, dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la manière dont l'hypoxie pouvait entraver le fonctionnement normal des CEA et leur relation avec les autres cellules du poumon profond dans différents modèles.

Dans une première partie de ce travail, nous avons étudié *in vivo* et *in vitro* l'altération de la réabsorption transépithéliale d'ions et d'eau par les CEA lors de l'exposition à une hypoxie sévère de courte durée, en confirmant que l'expression membranaire des 3 sous-unités d'ENaC est diminuée dans ces conditions du fait d'une endocytose augmentée et d'une dégradation dans le protéasome, et en détaillant l'implication dans ce processus de la liaison entre l'ubiquitine-protéine ligase Nedd4-2 et la sous-unité  $\beta$ -ENaC.

Dans une seconde partie de ce travail, nous avons évalué le rôle délétère de l'HIC dans la fibrogenèse pulmonaire en mettant au point un modèle murin de double agression des CEA par exposition à une HIC de souris préalablement traitées par bléomycine pour induire une fibrose pulmonaire. Cette étude a permis de confirmer que l'HIC augmente la mortalité liée à la bléomycine par rapport aux souris laissées en air intermittent, en aggravant l'alvéolite et la fibrose.

### I. Mécanismes d'inhibition de la réabsorption alvéolaire d'ions et d'eau par l'hypoxie

#### A. Hypothèse de travail et objectifs

Le volume de l'hypophase alvéolaire est régulé par un transport vectoriel actif d'ions  $\text{Na}^+$  par les CEA de l'hypophase vers l'interstitium pulmonaire, qui constitue le moteur de la CFA ([Matthay 1982](#), [Basset 1987a](#), [Basset 1987b](#), [Fukuda 2000](#)). Les  $\text{Na}^+$  pénètrent passivement en passant majoritairement par les canaux ENaC sensibles à l'AML présents à la surface apicale des CEA de type I et de type II, puis sont activement extrudés vers l'interstitium par les  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPases de la membrane basolatérale ([Johnson 2006](#), [Eaton 2009](#)). En cas d'œdème alvéolaire, ou lors de la naissance lorsque les alvéoles sont remplis de liquide amniotique, l'activité de ces canaux ioniques est essentielle pour réabsorber le fluide alvéolaire et préserver les échanges gazeux alvéolo-capillaires ([Hummler 1996](#)). L'entrée d'ions  $\text{Na}^+$  au pôle apical des CEA étant considérée comme l'étape limitante de ce processus de réabsorption, les mécanismes de régulation d'ENaC sont donc primordiaux dans le maintien de l'homéostasie liquidienne pulmonaire ([Matthay 2002](#)).

Il a été montré que l'hypoxie alvéolaire, associée à la présence d'un œdème pulmonaire, provoque *in vivo* chez le rat une altération de la CFA due à une inhibition du transport transépithélial de  $\text{Na}^+$  ([Vivona 2001](#), [Litvan 2006](#)). *In vitro*, l'exposition de CEA à l'hypoxie induit une diminution de l'activité d'ENaC et de la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. La transcription de ces transporteurs membranaires peut être affectée en cas d'hypoxie sévère et prolongée, mais les expositions de courte durée sont responsables d'une régulation post-traductionnelle par réduction de leur expression de surface ([Matthay 2002](#), [Eaton 2009](#)). Les mécanismes impliqués dans la diminution de l'expression de surface d'ENaC ont été peu étudiés. La densité de canaux exprimés à la membrane apicale dépend de la

balance entre leur adressage membranaire et leur endocytose. L'ubiquitine-protéine ligase Nedd4-2 est essentielle dans ce processus : en se liant à la sous-unité  $\beta$ -ENaC, elle peut initier la fixation de molécules d'ubiquitine sur le canal, cette poly-ubiquitinylation étant le signal pour son internalisation et sa dégradation dans le protéasome ou le lysosome, selon le type cellulaire et les conditions ([Snyder 2005](#), [Staub 2006](#), [Rotin 2011](#)). Dans la mesure où la voie Nedd4-2 est la cible de nombreuses régulations hormonales et biologiques, nous avons formulé l'hypothèse qu'elle pourrait être impliquée dans la diminution de l'expression membranaire d'ENaC induite par l'hypoxie.

L'objectif général de ce travail a donc été d'étudier les mécanismes responsables de l'inhibition du transport transépithélial de  $\text{Na}^+$  en condition d'hypoxie et notamment de la diminution de l'expression de surface d'ENaC, et de préciser le rôle de Nedd4-2 dans ce processus. *In vivo*, nous avons étudié les effets de l'hypoxie sur les souris de la lignée « *knock-in* »  $\beta$ -Liddle qui présentent une mutation du gène *SCNN1B* induisant une délétion de l'extrémité C-terminale de la sous-unité  $\beta$ -ENaC inhibant sa liaison avec Nedd4-2, et donc l'ubiquitination et l'endocytose d'ENaC ([Schild 1995](#), [Pradervand 1999](#)). *In vitro*, nous avons mis au point un modèle d'hypoxie aiguë sur des CEA de type II de rat en culture primaire, permettant de combiner des mesures fonctionnelles d'électrophysiologie de l'activité d'ENaC et des études mécanistiques comprenant des techniques de quantification de l'expression membranaire d'ENaC ainsi que des expériences de pharmacologie.

# Hypoxia-Induced Inhibition of Epithelial Na<sup>+</sup> Channels in the Lung

## Role of Nedd4-2 and the Ubiquitin-Proteasome Pathway

Thomas Gille<sup>1,6</sup>, Nadia Randrianarison-Pellan<sup>1</sup>, Arnaud Goolaerts<sup>2</sup>, Nicolas Dard<sup>1</sup>, Yurdagül Uzunhan<sup>1,6</sup>, Evelyne Ferrary<sup>3,4</sup>, Edith Hummler<sup>5</sup>, Christine Clerici<sup>2,4,6</sup>, and Carole Planès<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup>Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire Réponses Cellulaires et Fonctionnelles à l'Hypoxie (EA 2363), Bobigny, France; <sup>2</sup>INSERM U773, CRB3, Paris, France; <sup>3</sup>INSERM UMR-S 867, Paris, France; <sup>4</sup>Université Denis Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; <sup>5</sup>Département de Pharmacologie et de Toxicologie, Université de Lausanne, Lausanne, Switzerland; and <sup>6</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

### Abstract

Transepithelial sodium transport via alveolar epithelial Na<sup>+</sup> channels (ENaC) and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase constitutes the driving force for removal of alveolar edema fluid. Alveolar hypoxia associated with pulmonary edema may impair ENaC activity and alveolar Na<sup>+</sup> absorption through a decrease of ENaC subunit expression at the apical membrane of alveolar epithelial cells (AECs). Here, we investigated the mechanism(s) involved in this process *in vivo* in the β-Liddle mouse strain mice carrying a truncation of β-ENaC C-terminus abolishing the interaction between β-ENaC and the ubiquitin protein-ligase Nedd4-2 that targets the channel for endocytosis and degradation and *in vitro* in rat AECs. Hypoxia (8% O<sub>2</sub> for 24 h) reduced amiloride-sensitive alveolar fluid clearance by 69% in wild-type mice but had no effect in homozygous mutated β-Liddle littermates. *In vitro*, acute exposure of AECs to hypoxia (0.5–3% O<sub>2</sub> for 1–6 h) rapidly decreased transepithelial Na<sup>+</sup> transport as assessed by equivalent short-circuit current *I*<sub>eq</sub> and the amiloride-sensitive component of Na<sup>+</sup> current across the apical membrane, reflecting ENaC activity. Hypoxia induced a decrease of ENaC subunit expression in the apical membrane of AECs with no change in intracellular expression and induced a 2-fold increase in

α-ENaC polyubiquitination. Hypoxic inhibition of amiloride-sensitive *I*<sub>eq</sub> was fully prevented by preincubation with the proteasome inhibitors MG132 and lactacystin or with the antioxidant N-acetyl-cysteine. Our data strongly suggest that Nedd4-2-mediated ubiquitination of ENaC leading to endocytosis and degradation of apical Na<sup>+</sup> channels is a key feature of hypoxia-induced inhibition of transepithelial alveolar Na<sup>+</sup> transport.

**Keywords:** ubiquitination; alveolar fluid clearance; membrane trafficking; Nedd4-2; antioxidant

### Clinical Relevance

Alveolar fluid clearance secondary to sodium ion absorption by alveolar epithelial cells plays a major role in the resolution of pulmonary edema. However, it is impaired by alveolar hypoxia, which is usually present in lung injury. This paper investigates the mechanism of hypoxia-induced decrease in epithelial sodium channel activity and alveolar fluid clearance *in vitro* in cultured alveolar epithelial cells and *in vivo* in the mouse.

Active transepithelial sodium (Na<sup>+</sup>) transport by alveolar epithelial cells (AECs) is a driving force for the reabsorption of fluid from the alveolar space, a function that accounts for the ability of the lung to remove alveolar fluid at the time of birth and represents the main mechanism for

alveolar edema resolution (1–3). The two major proteins involved in this process are the basolateral sodium potassium adenosine triphosphatase (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase) and the amiloride-sensitive epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC) located in the apical membrane of type I and type II

AECs (3, 4). ENaC, composed of three homologous subunits (α, β, and γ), represents *in vivo* a limiting factor for lung fluid clearance (2, 5–10). The regulation of ENaC-mediated lung Na<sup>+</sup> absorption is therefore critical for normal lung fluid balance and function (1, 3, 4).

(Received in original form December 15, 2012; accepted in final form August 11, 2013)

This work was supported by Université Paris 13, PRES Sorbonne Paris Cité, by Chancellerie des Universités de Paris (Fondation du Legs Poix), and by Assistance Publique – Hôpitaux de Paris.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Carole Planès, M.D., Ph.D., EA 2363, UFR SMBH, 74 rue Marcel Cachin, F-93017 Bobigny, France. E-mail: carole.planes@avc.aphp.fr

This article has an online supplement, which is accessible from this issue's table of contents at [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org)

Am J Respir Cell Mol Biol Vol 50, Iss 3, pp 526–537, Mar 2014

Copyright © 2014 by the American Thoracic Society

Originally Published in Press as DOI: 10.1165/rccb.2012-0518OC on October 4, 2013

Internet address: [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org)

Alveolar hypoxia, a situation usually associated with pulmonary edema, has been shown by our group and other investigators to impair *in vivo* or *ex vivo* Na<sup>+</sup>-driven alveolar fluid clearance (AFC) in rat lung (11, 12). *In vitro*, exposure of rat AECs to hypoxia decreases Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and ENaC activity (11, 13–16). The mechanism whereby hypoxia inhibits ENaC is not univocal and may vary according to the duration and/or severity of oxygen deprivation (17). Whereas prolonged and severe hypoxia (0–1% O<sub>2</sub> for 12 h or more) was shown to inhibit ENaC subunit synthesis at transcriptional and translational levels in cultured rat AECs, short exposure (0–1% O<sub>2</sub> for 3 h) decreased ENaC activity without affecting ENaC mRNA transcript expression levels, suggesting a posttranslational regulation (16). Indeed, we have previously reported that mild hypoxia (3% O<sub>2</sub>) inhibited ENaC activity in primary rat AECs, mostly through a decrease in ENaC subunit cell surface expression, with no change in ENaC mRNA and protein expression (18). The mechanisms involved in the decrease of ENaC cell surface expression in hypoxic AECs have not been investigated. The density of ENaC channels expressed at the cell surface depends on the balance between the rate of insertion of new channels from intracellular pools and the rate of endocytosis. One major pathway for ENaC retrieval from the plasma membrane is its ubiquitination by the ubiquitin-protein ligase Nedd4–2 (neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein), which leads to internalization of the channel and degradation by the proteasome or the lysosome, depending on the cell type (19–24). Because the Nedd4–2-mediated pathway is the target of numerous hormonal and biological regulations, we hypothesized that it could be involved in hypoxia-induced decrease in ENaC cell surface expression.

The objective of the present study was to investigate the cellular mechanism(s) responsible for the decrease of ENaC activity and cell surface expression in AECs exposed to hypoxia, with a particular focus on the Nedd4–2-mediated endocytosis pathway. To do so, we combined *in vitro* and *in vivo* approaches. We studied *in vivo* the effect of hypoxia on AFC in wild-type and Liddle mice, a previously established knock-in mouse strain carrying a premature Stop codon within the *Scnn1b* (β-ENaC) gene (7,

9). This mutation leads to the deletion of the β-ENaC C-terminus PY motif, thus abolishing the interaction between ENaC and the ubiquitin protein ligase Nedd4–2 that targets the channel for endocytosis and degradation (25–29). We also established and characterized an *in vitro* model of acute exposure of primary rat AECs to hypoxia, allowing us to perform electrophysiological, biochemical, and pharmacological studies. Our data show that ENaC-mediated AFC was significantly impaired by hypoxic exposure (8% O<sub>2</sub> for 24 h) in wild-type mice but not in homozygous mutant β-Liddle mice. *In vitro*, acute exposure of primary rat AECs to various levels of hypoxia (0.5–3% O<sub>2</sub> for 1–6 h) induced a rapid decrease of amiloride-sensitive transepithelial Na<sup>+</sup> transport and ENaC activity related to a decrease of ENaC subunit protein expression in the apical plasma membrane. This functional decrease was associated with increased polyubiquitination of α-ENaC subunit and was fully prevented by incubation with proteasome inhibitors and antioxidants. Taken together, our results strongly suggest the involvement of Nedd4–2-mediated ubiquitination and subsequent endocytosis of ENaC channels in hypoxia-induced impairment in transepithelial alveolar Na<sup>+</sup> transport.

## Materials and Methods

### Transgenic Mice

The generation of β-Liddle mice harboring the R<sub>566</sub> stop mutation on the *Scnn1b* gene has been previously described (7, 9). Experiments were performed on litter-matched mice aged 2 to 6 months (*n* = 56 transgenic mice). Male C57B/6J mice (Elevage Janvier, Le Genest St. Isle, France) aged 2 to 3 months were also used in preliminary experiments to determine the time course of hypoxic exposure. The experiments were approved by the institutional review board on animal experimentation and accorded with animal welfare guidelines (Ministère Français de la Pêche et de l'Agriculture, #75–1045).

### Measurement of AFC

Mice were exposed to 21% O<sub>2</sub> (control normoxic mice) or to 8% O<sub>2</sub> (hypoxic mice; estimated O<sub>2</sub> tension in alveolar gas: 40 mm Hg) from 8 to 24 hours in specially designed environmental Plexiglas chambers

(Minerva, Esternay, France) (12). At the end of exposure, Na<sup>+</sup>-driven AFC was immediately measured *in vivo* at 37°C over a 15-minute period using an *in situ* nonventilated model in which the airspace was instilled with an isoosmolar Ringer's lactate solution containing <sup>125</sup>I-albumin as previously described (8, 10, 30). AFC (percentage fluid absorption at 15 min) was calculated from the increase in alveolar fluid albumin as follows: AFC (%) = (C<sub>f</sub> – C<sub>i</sub>)/C<sub>f</sub> × 100, where C<sub>i</sub> and C<sub>f</sub> represent the initial and final concentrations of <sup>125</sup>I-albumin in the aspirate at 1 and 15 minutes, respectively, as assessed by radioactivity measurements. In some experiments, amiloride (final concentration in the alveolar instillate, 1 mM) was added to the instillate to inhibit ENaC activity.

### Quantification of ENaC Subunit and Nedd4–2 Protein Expression in Distal Lung Homogenates from Liddle Mice

Mice were killed with intraperitoneal pentobarbital before a thoracotomy was performed. The lungs were removed and immediately homogenized for 3 minutes in ice-cold lysis buffer (pH 8) containing 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholate, and protease inhibitors. The lysate was centrifuged (15,000 rpm, 10 min) at 4°C, and supernatants were aliquoted and immediately frozen before use. Samples of protein extracts (100–200 μg) were resolved through 10% acrylamide gels, electroblotted, electrically transferred to nitrocellulose paper, and probed for α- or γ-ENaC subunits using rabbit polyclonal anti-α-rat ENaC (rENaC) and anti-γ-rENaC antibodies (31) as previously described (7, 10, 30) or with rabbit polyclonal anti-Nedd4–2 antibody (dilution, 1:2,000) (ab46521; Abcam, Cambridge, MA) (32). Quantification of β-ENaC protein could not be done in Liddle mice because anti-β-ENaC antibodies recognize epitopes located in the C-terminus of β-ENaC protein, which is deleted in Liddle mice (10).

### Isolation and Culture of Rat AECs

The procedure of rat AEC isolation accorded with legislation currently in force in France and with animal welfare guidelines. AECs were isolated from adult male, pathogen-free Sprague-Dawley rats by elastase digestion (Worthington, Lakewood, NJ) as previously described (16, 18, 33).

Cells (purity > 92%; viability > 95%) were seeded onto polycarbonate membrane filters with a pore size of 0.4  $\mu\text{m}$  (Transwell/Snapwell; Corning Inc., Corning, NY) and cultured in DMEM containing 25 mM D-glucose, 10 mM Hepes, 23.8 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 2 mM L-glutamine, 10% FBS, 50 U/ml penicillin, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin, and 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gentamycin. On Day 3 after isolation, the FBS concentration was reduced to 5%, and dexamethasone (final concentration: 1  $\mu\text{M}$ ) was added to the culture medium except when indicated.

### Exposure of AECs to Hypoxia and Drugs

Four or five days after plating, the cells were placed in a humidified airtight incubator with inflow and outflow valves, and the hypoxic gas mixture containing 0.5%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ , and 94.5%  $\text{N}_2$  was flushed at 5 l/min for 20 minutes before the airtight incubator was sealed and kept at 37°C for 1, 2, 3, 4, or 6 hours. Oxygen tensions assayed in culture media at the end of 1-, 2-, 4-, and 6-hour hypoxic exposures were 65, 50, 30, and 30 mm Hg, respectively. Control normoxic cells were maintained in a humidified incubator (21%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 74%  $\text{N}_2$ ) for the same periods of time (oxygen tension in culture media, 140 mm Hg). To test various hypoxia levels, cells were exposed for 4 hours to moderate hypoxia (1.5%  $\text{O}_2$ ; oxygen tension in culture media, 45 mm Hg) or mild hypoxia (3%  $\text{O}_2$ ; oxygen tension in culture media, 60 mm Hg).

In some experiments, cells were preincubated for 30 minutes with a lysosome inhibitor (chloroquine; final concentration, 75  $\mu\text{M}$ ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) or proteasome inhibitors, lactacystin (final concentration, 20  $\mu\text{M}$ ) (Sigma-Aldrich) or MG132 (final concentration, 10  $\mu\text{M}$ ) (Sigma-Aldrich), or vehicle before being exposed to 0.5 or 21%  $\text{O}_2$  for 2 hours and processed for electrophysiological measurements. In other experiments, cells were preincubated for 30 minutes with the glutathione precursor N-acetyl-cysteine (NAC) (final concentration, 5 mM) (Sigma-Aldrich) or vehicle before normoxic/hypoxic exposure.

### Electrophysiological Studies in Primary Cultures of Rat AECs

#### Measurements under open-circuit conditions.

Trans epithelial resistance ( $R_{te}$ )

and voltage were measured in rat AECs grown on semipermeable transwell filters for 5 days under open-circuit conditions using dual silver/silver chloride electrodes connected to the Millicell Electrical resistance Clamp apparatus (Millipore, Billerica, MA) as previously described (8, 34). Equivalent short-circuit current ( $I_{eq}$ ) was calculated with Ohm's law from  $R_{te}$  and PD. Measurements of  $R_{te}$  and PD were performed at 37°C before and after apical addition of amiloride (Sigma) (final concentration, 10  $\mu\text{M}$ ) for 10 minutes to block ENaC activity to calculate the amiloride-sensitive  $I_{eq}$  defined as the difference between  $I_{eq}$  value in the absence and  $I_{eq}$  value in the presence of amiloride.

#### Short-circuit current measurements.

Measurements of short-circuit current ( $I_{sc}$ ), transepithelial potential difference (PD), and  $R_{te}$  were performed in rat AECs grown on Snapwell filters mounted in a Ussing chamber system (Physiologic Instruments Inc., San Diego, CA) as previously described (35). All experiments were performed with basolateral membrane permeabilization (achieved by the addition of nystatin in the basolateral chamber at final concentration of 60 mg/ml) and asymmetric bath solutions (NaCl concentration, 140 mM in apical bath vs. 10 mM in basolateral bath). Short-circuit current was measured before and after exposure to amiloride (final concentration in the apical bath, 10  $\mu\text{M}$ ), and the difference current, representing the amiloride-sensitive component of the  $\text{Na}^+$  current across the apical membrane (amiloride-sensitive  $I_{sc \text{ nyst}}$ ), was calculated.

### Detection of ENaC Subunits Expressed at the Apical Surface of Cultured Rat AECs

Biotinylation and recovery of apical membrane proteins from cultured rat AECs were performed as previously described (18, 34). Samples of biotinylated and nonbiotinylated proteins were resolved through 10% acrylamide gels, electroblotted, electrically transferred to nitrocellulose paper, and probed for rENaC subunits (18, 31, 34) and for  $\beta$ -actin.

### Detection of Polyubiquitinated $\alpha$ -ENaC Subunits in Rat AECs

Polyubiquitinated proteins from rat AEC extracts were separated from nonubiquitinated and monoubiquitinated

proteins using agarose-TUBE2 resin (Tandem Ubiquitin-Binding Entities type 2; LifeSensors, Malvern, PA), and control agarose beads (LifeSensors) were used to assess nonspecific binding according to the manufacturer's instructions (details are provided in the online supplement). Tandem Ubiquitin-Binding Entities type 2 recognize tetra-ubiquitin with a very high affinity and are valuable tools for purifying endogenous polyubiquitin-conjugated proteins (36). The samples (nonubiquitinated/monoubiquitinated proteins and polyubiquitinated proteins) were processed for Western blotting and probed for  $\alpha$ -rENaC as described above or with mouse monoclonal antiubiquitin antibody (P4D1; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz) (dilution, 1:1,000) (36).

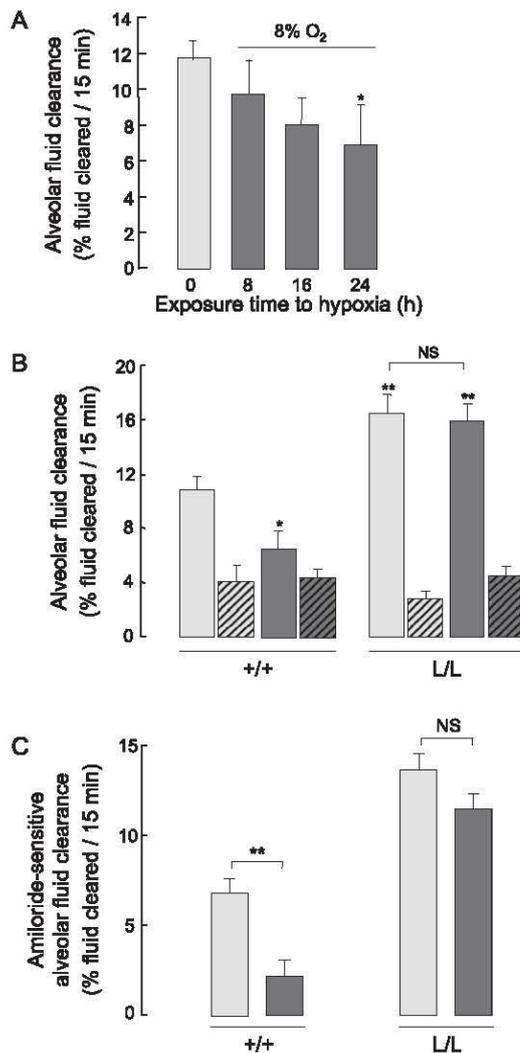
### Statistical Analysis

Results are presented as means  $\pm$  SE. For functional data, one-way or two-way ANOVA were performed, and, when allowed by the F value, results were compared by the modified protected least significant difference (Fisher's PLSD), adjusted by the Bonferroni correction when needed. For Western blot experiments, differences between groups were evaluated with paired or unpaired *t* test performed on raw densitometric data. A *P* value < 0.05 was considered significant. StatView (SAS Institute Inc., Cary, NC) and Prism (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) software was used.

## Results

### Effect of Hypoxia on AFC and ENaC Protein Expression in Wild-Type and Liddle Mice

To examine the role of the ubiquitin protein-ligase Nedd4-2 in hypoxia-induced decrease of alveolar  $\text{Na}^+$  transport, we studied *in vivo* the effect of hypoxic exposure on AFC in Liddle mice harboring the  $R_{566 \text{ stop}}$  mutation on the *Scnn1b* gene. The  $R_{566 \text{ stop}}$  mutation leads to the deletion of the  $\beta$ -ENaC C-terminus PY motif, thus abolishing the interaction between ENaC and Nedd4-2 that targets the channel for endocytosis and degradation (9). In a first set of experiments, we established the time course of hypoxic exposure on  $\text{Na}^+$ -driven AFC in C57Bl6J mice (Figure 1A). Hypoxic exposure (8%  $\text{O}_2$  for 8–24 h) induced a time-dependent decrease of total AFC,



**Figure 1.** Effect of hypoxia on alveolar fluid clearance (AFC) in wild-type and Liddle mice. (A) Male C57Bl6J mice aged 2 to 3 months were exposed to hypoxic atmosphere (8% O<sub>2</sub>, dark gray) for increasing times (0–24 h) as indicated. AFC was measured at the end of exposure over a 15-minute period at 37°C using an *in situ* nonventilated model in which the airspace was instilled with an isoosmolar Ringer's lactate solution containing <sup>125</sup>I-albumin as a volume marker, as described in MATERIALS AND METHODS. Results are expressed as percentage fluid absorption at 15 minutes and represent means ± SE ( $n = 5–9$  mice per condition). \*Significantly different from value at time 0 ( $P < 0.05$ ) (ANOVA and Fisher's protected least significant difference test). (B) Sodium-driven AFC was measured at baseline (total AFC, open bars) and in the presence of amiloride (final concentration in the instillate, 1 mM) (amiloride-insensitive AFC, hatched bars) in wild-type (+/+) and homozygous mutated (L/L) littermates aged 2 to 5 months exposed to normoxic (21% O<sub>2</sub>, light gray) or hypoxic (8% O<sub>2</sub>, dark gray) atmosphere for 24 hours. (C) Calculated values of amiloride-sensitive AFC. Results represent means ± SE ( $n = 4–9$  mice per condition). Significantly different from value in (+/+) mice exposed to normoxia at \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ . NS = nonsignificant (ANOVA and Bonferroni).

being significant at 24 hours ( $P < 0.05$ , ANOVA and Fisher's PLSD). In subsequent experiments, littermate +/+ and homozygous mutated L/L mice were submitted to normoxic/hypoxic exposure for 24 hours (Figures 1B and 1C). Total AFC measured in the absence of amiloride under normoxic conditions was

significantly higher in L/L mice than in +/+ mice ( $16.5 \pm 1.35\%$  vs.  $10.9 \pm 0.94\%$  fluid cleared in 15 min;  $P < 0.001$ , ANOVA and Bonferroni) (Figure 1B) as previously reported (10). Hypoxia induced a 39% decrease in total AFC in +/+ mice ( $P < 0.01$ ) but had no significant effect in L/L littermates (Figure 1B). The amiloride-

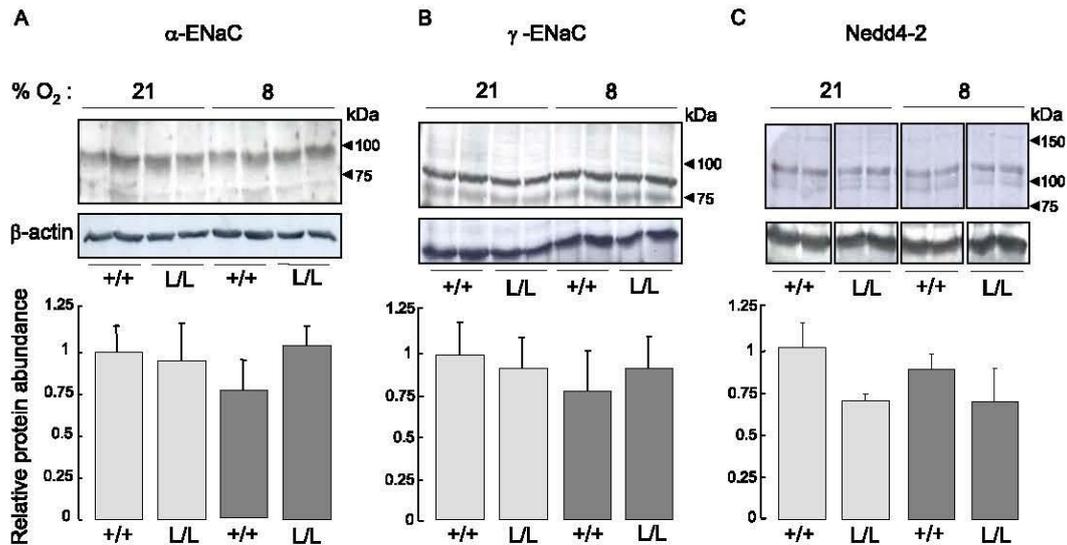
insensitive component of AFC was similar in +/+ and L/L mice and was not affected by hypoxic exposure (Figure 1B).

Therefore, the inhibition of total AFC observed in hypoxic wild-type mice was solely due to a decrease of the amiloride-sensitive component of AFC reflecting ENaC-mediated Na<sup>+</sup> absorption (–69% as compared with normoxic condition;  $P < 0.01$ , ANOVA and Bonferroni). By contrast, amiloride-sensitive AFC was not significantly modified by hypoxic exposure in L/L mice (Figure 1C).

To determine whether the Liddle mutation and/or exposure to hypoxia modified the expression of ENaC and of the ubiquitin protein-ligase Nedd4–2 in lung epithelial cells,  $\alpha$ - and  $\gamma$ -ENaC subunit and Nedd4–2 protein levels were quantified in distal lung homogenates from littermate wild-type and homozygous mutated L/L mice exposed for 24 hours to normoxia or hypoxia. Protein levels of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -ENaC subunits and of Nedd4–2 were similar under normoxic condition in +/+ and L/L mice (Figure 2). Exposure to hypoxia has no significant effect on ENaC or Nedd4–2 protein expression.

#### Effect of Acute Hypoxic Exposure on Transepithelial Sodium Transport across Rat AEC Monolayers

To further investigate the cellular mechanisms involved in hypoxia-induced inhibition of ENaC activity, we established an *in vitro* model of short-term exposure of AECs to hypoxia, allowing us to perform functional, pharmacological, and biochemical experiments. Rat AEC monolayers were first exposed to normoxia or severe hypoxia (0.5% O<sub>2</sub>) for 1 to 6 hours, and transepithelial Na<sup>+</sup> transport was assessed under open-circuit conditions (Figure 3). The total equivalent short-circuit current  $I_{eq}$  was stable in all normoxic experimental conditions (Figure 3A). Hypoxia induced a progressive decrease in total  $I_{eq}$ , which was significant for exposures of at least 2 hours. This decrease of total  $I_{eq}$  was solely due to a decrease of the amiloride-sensitive part of the current because the amiloride-insensitive part was not significantly modified by hypoxia (Figure 3A). The amiloride-sensitive component of  $I_{eq}$ , reflecting the activity of apical ENaC channels and basolateral Na,K-ATPase, was reduced to 60% of normoxic control after 2 hours of hypoxic exposure ( $P < 0.01$ ) and continued to decrease to reach a plateau at



**Figure 2.** Effect of hypoxia on  $\alpha$ - and  $\gamma$ -epithelial  $\text{Na}^+$  channel (ENaC) subunit protein expression in distal lung homogenates from wild-type and Liddle mice. Wild-type (+/+) and homozygous mutated (L/L) littermates aged 2 to 5 months were exposed to normoxic (21%  $\text{O}_2$ , light gray) or hypoxic (8%  $\text{O}_2$ , dark gray) atmosphere for 24 hours. Western blotting was performed on whole distal lung homogenates as described in MATERIALS AND METHODS. Representative immunoblots show the expression of the  $\alpha$ -ENaC subunit (A), the  $\gamma$ -ENaC subunit (B), and the Nedd4-2 protein (C). The intracellular protein  $\beta$ -actin was used as a loading control. Arrowheads indicate molecular mass markers. Different parts of the gel delineated in C come from the same original gel and not from different experiments. Only the order of indicated lanes has been changed to fit with the text and to facilitate the comprehension of the figure. Quantification of  $\alpha$ -ENaC,  $\gamma$ -ENaC, and Nedd4-2 signals was obtained using NIH image software, and data were normalized for the corresponding  $\beta$ -actin signal. Results are expressed as the ratio of the protein of interest to  $\beta$ -actin and represent means  $\pm$  SE ( $n = 3$  mice per group). There was no significant difference between groups (ANOVA and Fisher's protected least significant difference).

40% of normoxic value after 4 hours of hypoxic exposure ( $P < 0.001$ ) (Figure 3B) (two-way ANOVA and Bonferroni). This inhibition was observed whether the cells were cultured or not with dexamethasone (see Figure E1 in the online supplement). Exposure of AECs to moderate hypoxia (1.5%  $\text{O}_2$ ) for 4 hours induced a marked decrease of the amiloride-sensitive  $I_{\text{eq}}$  ( $P < 0.001$ ) similar to that observed with 0.5%  $\text{O}_2$ , whereas exposure to mild hypoxia (3%  $\text{O}_2$ ) had a more moderate inhibitory effect ( $P < 0.001$ ) (Figure 3C).

To specifically assess the effect of hypoxia on ENaC activity, AEC monolayers exposed to hypoxia/normoxia for 4 hours were mounted in an Ussing chamber, and  $I_{\text{sc}}$   $_{\text{nyst}}$  was measured after permeabilization of basolateral membrane with nystatin. The amiloride-sensitive  $I_{\text{sc}}$   $_{\text{nyst}}$  representing the component of the apical  $\text{Na}^+$  current mediated by ENaC, was reduced by almost 70% in hypoxic cells as compared with normoxic control cells ( $P < 0.01$ , unpaired  $t$  test) (Figure 3D).

#### Effect of Acute Hypoxic Exposure on ENaC Subunit Protein Expression in the Apical Membrane of Rat AECs

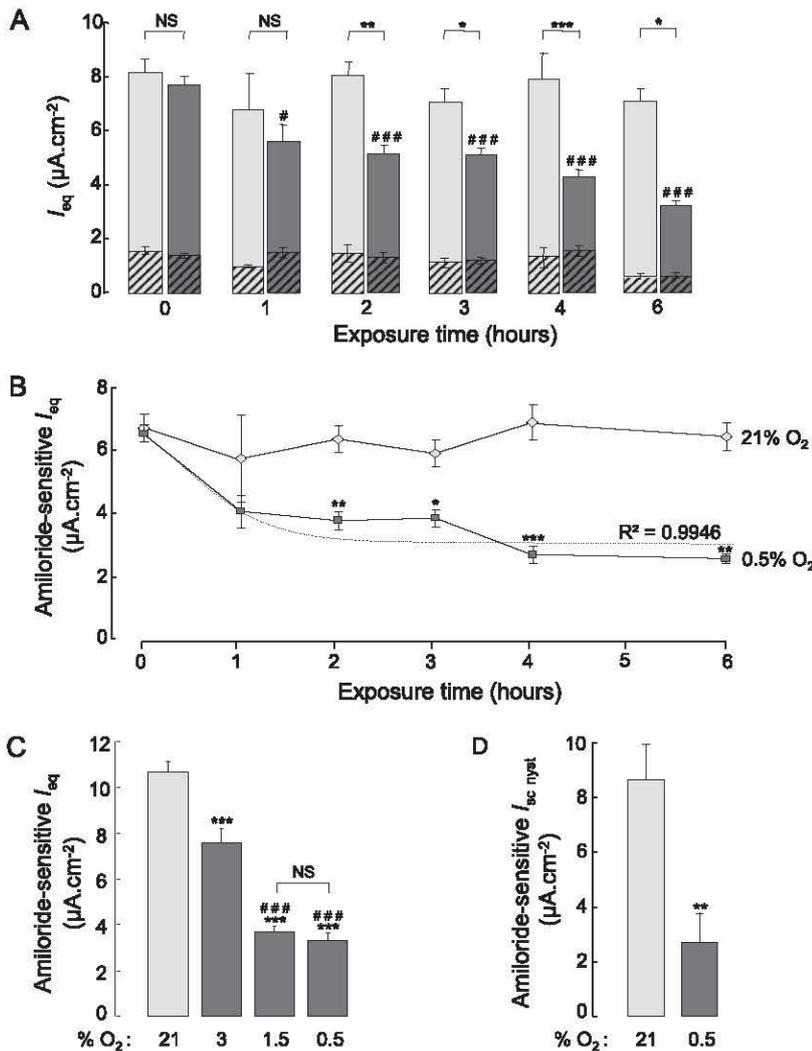
To further examine whether the inhibitory effect of hypoxia on transepithelial  $\text{Na}^+$

transport could be due to a decrease of the abundance rENaC subunits expressed at the apical membrane, rat AEC monolayers were exposed to normoxia or hypoxia for 2 hours before apical cell surface biotinylation and subsequent separation of intracellular (nonbiotinylated) and surface (biotinylated) proteins were performed. Immunoblotting with rabbit polyclonal anti  $\alpha$ -rENaC antibody revealed a major band with molecular mass of 80 to 85 kD in intracellular extracts of AECs, whereas the prominent band in biotinylated extracts migrated at 65 kD, as previously described (Figure 4A, left panel) (18, 34). Immunoblotting with rabbit polyclonal anti- $\beta$ -rENaC (Figure 4A, middle panel) showed one single band migrating at 95 to 100 kD in intracellular and surface extracts. Immunoblotting with rabbit polyclonal anti- $\gamma$ -rENaC (Figure 4A, right panel) detected a major band around 90 kD and a minor band at 75 kD in intracellular extracts but detected only a band at 90 kD in biotinylated extracts. A 2-hour hypoxic exposure did not modify the abundance of intracellular rENaC subunit proteins (Figure 4B). By contrast, levels of biotinylated  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -rENaC were reduced by 37% ( $P < 0.01$ ), 68% ( $P < 0.05$ ),

and 70% ( $P < 0.05$ ), respectively, in hypoxic cells (Figure 4C) (paired  $t$  test).

#### Effect of Hypoxic Exposure on the Ubiquitination of $\alpha$ -ENaC Subunits

Ubiquitination is a common mechanism to target endocytosis and degradation of cell surface proteins. In epithelial cells endogenously expressing ENaC, this mechanism mainly involves the binding of several ubiquitin molecules on ENaC subunits by the ubiquitin protein-ligase Nedd4-2 (19, 20, 22, 24, 37). To test whether hypoxia affected ENaC ubiquitination in our *in vitro* model, rat AEC monolayers were exposed to normoxia or hypoxia for 4 hours before polyubiquitinated proteins were purified using agarose beads coupled with TUBEs, and polyubiquitinated  $\alpha$ -ENaC protein was quantified (Figure 5). An antiubiquitin antibody detected a large amount of ubiquitinated proteins of various molecular masses in cell extracts incubated with agarose beads coupled with TUBEs (Figure 5A, diffuse bands in lanes 1 and 2) as expected (36), whereas no signal was detected in cell extracts incubated with control agarose beads (Figure 5A, lanes 3 and 4), excluding a nonspecific binding



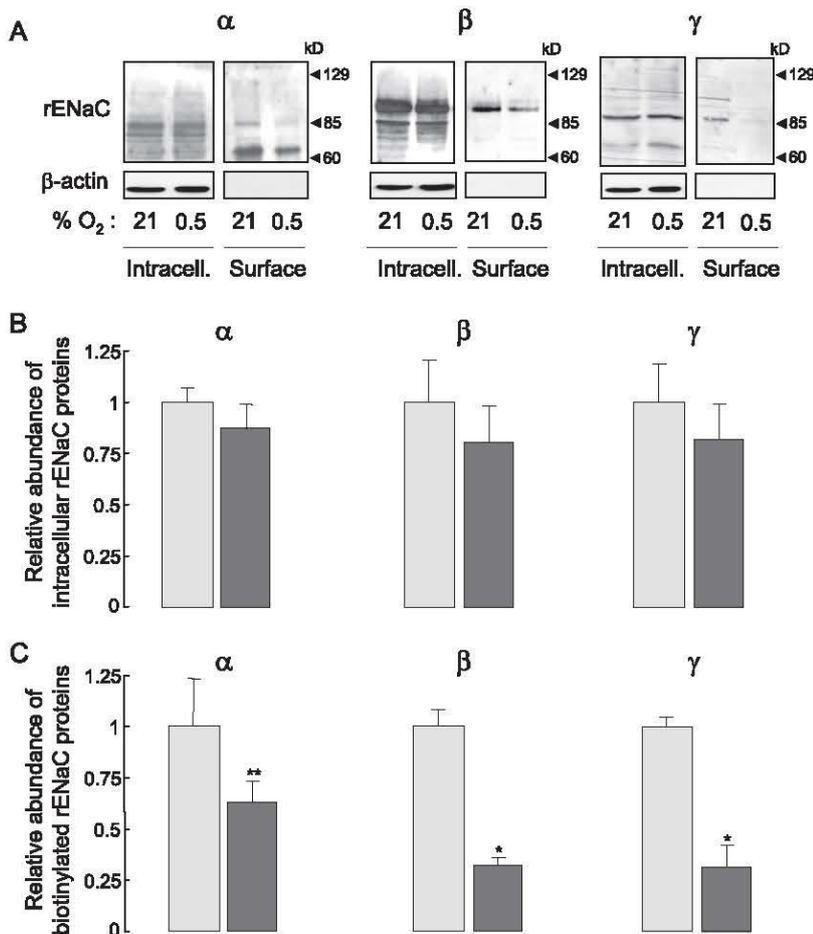
**Figure 3.** Effect of acute hypoxia on transepithelial sodium transport across rat alveolar epithelial cells (AECs). Rat airway epithelial cells (AECs) grown for 5 days on Transwell filters were exposed to normoxic (21% O<sub>2</sub>, light gray) or hypoxic (0.5% O<sub>2</sub>, dark gray) atmosphere for increasing times (0–6 h). (A) Equivalent short-circuit current ( $I_{eq}$ ) was measured under open-circuit conditions immediately at the end of exposure (plain bars), and after apical treatment with amiloride (10  $\mu$ M) (hatched bars). Results are expressed in  $\mu$ A/cm<sup>2</sup> and represent means  $\pm$  SE (4–22 filters per condition from six independent experiments). Significantly different from corresponding normoxic value at \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, and \*\*\* $P$  < 0.001; significantly different from hypoxic value at time 0 at # $P$  < 0.05 and ### $P$  < 0.001. NS = nonsignificant (two-way ANOVA and Bonferroni). (B) Amiloride-sensitive  $I_{eq}$  was calculated as the difference between  $I_{eq}$  values without and with amiloride. Significantly different from corresponding normoxic value at \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, and \*\*\* $P$  < 0.001 (two-way ANOVA and Bonferroni). Dashed line: nonlinear regression analysis of amiloride-sensitive  $I_{eq}$  values in hypoxic AECs. (C) Rat AECs were exposed for 4 hours to normoxia or to various levels of hypoxia (0.5, 1.5, and 3% O<sub>2</sub>) before amiloride-sensitive  $I_{eq}$  was measured (20–30 filters per condition from six independent experiments). \*\*\*Significantly different from value in normoxic cells at  $P$  < 0.001; ###significantly different from value in cells exposed to 3% O<sub>2</sub> at  $P$  < 0.001 (ANOVA and Fisher’s protected least significant difference). (D) Rat AECs on Snapwell filters were exposed for 4 hours to normoxic or hypoxic (0.5% O<sub>2</sub>) atmosphere and rapidly mounted in Ussing chambers. Basolateral membrane permeabilization was achieved by adding nystatin in the basolateral compartment. Short-circuit current was measured before and after apical treatment with amiloride (10  $\mu$ M), and the difference in current, representing the amiloride-sensitive component of the Na<sup>+</sup> current across the apical membrane (amiloride-sensitive  $I_{sc\ nyst}$ ), was calculated. Results represent means  $\pm$  SE (eight filters per condition from three independent experiments). \*\*Significantly different from corresponding normoxic value at  $P$  < 0.01) (unpaired  $t$  test).

between agarose and polyubiquitinated proteins.  $\alpha$ -ENaC was detected as a major band around 80 to 85 kD in the “input” samples (total cell extracts, not incubated with beads) (Figure 5B, lanes 1 and 2) and in the unbound fraction of samples incubated with TUBEs (representing nonubiquitinated or monoubiquitinated proteins) (Figure 5B, lanes 5 and 6). In the samples bound to TUBEs (representing polyubiquitinated proteins) (Figure 5B, lanes 3 and 4), a shift in  $\alpha$ -ENaC protein signal was observed, with a major band at 90 to 95 kD and a minor band at 110 kD (data not shown), as previously described by Malik and colleagues (37) (Figure 5B). The amount of  $\alpha$ -ENaC subunits in total cell extracts was not significantly different after normoxic or hypoxic exposure (Figure 5B, lanes 1 and 2; Figure 5C, left panel). Also, there was no significant difference in the amount of  $\alpha$ -ENaC subunits unbound to TUBEs (Figure 5B, lanes 5 and 6; Figure 5C, right panel). On the contrary, hypoxia induced a 2-fold increase of polyubiquitinated  $\alpha$ -ENaC subunits ( $P$  < 0.01; ANOVA and Fisher’s PLSD) (Figure 5B, lanes 3 and 4; Figure 5C, right panel).

Exposure to hypoxia did not modify Nedd4–2 protein expression in rat AEC extracts (details are provided in the online supplement and in Figure E3).

**Effect of Proteasome and Lysosome Inhibitors on Hypoxia-Induced Decrease in Transepithelial Sodium Transport**

In most native epithelial cells endogenously expressing ENaC, polyubiquitinated ENaC proteins are preferentially degraded in the proteasome (22, 37). However, in transfected cell lines, monoubiquitinated ENaC can also be degraded via the lysosomal pathway. We therefore tested whether pharmacological inhibition of these pathways could prevent the hypoxia-induced decrease of amiloride-sensitive alveolar Na<sup>+</sup> transport in AECs. Rat AECs were preincubated for 30 minutes with proteasome inhibitors (lactacystin or MG132), with the lysosome inhibitor chloroquine, or with vehicle before being exposed for 2 hours to a normoxic/hypoxic atmosphere and processed for electrophysiological measurements. Preincubation with lactacystin (20  $\mu$ M) (Figure 6A) or MG132 (10  $\mu$ M)



**Figure 4.** Effect of acute hypoxia on ENaC subunit cell surface expression in rat AECs. Rat AECs grown on transwell filters were exposed to normoxic (21% O<sub>2</sub>) or hypoxic (0.5% O<sub>2</sub>) atmosphere for 2 hours before apical cell surface biotinylation experiments were performed as described in MATERIALS AND METHODS to assess cell surface expression of rat ENaC (rENaC) subunits. (A) Representative immunoblots showing the expression of α-rENaC subunit (*left*), β-rENaC (*middle*), and γ-rENaC (*right*) subunits in nonbiotinylated (intracell. = intracellular) and biotinylated extracts (surface). β-actin, an abundant intracellular protein, was not detected in biotinylated (surface) extracts. Quantification of intracellular (nonbiotinylated) (B) and cell surface (biotinylated) (C) α-, β-, and γ-rENaC protein signals in normoxic (*light gray*) and hypoxic (*dark gray*) cells was obtained using NIH image software. Data were normalized for the β-actin signal in corresponding intracellular extracts. Results represent means ± SE (*n* = 3–five separate experiments). Statistical significance was calculated from the raw data by paired *t* test. Significantly different from normoxic value at \**P* < 0.05 and \*\**P* < 0.01 (paired *t* test).

(Figure 6B) fully prevented the inhibitory effect of hypoxia on amiloride-sensitive  $I_{eq}$ . By contrast, preincubation with chloroquine (75 μM) had no protective effect in hypoxic AECs (Figure 6C).

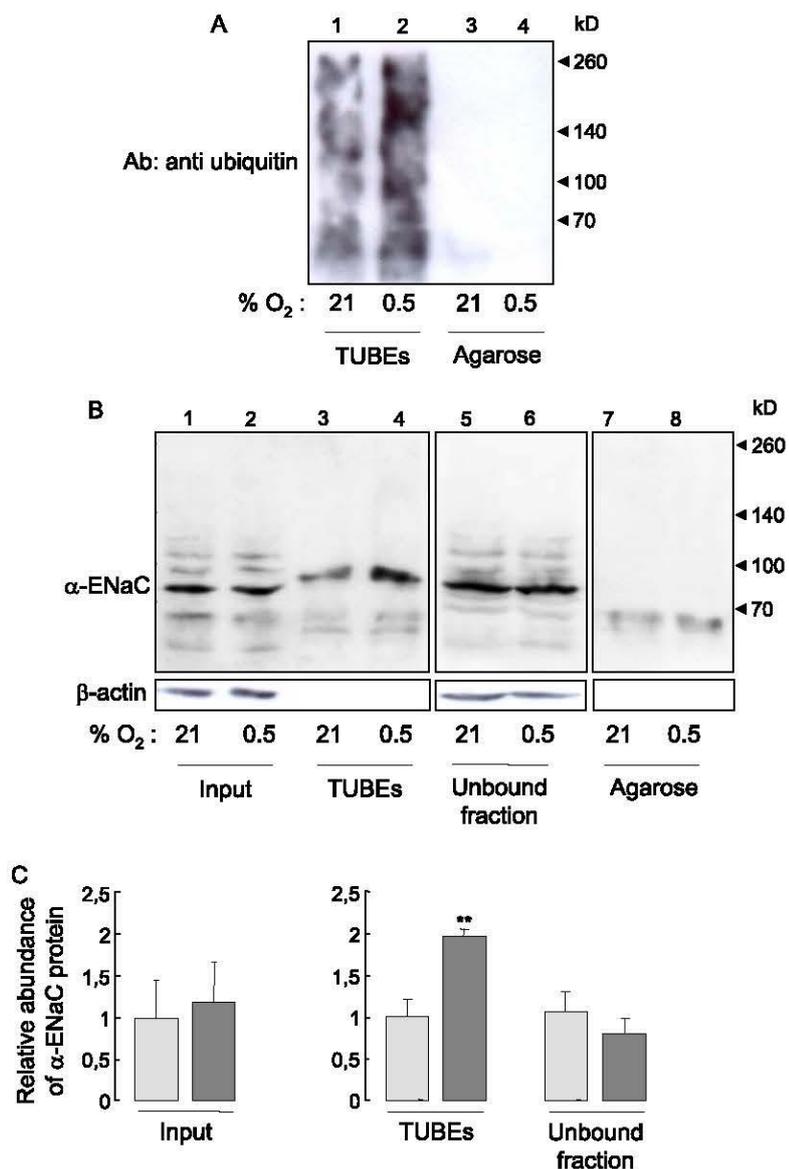
#### Effect of NAC on Transepithelial Sodium Transport and Ubiquitination of α-ENaC Subunits under Hypoxic Condition

Hypoxia has been shown to increase the production of mitochondrial reactive

oxygen species (ROS) in AECs (38). To examine whether increased ROS production could be involved in hypoxia-induced inhibition of transepithelial Na<sup>+</sup> transport, the effect of NAC, a glutathione precursor with antioxidant properties, was tested. Preincubation of AECs with NAC (5 mM) completely prevented the decrease of amiloride-sensitive  $I_{eq}$  induced by a 4-hour exposure to 0.5 or 1.5% O<sub>2</sub> (Figure 7).

## Discussion

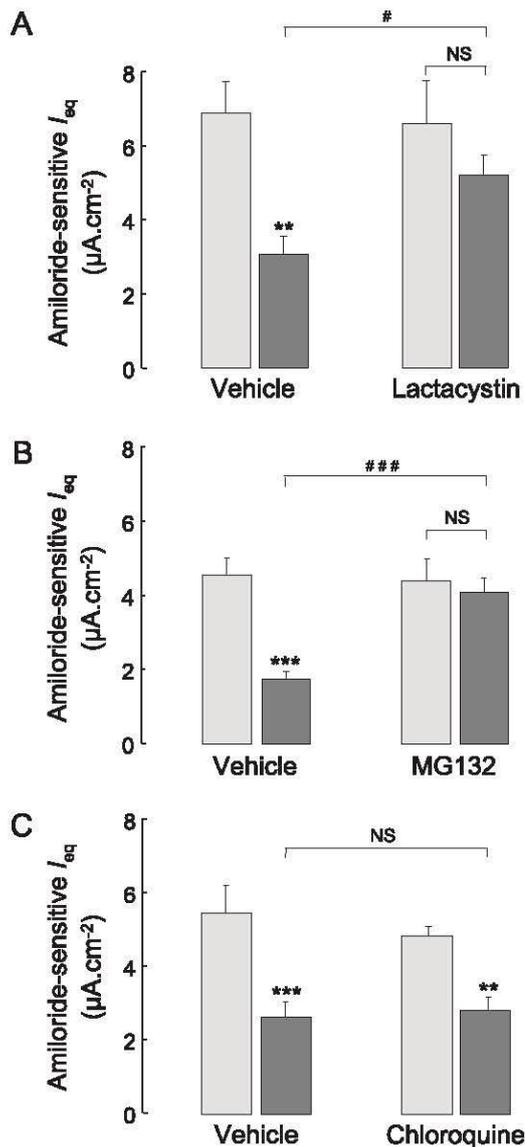
The present study was designed to investigate the cellular mechanism(s) responsible for hypoxia-induced decrease of ENaC cell surface expression and transepithelial alveolar Na<sup>+</sup> transport by combining *in vitro* and *in vivo* approaches in rodents. The number of channels on the apical surface of epithelial cells is a major determinant of the magnitude of ENaC-mediated Na<sup>+</sup> transport (19, 20, 23). Channel density in the plasma membrane depends on the balance between the rate of ENaC insertion and the rate of removal from the apical membrane. The mechanism of channel insertion in the plasma membrane is not clearly understood, although it is well recognized that ENaC delivery at the apical membrane is increased by cAMP/PKA stimulation (18, 23, 39). Retrieval of ENaC from the plasma membrane has been widely studied and is considered as a key process in the regulation of apical channel density. Accumulating evidence indicate that ubiquitin conjugation is a prerequisite for ENaC endocytosis and subsequent degradation (19–21, 23, 24, 26). In most native epithelial cells expressing endogenous ENaC, ENaC subunits are usually polyubiquitinated and then internalized and directed to the proteasome for degradation (22, 24, 37). The binding of consensus PY motifs located in β- or γ-ENaC C-terminus to the WW domains of Nedd4–2, a specific ubiquitin-ligase isoform, is required for ubiquitination of ENaC subunits (24, 27, 28). Two recent studies using Nedd4–2-deficient mice clearly demonstrated that Nedd4–2, which is coexpressed with ENaC in lung epithelial cells transporting Na<sup>+</sup>, plays a crucial role in the regulation of ENaC activity in the lung (40, 41). The deletion of Nedd4–2, whether it was restricted or not to the lung, induced the premature death of the mice (before the age of 3 wk), preventing the use of these animal models to study Nedd4–2 in the adult lung. To evaluate the role of Nedd4–2 in hypoxia-induced ENaC inhibition in the adult lung, we compared *in vivo* the effect of hypoxia on Na<sup>+</sup>-driven AFC in wild-type and β-Liddle mice carrying a premature Stop codon in the *Scn1b* (β-ENaC) gene corresponding to the R<sub>566 stop</sub> gain-of-function mutation found in human



**Figure 5.** Effect of acute hypoxia on polyubiquitination of  $\alpha$ -rENaC subunits. Rat AECs grown on Transwell filters were exposed to normoxic (21% O<sub>2</sub>) or hypoxic (0.5% O<sub>2</sub>) atmosphere for 4 hours before cell extracts were incubated with Tandem Ubiquitin-Binding Entities (TUBEs) beads as described in MATERIALS AND METHODS to separate nonubiquitinated and monoubiquitinated proteins (unbound fraction) from polyubiquitinated proteins (bound to TUBEs) or to control agarose beads. (A) Representative immunoblot showing polyubiquitinated proteins purified with TUBEs as detected with an antiubiquitin antibody (lanes 1 and 2), as indicated. No signal was detected in protein extracts incubated with control agarose beads (lanes 3 and 4), indicating the absence of nonspecific binding of ubiquitinated proteins to agarose beads. (B) Representative immunoblots showing the expression of  $\alpha$ -rENaC subunits in total cell extracts (input samples, 1 and 2), in protein extracts bound to TUBEs (lanes 3 and 4) and in the unbound fraction (lanes 5–6), or in protein extracts incubated with control agarose beads (lanes 7 and 8). Different parts of the gel delineated in B come from the same original gel and not from different experiments. Only the order of indicated lanes has been changed to fit with the text of the manuscript and to facilitate the comprehension of the figure. Note the shift of  $\alpha$ -rENaC signal detected in ubiquitinated protein extracts (lanes 3 and 4) (90–95 kD as compared with 80–85 kD in unbound extracts).  $\beta$ -actin, an abundant intracellular protein, was not detected in samples bound to TUBEs or incubated with control agarose beads. (C) Quantification of  $\alpha$ -ENaC subunits after normoxic (light gray) or hypoxic (dark gray) exposure. Signal quantification was obtained using NIH ImageJ software, and data were normalized for the  $\beta$ -actin signal in corresponding input samples, used as a loading control. Results represent means  $\pm$  SE of four separate experiments. Statistical

patients with Liddle's syndrome (9, 10, 25, 27). Liddle's syndrome is an autosomal dominant form of salt-sensitive hypertension due to increased Na<sup>+</sup> absorption in the distal nephron (25, 27, 29). The R<sub>566</sub> stop mutation leads to the deletion of the  $\beta$ -ENaC C-terminus containing consensus PY motifs that bind to the WW domains of Nedd4-2 (9), thus abolishing the interaction between  $\beta$ -ENaC and Nedd4-2. In wild-type mice, hypoxia (8% O<sub>2</sub> for 24 h) decreased the amiloride-sensitive component of AFC reflecting ENaC-mediated Na<sup>+</sup> transport by almost 70%. The hypoxic inhibition of ENaC-mediated AFC was not associated with a decrease of the ENaC subunit protein levels in distal lung homogenates, suggesting a posttranslational mechanism. In homozygous mutated Liddle mice, total and amiloride-sensitive AFC were significantly higher than in wild-type littermates under normoxic condition, as previously reported (10). The stimulation of basal AFC in Liddle mice can be attributed to increased density of ENaC channels on the apical membrane of AECs due to reduced endocytosis and degradation of ENaC subunits (26, 27). In Liddle mice, exposure to hypoxia did not impair total or amiloride-sensitive AFC as it did in wild-type mice. This indicates that the interaction between  $\beta$ -ENaC and Nedd4-2 is required for hypoxic inhibition of alveolar Na<sup>+</sup> transport, at least in mouse lung, and suggests that ubiquitination of ENaC by Nedd4-2 is instrumental in this process.

To further investigate the effect of hypoxia on ENaC ubiquitination and degradation, we established an *in vitro* model of acute hypoxic exposure of rat AECs, allowing us to perform functional, biochemical, and pharmacological studies. Our data show that exposure to severe hypoxia (0.5% O<sub>2</sub>) for as little as 2 hours decreased amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> transport and ENaC activity in rat AEC monolayers by approximately 40%. Exposure to moderate hypoxia (1.5% O<sub>2</sub>) induced a functional inhibition of equivalent magnitude, whereas mild hypoxia (3% O<sub>2</sub>) had a weaker but still significant inhibitory effect. Steady-state oxygen tensions in cell culture media ( $\sim$  30, 45, and 60 mm Hg for 0.5, 1.5, and 3% O<sub>2</sub>, respectively) were in the range of what can be found in the alveolar milieu in case of hydrostatic pulmonary edema or acute



**Figure 6.** Effect of proteasome and lysosome inhibitors on hypoxia-induced decrease in transepithelial sodium transport. Rat AECs grown for 5 days on Transwell filters were preincubated for 30 minutes with lactacystin (20  $\mu M$ ) (A), MG132 (10  $\mu M$ ) (B), chloroquine (75  $\mu M$ ) (C), or vehicle before being exposed to normoxic (21%  $O_2$ , light gray) or hypoxic (0.5%  $O_2$ , dark gray) atmosphere for 2 hours. Amiloride-sensitive  $I_{eq}$  was measured under open-circuit condition immediately at the end of exposure. Results are expressed in  $\mu A/cm^2$  and represent means  $\pm$  SE (6–10 filters per condition from six independent experiments). Significantly different from value in normoxic cells treated with vehicle at \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ . Significantly different from value in hypoxic cells treated with vehicle at # $P < 0.05$  and ### $P < 0.001$ . NS = nonsignificant (ANOVA and Fisher's protected least significant difference test).

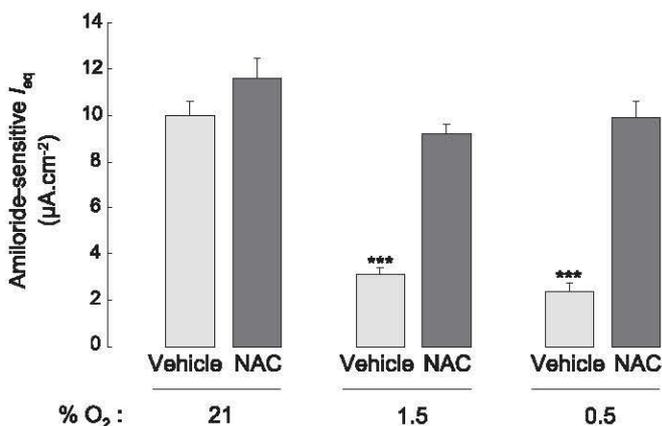
lung injury/acute respiratory distress syndrome. Inhibition of transepithelial  $Na^+$  transport was observed whether the cells

were cultured or not with dexamethasone (further details are provided in the online supplement and in Figure E1), in line with

previous work showing no protective effect of corticosteroids on hypoxia-induced decrease of  $Na^+$  transport in renal epithelial cells (42). The time course of hypoxic inhibition of transepithelial  $Na^+$  transport that we observed *in vitro* in rat AECs was somewhat shorter than that observed in mouse lung *in vivo*. This could be due to differences between species (rat vs. mouse) and to the presence *in vivo* of adaptive responses to hypoxic stress (such as release of endogenous catecholamines) that may affect ENaC and  $Na^+, K^+$ -ATPase activities (3). The very short time course of ENaC hypoxic inhibition *in vitro* could not be explained by a transcriptional mechanism. Indeed, we previously showed that severe hypoxic exposure (0%  $O_2$ ) for 3 hours did not modify  $\alpha$ - and  $\beta$ -ENaC mRNA transcript levels in rat AECs and only slightly decreased  $\gamma$ -ENaC mRNA levels (18). In the present study, intracellular pools of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -ENaC subunit proteins in rat AECs were not affected by the 2-hour hypoxic exposure, whereas cell surface expression was reduced by 37, 68, and 74%, respectively. Also, treatment with terbutaline, which promotes the insertion of new ENaC channels in the apical membrane (18, 39), completely and rapidly reversed the functional decrease induced by hypoxia (details are provided in the online supplement and in Figure E2). Together, these data indicate that exposure of AECs to hypoxia rapidly inhibited ENaC-mediated  $Na^+$  transport through a posttranslational mechanism inducing a decrease in ENaC cell surface expression. It was also previously reported that short-term exposure of rat AECs or A549 cells to hypoxia induced a rapid decrease of  $Na^+, K^+$ -ATPase activity due to increased internalization of the protein and decreased cell surface expression (13, 14, 43).

Consistent with *in vivo* findings in mice, our *in vitro* data strongly suggest the role of ENaC ubiquitination and subsequent internalization in response to hypoxia. Indeed, short-term hypoxic exposure induced a 2-fold increase in  $\alpha$ -ENaC polyubiquitination in cultured rat. To our best knowledge, this constitutes the first evidence that ubiquitination of ENaC in native epithelial cells is up-regulated by hypoxia. Also, our data show that the hypoxia-induced decrease of ENaC-mediated  $Na^+$  transport as assessed by amiloride-sensitive  $I_{eq}$  was fully prevented by preincubation with lactacystin or

**Figure 5.** (Continued). significance was calculated from the raw data. There was no significant difference between groups in input samples (paired  $t$  test). \*\*Significantly different from corresponding normoxic value at  $P < 0.01$  (ANOVA and Fisher's protected least significant difference test).



**Figure 7.** Effect of N-acetyl-cysteine (NAC) on hypoxia-induced decrease in transepithelial sodium transport. Rat AECs grown for 5 days on Transwell filters were preincubated for 30 minutes with NAC (5 mM, *dark gray*) or vehicle (*light gray*) before being exposed to normoxia (21% O<sub>2</sub>) or to moderate (1.5% O<sub>2</sub>) or severe (0.5% O<sub>2</sub>) hypoxia for 2 hours. Amiloride-sensitive  $I_{eq}$  was measured under open-circuit condition immediately at the end of exposure. Results are expressed in  $\mu A/cm^2$  and represent means  $\pm$  SE (10–18 filters per condition from four independent experiments). \*\*\*Significantly different from value in normoxic cells treated with vehicle at  $P < 0.001$  (ANOVA and Bonferroni).

MG132, which block the chymotryptic activity of the proteasome, whereas preincubation with chloroquine, an inhibitor of the lysosome, had no protective effect. This suggests that the ubiquitin–proteasome proteolytic pathway (rather than the lysosomal pathway) is involved in the degradation of polyubiquitinated ENaC channels in hypoxic AECs. This is in accordance with previous studies showing that, in untransfected epithelial cells endogenously expressing ENaC, polyubiquitination of ENaC by Nedd4–2 leads to endocytosis of the channel and degradation via the proteasomal pathway (37). However, because we did not directly measure the proteasomal degradation of ENaC channels, we cannot exclude the possibility that the preventive effect of proteasome

inhibitors was simply the consequence of decreased endocytosis due to a depletion of the cellular pool of free ubiquitin, as previously reported for MG132 (44).

Another interesting finding of the present study is the fact that the antioxidant NAC completely prevented the hypoxia-induced decrease in transepithelial Na<sup>+</sup> transport in rat AECs. Decreased O<sub>2</sub> availability induces the production of ROS by complex III in the mitochondrial electron transport chain (38), a phenomenon that could explain many of the biological effects of hypoxia, particularly in the field of ion transport. Lazrak and colleagues recently reported that increased steady-state concentrations of ROS (induced in their study by influenza virus M2 protein) in human respiratory cell lines (H441 and A549) decreased the

activity of wild-type ENaC (but not of Liddle mutants) by enhancing its endocytosis and degradation in the proteasome (45). The inhibitory effect of ROS on ENaC could have several explanations. Hypoxia-induced mitochondrial production of ROS can activate adenosine monophosphate-activated kinase (43), which has been shown to activate Nedd4–2 and inhibit ENaC in various epithelial cell types (46–48). Also, ROS can activate PKC, which promotes targeted degradation of ENaC channels in some cell types (45, 49). Finally, ROS were recently shown to induce a reversible and global inactivation of deubiquitinases, which remove ubiquitin conjugates from diverse substrates (50), a phenomenon that could potentially increase ubiquitinated forms of ENaC and their subsequent internalization.

In conclusion, the present study provides strong evidence that the interaction between Nedd4–2 and  $\beta$ -ENaC as well as polyubiquitination and subsequent endocytosis of Na<sup>+</sup> channels plays a crucial role in the pathophysiology of hypoxia-induced inhibition of transepithelial alveolar Na<sup>+</sup> transport. Inhibiting Nedd4–2 and the proteasomal degradation pathway or decreasing ROS concentrations in AECs could represent future therapeutic targets to enhance ENaC activity and AFC in pathological situations associated with alveolar hypoxia. ■

**Author disclosures** are available with the text of this article at [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org).

**Acknowledgments:** The authors thank Françoise Cluzeaud, Nicole Fowler-Jaeger, and Anissa Bouhafaia for helpful technical assistance and Dr Alain Vandewalle for fruitful discussions.

## References

- Eaton DC, Helms MN, Koval M, Bao HF, Jain L. The contribution of epithelial sodium channels to alveolar function in health and disease. *Annu Rev Physiol* 2009;71:403–423.
- Hummeler E, Barker P, Gatzky J, Beermann F, Verdumo C, Schmidt A, Boucher R, Rossier BC. Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nat Genet* 1996;12:325–328.
- Matthay MA, Folkesson HG, Clerici C. Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema. *Physiol Rev* 2002;82:569–600.
- Matalon S, O’Brodivich H. Sodium channels in alveolar epithelial cells: molecular characterization, biophysical properties, and physiological significance. *Annu Rev Physiol* 1999;61:627–661.
- Canessa CM, Horisberger JD, Rossier BC. Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration. *Nature* 1993;361:467–470.
- Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD, Rossier BC. Amiloride-sensitive epithelial Na<sup>+</sup> channel is made of three homologous subunits. *Nature* 1994;367:463–467.
- Hummeler E, Planès C. Importance of ENaC-mediated sodium transport in alveolar fluid clearance using genetically-engineered mice. *Cell Physiol Biochem* 2010;25:63–70.
- Planès C, Randrianarison NH, Charles R-P, Frateschi S, Cluzeaud F, Vuagniaux G, Soler P, Clerici C, Rossier BC, Hummeler E. ENaC-mediated alveolar fluid clearance and lung fluid balance depend on the channel-activating protease 1. *EMBO Mol Med* 2010;2:26–37.

9. Pradervand S, Wang Q, Burnier M, Beermann F, Horisberger JD, Hummler E, Rossier BC. A mouse model for Liddle's syndrome. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:2527–2533.
10. Randrianarison N, Escoubet B, Ferreira C, Fontayne A, Fowler-Jaeger N, Clerici C, Hummler E, Rossier BC, Planès C. Beta-Liddle mutation of the epithelial sodium channel increases alveolar fluid clearance and reduces the severity of hydrostatic pulmonary oedema in mice. *J Physiol* 2007;582:777–788.
11. Güney S, Schuler A, Ott A, Höschele S, Zügel S, Baloglu E, Bärtsch P, Mairbäurl H. Dexamethasone prevents transport inhibition by hypoxia in rat lung and alveolar epithelial cells by stimulating activity and expression of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and epithelial Na<sup>+</sup> channels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293:L1332–L1338.
12. Vivona ML, Matthay M, Chabaud MB, Friedlander G, Clerici C. Hypoxia reduces alveolar epithelial sodium and fluid transport in rats: reversal by beta-adrenergic agonist treatment. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25:554–561.
13. Comellas AP, Dada LA, Lecuona E, Pesce LM, Chandel NS, Quesada N, Budinger GRS, Strous GJ, Ciechanover A, Sznajder JI. Hypoxia-mediated degradation of Na,K-ATPase via mitochondrial reactive oxygen species and the ubiquitin-conjugating system. *Circ Res* 2006;98:1314–1322.
14. Dada LA, Chandel NS, Ridge KM, Pedemonte C, Bertorello AM, Sznajder JI. Hypoxia-induced endocytosis of Na,K-ATPase in alveolar epithelial cells is mediated by mitochondrial reactive oxygen species and PKC-zeta. *J Clin Invest* 2003;111:1057–1064.
15. Mairbäurl H, Mayer K, Kim K-J, Borok Z, Bärtsch P, Crandall ED. Hypoxia decreases active Na transport across primary rat alveolar epithelial cell monolayers. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282:L659–L665.
16. Planès C, Escoubet B, Blot-Chabaud M, Friedlander G, Farman N, Clerici C. Hypoxia downregulates expression and activity of epithelial sodium channels in rat alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17:508–518.
17. Clerici C, Planès C. Gene regulation in the adaptive process to hypoxia in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;296:L267–L274.
18. Planès C, Blot-Chabaud M, Matthay MA, Couette S, Uchida T, Clerici C. Hypoxia and beta 2-agonists regulate cell surface expression of the epithelial sodium channel in native alveolar epithelial cells. *J Biol Chem* 2002;277:47318–47324.
19. Butterworth MB, Edinger RS, Frizzell RA, Johnson JP. Regulation of the epithelial sodium channel by membrane trafficking. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;296:F10–F24.
20. Eaton DC, Malik B, Bao H-F, Yu L, Jain L. Regulation of epithelial sodium channel trafficking by ubiquitination. *Proc Am Thorac Soc* 2010;7:54–64.
21. Li T, Koshy S, Folkesson HG. Involvement of {alpha}ENaC and Nedd4-2 in the conversion from lung fluid secretion to fluid absorption at birth in the rat as assayed by RNA interference analysis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293:L1069–L1078.
22. Malik B, Price SR, Mitch WE, Yue Q, Eaton DC. Regulation of epithelial sodium channels by the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290:F1285–F1294.
23. Snyder PM. Minireview: regulation of epithelial Na<sup>+</sup> channel trafficking. *Endocrinology* 2005;146:5079–5085.
24. Staub O, Rotin D. Role of ubiquitylation in cellular membrane transport. *Physiol Rev* 2006;86:669–707.
25. Abriel H, Loffing J, Rebhun JF, Pratt JH, Schild L, Horisberger JD, Rotin D, Staub O. Defective regulation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel by Nedd4 in Liddle's syndrome. *J Clin Invest* 1999;103:667–673.
26. Firsov D, Schild L, Gautschi I, Mérillat AM, Schneeberger E, Rossier BC. Cell surface expression of the epithelial Na channel and a mutant causing Liddle syndrome: a quantitative approach. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:15370–15375.
27. Schild L, Canessa CM, Shimkets RA, Gautschi I, Lifton RP, Rossier BC. A mutation in the epithelial sodium channel causing Liddle disease increases channel activity in the *Xenopus laevis* oocyte expression system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5699–5703.
28. Schild L, Lu Y, Gautschi I, Schneeberger E, Lifton RP, Rossier BC. Identification of a PY motif in the epithelial Na channel subunits as a target sequence for mutations causing channel activation found in Liddle syndrome. *EMBO J* 1996;15:2381–2387.
29. Shimkets RA, Warnock DG, Bositis CM, Nelson-Williams C, Hansson JH, Schambelan M, Gill JR Jr, Ulick S, Milora RV, Findling JW. Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel. *Cell* 1994;79:407–414.
30. Randrianarison N, Clerici C, Ferreira C, Fontayne A, Pradervand S, Fowler-Jaeger N, Hummler E, Rossier BC, Planès C. Low expression of the beta-ENaC subunit impairs lung fluid clearance in the mouse. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;294:L409–L416.
31. Duc C, Farman N, Canessa CM, Bonvalet JP, Rossier BC. Cell-specific expression of epithelial sodium channel alpha, beta, and gamma subunits in aldosterone-responsive epithelia from the rat: localization by in situ hybridization and immunocytochemistry. *J Cell Biol* 1994;127:1907–1921.
32. Ronzaud C, Loffing-Cueni D, Hausel P, Debonneville A, Malsure SR, Fowler-Jaeger N, Boase NA, Perrier R, Maillard M, Yang B, et al. Renal tubular NEDD4-2 deficiency causes NCC-mediated salt-dependent hypertension. *J Clin Invest* 2013;123:657–665.
33. Ouidir A, Planès C, Fernandes I, VanHesse A, Clerici C. Hypoxia upregulates activity and expression of the glucose transporter GLUT1 in alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;21:710–718.
34. Planès C, Leyvraz C, Uchida T, Angelova MA, Vuagniaux G, Hummler E, Matthay MA, Clerici C, Rossier B. *In vitro* and *in vivo* regulation of transepithelial lung alveolar sodium transport by serine proteases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288:L1099–L1109.
35. Goolaerts A, Roux J, Ganter MT, Shlyonsky V, Chraïbi A, Stéphane R, Mies F, Matthay MA, Naeije R, Sariban-Sohraby S, et al. Serotonin decreases alveolar epithelial fluid transport via a direct inhibition of the epithelial sodium channel. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010;43:99–108.
36. Hjerpe R, Aillet F, Lopitz-Otsoa F, Lang V, England P, Rodriguez MS. Efficient protection and isolation of ubiquitylated proteins using tandem ubiquitin-binding entities. *EMBO Rep* 2009;10:1250–1258.
37. Malik B, Yue Q, Yue G, Chen XJ, Price SR, Mitch WE, Eaton DC. Role of Nedd4-2 and polyubiquitination in epithelial sodium channel degradation in untransfected renal A6 cells expressing endogenous ENaC subunits. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289:F107–F116.
38. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  during hypoxia. *J Biol Chem* 2000;275:25130–25138.
39. Chen X-J, Eaton DC, Jain L. Beta-adrenergic regulation of amiloride-sensitive lung sodium channels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282:L609–L620.
40. Kimura T, Kawabe H, Jiang C, Zhang W, Xiang Y-Y, Lu C, Salter MW, Brose N, Lu W-Y, Rotin D. Deletion of the ubiquitin ligase Nedd4L in lung epithelia causes cystic fibrosis-like disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:3216–3221.
41. Boase NA, Rychkov GY, Townley SL, Dinodom A, Candi E, Voss AK, Tsoutsman T, Semsarian C, Melino G, Koentgen F, et al. Respiratory distress and perinatal lethality in Nedd4-2-deficient mice. *Nat Commun* 2011;2:287.
42. Husted RF, Lu H, Sigmund RD, Stokes JB. Oxygen regulation of the epithelial Na channel in the collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011;300:F412–F424.
43. Gusarova GA, Dada LA, Kelly AM, Brodie C, Witters LA, Chandel NS, Sznajder JI. Alpha1-AMP-activated protein kinase regulates hypoxia-induced Na,K-ATPase endocytosis via direct phosphorylation of protein kinase C zeta. *Mol Cell Biol* 2009;29:3455–3464.
44. Krishnan MN, Ng A, Sukumaran B, Gilfoy FD, Uchil PD, Sultana H, Brass AL, Adametz R, Tsui M, Qian F, et al. RNA interference screen for human genes associated with West Nile virus infection. *Nature* 2008;455:242–245.

45. Lazrak A, Iles KE, Liu G, Noah DL, Noah JW, Matalon S. Influenza virus M2 protein inhibits epithelial sodium channels by increasing reactive oxygen species. *FASEB J* 2009;23:3829–3842.
46. Bhalla V, Oyster NM, Fitch AC, Wijngaarden MA, Neumann D, Schlattner U, Pearce D, Hallows KR. AMP-activated kinase inhibits the epithelial Na<sup>+</sup> channel through functional regulation of the ubiquitin ligase Nedd4–2. *J Biol Chem* 2006;281:26159–26169.
47. Woollhead AM, Scott JW, Hardie DG, Baines DL. Phenformin and 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside (AICAR) activation of AMP-activated protein kinase inhibits transepithelial Na<sup>+</sup> transport across H441 lung cells. *J Physiol* 2005;566:781–792.
48. Almaça J, Kongsuphol P, Hieke B, Ousingsawat J, Viollet B, Schreiber R, Amaral MD, Kunzelmann K. AMPK controls epithelial Na<sup>+</sup> channels through Nedd4–2 and causes an epithelial phenotype when mutated. *Pflugers Arch* 2009;458:713–721.
49. Booth RE, Stockhand JD. Targeted degradation of ENaC in response to PKC activation of the ERK1/2 cascade. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;284:F938–F947.
50. Lee J-G, Baek K, Soetandyo N, Ye Y. Reversible inactivation of deubiquitinases by reactive oxygen species *in vitro* and in cells. *Nat Commun* 2013;4:1568.

**ONLINE DATA SUPPLEMENT R1 Red-2012-0518OC**

**Hypoxia-induced inhibition of ENaC in the lung: role of Nedd4-2 and the ubiquitin-proteasome pathway.** Thomas Gille, Nadia Randrianarison-Pellan, Arnaud Goolaerts, Nicolas Dard, Yurdagül Uzunhan, Evelyne Ferrary, Edith Hummler, Christine Clerici, Carole Planès.

## **Supplemental Methods**

**Extended protocol for detection of polyubiquitinated  $\alpha$ -ENaC subunits.** Rat AEC grown on Transwell filters were placed on ice, washed three times, then scraped in cold PBS-Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup> in which PR-619 (LifeSensors, Malvern, PA, USA), an inhibitor of deubiquitinating proteases, was added to protect polyubiquitinated proteins from degradation. AEC were pelleted at 1,400 rpm for 5 min at 4°C, and solubilized at 4°C for 30 min in 500  $\mu$ l of lysis buffer (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15M NaCl, 1mM EDTA, 1% NP-40, 10% glycerol, 50  $\mu$ M PR-619). The lysates were clarified by centrifugation (14,000 g for 30 min at 4°C), and aliquots of supernatants (25  $\mu$ l, representing the “input” samples) were taken for Western-blotting. The remaining supernatants were incubated at 4°C for 60 min with either 20  $\mu$ l of agarose-TUBE2 resin (Tandem Ubiquitin-Binding Entities type 2, LifeSensors), or 20  $\mu$ l of control agarose beads (LifeSensors) to assess non-specific binding. Samples were then centrifuged at 1500 rpm for 5 min at 4°C, and supernatants representing the unbound proteins (i.e. non-ubiquitinated and monoubiquitinated proteins). Pellets were washed several times with Tris-Buffered Saline Tween (TBST: 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.15 M NaCl, 0.1% Tween-20), and polyubiquitinated proteins were eluted from the beads by heating to 100°C for 5 min in SDS-Page sample buffer. Samples were further processed for western-blotting as described in the text.

### **Quantification of Nedd4-2 protein expression in rat alveolar epithelial cells.**

Cultured rat AEC were scraped off the filters in ice-cold PBS and centrifuged at 1500 rpm for 10 min at 4°C. The pellets were resuspended in 30  $\mu$ l of ice-cold lysis buffer containing 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1% Triton X-100, 0.1% SDS, and protease inhibitors, and kept on ice for 1h. Cell lysates were then centrifuged (12,000 rpm, 15 min) at 4°C, and samples of the supernatants were immediately frozen before use. For Western blotting, samples of protein extracts (40  $\mu$ g protein) in one volume of sample buffer (containing 13.8% sucrose, 9.6% SDS, 4.2%  $\beta$ -mercaptoethanol, and 0.0126% bromophenol blue in H<sub>2</sub>O) were resolved through 10% acrylamide gels, electroblotted, electrically transferred to nitrocellulose

paper, and subsequently probed for Nedd4-2 using polyclonal anti Nedd4-2 antibody (ab46521, Abcam; dilution 1:2000) (32) and for  $\beta$ -actin.

## Supplemental results

**E1. Effect of Dexamethasone on hypoxia-induced inhibition of transepithelial sodium transport across rat alveolar epithelial cells.** We examined whether dexamethasone, used in our model to promote ENaC subunit expression in AEC, could affect the effect of hypoxia on transepithelial  $\text{Na}^+$  transport. In normoxic AEC cultured without dexamethasone, baseline amiloride-sensitive  $I_{\text{eq}}$  was 20% lower than in normoxic AEC cultured with dexamethasone (1  $\mu\text{M}$  in culture medium, from day 3 to day 5 post-isolation) ( $p < 0.01$ , ANOVA and Fisher's PLSD) (see online data supplement Figure E1). Hypoxic exposure (0.5 %  $\text{O}_2$  for 2h) induced a marked decrease of amiloride-sensitive  $I_{\text{eq}}$  in both culture conditions, indicating that dexamethasone in the culture medium did not blunt the inhibitory effect of hypoxia (Fig. E1).

**E2. Effect of reoxygenation and  $\beta_2$ -agonist treatment on hypoxia-induced decrease in transepithelial sodium transport.** In another set of experiments, we studied whether hypoxia-induced decrease of amiloride-sensitive  $I_{\text{eq}}$  could be reversed by reoxygenation and/or  $\beta_2$ -agonist treatment. Primary rat alveolar epithelial cells were exposed to 0.5 or 21%  $\text{O}_2$  for 2h, then placed in a 21%  $\text{O}_2$  incubator and treated for 45 min with the  $\beta_2$ -agonist terbutaline (final concentration:  $10^{-4}$  M) or vehicle in the presence or absence of brefeldin A (Sigma-Aldrich; final concentration: 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), an inhibitor of anterograde protein transport, before electrophysiological measurements were performed (Fig. E2). Reoxygenation by itself did not restore amiloride-sensitive  $I_{\text{eq}}$  in AEC previously exposed to hypoxia. By contrast, reoxygenation associated with terbutaline treatment completely reversed hypoxia-induced impairment of amiloride-sensitive  $I_{\text{eq}}$ . The stimulatory effect of terbutaline was completely abolished in the presence of brefeldin A, a blocker of anterograde

transport of proteins, indicating that the effect of terbutaline was mostly dependent on the insertion of new Na<sup>+</sup> transport proteins in the plasma membrane of AEC.

### Legends of supplemental figures

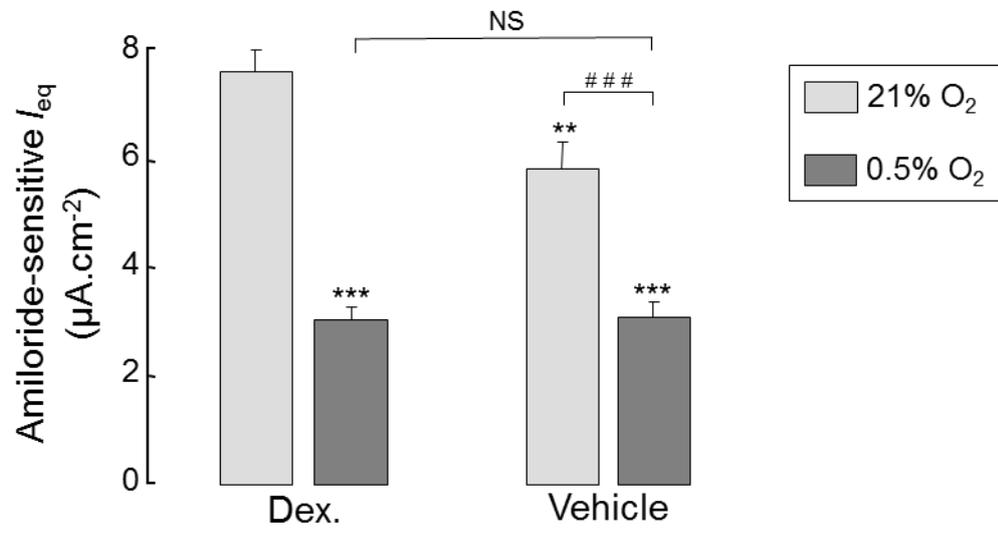
**Figure E1. Effect of Dexamethasone on hypoxia-induced inhibition of transepithelial sodium transport across rat alveolar epithelial cells.** Rat AEC were grown with or without dexamethasone (Dex, final concentration in the culture medium: 1 μM, from day 3 to day 5 post-isolation) before being exposed 2h to normoxic or hypoxic atmosphere. Amiloride-sensitive  $I_{eq}$  was measured under open-circuit condition immediately at the end of exposure. Results are expressed in μA.cm<sup>-2</sup> and represent means ± SE (17-18 filters per condition from 5 independent experiments). \*\* and \*\*\*: significantly different from value in normoxic cells cultured with dexamethasone ( $p < 0.01$  and  $p < 0.001$  respectively); ###: significantly different from value in corresponding normoxic value ( $p < 0.001$ ; ANOVA and Fisher's PLSD).

**Figure E2. Effect of reoxygenation and β<sub>2</sub>-agonist treatment on hypoxia-induced decrease in transepithelial sodium transport.** Rat AEC grown for 5 days on Transwell filters were exposed to normoxic (21% O<sub>2</sub>, light gray) or hypoxic (0.5% O<sub>2</sub>, dark gray) atmosphere for 2h. Open-circuit measurements were performed immediately at the end of exposure in some filters (columns 1-2), while other filters were placed in 21% O<sub>2</sub> for additional 45 minutes in the presence of terbutaline (10<sup>-4</sup> M), brefeldin A (1 μg/ml), or vehicle as indicated (columns 3-7). Amiloride-sensitive  $I_{eq}$  represent the difference between  $I_{eq}$  values without and with amiloride (10 μM). Results are expressed in μA.cm<sup>-2</sup> and represent means ± SE of 4-9 filters per condition from 3 independent experiments. \*\*\*: significantly different from value obtained in normoxic cells immediately at the end of exposure ( $p < 0,001$ ); †† and †††:

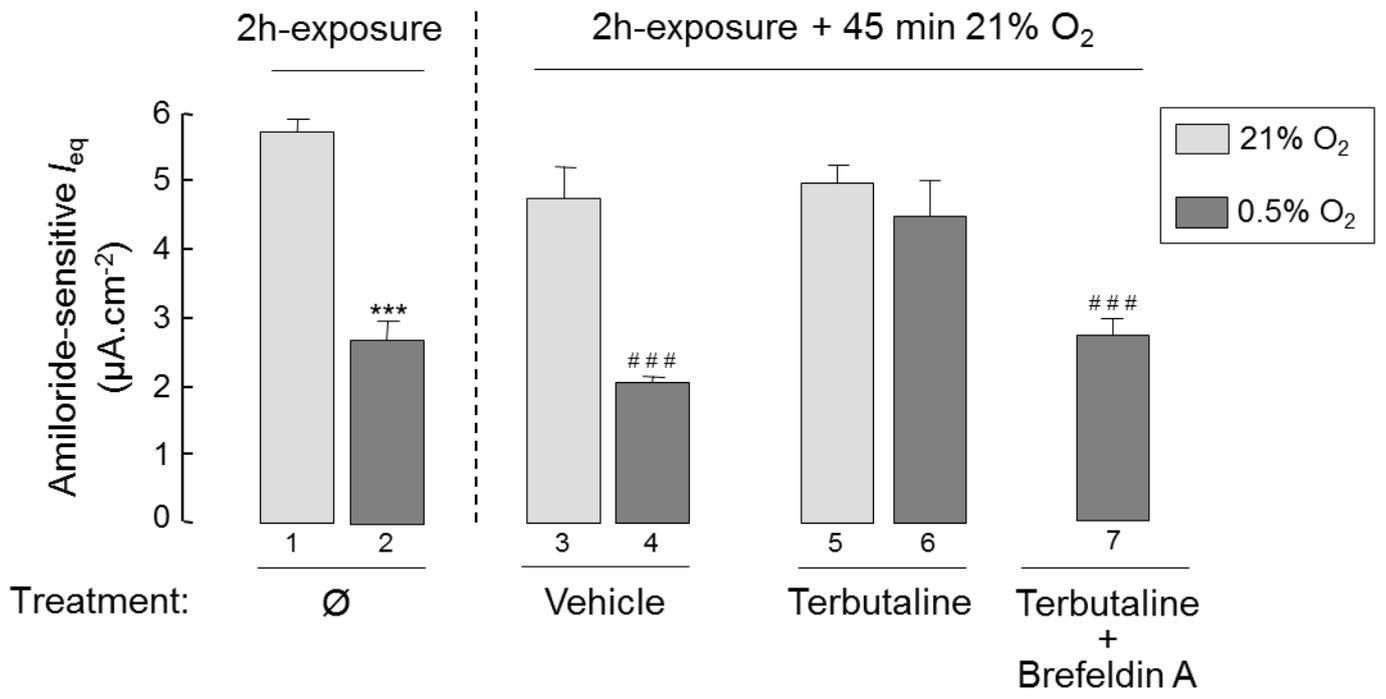
significantly different from value in normoxic cells treated with vehicle for 45 minutes at the end of exposure ( $p < 0,01$  and  $p < 0,001$ , respectively) (ANOVA and Bonferroni).

**Figure E3. Effect of acute hypoxic exposure on Nedd4-2 protein expression in rat alveolar epithelial cells.** Rat AEC grown on Transwell filters were exposed to normoxic (21% O<sub>2</sub>) or hypoxic (0.5% O<sub>2</sub>) atmosphere for 4h before cell extracts were prepared and processed for immunoblotting. **A.** Representative immunoblot showing the expression of Nedd4-2 protein and  $\beta$ -actin used as a loading control. **B.** Quantification of Nedd4-2 protein expression. Results represent means  $\pm$  SE of 3 separate experiments. Statistical significance was calculated from the raw data. There was no significant difference between groups.

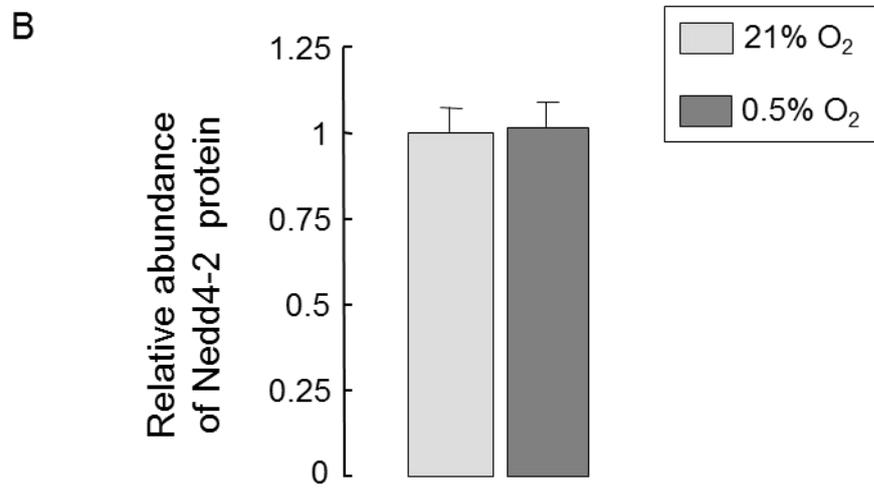
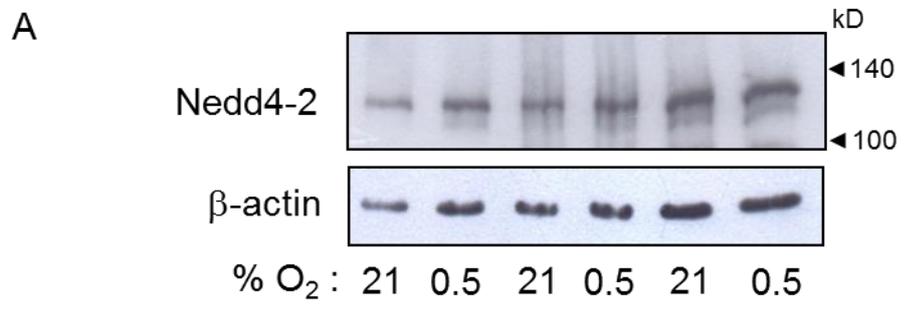
E1



E2



E3



### C. Déroulement de l'étude

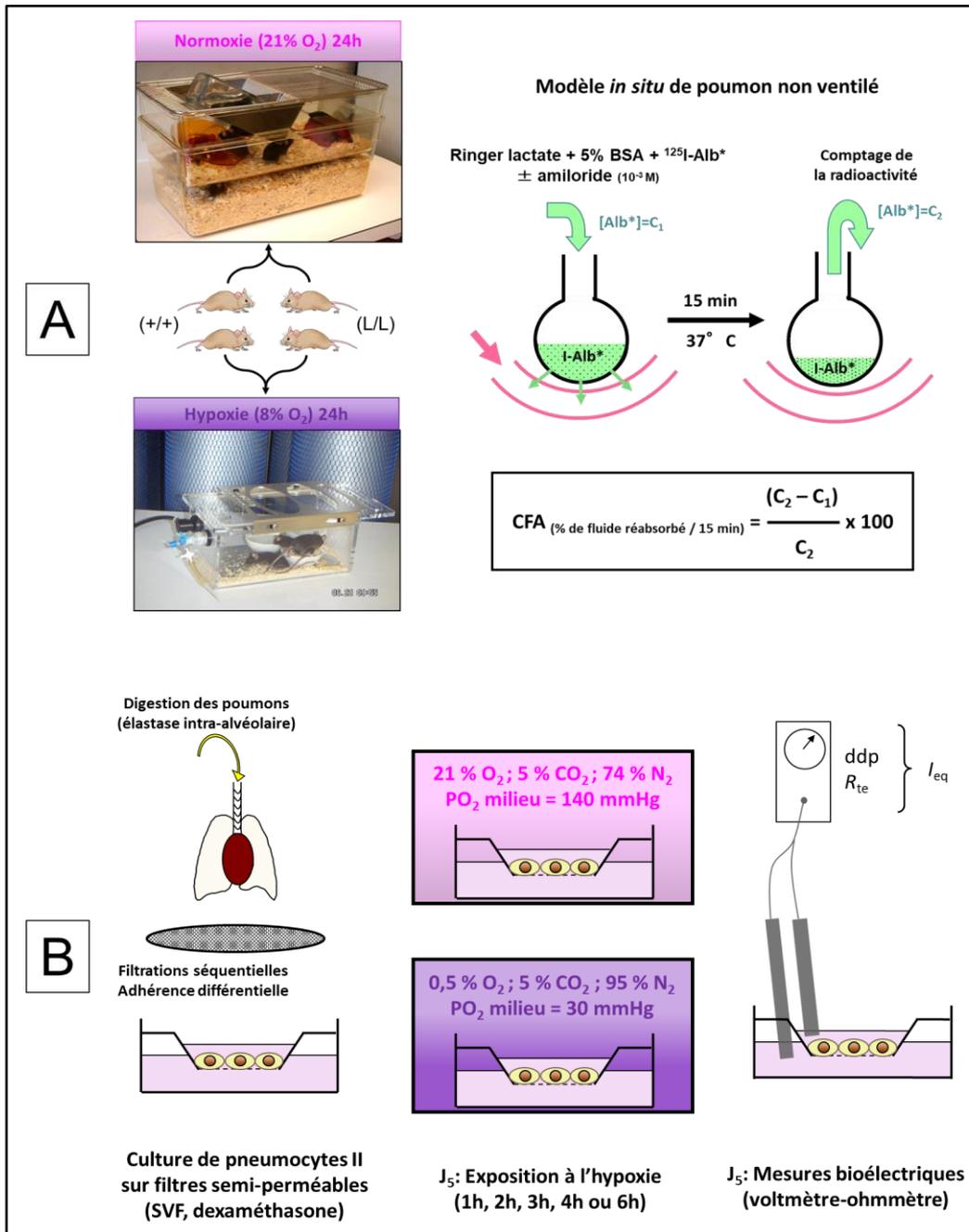


Figure 15 : Schéma du protocole expérimental du premier travail.

**A** : Des souris homozygotes mutées de la lignée  $\beta$ -Liddle et des témoins sauvages étaient exposées pendant 24 h à une atmosphère hypoxique à 8 % de FiO<sub>2</sub> ou laissées en normoxie, avant calcul de leur CFA dans un modèle *in situ* de poumon non ventilé. **B** : Cinq jours après leur isolement, des CEA de rats en culture primaire sur filtres semi-perméables étaient placées en hypoxie (0,5 à 3 % selon les expériences) pendant 1 h à 6 h, ou laissées en normoxie. Des mesures électrophysiologiques ou des expériences mécanistiques étaient ensuite réalisées.

Alb : albumine ; BSA : *bovine serum albumin* ; CEA : cellules épithéliales alvéolaires ; CFA : clairance du fluide alvéolaire ; CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone ; ddp : différence de potentiel ; I<sub>eq</sub> : équivalent de courant de court-circuit ; N<sub>2</sub> : diazote ; O<sub>2</sub> : dioxygène ; PO<sub>2</sub> : pression partielle en dioxygène ; R<sub>te</sub> : résistance transépithéliale ; SVF : sérum de vœu foetal.

#### D. Résumé des résultats

*In vivo*, l'exposition des souris sauvages à une hypoxie à 8 % de  $\text{FiO}_2$  entraînait une réduction de la CFA dont l'intensité était proportionnelle au temps d'exposition, et qui était due à une diminution de la portion AML-sensible, c'est-à-dire la CFA médiée par ENaC, sans modification de la quantité pulmonaire totale des sous-unités d'ENaC évaluée par *Western blot*. Les souris homozygotes mutées de la lignée  $\beta$ -Liddle, qui présentent une mutation de  $\beta$ -ENaC inhibant sa liaison avec Nedd4-2 et son endocytose, possédaient une CFA AML-sensible plus importante que les témoins en normoxie et étaient protégées des effets de l'hypoxie. La CFA AML-résistante, c'est-à-dire la portion du transport transépithélial dirigée par une réabsorption de  $\text{Na}^+$  à travers les autres transporteurs apicaux, n'était modifiée ni par le génotype ni par la  $\text{FiO}_2$ . *In vitro*, le transport de  $\text{Na}^+$  médié par ENaC dans les CEA de type II de rat natives, représenté par  $I_{\text{eq}}$  AML-sensible, était très rapidement diminué par l'hypoxie avec un effet quasi-maximal dès 2 heures d'exposition, sans modification de  $I_{\text{eq}}$  AML-résistant. Les expérimentations de biotinylation de la surface apicale des CEA, avec quantification de l'expression de chaque sous-unité par *Western blot*, ont permis de montrer que cette inhibition du transport de  $\text{Na}^+$  induite par l'hypoxie était secondaire à une réduction de l'expression de surface d'ENaC, sans altération du *pool* total de canaux présents dans la cellule. L'utilisation de *tandem ubiquitin-binding entities* (TUBEs), permettant d'isoler les protéines poly-ubiquitinylées par Nedd4-2, couplée à un *Western blot*, a confirmé que l'augmentation de l'endocytose d'ENaC en hypoxie était secondaire à l'action de l'ubiquitine ligase. Les effets de l'hypoxie sur la diminution de  $I_{\text{eq}}$  étaient prévenus par une molécule antioxydante (NAC) et par des inhibiteurs du protéasome (lactacystine et MG132), mais pas par un inhibiteur du lysosome (chloroquine).

## E. Discussion

### 1. Avantages et limites des modèles utilisés

#### i. *Lignée murine $\beta$ -Liddle*

La lignée de souris « *knock-in* »  $\beta$ -Liddle a été générée par le groupe des Prs Bernard Rossier et Edith Hummler (Institut de Pharmacologie et de Toxicologie, Université de Lausanne, Suisse) à partir de souris C57BL/6J. Chez ces souris, la mutation la plus fréquemment responsable chez l'homme du syndrome de Liddle, forme héréditaire d'hypertension artérielle volodépendante sévère par rétention hydrosodée ([Rizzo 2015](#)), a été reproduite par recombinaison homologue par introduction d'un codon stop en position 566 dans l'exon 13 du gène *SCNN1B* codant pour  $\beta$ -ENaC ([Pradervand 1999](#)). En conséquence, la partie C-terminale intracellulaire de la sous-unité  $\beta$ -ENaC contenant le motif PY est tronquée, ce qui inhibe la liaison de celle-ci avec l'ubiquitine ligase Nedd4-2. Faute d'ubiquitination, les canaux ENaC exprimés à la membrane plasmique ne peuvent être internalisés puis dégradés dans le protéasome ([Schild 1996](#), [Pradervand 1999](#)). Ainsi, les souris homozygotes mutées de la lignée  $\beta$ -Liddle, notées L/L, présentent une hyperactivité constitutive d'ENaC par augmentation de son expression à la membrane apicale, leur CFA est augmentée à l'état basal par rapport aux souris sauvages et elles sont protégées de l'œdème pulmonaire induit par surcharge hydrosodée aiguë alors que leur fonction cardiaque n'est pas modifiée ([Randrianarison-Pellan 2007](#)). Ces souris transgéniques constituent le premier modèle d'hyperactivité d'ENaC dans les alvéoles.

#### ii. *Cultures primaires de cellules épithéliales alvéolaires de rat*

Les cultures primaires de CEA de type II ont été obtenues à partir de rats mâles Sprague-Dawley (180-200 g) par digestion à l'élastase, technique permettant d'isoler des CEA avec une pureté de plus de 92 % et une viabilité de plus de 95 %, les principaux contaminants étant des macrophages

([Dobbs 1986](#), [Clerici 1991](#)). Il aurait évidemment été préférable de travailler avec des CEA d'origine humaine, mais cette solution s'est heurtée à d'importantes contraintes : coût élevé, grand nombre de CEA recueillies avec une durée de vie limitée en culture primaire, difficulté d'obtenir un tapis cellulaire assez jointif pour permettre les mesures électrophysiologiques. De nombreux auteurs considèrent cependant que l'utilisation de cultures primaires de rats offre un bon substitut aux cellules humaines, elles sont de fait largement employées. En effet, les CEA de type II de rat possèdent, à l'instar des cellules humaines, une faible capacité proliférative à un stade physiologique, la capacité à établir des jonctions intercellulaires et à former un tapis cellulaire en culture, recréant ainsi un épithélium en culture *in vitro* ([Mason 1982](#), [Dobbs 1990](#), [Clerici 1991](#)). Ces caractéristiques sont difficiles à retrouver dans des lignées cellulaires d'origine tumorale, dont le phénotype reproduit moins fidèlement celui d'une CEA native ([Kobayashi 1995](#)). Les CEA de type II obtenues ont ensuite été cultivées en interface liquide / liquide sur filtre semi-perméable, dans un milieu contenant du sérum de veau fœtal (10 % jusqu'à J3, puis 5 % jusqu'à utilisation à J5) et de la dexaméthasone à la concentration d'1  $\mu\text{M}$ . Des données contradictoires ayant été rapportées à propos d'un éventuel effet protecteur de la dexaméthasone vis-à-vis de la diminution du transport transépithélial de  $\text{Na}^+$  induit par l'hypoxie ([Güney 2007](#), [Husted 2011](#)), nous avons effectué une série d'expériences avec un milieu de culture dépourvu de dexaméthasone : l'effet de l'hypoxie était comparable, que les CEA aient été cultivées avec ou sans dexaméthasone. Les différences observées avec l'article relatant un effet protecteur de la dexaméthasone pourraient être expliquées par des modalités d'exposition à l'hypoxie différentes : 1,5 %  $\text{O}_2$  pendant 48 heures ([Güney 2007](#)), contre 0,5 %  $\text{O}_2$  pendant 2 heures dans notre travail. En revanche, aucune expérience n'a été réalisée en l'absence de sérum de veau fœtal, pouvant contenir des hormones stimulant l'expression d'ENaC et notamment des petites concentrations de cortisol endogène ; toutefois les conditions de cultures étaient identiques pour tous les groupes expérimentaux.

iii. Exposition des animaux et des cellules épithéliales alvéolaires à l'hypoxie

Dans ce travail, des souris âgées de 2 à 6 mois ont été placées dans un caisson hermétique ventilé avec un mélange gazeux contenant 8 % d'O<sub>2</sub> et 92 % de N<sub>2</sub> pendant une durée de 8 à 24 heures. La PAO<sub>2</sub> moyenne des souris exposées à cette atmosphère hypoxique était estimée à 40 mmHg, ce qui est un niveau d'hypoxie alvéolaire sévère mais observable en pathologie humaine, notamment en cas d'œdème pulmonaire hydrostatique ou de SDRA. Quant à elles, les CEA en culture primaire ont été exposées à des niveaux croissants d'hypoxie pour des durées d'exposition variables. On observait une stabilité de la PO<sub>2</sub> à partir de 4 heures d'exposition à 0,5 % de FiO<sub>2</sub>, ce qui se rapprochait de la PAO<sub>2</sub> moyenne estimée des souris exposées à une hypoxie de 8 % de FiO<sub>2</sub> (tableau II).

**Tableau 2. Pressions partielles en O<sub>2</sub> mesurées dans le milieu de culture à différents temps d'exposition en fonction de la FiO<sub>2</sub>.**

FiO <sub>2</sub>	Temps d'exposition			
	1 heure	2 heures	4 heures	6 heures
0,5 % O <sub>2</sub>	65 mmHg	50 mmHg	30 mmHg	30 mmHg
1,5 % O <sub>2</sub>	-	-	45 mmHg	-
3 % O <sub>2</sub>	-	-	60 mmHg	-
21 % O <sub>2</sub>	140 mmHg	140 mmHg	140 mmHg	140 mmHg

iv. Mesure de la clairance du fluide alvéolaire *in situ* sur poumon non ventilé

La CFA a été calculée *in situ* sur poumon non ventilé en utilisant l'albumine radiomarquée à l'iode 125 comme traceur du volume de fluide alvéolaire. Cette méthode a montré qu'elle donnait pendant les 15 premières minutes de la mesure des valeurs de CFA équivalentes à celles obtenues dans un modèle *in situ* de poumons de souris ventilées, et plus fiables que celles obtenues dans les modèles *ex vivo* de poumon isolé et perfusé (Fukuda 2000). Le volume d'instillât peut néanmoins

influencer la valeur de la CFA ([Garat 1998](#)), ici la dose de 10 ml/kg a été choisie afin d'éviter un décès des souris par hypoxie, elle était scrupuleusement identique pour les souris de chaque groupe. La CFA a également été mesurée sur certaines souris en présence d'AML dans l'instillât initial (CFA résistante à l'AML), la concentration choisie était de  $10^{-3}$  M afin d'obtenir une concentration effective de  $2.10^{-4}$  M dans l'alvéole.

#### *v. Mesures électrophysiologiques par équivalent du courant de court-circuit*

La plupart des mesures électrophysiologiques ont concerné la mesure de  $I_{eq}$  AML-sensible. Toutefois  $I_{eq}$  dépend à la fois de l'activité propre d'ENaC à la surface apicale et de celle de la  $Na^+,K^+$ -ATPase dans la membrane basolatérale des CEA. Afin d'être certains que l'altération du transport transépithélial de  $Na^+$  en hypoxie n'était pas uniquement due à une diminution de l'activité de la  $Na^+,K^+$ -ATPase, nous avons contrôlé dans une des expérimentations la valeur de  $I_{sc}$  en chambre d'Ussing en présence de nystatine, noté  $I_{sc\ nyst}$ , qui permet de perméabiliser la membrane basolatérale et donc de s'affranchir de l'activité de la  $Na^+,K^+$ -ATPase. La mesure de  $I_{sc\ nyst}$  en absence puis en présence d'AML a permis de calculer la valeur de  $I_{sc\ nyst}$  AML-sensible, représentant spécifiquement le flux de  $Na^+$  entrant par les canaux ENaC à la membrane apicale. La diminution de  $I_{sc\ nyst}$  AML-sensible après 4 heures d'exposition en 0,5 % de  $FiO_2$  a bien confirmé que l'hypoxie diminuait spécifiquement l'activité d'ENaC, et que  $I_{eq}$  AML-sensible était utilisable pour les expérimentations pharmacologiques ultérieures. En fait, les deux transporteurs étant fonctionnellement couplés, notamment par le biais de la concentration intracellulaire en  $Na^+$ , il est vraisemblable que l'activité de la  $Na^+,K^+$ -ATPase ait également été diminuée dans notre modèle. Il a d'ailleurs été montré précédemment sur des lignées de cellules épithéliales alvéolaires A549 qu'une hypoxie de courte durée induisait une diminution de l'activité de la pompe due à une diminution de l'expression membranaire de la sous-unité  $\alpha 1$  de la  $Na^+,K^+$ -ATPase ([Dada 2003](#)), résultat d'une augmentation de l'ubiquitination et de l'endocytose de cette sous-unité, pouvant être prévenue par des inhibiteurs du protéasome ([Comellas 2006](#)).

## 2. Maintien de la clairance du fluide alvéolaire en hypoxie chez les souris $\beta$ -Liddle

Chez les souris sauvages, l'hypoxie à 8 % de  $\text{FiO}_2$  était responsable d'une diminution de la CFA totale, qui devenait statistiquement significative à partir de 24 heures d'exposition. A ce temps, la CFA AML-sensible était diminuée de 69 % par rapport à celles des souris témoins laissées en air ambiant. Cette inhibition de la CFA survenait sans diminution de la quantité totale des sous-unités  $\alpha$ - et  $\gamma$ -ENaC, ni modification de la quantité de Nedd4-2, mesurées sur homogénats de poumon par *Western blot*, ce qui évoque une régulation d'origine post-traductionnelle. En revanche, l'hypoxie n'avait pas d'effet délétère sur la CFA des souris L/L de la lignée  $\beta$ -Liddle, qui est restée maximale après 24 h d'exposition. Le mécanisme de cette inhibition de la CFA induite par l'hypoxie implique donc la liaison entre  $\beta$ -ENaC et Nedd4-2.

## 3. Effet-dose post-traductionnel de l'hypoxie sur le transport transépithélial de $\text{Na}^+$

Les modèles d'exposition prolongée à l'hypoxie se prêtant mal aux études mécanistiques, les voies de signalisation hypoxique impliquées dans l'inhibition de la réabsorption transépithéliale d'ions et de fluide, ainsi que les mécanismes distaux de régulation des protéines de transport, ne sont pas connus. Nous avons donc mis au point un modèle d'étude *in vitro* des effets de l'hypoxie aiguë sur l'activité d'ENaC dans des CEA de type II de rat en culture primaire, rendant possibles les études pharmacologiques et les expériences de biologie cellulaire complexes. Ce modèle a montré que l' $I_{\text{eq}}$  AML-sensible était rapidement diminué en hypoxie, de manière statistiquement significative à partir de 2 heures d'exposition. L'allongement de la durée d'exposition (responsable d'une diminution de la  $\text{PO}_2$  dans le milieu de culture) ou l'intensité de l'hypoxie (0,5 ou 1,5 % contre 3 %) étaient responsables d'une diminution plus importante de l' $I_{\text{eq}}$  AML-sensible. Cette rapidité de l'effet de l'hypoxie est peu compatible avec une régulation d'ordre transcriptionnelle. La relation effet / temps de l'inhibition du transport transépithélial de  $\text{Na}^+$  en fonction de la durée d'hypoxie était plus marquée dans les expérimentations *in vitro*, cette constatation peut avoir plusieurs explications : des

différences d'espèce entre la souris et le rat, une hypoxie plus sévère dans le modèle *in vitro*, et l'absence de certaines réponses adaptatives au stress hypoxique que les animaux peuvent mettre en place *in vivo* (notamment la sécrétion de catécholamines endogènes ayant une action stimulatrice sur l'activité d'ENaC et de la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase) ([Matthay 2002](#), [Eaton 2009](#)). Par ailleurs, après 2 heures d'exposition hypoxique, la simple réoxygénation pendant 45 minutes était insuffisante pour rétablir l' $I_{\text{eq}}$  AML-sensible, en revanche le traitement *a posteriori* des CEA par la terbutaline permettait de corriger totalement les effets de l'hypoxie. Cet effet thérapeutique de la terbutaline était inhibé par la bréfeldine A, qui bloque l'adressage membranaire des canaux. A l'inverse, dans une autre expérimentation, la pré-incubation des CEA avec de la bréfeldine A ne modifiait pas l'intensité de l'inhibition de l' $I_{\text{eq}}$  AML-sensible induite par l'hypoxie (49 % de réduction contre 43 % dans les CEA témoins, données non publiées). Ces données suggèrent que l'effet de l'hypoxie passe par une diminution du nombre de canaux ENaC à la membrane, préférentiellement par une augmentation de son endocytose plutôt que par une diminution de son adressage.

#### 4. Diminution de l'expression de surface du canal sodique épithélial dépendante de son ubiquitinylation induite par l'hypoxie

Nous avons donc mesuré l'expression membranaire d'ENaC par une technique de biotinylation de surface. Cette technique originale était la seule permettant de quantifier l'expression de surface d'ENaC dans des CEA natives, car l'étude en immunofluorescence du canal sodique est peu contributive du fait de l'absence d'anticorps spécifique adapté. En outre, elle permet de quantifier séparément les canaux présents à la membrane et ceux présents dans le cytoplasme. Nos expériences ont mis en évidence une importante diminution de l'expression de surface d'ENaC en hypoxie, prédominant sur les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ , alors même que les réserves intracellulaires, représentant plus de 90% de la quantité totale d'ENaC, n'étaient pas affectées. De manière intéressante, des résultats comparables ont été rapportés dans des modèles d'hypoxie plus prolongée ([Planès 2002](#), [Bouvry 2006](#)), ou pour la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase avec des hypoxies de courte durée

([Dada 2003](#), [Comellas 2006](#), [Gusarova 2009](#)), soulignant l'importance des modifications d'expression de surface des transporteurs membranaires dans les processus pathologiques. Afin de confirmer l'implication de Nedd4-2 (dont on ne possède pas d'inhibiteur direct) dans ce mécanisme, les extraits cellulaires de CEA exposées pendant 4 heures à une hypoxie à 0,5 % de  $\text{FiO}_2$  ont été incubés avec des TUBEs. Cette technique de purification permettant d'isoler les protéines poly-ubiquitinylées, couplée à un *Western blot*, a montré que la quantité de sous-unités  $\alpha$ -ENaC poly-ubiquitinylées par Nedd4-2 était quasiment 2 fois plus importante que dans les CEA témoins laissées en normoxie, tandis que le *pool* total d' $\alpha$ -ENaC n'était pas modifié. A notre connaissance, ce résultat constitue la première démonstration que l'ubiquitinylation d'ENaC est stimulée par l'hypoxie dans des CEA natives. Ce mécanisme survenait sans modification de la quantité de Nedd4-2 en hypoxie par rapport à la normoxie, estimée par *Western blot* sur extraits de CEA. Enfin, dans notre modèle, l'inhibition du transport transépithélial de  $\text{Na}^+$  en hypoxie était prévenue par la pré-incubation des CEA avec de la lactacystine ou du MG132, mais pas avec la chloroquine, ce qui laisse supposer que la dégradation d'ENaC après poly-ubiquitinylation par Nedd4-2 dans des CEA natives de rat soumis à l'hypoxie implique le protéasome et non pas le lysosome. Des données comparables ont été rapportées avec la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase ([Gusarova 2009](#)), mais une étude plus précise de la voie de la dégradation protéasomale en hypoxie serait nécessaire pour le confirmer.

##### 5. Rôle protecteur des anti-oxydants

Afin de préciser par quel mécanisme l'hypoxie pouvait augmenter l'activité de Nedd4-2 dans notre modèle, nous avons dans un dernier temps testé les effets de la NAC. Les CEA ont été pré-incubées avec de la NAC avant 2 heures d'exposition à deux niveaux d'hypoxie sévère (1,5 % et 0,5 %) ou laissées en air ambiant pour le groupe témoin. Dans cette expérience, la NAC a permis de restaurer totalement la valeur de  $I_{\text{eq}}$  AML-sensible au niveau des témoins, quel que soit le niveau d'hypoxie considéré. Il est donc possible que la production de ROS mitochondriaux dans ces conditions intervienne comme un transducteur intracellulaire du signal hypoxique et active Nedd4-2,

comme c'est le cas pour la Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase via l'activation de la voie AMPK / PKCζ ([Dada 2003](#), [Comellas 2006](#), [Gusarova 2009](#)). En effet, l'implication des ROS dans l'endocytose et la dégradation d'ENaC dans le protéasome a été mise en évidence dans des lignées de CEA (H441 et A549) ([Lazrak 2009](#)). Par ailleurs, d'autres travaux ont montré que l'activation de l'AMPK permettait d'inhiber l'activité d'ENaC, dans des CEA de la lignée H441 ([Woolhead 2005](#)) ainsi que dans des oocytes et des cellules rénales polarisées ([Carattino 2005](#)), et que cette action résultait d'une diminution de l'expression membranaire d'ENaC dépendante de la liaison Nedd4-2 / ENaC ([Carattino 2005](#), [Bhalla 2006](#)). Dans un travail ultérieur dont je suis co-auteur, les CSM, qui ont des propriétés antioxydantes ([Valle-Prieto 2010](#), [Bernard 2017](#)), permettaient de prévenir la diminution de l' $I_{sc}$  amilorie-sensible et de l'expression membranaire d'ENaC induite par l'hypoxie (6 heures à 3 % O<sub>2</sub> dans ce modèle). L'effet des CSM était au moins en partie médié par un effet paracrine secondaire à la sécrétion de KGF, mais le mécanisme d'action et l'éventuelle implication des ROS et de l'AMPK n'avaient pas été précisés ([Goolaerts 2016](#)) (*annexe 4*).

En conclusion, l'ensemble de nos résultats souligne l'importance physiologique et la rapidité de mise en œuvre des mécanismes cellulaires régulant l'expression de surface d'ENaC dans l'épithélium alvéolaire, et confirme le rôle pivot du processus d'ubiquitination / endocytose du canal sodique médié par Nedd4-2 au cours de l'hypoxie.

## II. Effets de l'hypoxie intermittente chronique sur la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris

### A. Hypothèse de travail et objectifs

La FPI est la plus fréquente des PII et la plus sévère des PID. Elle touche préférentiellement des patients âgés de plus de 60 ans et se manifeste par une dyspnée d'effort d'aggravation progressive en lien avec une détérioration irréversible de la fonction respiratoire. Du fait de l'absence de traitement curatif, le pronostic est sombre. Toutefois on observe une grande variabilité selon les patients, au moins en partie du fait des comorbidités et de leur prise en charge. La FPI semble déclenchée par des agressions épithéliales alvéolaires répétées (micro-inhalations, fumée de cigarette, infections virales...) qui vont accélérer le *turnover* et la sénescence des CEA, alors que la prolifération incontrôlée des fibroblastes aboutit à un échec de réparation avec formation de FFJ déposant du collagène et faisant progresser la fibrose de proche en proche. Un stress oxydant important est observé dans les poumons des patients et joue probablement un rôle important dans la physiopathologie de la maladie ([Walters 2008](#), [Raghu 2011](#), [King 2011](#)).

Durant la dernière décennie, plusieurs études ont montré que la prévalence du SAOS est importante au cours de la FPI ([Mermigkis 2007](#), [Lancaster 2009](#), [Mermigkis 2010](#), [Pihtili 2013](#), [Gille 2017](#)). En particulier, notre équipe a récemment rapporté la présence d'un SAOS modéré à sévère dans 62 % des cas de FPI incidentes, dont les deux tiers étaient sévères avec un IAH  $\geq 30$  /h, suggérant que le SAOS précède la FPI (ou apparaît en même temps). Les patients du groupe avec SAOS sévère présentaient plus fréquemment une coronaropathie ainsi qu'une augmentation du stress oxydant et de certains biomarqueurs de la FPI ([Gille 2017](#)) (*annexe 1*). Pour autant, l'influence du SAOS sur l'histoire naturelle de la FPI n'a été que très peu étudiée en recherche clinique ([Kolilekas 2013](#), [Mermigkis 2015](#), [Bosi 2017](#), [Gille 2017](#)). Nous formulons l'hypothèse qu'un SAOS modéré à sévère, en augmentant le stress oxydant pulmonaire et l'inflammation du fait de l'HIC nocturne,

pourrait générer des agressions épithéliales alvéolaires répétées et promouvoir l'apparition et/ou le développement d'une fibrose pulmonaire ([Walters 2008](#), [Pialoux 2009](#), [Almendros 2014](#), [Lévy 2015](#), [Lavie 2015](#)).

Afin de tester cette hypothèse sur le plan expérimental, nous avons mis au point un modèle murin de double agression dans lequel les souris recevaient dans un premier temps une instillation intra-trachéale de bléomycine afin d'induire une fibrose pulmonaire, puis étaient exposées à une HI ou à l'air intermittent (AI) pendant 3 semaines. Les objectifs de ce travail étaient d'évaluer dans ce modèle les effets de l'HI sur la survie des animaux ainsi que sur la sévérité de l'inflammation pulmonaire et de la fibrose pulmonaire, et d'étudier les mécanismes impliqués.

## Research Article

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

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

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

<sup>2</sup>Hôpital Avicenne (AP-HP), 93009 Bobigny, France

<sup>3</sup>AP-HP, Hôpital Jean Verdier, 93140 Bondy, France

<sup>4</sup>UPMC, Sorbonne Université, 75013 Paris, France

Correspondence should be addressed to Carole Planès; [carole.planes@aphp.fr](mailto:carole.planes@aphp.fr)

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

Academic Editor: Jean-Louis Pepin

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

**Background.** Severe obstructive sleep apnea (OSA) with chronic intermittent hypoxia (IH) is common in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). Here, we evaluated the impact of IH on bleomycin- (BLM-) induced pulmonary fibrosis in mice. **Methods.** C57BL/6J mice received intratracheal BLM or saline and were exposed to IH (40 cycles/hour; FiO<sub>2</sub> nadir: 6%; 8 hours/day) or intermittent air (IA). In the four experimental groups, we evaluated (i) survival; (ii) alveolar inflammation, pulmonary edema, lung oxidative stress, and antioxidant enzymes; (iii) lung cell apoptosis; and (iv) pulmonary fibrosis. **Results.** Survival at day 21 was lower in the BLM-IH group ( $p < 0.05$ ). Pulmonary fibrosis was more severe at day 21 in BLM-IH mice, as assessed by lung collagen content ( $p = 0.02$ ) and histology. At day 4, BLM-IH mice developed a more severe neutrophilic alveolitis, ( $p < 0.001$ ). Lung oxidative stress was observed, and superoxide dismutase and glutathione peroxidase expression was decreased in BLM-IH mice ( $p < 0.05$  versus BLM-IA group). At day 8, pulmonary edema was observed and lung cell apoptosis was increased in the BLM-IH group. **Conclusion.** These results show that exposure to chronic IH increases mortality, lung inflammation, and lung fibrosis in BLM-treated mice. This study raises the question of the worsening impact of severe OSA in IPF patients.

## 1. Introduction

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

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

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

## 2. Methods

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

**2.2. Model of Pulmonary Fibrosis and Chronic Intermittent Hypoxia.** Pulmonary fibrosis was induced by a single intratracheal instillation of bleomycin (BLM) (Bellon, Paris, France) (3.5 unit/g body weight in 100  $\mu$ l saline) [14, 15]. In preliminary experiments, such a dose of BLM induced significant pulmonary fibrosis on day 21 as assessed by lung histology and collagen content determination with an acceptable mortality rate (~25% on day 21). Exposure to chronic intermittent hypoxia (IH) was achieved in customized Plexiglas chambers using an automated nitrogen/air delivery profile system ( $O_2$  Sense Gas Driver Vivo, Adelbio, Aubière, France) modulating flow rates and adjusting the balance of inspired nitrogen and room air enriched with oxygen ( $O_2$ ). The fraction of inspired oxygen ( $FIO_2$ ) within the chamber declined from 21% to 6%, resulting in arterial oxyhemoglobin saturation nadir of 60% to 65% for <5 seconds in mice. The nadir in  $FIO_2$  within the chamber during each cycle was followed by restoration of oxygen tension to 21% by flushing the chamber with room air enriched with  $O_2$ . Control animals exposed to chronic intermittent air (IA) were placed in a similar Plexiglas chamber in the same room and exposed

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

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

**2.4. Lung Histology.** Lung histology was performed as previously described [16]. Lungs were inflated with 4% paraformaldehyde at a pressure of 20 cm  $H_2O$  before the trachea was tied. Heart and lungs were removed *en bloc* and placed in 20 ml 4% paraformaldehyde overnight. The lungs were embedded in paraffin. Sections were cut at 4  $\mu$ m thickness and stained with haematoxylin and eosin.

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

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

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

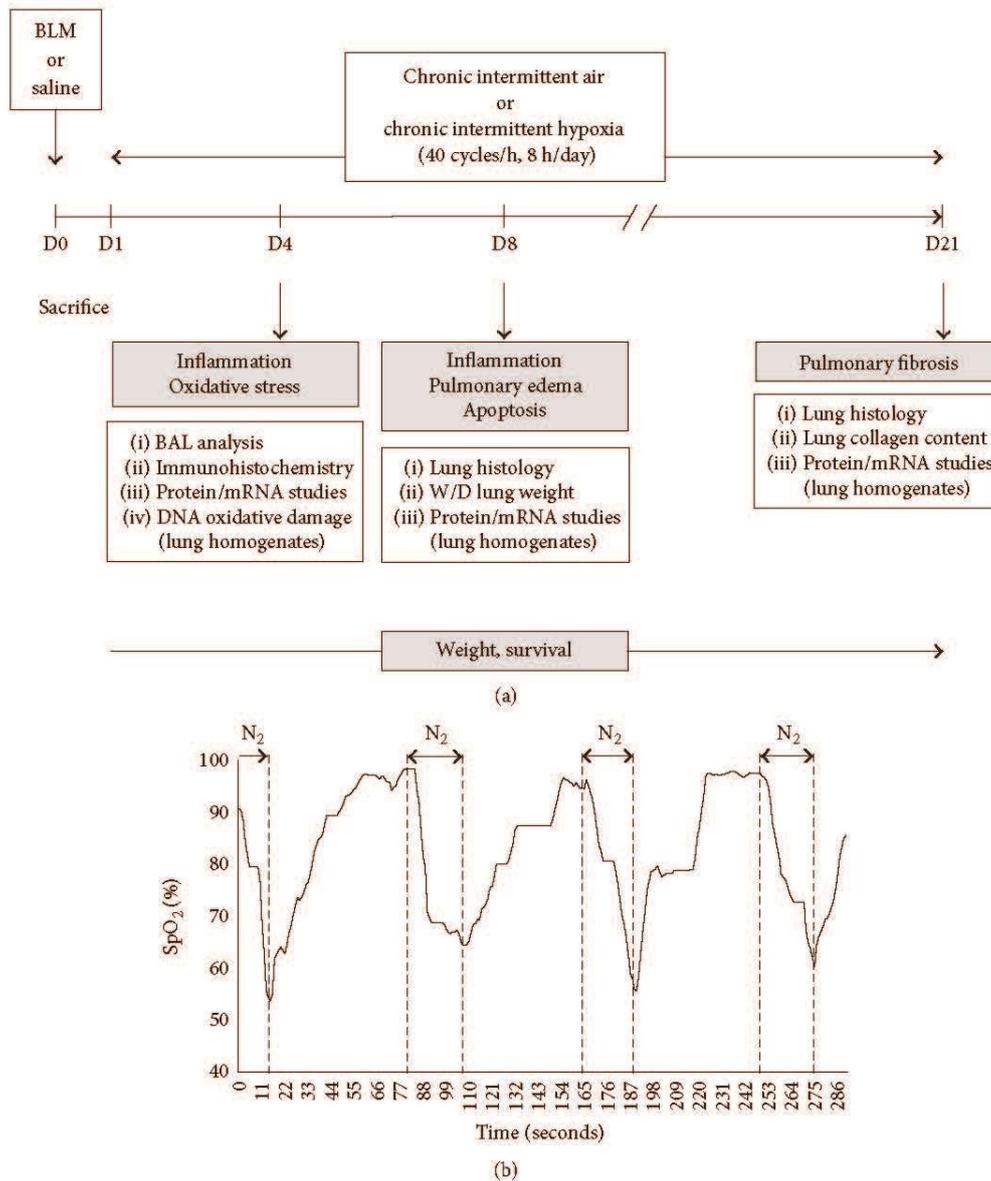


FIGURE 1: Exposure to intermittent hypoxia in a murine model of lung fibrosis. (a) Experimental design. (b) Representative trace of oxygen saturation measured by pulse oximetry (SpO<sub>2</sub>) in a mouse exposed to intermittent hypoxia.

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

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

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

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

TABLE 1: qPCR primers list.

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	PCR product size (bp)
<i>B2m</i>	GTGACCCCTGGTCTTCTGGT	GTATGTTCCGGCTTCCCATTTC	115
<i>Coll1a1</i>	GTGGTGACAAGGGTGAGACA	GAGAACCAGGAGAACCAGGA	99
<i>Col3a1</i>	TACACCTGCTCCTGTGCTTC	CATTCCTCCCCTCCAGACT	226
<i>Fn1</i>	TGGTGGCCACTAAATACGAA	GGAGGGCTAACATTCTCCAG	103
<i>Tgfb1</i>	ACTGATACGCCTGAGTGGCT	CCCTGTATTCCGTCTCCTTG	80
<i>Ctgf</i>	GAGTGTGCACTGCCAAAGAT	GGCAAGTGCATTGGTATTTG	102

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

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

**2.12. Reverse Transcription and Real-Time (RT) PCR Analysis.** Total cellular RNAs from lung homogenates were extracted using the RNeasy kit (QIAGEN S.A., Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions. RNAs were quantified using a BioSpec-nano (Shimadzu, Noisiel, France) at 260 nm. Single-strand cDNAs were synthesized from 0.5 µg of total RNA using Maxima first strand cDNA synthesis kit composed by a mixture of oligo (dT) and random hexamer primers according to the manufacturer's instructions (Fisher Scientific, Illkirch, France). Resulting cDNA samples were amplified by quantitative polymerase chain reaction (PCR) with Absolute qPCR SYBR Green ROX mix (Fisher Scientific, Illkirch, France) on StepOne

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

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

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

### 3. Results

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

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

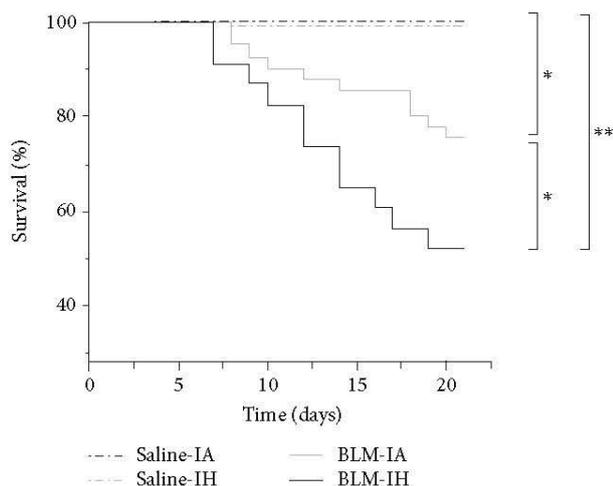


FIGURE 2: Survival is reduced in response to intermittent hypoxia in a murine model of lung fibrosis. Kaplan-Meier plot of mice survival after bleomycin exposure in normoxia and intermittent hypoxia (IH). Eight-week-old mice received an intratracheal instillation of bleomycin or saline (NaCl) at day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

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

### 3.3. Lung Oxidative Stress and Lung Antioxidant Enzymes.

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

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

### 3.4. Exposure to Intermittent Hypoxia Increases Lung Cell Apoptosis in Bleomycin-Treated Mice.

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

### 3.5. Exposure to Intermittent Hypoxia Worsens Lung Fibrosis in Bleomycin-Treated Mice.

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

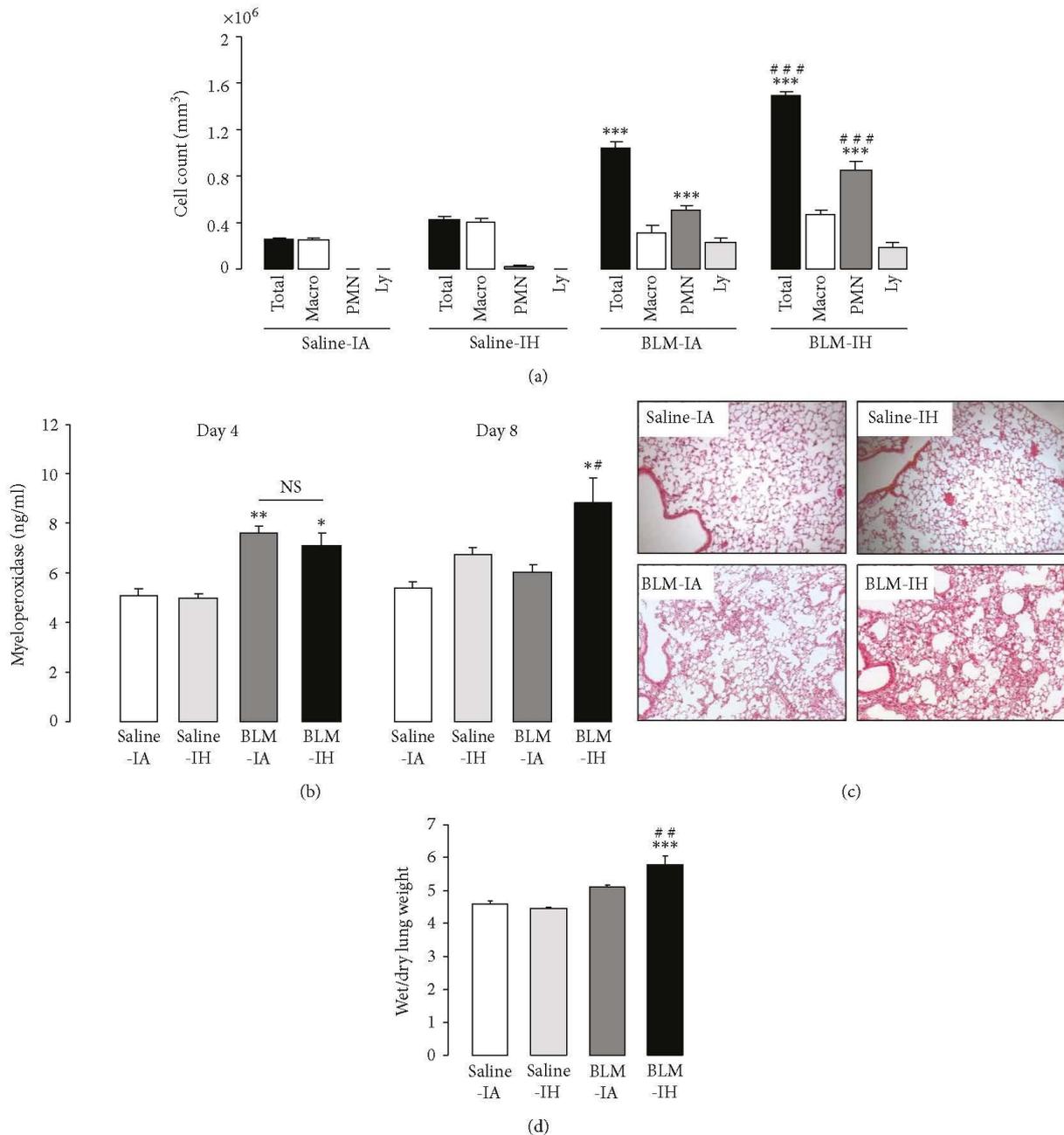


FIGURE 3: Intermittent hypoxia increases lung inflammation and pulmonary edema in bleomycin-treated mice. (a) Total cell count was determined in BAL from mice at day 4 in the 4 experimental groups. Changes in BAL cell population (Macro: macrophages; PMN: polymorphonuclear cells; Ly: lymphocytes) were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

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

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

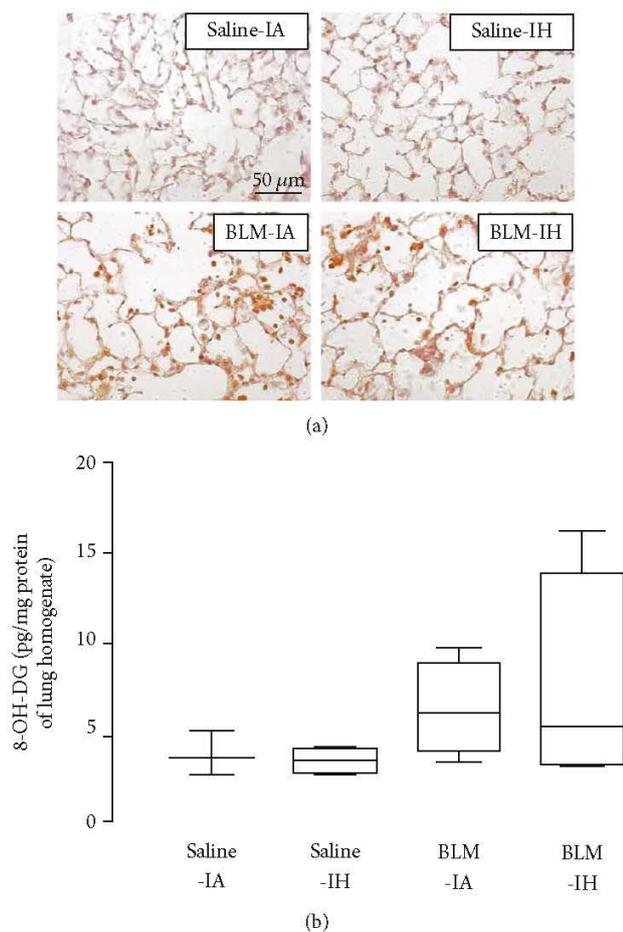


FIGURE 4: Intermittent hypoxia and bleomycin enhanced lung nitrosative/oxidative stress in mouse lungs. (a) 3-nitrotyrosine presence was assessed by immunostaining on lung sections of mice prepared at day 4 in the 4 experimental groups. The figure is representative of at least 5 individual mice for each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

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

#### 4. Discussion

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

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

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

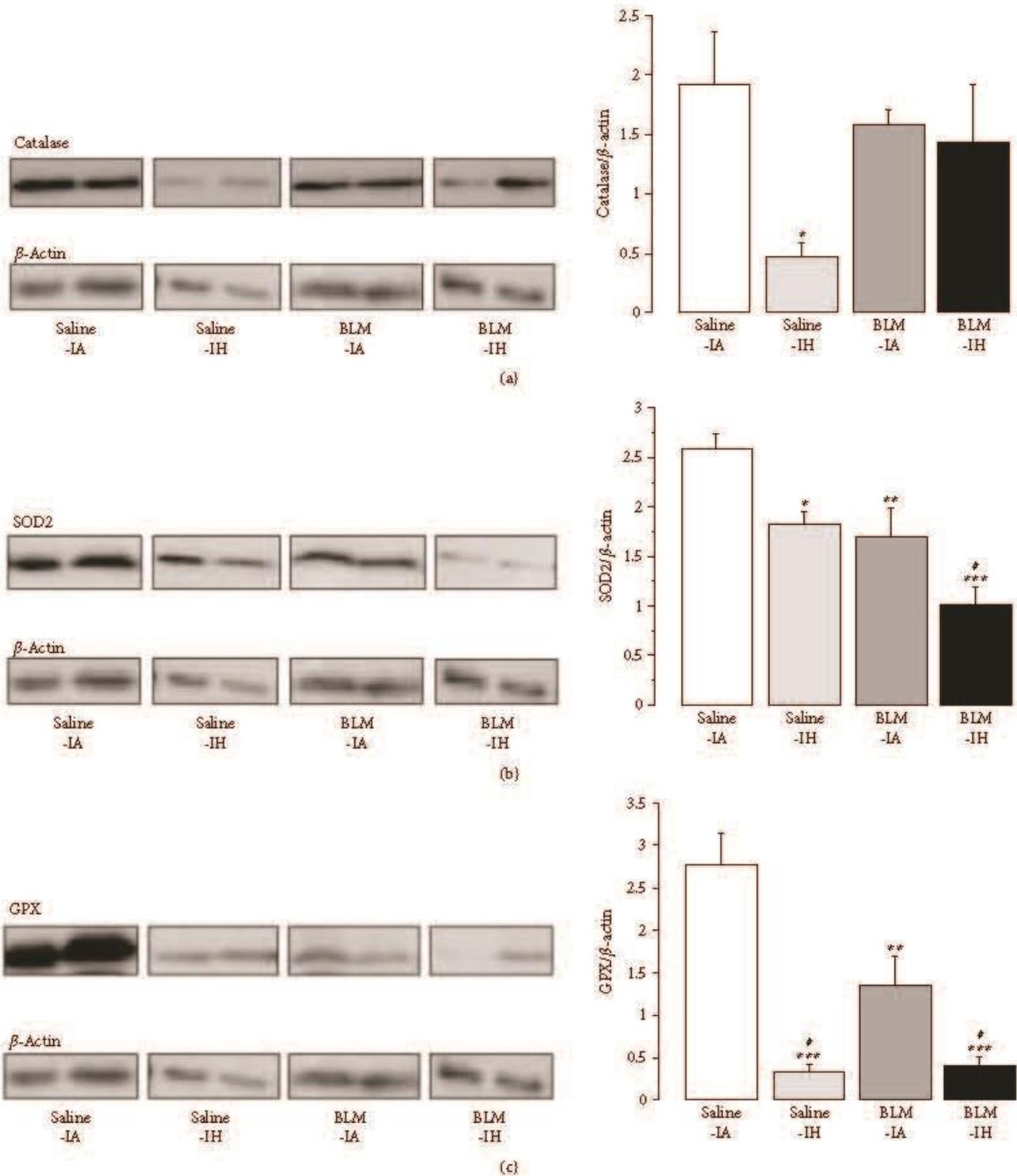


FIGURE 5: Intermittent hypoxia reduced antioxidant enzymes in mouse lungs. Immunoblotting for catalase (a), SOD2 (b), and GPX (c) was performed on lungs on D4 in the 4 experimental groups. Histograms show quantitative representation of protein levels of  $n = 4-5$  mice/group. \* $p < 0.01$  versus Saline-IA;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

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

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

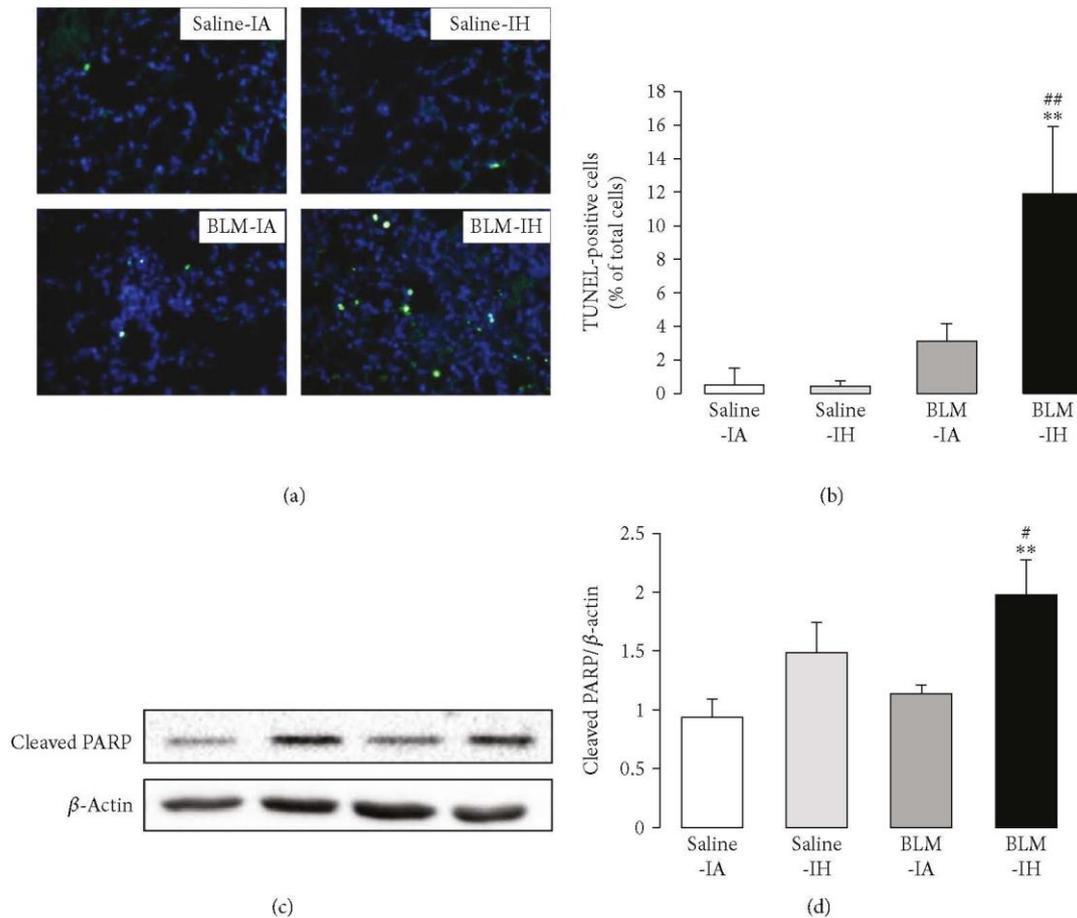


FIGURE 6: Intermittent hypoxia increased apoptosis in mouse lungs. (a) Apoptosis was determined by TUNEL assay on lung sections of mice prepared at day 8 in the 4 experimental groups. Magnification  $\times 200$ . (b) Fraction of TUNEL-positive cells (green) on lung sections was determined relative to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

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

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

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

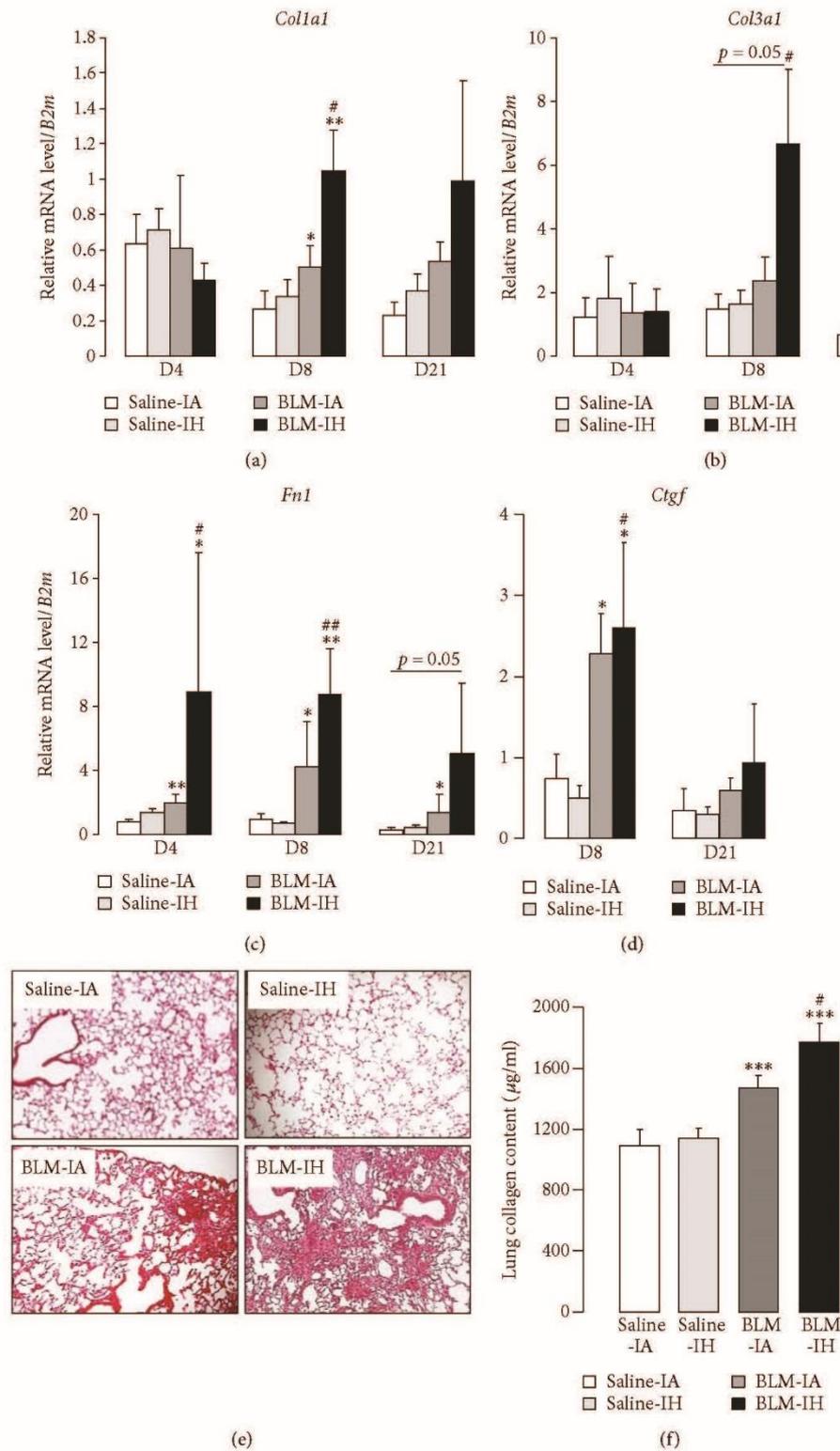


FIGURE 7: Lung fibrosis is increased in response to intermittent hypoxia. Quantitative RT-PCR was performed to estimate (a) *Col1a1*, (b) *Col3a1*, (c) *Fn1*, and (d) *Ctgf* mRNA levels in whole lung homogenate from mice in the 4 experimental groups and normalized to *B2m* mRNA. Results are expressed as means  $\pm$  SE of 5 animals per group. (e) Lung histology of mice at day 21. Lung sections were prepared at day 21 in the 4 experimental groups and stained with haematoxylin and eosin to assess lung morphology. (f) Soluble collagen content was assessed by Sircol assay in lung homogenates in saline-treated mice ( $n = 5-10$  mice per group) compared with BLM-treated mice ( $n = 14-18$  mice per group). \* $p < 0.01$  versus Saline-IA; \*\* $p < 0.01$  versus Saline-IA; \*\*\* $p < 0.001$  versus Saline-IA; # $p < 0.05$  versus BLM-IA; ## $p < 0.01$  versus BLM-IA.

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

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

One important question is whether exposure to IH would worsen lung fibrosis and animal mortality in our experimental model. Our results based on lung histological examination, the time-course of extracellular matrix protein mRNA transcripts, and quantification of lung collagen provide evidence that pulmonary fibrosis at day 21 was more severe in mice treated with BLM and IH as compared with those treated by BLM and IA. Indeed, animal mortality observed during the fibrotic phase (from day 8 to day 21) was almost doubled in the BLM-IH group as compared with the BLM-IA group, and postmortem analysis of the lungs suggests that the cause of death was mostly respiratory deficiency. Our data concerning lung fibrosis are in line with those from Braun et al. [36], recently obtained in rats treated with BLM or saline on day 0 and exposed to chronic IH (nadir  $\text{FIO}_2$  10%, 30 cycles/h, 10 h/day) or to normoxia from day 5 to day 35. The latter study showed that a 30-day exposure to IH increased lung NF- $\kappa$ B activity, worsened pulmonary fibrosis (as assessed by lung hydroxyproline content), and

impaired lung compliance in rats treated with BLM. The authors observed a significant increase in mRNA expression of the profibrotic factor CTGF in rat lungs treated by BLM and IH (as compared with mice treated with BLM and IA) which could contribute to worsen fibrosis, but this was not the case in our experiments in mice, maybe because of species differences. In their study, Braun et al. did not specifically evaluate the severity of pulmonary inflammation during the first week following BLM administration. Indeed, contrary to our findings, the authors did not mention any increase in the mortality rate of rats exposed to BLM and IH. This discrepancy may be due to the fact that the IH regimen they used was less severe than that in our experiments (e.g.,  $\text{FIO}_2$  nadir 10% versus 6% in the present study). However, whatever the species and IH regimen differences between the two studies, they both strongly support the deleterious role of chronic IH in the development of BLM-induced lung fibrosis. Further *in vitro* experiments using specific lung cell types (ATII cells, fibroblasts) should be undertaken to decipher the mechanism(s) leading to the worsening of pulmonary fibrosis by chronic IH.

## 5. Conclusion

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

## Disclosure

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

## Conflicts of Interest

The authors have no conflict of interest to disclose.

## Authors' Contributions

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

## Acknowledgments

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

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

## References

- [1] T. Gille, M. Didier, M. Boubaya et al., “Obstructive sleep apnoea and related comorbidities in incident idiopathic pulmonary fibrosis,” *The European Respiratory Journal*, vol. 49, no. 6, article 1601934, 2017.
- [2] L. H. Lancaster, W. R. Mason, J. A. Parnell et al., “Obstructive sleep apnea is common in idiopathic pulmonary fibrosis,” *Chest*, vol. 136, no. 3, pp. 772–778, 2009.
- [3] C. Mermigkis, J. Chapman, J. Golish et al., “Sleep-related breathing disorders in patients with idiopathic pulmonary fibrosis,” *Lung*, vol. 185, no. 3, pp. 173–178, 2007.
- [4] G. Milioli, M. Bosi, V. Poletti et al., “Sleep and respiratory sleep disorders in idiopathic pulmonary fibrosis,” *Sleep Medicine Reviews*, vol. 26, pp. 57–63, 2016.
- [5] T. E. King Jr, A. Pardo, and M. Selman, “Idiopathic pulmonary fibrosis,” *Lancet*, vol. 378, no. 9807, pp. 1949–1961, 2011.
- [6] B. Ley, H. R. Collard, and T. E. King Jr., “Clinical course and prediction of survival in idiopathic pulmonary fibrosis,” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 183, no. 4, pp. 431–440, 2011.
- [7] G. Raghu, “The role of gastroesophageal reflux in idiopathic pulmonary fibrosis,” *The American Journal of Medicine*, vol. 115, no. 3, Supplement 1, pp. 60–64, 2003.
- [8] V. L. Kinnula, C. L. Fattman, R. J. Tan, and T. D. Oury, “Oxidative stress in pulmonary fibrosis: a possible role for redox modulatory therapy,” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 172, no. 4, pp. 417–422, 2005.
- [9] D. M. Walters, H. Y. Cho, and S. R. Kleeberger, “Oxidative stress and antioxidants in the pathogenesis of pulmonary fibrosis: a potential role for Nrf2,” *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 10, no. 2, pp. 321–332, 2008.
- [10] I. Almendros, Y. Wang, and D. Gozal, “The polymorphic and contradictory aspects of intermittent hypoxia,” *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 307, no. 2, pp. L129–L140, 2014.
- [11] L. Lavie, “Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia – revisited – the bad ugly and good: implications to the heart and brain,” *Sleep Medicine Reviews*, vol. 20, pp. 27–45, 2015.
- [12] P. Levy, M. Kohler, M. N. WT et al., “Obstructive sleep apnoea syndrome,” *Nature Reviews Disease Primers*, vol. 1, article 15015, 2015.
- [13] V. Pialoux, P. J. Hanly, G. E. Foster et al., “Effects of exposure to intermittent hypoxia on oxidative stress and acute hypoxic ventilatory response in humans,” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 180, no. 10, pp. 1002–1009, 2009.
- [14] B. B. Moore and C. M. Hogaboam, “Murine models of pulmonary fibrosis,” *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 294, no. 2, pp. L152–L160, 2008.
- [15] M. A. Mouratis and V. Aidinis, “Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin,” *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, vol. 17, no. 5, pp. 355–361, 2011.
- [16] N. Randrianarison, C. Clerici, C. Ferreira et al., “Low expression of the  $\beta$ -ENaC subunit impairs lung fluid clearance in the mouse,” *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 294, no. 3, pp. L409–L416, 2008.
- [17] C. Planes, N. H. Randrianarison, R. P. Charles et al., “ENaC-mediated alveolar fluid clearance and lung fluid balance depend on the channel-activating protease 1,” *EMBO Molecular Medicine*, vol. 2, no. 1, pp. 26–37, 2010.
- [18] J. Zhou, L. Ge, C. Jia et al., “ROS-mediated different homeostasis of murine corneal epithelial progenitor cell line under oxidative stress,” *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, p. 36481, 2016.
- [19] C. M. Simbulan-Rosenthal, D. S. Rosenthal, S. Iyer, A. H. Boulares, and M. E. Smulson, “Transient poly(ADP-ribose)ylation of nuclear proteins and role of poly(ADP-ribose) polymerase in the early stages of apoptosis,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 22, pp. 13703–13712, 1998.
- [20] P. Levy, J. L. Pepin, C. Arnaud et al., “Intermittent hypoxia and sleep-disordered breathing: current concepts and perspectives,” *The European Respiratory Journal*, vol. 32, no. 4, pp. 1082–1095, 2008.
- [21] B. C. Willis, J. M. Liebler, K. Luby-Phelps et al., “Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor- $\beta$ 1,” *The American Journal of Pathology*, vol. 166, no. 5, pp. 1321–1332, 2005.
- [22] Y. Uzunhan, O. Bernard, D. Marchant et al., “Mesenchymal stem cells protect from hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition,” *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 310, no. 5, pp. L439–L451, 2016.
- [23] L. B. Ware and M. A. Matthay, “The acute respiratory distress syndrome,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 342, no. 18, pp. 1334–1349, 2000.
- [24] E. Hummler and C. Planes, “Importance of ENaC-mediated sodium transport in alveolar fluid clearance using genetically-engineered mice,” *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 25, no. 001, pp. 063–070, 2010.
- [25] M. A. Matthay, “Resolution of pulmonary edema. Thirty years of progress,” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 189, no. 11, pp. 1301–1308, 2014.
- [26] T. Gille, N. Randrianarison-Pellan, A. Goolaerts et al., “Hypoxia-induced inhibition of epithelial Na<sup>+</sup> channels in the lung. Role of Nedd4-2 and the ubiquitin-proteasome pathway,” *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 50, no. 3, pp. 526–537, 2014.
- [27] S. Matalon, R. Bartoszewski, and J. F. Collawn, “Role of epithelial sodium channels in the regulation of lung fluid homeostasis,” *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 309, no. 11, pp. L1229–L1238, 2015.
- [28] C. Planes, M. Blot-Chabaud, M. A. Matthay, S. Couette, T. Uchida, and C. Clerici, “Hypoxia and  $\beta_2$ -agonists regulate cell surface expression of the epithelial sodium channel in native alveolar epithelial cells,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 49, pp. 47318–47324, 2002.
- [29] S. I. Hagiwara, Y. Ishii, and S. Kitamura, “Aerosolized administration of N-acetylcysteine attenuates lung fibrosis induced by bleomycin in mice,” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 162, no. 1, pp. 225–231, 2000.
- [30] C. Li, M. M. Wright, and R. M. Jackson, “Reactive species mediated injury of human lung epithelial cells after hypoxia-reoxygenation,” *Experimental Lung Research*, vol. 28, no. 5, pp. 373–389, 2002.
- [31] W. Xu, L. Chi, B. W. Row et al., “Increased oxidative stress is associated with chronic intermittent hypoxia-mediated brain

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

### C. Déroulement de l'étude

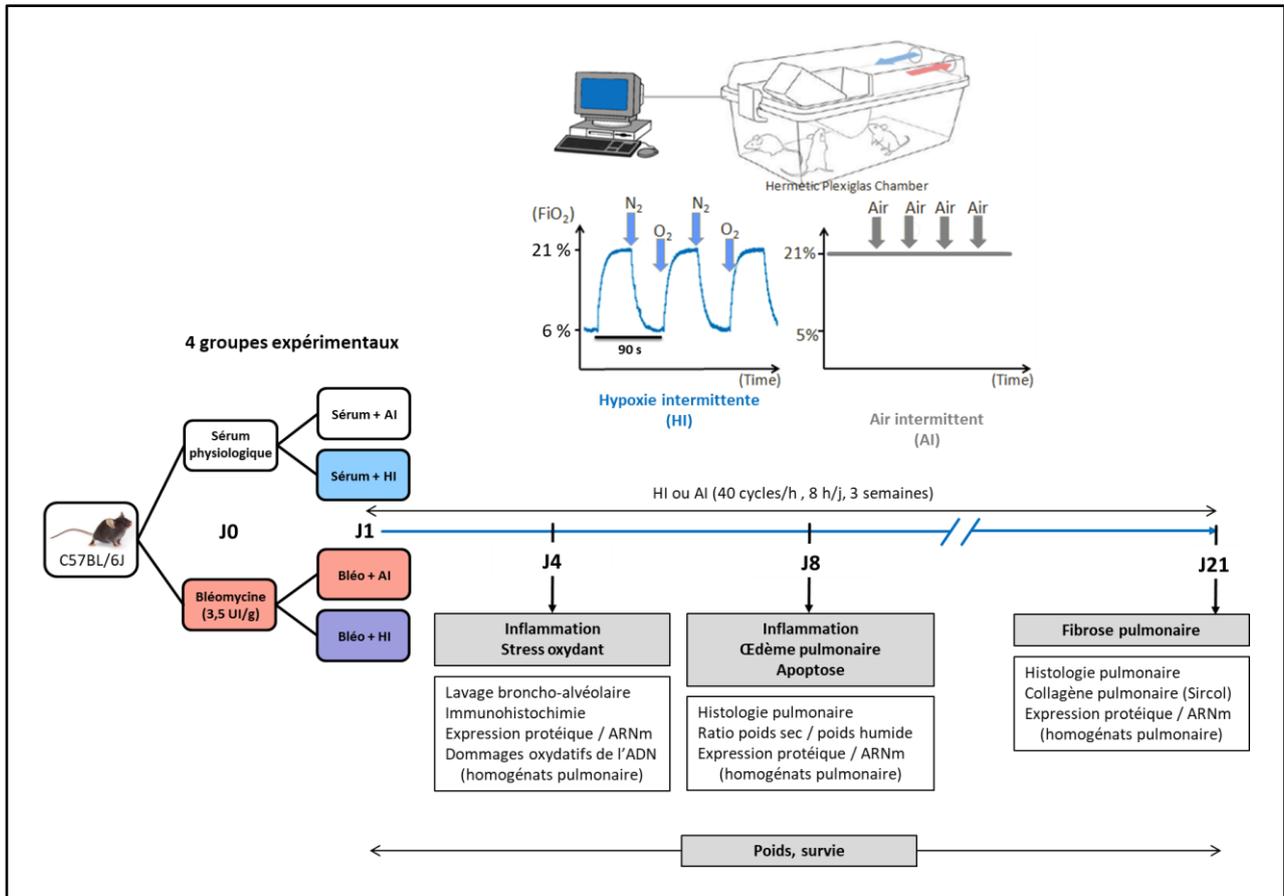


Figure 16 : Schéma du protocole expérimental du second travail.

Les souris C57BL/6J du commerce recevaient une instillation intratrachéale de bléomycine 3,5 UI/g ou de sérum physiologique (volume = 100  $\mu$ l), puis elles étaient exposées à une hypoxie intermittente (HI) (nadir de  $FiO_2$  à 5 % ; 40 cycles/h ; 8 h/j) ou laissées en air intermittent (AI) pendant 4, 8 ou 21 jours avant sacrifice.

### D. Résumé des résultats

Les souris ayant reçu la bléomycine puis ayant été exposées à l'HI pendant 3 semaines présentaient une mortalité deux fois plus importante que dans le groupe bléomycine + AI, respectivement 48 % contre 24 %. En plus d'aggraver la mortalité, la double agression bléomycine + HI majorait l'alvéolite pulmonaire sur le liquide de LBA à J4, majorait l'œdème pulmonaire (histologie et rapport poids humide / poids sec) et l'apoptose des CEA (méthode TUNEL et expression de la PARP clivée) à J8, et majorait la fibrose évaluée à J21 sur les coupes histologiques et par la quantité de

collagène pulmonaire (dosage Sircol). Dans le groupe bléomycine + HI, on observait à J8 une augmentation plus importante de l'expression des ARNm codant pour des protéines de la MEC (collagène I, collagène III, fibronectine) par rapport au groupe bléomycine + AI, alors que les niveaux d'expression étaient comparables pour le CTGF (et supérieurs à ceux observés dans les groupes témoins). Le stress oxydant, évalué à J4 par immunomarquage de 3-nitrotyrosine et dosage de 8-OHdG dans les homogénats pulmonaires, était plus élevé chez toutes les souris ayant reçu de la bléomycine, qu'elles aient ensuite été exposées à l'HI ou à l'AI. Les profils d'expression des enzymes antioxydantes étaient différents selon l'enzyme concernée : HI et bléomycine avaient un effet additif pour inhiber l'expression de la SOD2, l'inhibition de GPx était maximale en HI (avec ou sans bléomycine) et partielle avec la bléomycine seule, enfin la catalase n'était inhibée que chez les souris témoins exposées à l'HI, mais pas dans le groupe bléomycine + HI.

## E. Discussion

### 1. Avantages et limites des modèles utilisés

#### *i. Modèle d'hypoxie intermittente*

Dans ce travail, les souris étaient exposées à une HI sévère (6 % FiO<sub>2</sub> ; 40 cycles /h) et pouvant durer 3 semaines pour les temps longs, afin de mimer les épisodes d'hypoxie / réoxygénation rencontrés au cours d'un SAOS sévère, dans la mesure où celui-ci peut affecter jusqu'à 40 % des patients atteints de FPI ([Gille 2017](#)). En effet, si le rôle du SAOS / de l'HIC sur la fibrogenèse pulmonaire n'a été que très peu étudié, la pathogénie des conséquences délétères du SAOS est bien documentée et implique pour une grande part une HIC et la génération d'un important stress oxydant. Des données expérimentales antérieures ont montré que l'exposition à l'HIC selon ces modalités pouvaient provoquer des effets délétères cardiovasculaires, métaboliques ou neurologiques chez les souris ([Almendros 2014](#), [Lavie 2015](#)). Toutefois, du fait de l'absence d'obstruction et de réelle apnée ou hypopnée, ce modèle ne reproduit pas la totalité des

mécanismes physiopathologiques induits par le SAOS, au premier rang desquels les contraintes thoraco-abdominales lors des efforts respiratoires pour restaurer un débit dans les voies aériennes, et dont on pense qu'elles pourraient jouer un rôle dans la physiopathologie de la FPI ([Leslie 2012](#), [Froese 2016](#)). Par un autre mécanisme que lors du SAOS, ce modèle pourrait avoir des conséquences sur le sommeil, mais elles n'ont pas été étudiées. En effet, l'hypoxie était générée par un *flush* de diazote (N<sub>2</sub>) faisant baisser la FiO<sub>2</sub> dans le caisson, et lorsque cette dernière atteignait 6 % une valve était actionnée et c'est de l'air enrichi en O<sub>2</sub> qui pénétrait à haut débit pour une remontée rapide de la FiO<sub>2</sub> (*figure 18*). Ce système peut donc générer un certain stress chez les souris (bruit, souffle), or l'exposition durait 8 h/j et était réalisée en journée, c'est-à-dire pendant la période naturelle de sommeil de la souris qui est un animal nocturne. C'est la raison pour laquelle les animaux témoins n'ont pas été laissés en air ambiant simple mais ont été placés dans un caisson identique avec des *flushs* d'air atmosphérique (FiO<sub>2</sub> à 21 % en permanence) (AI). Par ailleurs, la fragmentation du sommeil au cours du SAOS a des conséquences sur les fonctions cognitives et peut induire une hyperactivité sympathique participant aux dommages cardiovasculaires ([Lévy 2015](#)), mais elle n'intervient pas *a priori* dans la fibrogenèse pulmonaire. Enfin, ce modèle ne reproduit pas les épisodes d'hypercapnie intermittente qui sont observés au cours du SAOS pendant les apnées, mais là encore il n'existe aucun d'argument expérimental pour penser qu'ils participent à la pathogénie de la FPI.

#### *ii. Modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine*

L'induction d'une fibrose pulmonaire chez le rongeur par une instillation intratrachéale unique de bléomycine est le modèle le mieux caractérisé et le plus utilisé pour étudier les mécanismes de fibrogenèse ([Moore 2008](#), [Mouratis 2011](#), [Williamson 2015](#)). La bléomycine est un glycopeptide isolé à partir de *Streptomyces verticillus* possédant des propriétés antibiotiques et antitumorales. Elle peut être responsable d'une pneumotoxicité dose-dépendante chez l'Homme, aboutissant à une fibrose pulmonaire. Utilisée dans les modèles expérimentaux en instillation

intratrachéale, elle induit des lésions directes de l'épithélium alvéolaire avec apoptose des CEA (notamment les CEA de type I), et une importante réaction inflammatoire avec œdème et dépôts hyalins endo-alvéolaires : c'est la phase inflammatoire, maximale autour de J8 chez la souris. En réponse à cette agression initiale, une fibrose pulmonaire peut se développer, détectable dès J14 et souvent maximale entre J21 et J28 chez la souris. Comme pour la maladie humaine, l'activation des fibroblastes, la TEM et la différenciation en myofibroblastes sont observables, sous la dépendance du TGF- $\beta$ . Par la suite, la fibrose peut persister ou disparaître dans un troisième temps. L'intensité de la phase inflammatoire et de la phase fibrosante est dépendante de la dose de bléomycine instillée ([Moore 2008](#), [Mouratis 2011](#), [Williamson 2015](#)). Ce modèle présente cependant de nombreuses différences avec la FPI. Tout d'abord, la fibrose induite par la bléomycine correspond à une fibrose séquellaire d'une agression inflammatoire initiale, ce qui de fait se rapproche plus de la physiopathologie des pneumopathies toxiques chez l'Homme, ou d'autres PII comme la PINS. Par ailleurs, du fait de l'intensité de la phase inflammatoire, l'histologie pulmonaire réalisée précocement jusque J8 possède de nombreuses similarités avec ce qui peut être observé chez l'Homme en cas de SDRA ou d'EA de FPI. Par ailleurs, au terme de la phase fibrosante du modèle bléomycine, l'activation des fibroblastes ne se pérennise pas et la fibrose se stabilise, voire peut régresser. Sur le plan histologique, le modèle animal se caractérise par une fibrose bronchiolo-centrique (et non à prédominance basale et sous-pleurale comme la FPI), pouvant toutefois présenter des FFJ. Les alternatives pourraient être d'administrer la bléomycine en dose unique par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, modèles induisant une fibrose prédominant en sous-pleural, ou par instillations intratrachéales répétées, modèle censé être plus « fibrosant » et moins « inflammatoire » ([Degryse 2010](#)). Enfin, notons que du fait de contraintes diverses (temps, surface et coût d'une stabulation prolongée), on utilise en général des souris d'âge jeune (8-12 semaines dans ce travail), alors que la FPI est une maladie touchant des patients généralement âgés de plus de 60 ans et dans laquelle les voies de signalisation de la sénescence cellulaire sont primordiales.

## 2. Majoration de l'inflammation pulmonaire

Les formules des liquides de LBA ont été comparés entre les 4 groupes : les souris ayant reçu de la bléomycine présentaient toutes une alvéolite à cellules polynucléées (essentiellement des PNN), mais cette alvéolite était plus intense pour les souris du groupe bléomycine + HI, avec une expression plus importante de MPO. Les coupes histologiques montraient un infiltrat inflammatoire alvéolaire et interstitiel chez les souris traitées par bléomycine, majoritaire chez celles exposées à l'HI. Dans ce groupe, la présence d'un œdème alvéolaire était confirmée par l'augmentation du ratio poids humide / poids sec. Comme évoqué précédemment, l'agression initiale de l'épithélium alvéolaire par une instillation intratrachéale de bléomycine entraîne une réaction inflammatoire intense pouvant augmenter la perméabilité alvéolo-capillaire au fluide et aux protéines, à l'instar de ce que l'on peut observer au cours d'un SDRA ([Williamson 2015](#)). L'effet spécifique de l'HI sur la réabsorption transépithéliale de Na<sup>+</sup> et d'eau n'a pas été étudié, cependant il a été montré que la capacité de l'épithélium alvéolaire d'assurer ce transport vectoriel était diminuée *in vitro* et *in vivo* lors d'une exposition à une hypoxie aiguë ou chronique et/ou lors d'une production exagérée de ROS ([Vivona 2001](#), [Planès 2002](#), [Litvan 2006](#), [Gille 2014](#)). Ces conditions étant reproduites par l'HI, on peut penser que l'œdème alvéolaire plus important observé dans le groupe bléomycine + HI puisse être également dû en partie à un défaut de réabsorption.

## 3. Déséquilibre redox dans le poumon

Les souris traitées par bléomycine, qu'elles aient été ensuite exposées à l'AI ou à l'HI, présentaient un stress oxydant plus important que les témoins, comme en attestait l'immunohistochimie avec un marquage en 3-nitrotyrosine plus intense (notamment au niveau des CEA et des leucocytes) et une tendance non significative à une augmentation de la 8-OHdG dosée par ELISA dans les homogénats de poumon et dans le liquide de LBA. Aucune modification de l'expression de Nox2 ni de Nox4 entre les groupes n'avait été observée (données non publiées). La

concentration de MPO, enzyme pro-oxydante synthétisée par les PNN, mesurée par ELISA sur homogénat de poumon, était élevée à J4 pour toutes les souris ayant reçu de la bléomycine par rapport aux témoins, mais cette hyper-expression de MPO ne persistait à J8 que dans les poumons des souris du groupe exposé à l'HI. Alors que le stress oxydant est une caractéristique de l'exposition à l'HI ([Prabhakar 2012](#), [Almendros 2014](#), [Lavie 2015](#)), les seuils de sensibilité de ces techniques n'ont pas permis de mettre en évidence de différence entre les groupes sérum physiologique + AI et sérum physiologique + HI (représentant l'effet propre de l'HI). Toutefois, l'expression protéique des enzymes antioxydantes SOD2, GPx et catalase, mesurées par *Western blot* sur homogénat de poumon, était drastiquement diminuée par l'HI : respectivement -31 %, -89 % et -77 % pour le groupe sérum physiologique + HI par rapport au groupe sérum physiologique + AI. La capacité de l'HI à générer un stress oxydant et à diminuer l'activité de la SOD2 avait déjà été mise en évidence dans la lignée H441 de CEA ([Li 2002](#)). La bléomycine possédait un effet quasiment identique sur la SOD2 (-35 %), qui avait la particularité d'être additif avec celui de l'HI puisque l'expression de cette enzyme était diminuée de 61 % dans le groupe bléomycine + HI. En revanche, l'effet de la bléomycine sur la GPx, bien que significatif (-50 %) était inférieur à celui de l'HI et non additif. Un dosage de l'activité des enzymes antioxydantes, éventuellement à plusieurs temps, serait nécessaire pour préciser l'implication de chaque exposition et la cinétique de mise en jeu. Toutefois, pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que la double agression bléomycine + HI induit un déséquilibre du statut redox des cellules pulmonaires en générant un stress oxydant et en diminuant l'activité des systèmes de défense antioxydants. Ces données sont concordantes avec celles d'un autre article publié très récemment par une équipe américaine, dans lequel des rats traités par bléomycine ou sérum physiologique ont été secondairement exposés à une HI (nadir à 10 % de FiO<sub>2</sub> ; 30 cycles/h ; 10 h/j) ou laissés en air ambiant pendant 30 jours à partir de J5. Le stress oxydant était évalué par le dosage sur homogénats de poumon du malondialdéhyde (produit par les peroxydations lipidiques), il était augmenté par rapport aux rats témoins dans les deux groupes exposés à une agression simple (bléomycine + air ambiant ou sérum physiologique + HI), et le niveau était encore plus élevé dans le

groupe bléomycine + HI (avec toutefois un  $p$  significatif à J14 mais non significatif à J35) ([Braun 2017](#)). Dans cette étude, l'activité du NF- $\kappa$ B a été mesurée à deux temps différents. Elle était augmentée initialement à J14 chez les rats ayant reçu de la bléomycine, et même supérieure chez ceux laissés en air ambiant par rapport à ceux exposés à l'HI. Dans un deuxième temps, une inversion s'opérait et l'activité NF- $\kappa$ B à J35 était maximale chez les rats soumis à une double agression (valeur doublée par rapport à J14), alors qu'elle diminuait chez les rats du groupe bléomycine + air ambiant. La voie du NF- $\kappa$ B devra être explorée dans notre modèle, et ces résultats soulignent l'importance de réaliser des mesures échelonnées afin d'étudier la cinétique de mise en jeu. Nous prévoyons également de quantifier l'expression d'HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  à des temps précoces et tardifs.

#### 4. Majoration de l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires

L'apoptose des cellules pulmonaires a été mesurée par un marquage *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (TUNEL) sur des coupes de poumons incluses en paraffine, et une quantification de l'expression protéique de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) clivée par *Western blot*, un marqueur de phase précoce d'apoptose. Ces deux méthodes ont montré une augmentation significative de l'apoptose spécifiquement dans le groupe bléomycine + HI, alors qu'il n'y avait pas de différence entre les trois autres groupes. Les cellules marquées par la méthode TUNEL étaient majoritairement des CEA de type II, et dans une moindre mesure des leucocytes. Ces résultats sont concordants avec des travaux antérieurs qui ont montré que l'HI peut induire une apoptose dans différents types cellulaires, tels que les neurones ([Young 2004](#)) ou les cellules  $\beta$  du pancréas ([Xu 2009](#)). Notre modèle *in vivo* ne nous ayant pas permis de réaliser des études mécanistiques, des expérimentations complémentaires *in vitro* seront nécessaires pour identifier les voies pro- et anti-apoptotiques impliquées dans l'apoptose des CEA de type II. Selon l'état actuel des connaissances, on peut penser que l'activation de la voie HIF-1 $\alpha$  (et de ses cibles transcriptionnelles pro-apoptotiques) et l'accumulation de ROS sont impliquées ([Krick 2005](#), [Bouvry 2006](#), [Kagawa 2008](#)).

## 5. Majoration de la fibrose pulmonaire et de la mortalité

Il existait une mortalité accrue dans le groupe bléomycine + HI, deux fois plus importante que dans le groupe bléomycine + AI. Ceci est à mettre en lien avec une augmentation de la fibrose pulmonaire sur les coupes histologiques et de la quantité de collagène pulmonaire mesurée par dosage Sircol sur les homogénats de poumon. Enfin, l'expression des ARNm du collagène I, du collagène III et de la fibronectine était augmentée, alors que celle du CTGF était identique pour les deux groupes traités par bléomycine (et supérieure à celle des groupes témoins). En revanche, l'expression des ARNm du TGF- $\beta$  était identique dans les 4 groupes expérimentaux. Afin de s'assurer que la quantité finale de fibrose accumulée ne soit pas due uniquement à l'intensité de la phase inflammatoire, nous avons répété le protocole en commençant l'exposition à l'HI ou l'AI à partir de J8 seulement. Les chiffres de mortalité étaient comparables, elle était de 50 % dans le groupe bléomycine + HI (n = 18) pour seulement 22 % dans le groupe bléomycine + AI (n = 18), confirmant que les effets délétères de l'HI concernent également les mécanismes physiopathologiques mis en jeu pendant la phase fibrosante. Aucun décès n'avait été observé dans les groupes témoins (n = 11) (données non publiées). Ces résultats viennent appuyer ceux obtenus par Braun *et al.*, qui avaient observé des quantités pulmonaires d'hydroxyproline plus importantes chez les rats du groupe bléomycine + HI par rapport au groupe bléomycine + air ambiant à J35, ainsi qu'une surexpression des ARNm du collagène I, du collagène V et du CTGF. Par ailleurs, la compliance pulmonaire était plus sévèrement diminuée en cas de double agression. En revanche, malgré ces constatations, les auteurs n'avaient pu mettre en évidence qu'une tendance à l'augmentation de la fibrose par analyse visuelle des lames d'histologie, sans que la différence soit significative entre bléomycine + HI et bléomycine + air ambiant lors de la quantification par méthode d'Aschcroft. Il n'était pas fait mention d'une surmortalité en cas de double agression (Braun 2017). Ces deux derniers points sont probablement expliqués par un modèle d'agression moins sévère, que ce soit pour la dose de bléomycine choisie (la fibrose dans le groupe bléomycine + air ambiant semblait moins importante sur les images histologiques disponibles que celle qui avait été développée dans notre groupe bléomycine + AI), ou

pour le nadir de  $FiO_2$  dans le modèle d'exposition à l'HI (10 % contre 6 % dans notre modèle). Toutefois, ces deux études suggèrent fortement que l'HIC joue un rôle délétère dans le développement d'une fibrose pulmonaire induite par la bléomycine. Des expérimentations supplémentaires sont nécessaires pour préciser les mécanismes mis en jeu. Le stress du RE, qui est induit en hypoxie et peut favoriser une TEM ou l'apoptose des CEA ([Delbrel 2016](#)), pourrait par exemple être impliqué. *In vivo*, l'activation des voies de l'UPR pourrait être recherchée dans les CEA des animaux soumis à une double agression, ainsi que des marqueurs de TEM. Dans ce cas, les souris traitées par un inhibiteur du stress du RE, ou présentant une inactivation conditionnelle de CHOP dans les CEA, pourraient être protégées des effets délétères de l'HIC. Les liens éventuels entre HIC, stress du RE et apoptose pourraient être étudiés *in vitro* en comparant les CEA exposées à celles cultivées en conditions normoxiques.

En conclusion, l'ensemble de ces données suggère que l'HIC module la sévérité de la pneumopathie induite par la bléomycine dans le sens d'une aggravation, tant à la phase aiguë inflammatoire qu'à la phase plus tardive fibrosante, avec *in fine* une surmortalité chez les animaux soumis à une double agression alvéolaire.

## CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

La première partie de ce travail contribue à mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans l'inhibition du transport transépithélial de  $\text{Na}^+$  en condition d'hypoxie. Notre approche à la fois biochimique et fonctionnelle, couplant des études *in vivo* et *in vitro*, a permis de montrer qu'une hypoxie de courte durée peut entraîner une diminution réversible de l'expression de surface d'ENaC, secondaire à une augmentation de son endocytose médiée par Nedd4-2. Ce processus de régulation est important à connaître tant il est susceptible d'intervenir dans des situations physiopathologiques variées, non seulement parce que de nombreuses agressions pulmonaires soumettent les alvéoles à un défaut d'oxygénation, mais également parce que l'hypoxie tissulaire peut survenir dans les épithéliums d'autres organes où la réabsorption de fluide médiée par ENaC est cruciale, tels le rein et le tube digestif.

Dans la mesure où l'activité d'un canal ionique est le produit de son expression membranaire et de sa  $P_o$ , il est concevable qu'une éventuelle diminution de la  $P_o$  d'ENaC intervienne dans l'altération de son activité en conditions hypoxiques, toutefois nous ne disposons pas du matériel de *patch clamp* nécessaire pour vérifier cette possibilité. En réalité, la régulation d'ENaC (tout comme celle de la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase avec laquelle il est fonctionnellement lié) est multimodale, et il a été montré que des expositions plus sévères et de durée plus prolongée à l'hypoxie entraînent une diminution de sa transcription ([Planès 1997](#)).

Concernant l'endocytose accrue d'ENaC, nous avons des arguments pour penser que cet effet aigu de l'hypoxie pourrait passer au moins en partie par la production de ROS mitochondriaux et l'activation de l'AMPK ([Carattino 2005](#), [Bhalla 2006](#), [Lazrak 2009](#)) mais ces voies de signalisation doivent être explorées afin de confirmer cette hypothèse. Il a été montré que les CSM ont un rôle protecteur vis-à-vis de la diminution de l'expression membranaire d'ENaC induite par l'hypoxie ([Goolaerts 2016](#)), mais l'implication des ROS et de l'AMPK n'avait pas été recherchée dans ce travail.

Sur le plan clinique, les CSM représentent une piste thérapeutique prometteuse dans le SDRA. En effet, bien que la mortalité de cette affection ait diminué au cours des vingt dernières années par l'adoption de techniques de ventilations mécaniques spécifiques ([Matthay 2012](#)), on ne dispose pas encore de traitement efficace. De nombreuses données précliniques ont été accumulées ([Walter 2014](#), [Laffey 2017](#)) et deux essais de phase 1 n'ont pas rapporté d'effet indésirable notable ([Zheng 2014](#), [Wilson 2015](#)). Un premier essai de phase 2 est actuellement en cours (NCT 02444455).

Le service de pneumologie de l'hôpital Avicenne est centre de référence des maladies pulmonaires rares de l'adulte, avec une grande expertise de la FPI. Afin de se rapprocher de ce champ d'investigation et de développer des axes de recherche translationnelle, la thématique du laboratoire a évolué vers l'étude des mécanismes physiopathologiques des PID granulomateuses et fibrosantes, et notamment l'implication de l'hypoxie et de l'hypoxie intermittente dans ces phénomènes. C'est pourquoi la deuxième partie de ce travail a consisté à mettre au point un modèle physiopathologique original de double agression pulmonaire permettant l'étude des effets de l'HIC sur la fibrogenèse pulmonaire chez la souris. Les résultats obtenus confortent l'hypothèse initiale d'un impact négatif de l'HIC dans le modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris, avec une augmentation de la mortalité, de l'œdème pulmonaire précoce et de la sévérité de la fibrose à la phase tardive.

La stabilisation d'HIF-1 $\alpha$  dans les CEA et l'activation de la transcription de gènes à l'action pro-fibrosante est un mécanisme plausible par lequel l'hypoxie chronique, qu'elle soit intermittente ou non, pourrait favoriser la fibrogenèse pulmonaire. Nous quantifierons l'expression alvéolaire des facteurs induits par l'hypoxie afin de vérifier s'il existe dans notre modèle une stabilisation d'HIF-1 $\alpha$  aux dépens d'HIF-2 $\alpha$ . Par ailleurs, concernant l'étude du rôle d'HIF-1 $\alpha$ , nous avons généré une lignée de souris triples transgéniques surexprimant HIF-1 $\alpha$  de manière constitutionnelle dans l'épithélium

alvéolaire par inactivation conditionnelle d'*EGLN1* (codant pour PHD2) dans les CEA. Si notre hypothèse est exacte, elles devraient être plus sensibles à la bléomycine que les souris sauvages.

Nous avons prévu d'acquérir un système dédié permettant d'exposer des cultures primaires de CEA à une HIC, afin de mieux appréhender les modifications induites sur le plan cellulaire et moléculaire. Il s'agira d'un modèle puissant pour compléter les données déjà obtenues, en menant en parallèle des études mécanistiques *in vivo* et *in vitro* sur les voies impliquées dans la pathogénie de la FPI. Ainsi, dans les poumons de souris soumises à une double agression, comme dans les CEA exposées à une HIC, nous pourrions compléter la quantification des médiateurs pro- et antioxydants, notamment en confirmant les dosages protéiques par des mesures de l'activité, et en recueillant des échantillons à différents moments de l'étude (par exemple J4, J8, J14 et J21), afin de pouvoir analyser la cinétique de ces mécanismes. Nous étudierons également l'implication de la voie du NF- $\kappa$ B et l'expression de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6) et de médiateurs pro-fibrosants (TGF- $\beta$ , CTGF, CXCL12).

Comme évoqué précédemment, nous projetons d'évaluer la mise en jeu du stress du RE dans les CEA de souris soumises à une double agression. Des CEA de rat en culture primaire pourront également être exposés à une HIC afin d'étudier ses effets sur l'activation des voies de l'UPR, en comparaison des effets de l'hypoxie chronique continue ([Delbrel 2016](#)). L'induction d'une TEM et l'augmentation de l'apoptose seront également recherchées dans ces expérimentations *in vitro*, et le cas échéant des inhibiteurs des ROS ou de CHOP permettront de préciser les mécanismes impliqués. D'autres acteurs de la pathogénie de la FPI et du SAOS devront être évalués. Par exemple, nous n'avons pas mesuré la longueur des télomères dans les CEA, ou d'autres marqueurs de la sénescence cellulaire, et leur lien avec le stress du RE. Nous n'avons pas non plus étudié les effets de l'hypoxie ou de l'HI sur l'activation des fibroblastes, leur différenciation en myofibroblastes et leur phénotype sécrétoire, alors que les FFJ sont le siège d'une hypoxie ([Weng 2014](#)).

Par ailleurs, notre modèle pourrait permettre d'étudier les répercussions d'une double agression sur la vascularisation pulmonaire. En effet, l'apparition d'une hypertension pulmonaire est bien décrite chez les patients porteurs de SAOS ([Sajkov 2002](#)), et peut être provoquée dans des modèles murins d'HIC ([Fagan 2001](#)). HIF-1 $\alpha$  semble impliqué dans ces conditions ([Ball 2014](#)). L'hypertension pulmonaire émaille également de manière fréquente l'évolution des FPI ([Nunes 2012](#)). Concernant le modèle animal, l'induction d'une fibrose pulmonaire chez des souris exposées à la bléomycine peut elle aussi aboutir à l'apparition d'une hypertension pulmonaire, impliquant d'ailleurs la voie de signalisation HIF- $\alpha$  ([Bryant 2016](#)). L'HIC et la bléomycine ayant démontré des effets cumulatifs sur la mortalité, l'inflammation et la fibrose dans notre travail, la double agression pourrait ainsi représenter un modèle d'étude pertinent des interactions entre FPI, SAOS et hypertension pulmonaire. Il pourrait également permettre de tester l'effet thérapeutique de certaines molécules.

Bien que non transposable directement chez l'Homme, l'augmentation de la fibrose pulmonaire observée *in vivo* dans des modèles de double agression impliquant le rôle délétère de l'HIC ([Braun 2017](#), [Gille 2018](#)) est à mettre en perspective avec la forte prévalence du SAOS dans les FPI incidentes ([Gille 2017](#)) et le lien suggéré dans deux études entre profondeur des désaturations au cours du SAOS et pronostic péjoratif de la FPI ([Kolilekas 2013](#), [Bosi 2017](#)). De manière intéressante, parmi les 45 patients de notre étude ancillaire de la cohorte COFI, les 18 patients avec SAOS modéré à sévère ayant refusé ou mal toléré le traitement par PPC (IAH  $\geq$  15 /h) présentaient une survie sans événement respiratoire à 18 mois abaissée par rapport aux 17 patients ne présentant pas de SAOS (IAH < 15 /h) ou par rapport aux 10 patients avec SAOS modéré à sévère traités efficacement par PPC (la progression respiratoire étant définie par une transplantation pulmonaire, une dégradation significative de la CV, de la DLCO ou de la distance parcourue au test de marche des six minutes, la survenue d'une EA ou d'une hypertension pulmonaire) (données non publiées). Une autre étude récente a comparé 55 patients FPI avec SAOS modéré à sévère, en fonction de leur compliance au traitement initié par PPC : 3 des 18 patients du groupe « mauvaise compliance » étaient décédés à 1

an, aucun parmi les 37 patients compliants ([Mermigkis 2015](#)). Ces résultats nécessitent d'être confirmés sur des études avec des effectifs plus importants et présentant une méthodologie plus robuste, toutefois ils soulignent le rôle délétère potentiel du SAOS dans l'histoire naturelle de la FPI et l'effet éventuel de son traitement par PPC. C'est l'objet de la demande de programme hospitalier de recherche clinique (PHRC) interrégional déposée cette année par notre équipe. Elle concerne une étude multicentrique ouverte contrôlée randomisée, intitulée « Efficacité de la ventilation en pression positive continue nocturne dans la fibrose pulmonaire idiopathique avec syndrome d'apnées obstructives du sommeil associé (FIPAP) » dans laquelle nous prévoyons d'inclure 350 FPI incidentes ou prévalentes. Les patients présentant un IAH  $\geq 15$  /h à la polysomnographie seront randomisés pour l'attribution d'une PCC, afin de minimiser les biais liés à une éventuelle mauvaise compliance aux autres traitements (notamment à visée cardiovasculaire). La survie globale et la survie sans progression seront comparées entre les groupes.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alder JK, Chen JJ-L, Lancaster L, et al (2008) Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *PNAS* 105:13051–13056. doi: 10.1073/pnas.0804280105
- Almendros I, Wang Y, Gozal D (2014) The polymorphic and contradictory aspects of intermittent hypoxia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 307:L129–L140. doi: 10.1152/ajplung.00089.2014
- Aron-Wisniewsky J, Minville C, Tordjman J, et al (2012) Chronic intermittent hypoxia is a major trigger for non-alcoholic fatty liver disease in morbid obese. *Journal of Hepatology* 56:225–233. doi: 10.1016/j.jhep.2011.04.022
- ATS/ERS (2002) American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 165:277–304. doi: 10.1164/ajrccm.165.2.ats01
- Ball MK, Waypa GB, Mungai PT, et al (2014) Regulation of Hypoxia-induced Pulmonary Hypertension by Vascular Smooth Muscle Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$ . *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 189:314–324. doi: 10.1164/rccm.201302-0302OC
- Basset G, Crone C, Saumon G (1987a) Significance of active ion transport in transalveolar water absorption: a study on isolated rat lung. *J Physiol* 384:311–324
- Basset G, Crone C, Saumon G (1987b) Fluid absorption by rat lung in situ: pathways for sodium entry in the luminal membrane of alveolar epithelium. *J Physiol* 384:325–345
- Beers MF, Morrisey EE (2011) The three R's of lung health and disease: repair, remodeling, and regeneration. *Journal of Clinical Investigation* 121:2065–2073. doi: 10.1172/JCI45961
- Bell EL, Klimova TA, Eisenbart J, et al (2007) Mitochondrial Reactive Oxygen Species Trigger Hypoxia-Inducible Factor-Dependent Extension of the Replicative Life Span during Hypoxia. *Mol Cell Biol* 27:5737–5745. doi: 10.1128/MCB.02265-06
- 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. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 314:L360–L371. doi: 10.1152/ajplung.00153.2017
- Berra E, Benizri E, Ginouvès A, et al (2003) HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 $\alpha$  in normoxia. *EMBO J* 22:4082–4090. doi: 10.1093/emboj/cdg392
- Bhaskaran M, Kolliputi N, Wang Y, et al (2006) Trans-differentiation of Alveolar Epithelial Type II Cells to Type I Cells Involves Autocrine Signaling by Transforming Growth Factor beta1 through the Smad Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 282:3968–3976. doi: 10.1074/jbc.M609060200
- Bishop T, Ratcliffe PJ (2014) Signaling hypoxia by hypoxia-inducible factor protein hydroxylases: a historical overview and future perspectives. *Hypoxia (Auckl)* 2:197–213. doi: 10.2147/HP.S47598
- Bodega F, Sironi C, Armilli M, et al (2010) Evidence for Na<sup>+</sup>–glucose cotransporter in type I alveolar epithelium. *Histochemistry and Cell Biology* 134:129–136. doi: 10.1007/s00418-010-0725-7
- Boon K, Bailey NW, Yang J, et al (2009) Molecular Phenotypes Distinguish Patients with Relatively Stable from Progressive Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF). *PLoS ONE* 4:e5134. doi: 10.1371/journal.pone.0005134
- Boscardin E, Alijevic O, Hummler E, et al (2016) The function and regulation of acid-sensing ion channels (ASICs) and the epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC): IUPHAR Review 19. *British Journal of Pharmacology* 173:2671–2701. doi: 10.1111/bph.13533

- Bosi M, Milioli G, Fanfulla F, et al (2017) OSA and Prolonged Oxygen Desaturation During Sleep are Strong Predictors of Poor Outcome in IPF. *Lung* 195:643–651. doi: 10.1007/s00408-017-0031-4
- Boutten A, Goven D, Artaud-Macari É, Bonay M (2011) La voie Nrf2 en pathologie respiratoire. *Med Sci (Paris)* 27:966–972. doi: 10.1051/medsci/20112711012
- Bouvry D, Planès C, Malbert-Colas L, et al (2006) Hypoxia-Induced Cytoskeleton Disruption in Alveolar Epithelial Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 35:519–527. doi: 10.1165/rcmb.2005-0478OC
- Braun RK, Broymann O, Braun FM, et al (2017) Chronic intermittent hypoxia worsens bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. doi: 10.1016/j.resp.2017.04.010
- Bruick RK (2001) A Conserved Family of Prolyl-4-Hydroxylases That Modify HIF. *Science* 294:1337–1340. doi: 10.1126/science.1066373
- Bruick RK (2003) Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. *Genes Dev* 17:2614–2623. doi: 10.1101/gad.1145503
- Bryant AJ, Carrick RP, McConaha ME, et al (2015) Endothelial HIF signaling regulates pulmonary fibrosis-associated pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 310:L249–L262. doi: 10.1152/ajplung.00258.2015
- Canessa CM, Horisberger JD, Rossier BC (1993) Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration. *Nature* 361:467–470. doi: 10.1038/361467a0
- Canessa CM, Schild L, Buell G, et al (1994) Amiloride-sensitive epithelial Na<sup>+</sup> channel is made of three homologous subunits. *Nature* 367:463–467. doi: 10.1038/367463a0
- Cantin AM, North SL, Fells GA, et al (1987) Oxidant-mediated epithelial cell injury in idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* 79:1665–1673. doi: 10.1172/JCI113005
- Carrington CB, Green TJ (1970) Granular pneumocytes in early repair of diffuse alveolar injury. *Arch Intern Med* 126:464–465
- Chan SY, Zhang Y-Y, Hemann C, et al (2009) MicroRNA-210 Controls Mitochondrial Metabolism during Hypoxia by Repressing the Iron-Sulfur Cluster Assembly Proteins ISCU1/2. *Cell Metabolism* 10:273–284. doi: 10.1016/j.cmet.2009.08.015
- Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, et al (1998) Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:11715–11720. doi: 10.1073/pnas.95.20.11715
- Chandel NS (2010) Mitochondrial complex III: An essential component of universal oxygen sensing machinery? *Respiratory Physiology & Neurobiology* 174:175–181. doi: 10.1016/j.resp.2010.08.004
- Chapman HA (2011) Epithelial-Mesenchymal Interactions in Pulmonary Fibrosis. *Annual Review of Physiology* 73:413–435. doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142225
- Chen X-J, Eaton DC, Jain L (2002)  $\beta$ -Adrenergic regulation of amiloride-sensitive lung sodium channels. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 282:L609–L620. doi: 10.1152/ajplung.00356.2001
- Chuong Nguyen MV, Lardy B, Paclet M-H, et al (2015) Les NADPH oxydases, Nox: Une nouvelle famille d'isoenzymes. *médecine/sciences* 31:43–52. doi: 10.1051/medsci/20153101012
- Clanton TL, Hogan MC, Gladden LB (2013) Regulation of cellular gas exchange, oxygen sensing, and metabolic control. *Compr Physiol* 3:1135–1190. doi: 10.1002/cphy.c120030
- Clerici C, Soler P, Saumon G (1991) Sodium-dependent phosphate and alanine transports but sodium-independent hexose transport in type II alveolar epithelial cells in primary culture. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1063:27–35. doi: 10.1016/0005-2736(91)90349-D
- Clerici C, Planès C (2009) Gene regulation in the adaptive process to hypoxia in lung epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 296:L267–L274. doi: 10.1152/ajplung.90528.2008

- Collard HR, King TE, Bartelson BB, et al (2003) Changes in Clinical and Physiologic Variables Predict Survival in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 168:538–542. doi: 10.1164/rccm.200211-1311OC
- Comellas AP, Dada LA, Lecuona E, et al (2006) Hypoxia-Mediated Degradation of Na,K-ATPase via Mitochondrial Reactive Oxygen Species and the Ubiquitin-Conjugating System. *Circulation Research* 98:1314–1322. doi: 10.1161/01.RES.0000222418.99976.1d
- Cool CD, Groshong SD, Rai PR, et al (2006) Fibroblast foci are not discrete sites of lung injury or repair: the fibroblast reticulum. *Am J Respir Crit Care Med* 174:654–658. doi: 10.1164/rccm.200602-205OC
- Cottin V (2005) Combined pulmonary fibrosis and emphysema: a distinct underrecognised entity. *European Respiratory Journal* 26:586–593. doi: 10.1183/09031936.05.00021005
- Crapo JD, Barry BE, Gehr P, et al (1982) Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Respir Dis* 125:740–745. doi: 10.1164/arrd.1982.125.6.740
- Crosby LM, Waters CM (2010) Epithelial repair mechanisms in the lung. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 298:L715–L731. doi: 10.1152/ajplung.00361.2009
- Dada LA, Chandel NS, Ridge KM, et al (2003) Hypoxia-induced endocytosis of Na,K-ATPase in alveolar epithelial cells is mediated by mitochondrial reactive oxygen species and PKC-zeta. *J Clin Invest* 111:1057–1064. doi: 10.1172/JCI16826
- Degryse AL, Tanjore H, Xu XC, et al (2010) Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 299:L442–L452. doi: 10.1152/ajplung.00026.2010
- Delbrel E, Soumare A, Naguez A, et al (2016) Hypoxia induces Endoplasmic Reticulum stress in Alveolar Epithelial cells: Potential implication in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Presented at the American Thoracic Society (ATS) Congress, San Francisco.
- Dobbs LG, Gonzalez R, Williams MC (1986) An improved method for isolating type II cells in high yield and purity. *Am Rev Respir Dis* 134:141–145. doi: 10.1164/arrd.1986.134.1.141
- Dobbs LG (1990) Isolation and culture of alveolar type II cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 258:L134–L147. doi: 10.1152/ajplung.1990.258.4.L134
- Duchemann B, Annesi-Maesano I, Jacobe de Naurois C, et al (2017) Prevalence and incidence of interstitial lung diseases in a multi-ethnic county of Greater Paris. *Eur Respir J* 50:1602419. doi: 10.1183/13993003.02419-2016
- Duranteau J, Chandel NS, Kulisz A, et al (1998) Intracellular Signaling by Reactive Oxygen Species during Hypoxia in Cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry* 273:11619–11624. doi: 10.1074/jbc.273.19.11619
- Eaton, D. C., Helms, M. N., Koval, M., Bao, H. F., & Jain, L. (2009). “The Contribution of Epithelial Sodium Channels to Alveolar Function in Health and Disease.” *Annual Review of Physiology*, 71(1), 403–423. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163250>
- Eaton DC, Malik B, Bao H-F, et al (2010) Regulation of Epithelial Sodium Channel Trafficking by Ubiquitination. *Proc Am Thorac Soc* 7:54–64. doi: 10.1513/pats.200909-096JS
- Fagan KA (2001) Selected Contribution: Pulmonary hypertension in mice following intermittent hypoxia. *Journal of Applied Physiology* 90:2502–2507. doi: 10.1152/jappl.2001.90.6.2502
- Fell CD, Martinez FJ, Liu LX, et al (2010) Clinical Predictors of a Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 181:832–837. doi: 10.1164/rccm.200906-0959OC
- Firsov D (1998) The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC). *The EMBO Journal* 17:344–352. doi: 10.1093/emboj/17.2.344
- Froese AR, Shimbori C, Bellaye P-S, et al (2016) Stretch-induced Activation of Transforming Growth Factor- $\beta_1$  in Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 194:84–96. doi: 10.1164/rccm.201508-1638OC

- Fukuda N, Folkesson HG, Matthay MA (2000) Relationship of interstitial fluid volume to alveolar fluid clearance in mice: ventilated vs. in situ studies. *Journal of Applied Physiology* 89:672–679. doi: 10.1152/jappl.2000.89.2.672
- Garat C, Carter EP, Matthay MA (1998) New in situ mouse model to quantify alveolar epithelial fluid clearance. *Journal of Applied Physiology* 84:1763–1767. doi: 10.1152/jappl.1998.84.5.1763
- García-Sancho C, Buendía-Roldán I, Fernández-Plata MR, et al (2011) Familial pulmonary fibrosis is the strongest risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Medicine* 105:1902–1907. doi: 10.1016/j.rmed.2011.08.022
- Gille T, Randrianarison-Pellan N, Goolaerts A, et al (2014) Hypoxia-induced inhibition of epithelial Na<sup>+</sup> channels in the lung. Role of Nedd4-2 and the ubiquitin-proteasome pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 50:526–537. doi: 10.1165/rcmb.2012-0518OC
- Gille T, Didier M, Boubaya M, et al (2017) Obstructive sleep apnoea and related comorbidities in incident idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 49:. doi: 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* 2018:1240192. doi: 10.1155/2018/1240192
- Giraldez T, Rojas P, Jou J, et al (2012) The epithelial sodium channel  $\delta$ -subunit: new notes for an old song. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 303:F328–F338. doi: 10.1152/ajprenal.00116.2012
- Gondzik V, Awayda MS (2011) Methods for stable recording of short-circuit current in a Na<sup>+</sup>-transporting epithelium. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 301:C162–C170. doi: 10.1152/ajpcell.00459.2010
- Goolaerts A, Pellan-Randrianarison N, Larghero J, et al (2014) Conditioned media from mesenchymal stromal cells restore sodium transport and preserve epithelial permeability in an in vitro model of acute alveolar injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 306:L975–985. doi: 10.1152/ajplung.00242.2013
- Görlach A, Bonello S (2008) The cross-talk between NF- $\kappa$ B and HIF-1: further evidence for a significant liaison. *Biochemical Journal* 413:571–571. doi: 10.1042/BJ4130571
- Görlach A, Dimova EY, Petry A, et al (2015) Reactive oxygen species, nutrition, hypoxia and diseases: Problems solved? *Redox Biol* 6:372–385. doi: 10.1016/j.redox.2015.08.016
- Güney Ş, Schuler A, Ott A, et al (2007) Dexamethasone prevents transport inhibition by hypoxia in rat lung and alveolar epithelial cells by stimulating activity and expression of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and epithelial Na<sup>+</sup> channels. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 293:L1332–L1338. doi: 10.1152/ajplung.00338.2006
- Günter J, Ruiz-Serrano A, Pickel C, et al (2017) The functional interplay between the HIF pathway and the ubiquitin system – more than a one-way road. *Experimental Cell Research* 356:152–159. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.03.027
- Gusarova GA, Dada LA, Kelly AM, et al (2009)  $\alpha$ 1-AMP-Activated Protein Kinase Regulates Hypoxia-Induced Na,K-ATPase Endocytosis via Direct Phosphorylation of Protein Kinase C $\zeta$ . *Mol Cell Biol* 29:3455–3464. doi: 10.1128/MCB.00054-09
- Guzy RD, Schumacker PT (2006) Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Experimental Physiology* 91:807–819. doi: 10.1113/expphysiol.2006.033506
- Haase VH (2009) Pathophysiological Consequences of HIF Activation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1177:57–65. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05030.x
- Hancock RL, Dunne K, Walport LJ, et al (2015) Epigenetic regulation by histone demethylases in hypoxia. *Epigenomics* 7:791–811. doi: 10.2217/epi.15.24
- Hayashi T, Yamashita C, Matsumoto C, et al (2008) Role of gp91<sup>phox</sup>-containing NADPH oxidase in left ventricular remodeling induced by intermittent hypoxic stress. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 294:H2197–H2203. doi: 10.1152/ajpheart.91496.2007

- Heinzer RC, Stanchina ML, Malhotra A, et al (2005) Lung Volume and Continuous Positive Airway Pressure Requirements in Obstructive Sleep Apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 172:114–117. doi: 10.1164/rccm.200404-552OC
- Higgins DF, Biju MP, Akai Y, et al (2004) Hypoxic induction of *Ctgf* is directly mediated by Hif-1. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 287:F1223–F1232. doi: 10.1152/ajprenal.00245.2004
- Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, et al (2007) Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*. doi: 10.1172/JCI30487
- Huang J, Zhao Q, Mooney SM, Lee FS (2002) Sequence Determinants in Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  for Hydroxylation by the Prolyl Hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *Journal of Biological Chemistry* 277:39792–39800. doi: 10.1074/jbc.M206955200
- Hummeler E, Barker P, Gatzky J, et al (1996) Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nat Genet* 12:325–328. doi: 10.1038/ng0396-325
- Husted RF, Lu H, Sigmund RD, Stokes JB (2011) Oxygen regulation of the epithelial Na channel in the collecting duct. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 300:F412–F424. doi: 10.1152/ajprenal.00245.2010
- Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH (1996) Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 271:C1172–C1180. doi: 10.1152/ajpcell.1996.271.4.C1172
- Johnson MD, Bao H-F, Helms MN, et al (2006) Functional ion channels in pulmonary alveolar type I cells support a role for type I cells in lung ion transport. *PNAS* 103:4964–4969. doi: 10.1073/pnas.0600855103
- Kapanci Y, Tosco R, Eggermann J (1972) Demonstration of the extracellular alveolar lining layer (surfactant) in human lungs. An ultrastructural study. *Virchows Arch B Cell Pathol* 10:243–252
- Khurana P, Sugadev R, Jain J, Singh SB (2013) HypoxiaDB: a database of hypoxia-regulated proteins. *Database* 2013:bat074–bat074. doi: 10.1093/database/bat074
- Kimura K, Iwano M, Higgins DF, et al (2008) Stable expression of HIF-1 $\alpha$  in tubular epithelial cells promotes interstitial fibrosis. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 295:F1023–F1029. doi: 10.1152/ajprenal.90209.2008
- King TE, Pardo A, Selman M (2011) Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 378:1949–1961. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60052-4
- Knudsen L, Ruppert C, Ochs M (2017) Tissue remodelling in pulmonary fibrosis. *Cell and Tissue Research* 367:607–626. doi: 10.1007/s00441-016-2543-2
- Kobayashi S, Kondo S, Juni K (1995) Permeability of peptides and proteins in human cultured alveolar A549 cell monolayer. *Pharm Res* 12:1115–1119
- Kolilekas L, Manali E, Vlami KA, et al (2013) Sleep Oxygen Desaturation Predicts Survival in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *JCSM* 09:593–601. doi: 10.5664/jcsm.2758
- Krick S, Eul BG, Hänze J, et al (2005) Role of Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  in Hypoxia-Induced Apoptosis of Primary Alveolar Epithelial Type II Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 32:395–403. doi: 10.1165/rcmb.2004-0314OC
- 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. doi: 10.1164/rccm.201510-2026OC
- Kuwano K, Hagimoto N, Kawasaki M, et al (1999) Essential roles of the Fas-Fas ligand pathway in the development of pulmonary fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* 104:13–19. doi: 10.1172/JCI5628
- Kuwano K, Nakashima N, Inoshima I, et al (2003) Oxidative stress in lung epithelial cells from patients with idiopathic interstitial pneumonias. *European Respiratory Journal* 21:232–240. doi: 10.1183/09031936.03.00063203

- Laffey JG, Matthay MA (2017) FIFTY YEARS OF RESEARCH IN ARDS. Cell-based Therapy for Acute Respiratory Distress Syndrome. Biology and Potential Therapeutic Value. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 196:266–273. doi: 10.1164/rccm.201701-0107CP
- Lancaster LH, Mason WR, Parnell JA, et al (2009) Obstructive sleep apnea is common in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 136:772–778. doi: 10.1378/chest.08-2776
- 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 Medicine Reviews* 20:27–45. doi: 10.1016/j.smrv.2014.07.003
- Leslie KO (2012) Idiopathic Pulmonary Fibrosis May Be a Disease of Recurrent, Tractional Injury to the Periphery of the Aging Lung: A Unifying Hypothesis Regarding Etiology and Pathogenesis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 136:591–600. doi: 10.5858/arpa.2011-0511-OA
- Lévy P, Kohler M, McNicholas WT, et al (2015) Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nature Reviews Disease Primers* 1:15015. doi: 10.1038/nrdp.2015.15
- Ley B, Collard HR, King TE (2011) Clinical Course and Prediction of Survival in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 183:431–440. doi: 10.1164/rccm.201006-0894CI
- Li C, Wright MM, Jackson RM (2002) Reactive Species Mediated Injury of Human Lung Epithelial Cells After Hypoxia-Reoxygenation. *Experimental Lung Research* 28:373–389. doi: 10.1080/01902140290092001
- Litvan J, Briva A, Wilson MS, et al (2006)  $\beta$ -Adrenergic Receptor Stimulation and Adenoviral Overexpression of Superoxide Dismutase Prevent the Hypoxia-mediated Decrease in Na,K-ATPase and Alveolar Fluid Reabsorption. *Journal of Biological Chemistry* 281:19892–19898. doi: 10.1074/jbc.M602064200
- Mairbäurl H, Wodopia R, Eckes S, et al (1997) Impairment of cation transport in A549 cells and rat alveolar epithelial cells by hypoxia. *Am J Physiol* 273:L797-806
- Mason RJ, Williams MC, Widdicombe JH, et al (1982) Transepithelial transport by pulmonary alveolar type II cells in primary culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79:6033–6037. doi: 10.1073/pnas.79.19.6033
- Masson N, Singleton RS, Sekirnik R, et al (2012) The FIH hydroxylase is a cellular peroxide sensor that modulates HIF transcriptional activity. *EMBO reports* 13:251–257. doi: 10.1038/embor.2012.9
- Matés JM, Sánchez-Jiménez FM (2000) Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 32:157–170
- Matthay MA, Landolt CC, Staub NC (1982) Differential liquid and protein clearance from the alveoli of anesthetized sheep. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 53:96–104. doi: 10.1152/jappl.1982.53.1.96
- Matthay MA, Folkesson HG, Clerici C (2002) Lung Epithelial Fluid Transport and the Resolution of Pulmonary Edema. *Physiological Reviews* 82:569–600. doi: 10.1152/physrev.00003.2002
- Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA (2012) The acute respiratory distress syndrome. *Journal of Clinical Investigation* 122:2731–2740. doi: 10.1172/JCI60331
- Mermigkis C, Chapman J, Golish J, et al (2007) Sleep-Related Breathing Disorders in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Lung* 185:173–178. doi: 10.1007/s00408-007-9004-3
- Mermigkis C, Stagaki E, Tryfon S, et al (2010) How common is sleep-disordered breathing in patients with idiopathic pulmonary fibrosis? *Sleep and Breathing* 14:387–390. doi: 10.1007/s11325-010-0336-5
- Mermigkis C, Bouloukaki I, Antoniou K, et al (2015) Obstructive sleep apnea should be treated in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Sleep and Breathing* 19:385–391. doi: 10.1007/s11325-014-1033-6
- Minakata Y, Suzuki S, Grygorczyk C, et al (1998) Impact of beta-adrenergic agonist on Na<sup>+</sup> channel and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase expression in alveolar type II cells. *Am J Physiol* 275:L414-422
- Montaner JS, Tsang J, Evans KG, et al (1986) Alveolar epithelial damage. A critical difference between high pressure and oleic acid-induced low pressure pulmonary edema. *J Clin Invest* 77:1786–1796. doi: 10.1172/JCI112503

- Moon J-O, Welch TP, Gonzalez FJ, Copple BL (2009) Reduced liver fibrosis in hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ -deficient mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 296:G582–G592. doi: 10.1152/ajpgi.90368.2008
- Moore BB, Hogaboam CM (2008) Murine models of pulmonary fibrosis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 294:L152–L160. doi: 10.1152/ajplung.00313.2007
- Moran O, Zegarra-Moran O (2008) On the measurement of the functional properties of the CFTR. *Journal of Cystic Fibrosis* 7:483–494. doi: 10.1016/j.jcf.2008.05.003
- Mouratis MA, Aidinis V (2011) Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin. *Curr Opin Pulm Med* 17:355–361. doi: 10.1097/MCP.0b013e328349ac2b
- Murray JF (2011) Pulmonary edema: pathophysiology and diagnosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 15:155–160, i
- Nanduri J, Wang N, Yuan G, et al (2009) Intermittent hypoxia degrades HIF-2 via calpains resulting in oxidative stress: Implications for recurrent apnea-induced morbidities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:1199–1204. doi: 10.1073/pnas.0811018106
- Nanduri J, Peng Y-J, Wang N, et al (2017) Epigenetic regulation of redox state mediates persistent cardiorespiratory abnormalities after long-term intermittent hypoxia. *The Journal of Physiology* 595:63–77. doi: 10.1113/JP272346
- Netzer NC, Ancoli-Israel S, Bliwise DL, et al (2016) Principles of practice parameters for the treatment of sleep-disordered breathing in the elderly and frail elderly: the consensus of the International Geriatric Sleep Medicine Task Force. *The European Respiratory Journal* 48:992–1018. doi: 10.1183/13993003.01975-2015
- Nunes H, Uzunhan Y, Gille T, et al (2012) Pulmonary Hypertension Complicating Interstitial and Granulomatous Lung Diseases. In: Humbert M, Souza R, Simonneau G (eds) *Progress in Respiratory Research*. S. KARGER AG, Basel, pp 178–198
- Olmeda B, Martínez-Calle M, Pérez-Gil J (2017) Pulmonary surfactant metabolism in the alveolar airspace: Biogenesis, extracellular conversions, recycling. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 209:78–92. doi: 10.1016/j.aanat.2016.09.008
- Peng Y-J, Yuan G, Ramakrishnan D, et al (2006) Heterozygous HIF-1 $\alpha$  deficiency impairs carotid body-mediated systemic responses and reactive oxygen species generation in mice exposed to intermittent hypoxia. *The Journal of Physiology* 577:705–716. doi: 10.1113/jphysiol.2006.114033
- 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. doi: 10.1164/rccm.200905-0671OC
- Pihtili A, Bingol Z, Kiyani E, et al (2013) Obstructive sleep apnea is common in patients with interstitial lung disease. *Sleep and Breathing* 17:1281–1288. doi: 10.1007/s11325-013-0834-3
- Pittet JF, Wiener-Kronish JP, McElroy MC, et al (1994) Stimulation of lung epithelial liquid clearance by endogenous release of catecholamines in septic shock in anesthetized rats. *J Clin Invest* 94:663–671. doi: 10.1172/JCI117383
- Planès C, Friedlander G, Loiseau A, et al (1996) Inhibition of Na-K-ATPase activity after prolonged hypoxia in an alveolar epithelial cell line. *Am J Physiol* 271:L70-78. doi: 10.1152/ajplung.1996.271.1.L70
- Planès C, Escoubet B, Blot-Chabaud M, et al (1997) Hypoxia downregulates expression and activity of epithelial sodium channels in rat alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17:508–518. doi: 10.1165/ajrcmb.17.4.2680
- Planès C, Blot-Chabaud M, Matthay MA, et al (2002) Hypoxia and  $\beta_2$ -Agonists Regulate Cell Surface Expression of the Epithelial Sodium Channel in Native Alveolar Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* 277:47318–47324. doi: 10.1074/jbc.M209158200
- Planès C, Leyvraz C, Uchida T, et al (2005) In vitro and in vivo regulation of transepithelial lung alveolar sodium transport by serine proteases. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 288:L1099–L1109. doi: 10.1152/ajplung.00332.2004

- Planès C, Randrianarison NH, Charles R-P, et al (2010) ENaC-mediated alveolar fluid clearance and lung fluid balance depend on the channel-activating protease 1: CAP1 gene inactivation inhibits ENaC in the lung. *EMBO Molecular Medicine* 2:26–37. doi: 10.1002/emmm.200900050
- Prabhakar NR, Semenza GL (2012) Adaptive and Maladaptive Cardiorespiratory Responses to Continuous and Intermittent Hypoxia Mediated by Hypoxia-Inducible Factors 1 and 2. *Physiological Reviews* 92:967–1003. doi: 10.1152/physrev.00030.2011
- Pradervand S, Wang Q, Burnier M, et al (1999) A Mouse Model for Liddle's Syndrome. *JASN* 10:2527–2533
- 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. doi: 10.1164/rccm.2009-040GL
- Raghu G, Chen S-Y, Yeh W-S, et al (2014) Idiopathic pulmonary fibrosis in US Medicare beneficiaries aged 65 years and older: incidence, prevalence, and survival, 2001–11. *The Lancet Respiratory Medicine* 2:566–572. doi: 10.1016/S2213-2600(14)70101-8
- Randrianarison-Pellan N, Escoubet B, Ferreira C, et al (2007)  $\beta$ -Liddle mutation of the epithelial sodium channel increases alveolar fluid clearance and reduces the severity of hydrostatic pulmonary oedema in mice. *The Journal of Physiology* 582:777–788. doi: 10.1113/jphysiol.2007.131078
- Rizzo F, Staub O (2015) NEDD4-2 and salt-sensitive hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 24:111–116. doi: 10.1097/MNH.000000000000097
- Rotin D, Staub O (2011) Role of the ubiquitin system in regulating ion transport. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 461:1–21. doi: 10.1007/s00424-010-0893-2
- Ryerson CJ, Cottin V, Brown KK, Collard HR (2015) Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: shifting the paradigm. *European Respiratory Journal* 46:512–520. doi: 10.1183/13993003.00419-2015
- Sajkov D, Wang T, Saunders NA, et al (2002) Continuous Positive Airway Pressure Treatment Improves Pulmonary Hemodynamics in Patients with Obstructive Sleep Apnea. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 165:152–158. doi: 10.1164/ajrccm.165.2.2010092
- Santos CXC, Tanaka LY, Wosniak J, Laurindo FRM (2009) Mechanisms and Implications of Reactive Oxygen Species Generation During the Unfolded Protein Response: Roles of Endoplasmic Reticulum Oxidoreductases, Mitochondrial Electron Transport, and NADPH Oxidase. *Antioxidants & Redox Signaling* 11:2409–2427. doi: 10.1089/ars.2009.2625
- Sartori C, Yves A, Hervé D, et al (2002) Salmeterol for the Prevention of High-Altitude Pulmonary Edema. *The New England Journal of Medicine* 346:1631–1636. doi:10.1056/NEJMoa013183
- Saumon G (1999) L'épithélium alvéolaire lors des oedèmes pulmonaires. *Médecine/Sciences* 15:778–787
- Savransky V, Bevans S, Nanayakkara A, et al (2007) Chronic intermittent hypoxia causes hepatitis in a mouse model of diet-induced fatty liver. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 293:G871–G877. doi: 10.1152/ajpgi.00145.2007
- Schild L, Canessa CM, Shimkets RA, et al (1995) A mutation in the epithelial sodium channel causing Liddle disease increases channel activity in the *Xenopus laevis* oocyte expression system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:5699–5703. doi: 10.1073/pnas.92.12.5699
- Schofield CJ, Ratcliffe PJ (2004) Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5:343–354. doi: 10.1038/nrm1366
- Schroedl C, McClintock DS, Budinger GRS, Chandel NS (2002) Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1 $\alpha$  requires mitochondrial reactive oxygen species. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 283:L922–L931. doi: 10.1152/ajplung.00014.2002
- Schumacker PT (2011) Lung Cell Hypoxia. *Proc Am Thorac Soc* 8:477–484. doi: 10.1513/pats.201103-032MW

- Selman M, Carrillo G, Estrada A, et al (2007) Accelerated Variant of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Clinical Behavior and Gene Expression Pattern. *PLoS ONE* 2:e482. doi: 10.1371/journal.pone.0000482
- Semenza GL, Wang GL (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 12:5447–5454. doi: 10.1128/MCB.12.12.5447
- Semenza GL (2004) Hydroxylation of HIF-1: Oxygen Sensing at the Molecular Level. *Physiology* 19:176–182. doi: 10.1152/physiol.00001.2004
- Semenza GL (2011) Hypoxia-inducible factor 1: Regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813:1263–1268. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.08.006
- Sériès F, Cormier Y, Lampron N, La Forge J (1988) Increasing the functional residual capacity may reverse obstructive sleep apnea. *Sleep* 11:349–353
- Series F, Cormier Y, Lampron N, La Forge J (1989) Influence of lung volume in sleep apnoea. *Thorax* 44:52–57. doi: 10.1136/thx.44.1.52
- 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. doi: 10.1136/thoraxjnl-2017-209967
- Shi S, Carattino MD, Hughey RP, Kleyman TR (2013) ENaC regulation by proteases and shear stress. *Curr Mol Pharmacol* 6:28–34
- Shin H-W, Cho K, Kim DW, et al (2012) Hypoxia-inducible Factor 1 Mediates Nasal Polypogenesis by Inducing Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 185:944–954. doi: 10.1164/rccm.201109-1706OC
- Sisson TH, Mendez M, Choi K, et al (2010) Targeted Injury of Type II Alveolar Epithelial Cells Induces Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 181:254–263. doi: 10.1164/rccm.200810-1615OC
- Snyder PM (2000) Liddle's syndrome mutations disrupt cAMP-mediated translocation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel to the cell surface. *Journal of Clinical Investigation* 105:45–53. doi: 10.1172/JCI7869
- Snyder PM (2005) Minireview: regulation of epithelial Na<sup>+</sup> channel trafficking. *Endocrinology* 146:5079–5085. doi: 10.1210/en.2005-0894
- Staub O, Rotin D (2006) Role of Ubiquitylation in Cellular Membrane Transport. *Physiological Reviews* 86:669–707. doi: 10.1152/physrev.00020.2005
- Stone KC, Mercer RR, Gehr P, et al (1992) Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6:235–243. doi: 10.1165/ajrcmb/6.2.235
- Sun W, Yin X, Wang Y, et al (2012) Intermittent Hypoxia-Induced Renal Antioxidants and Oxidative Damage in Male Mice: Hormetic Dose Response. *Dose Response* 11:385–400. doi: 10.2203/dose-response.12-027.Cai
- Tian Y-M, Yeoh KK, Lee MK, et al (2011) Differential Sensitivity of Hypoxia Inducible Factor Hydroxylation Sites to Hypoxia and Hydroxylase Inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* 286:13041–13051. doi: 10.1074/jbc.M110.211110
- Travis WD, Costabel U, Hansell DM, et al (2013) An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Update of the International Multidisciplinary Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 188:733–748. doi: 10.1164/rccm.201308-1483ST
- Tzouveleakis A, Kaminski N (2015) Epigenetics in idiopathic pulmonary fibrosis. *Biochem Cell Biol* 93:159–170. doi: 10.1139/bcb-2014-0126
- Université de Duke. Duke Pathology - Weeks 1: Histology Review & Cell Injury. <https://web.duke.edu/pathology/Week01/Week01.html#path40>. Accessed 8 May 2018

- Ussing HH, Zerahn K (1951) Active Transport of Sodium as the Source of Electric Current in the Short-circuited Isolated Frog Skin. *Acta Physiologica Scandinavica* 23:110–127. doi: 10.1111/j.1748-1716.1951.tb00800.x
- Uzunhan Y, Nunes H, Gille T, et al (2011) Innovations thérapeutiques de la fibrose pulmonaire idiopathique. *La Presse Médicale* 40:1100–1112. doi: 10.1016/j.lpm.2011.07.009
- Uzunhan Y (2012) Aspects génétiques des pneumopathies interstitielles diffuses. *Revue des Maladies Respiratoires, Actualités* 4:381–386
- Uzunhan Y, Bernard O, Marchant D, et al (2015) Mesenchymal stem cells protect from hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 310:L439–L451. doi: 10.1152/ajplung.00117.2015
- Valeyre D, Freynet O, Dion G, et al (2010) Épidémiologie des pneumopathies infiltrantes diffuses. *La Presse Médicale* 39:53–59. doi: 10.1016/j.lpm.2009.09.015
- Valle-Prieto A, Conget PA (2010) Human Mesenchymal Stem Cells Efficiently Manage Oxidative Stress. *Stem Cells and Development* 19:1885–1893. doi: 10.1089/scd.2010.0093
- Vallet V, Chraïbi A, Gaeggeler HP, et al (1997) An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. *Nature* 389:607–610. doi: 10.1038/39329
- Vergheze GM, Ware LB, Matthay BA, Matthay MA (1999) Alveolar epithelial fluid transport and the resolution of clinically severe hydrostatic pulmonary edema. *Journal of Applied Physiology* 87:1301–1312. doi: 10.1152/jappl.1999.87.4.1301
- Vivona ML, Matthay M, Chabaud MB, et al (2001) Hypoxia Reduces Alveolar Epithelial Sodium and Fluid Transport in Rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25:554–561. doi: 10.1165/ajrcmb.25.5.4420
- Waghay 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. *The FASEB Journal* 19:854–856. doi: 10.1096/fj.04-2882fje
- Walter J, Ware LB, Matthay MA (2014) Mesenchymal stem cells: mechanisms of potential therapeutic benefit in ARDS and sepsis. *The Lancet Respiratory Medicine* 2:1016–1026. doi: 10.1016/S2213-2600(14)70217-6
- Walters DM, Cho H-Y, Kleeberger SR (2008) Oxidative stress and antioxidants in the pathogenesis of pulmonary fibrosis: a potential role for Nrf2. *Antioxid Redox Signal* 10:321–332. doi: 10.1089/ars.2007.1901
- Wang GL, JIANG B-H, RUE EA, SEMENZA GL (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 5
- Ware LB, Matthay MA (2001) Alveolar Fluid Clearance Is Impaired in the Majority of Patients with Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 163:1376–1383. doi: 10.1164/ajrccm.163.6.2004035
- Waypa GB, Marks JD, Guzy R, et al (2010) Hypoxia Triggers Subcellular Compartmental Redox Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation Research* 106:526–535. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.206334
- Weisz OA, Johnson JP (2003) Noncoordinate regulation of ENaC: paradigm lost? *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 285:F833–F842. doi: 10.1152/ajprenal.00088.2003
- 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. doi: 10.1164/rccm.201404-0744OC
- West JB, Luks A (2015) *Respiratory Physiology: The Essentials*, 10th edn. Lippincott Williams & Wilkins. 238 p.
- West JB, Luks A (2017) *Pulmonary Pathophysiology: The Essentials*, 9th edn. Lippincott Williams & Wilkins. 264 p.
- Wheaton WW, Chandel NS (2011) Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 300:C385–C393. doi: 10.1152/ajpcell.00485.2010

- Williamson JD, Sadofsky LR, Hart SP (2015) The pathogenesis of bleomycin-induced lung injury in animals and its applicability to human idiopathic pulmonary fibrosis. *Experimental Lung Research* 41:57-73. doi: 10.3109/01902148.2014.979516
- Wilson JG, Liu KD, Zhuo H, et al (2015) Mesenchymal stem (stromal) cells for treatment of ARDS: a phase 1 clinical trial. *Lancet Respir Med* 3:24–32. doi: 10.1016/S2213-2600(14)70291-7
- Wolters PJ, Blackwell TS, Eickelberg O, et al (2018) Time for a change: is idiopathic pulmonary fibrosis still idiopathic and only fibrotic? *Lancet Respir Med* 6:154–160. doi: 10.1016/S2213-2600(18)30007-9
- Wright JR, Clements JA (1987) Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am Rev Respir Dis* 136:426–444. doi: 10.1164/ajrccm/136.2.426
- Wright JR (2005) Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol* 5:58–68. doi: 10.1038/nri1528
- Xu W, Chi L, Row BW, et al (2004) Increased oxidative stress is associated with chronic intermittent hypoxia-mediated brain cortical neuronal cell apoptosis in a mouse model of sleep apnea. *Neuroscience* 126:313–323. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.03.055
- Xu J, Long Y-S, Gozal D, Epstein PN (2009)  $\beta$ -cell death and proliferation after intermittent hypoxia: Role of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 46:783–790. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.026
- Young T, Shahar E, Nieto FJ, et al (2002) Predictors of sleep-disordered breathing in community-dwelling adults: the Sleep Heart Health Study. *Arch Intern Med* 162:893–900
- Yuan G, Nanduri J, Bhasker CR, et al (2005)  $Ca^{2+}$ /Calmodulin Kinase-dependent Activation of Hypoxia Inducible Factor 1 Transcriptional Activity in Cells Subjected to Intermittent Hypoxia. *Journal of Biological Chemistry* 280:4321–4328. doi: 10.1074/jbc.M407706200
- Yuan G, Nanduri J, Khan S, et al (2008) Induction of HIF-1 $\alpha$  expression by intermittent hypoxia: Involvement of NADPH oxidase,  $Ca^{2+}$  signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR. *Journal of Cellular Physiology* 217:674–685. doi: 10.1002/jcp.21537
- Yuan G, Khan SA, Luo W, et al (2011) Hypoxia-inducible factor 1 mediates increased expression of NADPH oxidase-2 in response to intermittent hypoxia. *Journal of Cellular Physiology* 226:2925–2933. doi: 10.1002/jcp.22640
- Zhang SXL, Miller JJ, Gozal D, Wang Y (2004) Whole-body hypoxic preconditioning protects mice against acute hypoxia by improving lung function. *Journal of Applied Physiology* 96:392–397. doi: 10.1152/jappphysiol.00829.2003
- Zhang SXL, Miller JJ, Stolz DB, et al (2009) Type I Epithelial Cells Are the Main Target of Whole-Body Hypoxic Preconditioning in the Lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 40:332–339. doi: 10.1165/rcmb.2008-0003OC
- Zhang G, Yu F, Li Y, et al (2017) Prolyl 4-Hydroxylase Domain Protein 3 Overexpression Improved Obstructive Sleep Apnea—Induced Cardiac Perivascular Fibrosis Partially by Suppressing Endothelial-to-Mesenchymal Transition. *Journal of the American Heart Association* 6:e006680. doi: 10.1161/JAHA.117.006680
- Zheng G, Huang L, Tong H, et al (2014) Treatment of acute respiratory distress syndrome with allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells: a randomized, placebo-controlled pilot study. *Respiratory Research* 15:39. doi: 10.1186/1465-9921-15-39
- Zhou G, Dada LA, Wu M, et al (2009) Hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition requires mitochondrial ROS and hypoxia-inducible factor 1. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 297:L1120–L1130. doi: 10.1152/ajplung.00007.2009
- Zhou Q, Pardo A, Königshoff M, et al (2011) Role of von Hippel-Lindau protein in fibroblast proliferation and fibrosis. *The FASEB Journal* 25:3032–3044. doi: 10.1096/fj.10-177824

### Annexe 1 :

**Gille T**, Didier M, Boubaya M, Moya L, Sutton A, Carton Z, Baran-Marszak F, Sadoun-Danino D, Israël-Biet D, Cottin V, Gagnadoux F, Crestani B, d'Ortho MP, Brillet PY, Valeyre D, Nunes H, Planès C and collaborators. Obstructive sleep apnoea and related comorbidities in incident idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J.* juin 2017;49(6).

P : 148

### Annexe 2 :

Delbrel E, Soumare A, Naguez A, Label R, Bernard O, Bruhat A, Fafournoux P, Tremblais G, Marchant D, **Gille T**, Bernaudin JF, Callard P, Kambouchner M, Martinod E, Valeyre D, Uzunhan Y, Planès C, Boncoeur E. Hypoxia induces Endoplasmic Reticulum stress in Alveolar Epithelial cells: Potential role in Lung Fibrosis. Article soumis à l'*Eur Respir J.*

P : 167 (page de garde)

### Annexe 3 :

Uzunhan Y, Bernard O, Marchant D, Dard N, Vanneaux V, Larghero J, **Gille T**, Clerici C, Valeyre D, Nunes H, Boncoeur E, Planès C. Mesenchymal stem cells protect from hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* 23 déc 2015;310(5):L439- 51.

P : 169 (première page)

### Annexe 4 :

Goolaerts A, Pellan-Randrianarison N, Larghero J, Vanneaux V, Uzunhan Y, **Gille T**, Dard N, Planès C, Matthay M, Clerici C. Conditioned media from mesenchymal stromal cells restore sodium transport and preserve epithelial permeability in an in vitro model of acute alveolar injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1 juin 2014;306(11):L975-985.

P : 171 (première page)

**Annexe 1 :**

**Gille T, Didier M, Boubaya M, Moya L, Sutton A, Carton Z, Baran-Marszak F, Sadoun-Danino D, Israël-Biet D, Cottin V, Gagnadoux F, Crestani B, d'Ortho MP, Brillet PY, Valeyre D, Nunes H, Planès C and collaborators. Obstructive sleep apnoea and related comorbidities in incident idiopathic pulmonary fibrosis. Eur Respir J. juin 2017;49(6).**

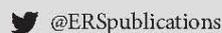


# Obstructive sleep apnoea and related comorbidities in incident idiopathic pulmonary fibrosis

Thomas Gille<sup>1,2</sup>, Morgane Didier<sup>3</sup>, Marouane Boubaya<sup>4</sup>, Loris Moya<sup>5</sup>, Angela Sutton<sup>6,7</sup>, Zohra Carton<sup>3</sup>, Fanny Baran-Marszak<sup>8,9</sup>, Danielle Sadoun-Danino<sup>3</sup>, Dominique Israël-Biet<sup>10,11</sup>, Vincent Cottin <sup>12,13</sup>, Frederic Gagnadoux<sup>14,15</sup>, Bruno Crestani<sup>16,17</sup>, Marie-Pia d'Ortho<sup>17,18</sup>, Pierre-Yves Brillet<sup>2,5</sup>, Dominique Valeyre<sup>2,3</sup>, Hilario Nunes<sup>2,3</sup>, Carole Planès<sup>1,2</sup> and collaborators<sup>19</sup>

**Affiliations:** <sup>1</sup>Dept of Physiology, Avicenne Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Bobigny, France. <sup>2</sup>Laboratory EA2363, University Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Bobigny, France. <sup>3</sup>Pulmonary Dept, Avicenne Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Bobigny, France. <sup>4</sup>Dept of Clinical Research, Avicenne Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Bobigny, France. <sup>5</sup>Dept of Radiology, Avicenne Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Bobigny, France. <sup>6</sup>Biochemistry Laboratory, Jean Verdier Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Bondy, France. <sup>7</sup>■■■■, University Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Bobigny, France. <sup>8</sup>Laboratory of Biological Hematology, Avicenne Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Bobigny, France. <sup>9</sup>■■■■, University Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Bobigny, France. <sup>10</sup>Pulmonary Dept, Georges Pompidou European Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France. <sup>11</sup>■■■■, University Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France. <sup>12</sup>■■■■, Hôpital Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France. <sup>13</sup>Dept of Respiratory Medicine, National Reference Centre for Rare Pulmonary Diseases, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France. <sup>14</sup>INSERM 1063, Université Bretagne Loire (UBL), Angers, France. <sup>15</sup>Pulmonary Dept, Angers University Hospital, Angers, France. <sup>16</sup>Dept of Pneumology A, Bichat Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France. <sup>17</sup>DHU FIRE, University Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France. <sup>18</sup>Dept of Physiology, Bichat Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France. <sup>19</sup>A full list of the collaborators and their affiliations can be found in the Acknowledgements section.

**Correspondence:** Carole Planès, Service de Physiologie, Hôpital Avicenne, 125 route de Stalingrad, F-93009 Bobigny, France. E-mail: carole.planes@aphp.fr



@ERSpublications

Severe sleep apnoea syndrome is associated with cardiovascular disease in incident idiopathic pulmonary fibrosis <http://ow.ly/9GTv30bgIOR>

**Cite this article as:** Gille T, Didier M, Boubaya M, *et al.* Obstructive sleep apnoea and related comorbidities in incident idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2017; 49: 1601934 [<https://doi.org/10.1183/13993003.01934-2016>].

**ABSTRACT** The objectives of this prospective study were: 1) to determine the prevalence and determinants of obstructive sleep apnoea (OSA) in patients with newly diagnosed idiopathic pulmonary fibrosis (IPF); 2) to determine whether OSA was associated with cardiovascular disease (CVD) as well as increased oxidative stress and levels of IPF biomarkers in the blood.

A group of 45 patients with newly diagnosed IPF attended polysomnography. The prevalence of CVD and the severity of coronary artery calcification were investigated by high-resolution computed tomography. The levels of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-DG) and various IPF biomarkers in the blood were compared between patients with no or mild OSA (apnoea-hypopnoea index (AHI) <15 events·h<sup>-1</sup>), with moderate OSA (15 ≤ AHI <30 events·h<sup>-1</sup>) and with severe OSA (AHI ≥30 events·h<sup>-1</sup>).

The prevalence of moderate-to-severe OSA and severe OSA was 62% and 40%, respectively. AHI did not correlate with demographic or physiological data. All patients with severe OSA had a medical history of CVD, versus 41.2% and 40% of those with no or mild OSA, or with moderate OSA, respectively (p<0.0001). Ischaemic heart disease (IHD) and moderate-to-severe coronary artery calcifications were strongly associated with severe OSA. The 8-OH-DG and matrix metalloproteinase-7 serum levels were significantly increased in the severe OSA group.

Moderate-to-severe OSA is highly prevalent in incident IPF and severe OSA is strongly associated with the presence of CVD, particularly IHD.

Copyright ©ERS 2017

## Introduction

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a rare and fatal disease of unknown origin affecting mostly elderly people, characterised by the accumulation of extracellular matrix in the distal lung, leading to progressive loss of pulmonary function. The pathophysiology of IPF is not fully understood, but it could be due to aberrant repair following repetitive micro-injuries of the alveolar epithelium [1]. Recently, several studies have reported that moderate-to-severe obstructive sleep apnoea (OSA) syndrome defined by an apnoea-hypopnoea index (AHI)  $>15$  events·h<sup>-1</sup>, was particularly frequent in IPF patients [2–6].

The interrelationships between IPF and OSA are complex. On the one hand, physiological studies have shown that a decrease in lung volume increased upper airway instability. This suggests that lung restriction in IPF could potentially lead to OSA [7–9]. On the other hand, OSA promoting gastro-oesophageal reflux (GER) [10], or increasing lung oxidative stress through chronic nocturnal intermittent hypoxia [11] might *per se* favour the development of pulmonary fibrosis. Thus, it raises the important question whether OSA appears in the natural course of IPF as a consequence of lung function restriction, or whether it precedes (or occurs at the same time as) it.

Respiratory failure is the main cause of death in IPF [12]. However, IPF patients often present comorbid conditions including cardiovascular disease (CVD) and diabetes mellitus that may impact survival [13–18]. Moderate-to-severe OSA is a recognised risk factor for CVD [19–23] and glucose intolerance [24]. Oxidative stress and low-grade systemic inflammation induced by chronic intermittent hypoxia are likely to play a key role in this phenomenon [25]. It is currently not known whether severe OSA is associated with cardiovascular and metabolic comorbidities and whether or not it may increase systemic oxidative stress in IPF patients.

To address these issues, we prospectively recorded by nocturnal polysomnography (PSG) 45 consecutive patients at the time of IPF diagnosis. The main objectives of the study were 1) to determine the prevalence of OSA in incident IPF and to look for correlations between AHI and demographic and physiological variables; 2) to compare in IPF patients with no or mild OSA, with moderate OSA or with severe OSA the prevalence of comorbid conditions such as GER, CVD and diabetes, as well as oxidative stress and prognostic IPF biomarker peripheral blood levels.

## Materials and methods

### Subjects

This prospective study was part of a larger French national cohort study on IPF (the COFI study 2007–2014; principal investigator, Dominique Valeyre), and was approved by Aulnay-sous-Bois Comité de Protection des Personnes and CNIL (no. 908198). Five university pulmonary departments participated in the study between June 2009 and December 2010. Inclusion criteria were the following: age  $>18$  years; ability to provide informed consent; stable dyspnoea; diagnosis of incident IPF according to ATS/ERS recommendations [26] (delay between diagnosis of IPF and inclusion  $<9$  months). Non-inclusion criteria were prior diagnosis of OSA and unstable dyspnoea.

### Study protocol

All patients attended nocturnal PSG (Morpheus Apparatus, Micromed, Mâcon-Loché, France, Dream Apparatus, Medatec, Brussel, Belgium or CID102L, CIDELEC, Sainte-Gemmes sur Loire, France) according to established standards [27]. Patients requiring nocturnal home oxygen therapy ( $n=4$ ) at the time of the study received oxygen supplementation during PSG at their usual flow-rate ( $2\text{--}3$  L·min<sup>-1</sup>). Apnoeas, hypopnoeas and sleep staging were defined as outlined by the American Academy of Sleep Medicine [27] (rules for scoring respiratory events are summarised in the supplementary material). Subjects were asked to complete the Epworth Sleepiness Scale questionnaire. Comorbidities and cardiovascular risk factors were carefully registered by a chest physician based on information from medical records, paying special attention to the presence of GER, smoking status, hyperlipidaemia, prednisone treatment, obesity, diabetes mellitus, pulmonary hypertension, thromboembolic disease and CVD. CVD was defined as one or more of the following: hypertension, ischaemic heart disease (IHD,

---

This article has supplementary material available from [erj.ersjournals.com](http://erj.ersjournals.com)

Received: Oct 03 2016 | Accepted after revision: Feb 28 2017

Support statement: This work was supported by the Chancellerie des Universités de Paris-Fondation du Legs Poix (grant: 637), the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) (grant: AOR 07076) and the University Paris 13/ComUE Sorbonne Paris Cité (grant: FPI-SPC). Funding information for this article has been deposited with the Crossref Funder Registry.

Conflict of interest: Disclosures can be found alongside this article at [erj.ersjournals.com](http://erj.ersjournals.com)

including history of myocardial infarction, coronary artery bypass or coronary artery stent), stroke/transient ischaemic attack, aortic aneurysm and peripheral arteriosclerosis. High-resolution computed tomography (HRCT) and pulmonary function testing (PFT) including spirometry, body box plethysmography and measurement of diffusing capacity of the lung for carbon monoxide (DLCO) were performed according to ATS/ERS guidelines within 3 months of PSG. Blood samples were obtained the day patients underwent PFT between 08:00 h and 10:00 h after one night of fasting, and serum was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in the tumour biobank of the Biological Hematology Laboratory before subsequent analysis.

#### HRCT analysis

Two radiologists independently reviewed HRCT scans and evaluated the extent of fibrosis representing the sum of the reticular pattern and honeycombing, according to SUMIKAWA *et al.* [28]. Coronary arteries from the mediastinal windows were screened for calcification and graded according to NATHAN *et al.* [29] as follows: 0=no visible calcification, 1=trace calcification, 2=mild calcification, 3=moderate calcification and 4=extensive calcification.

#### Serum biomarker analyses

DNA oxidative damage was assessed by determination of 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OH-DG) serum levels using an ELISA kit (Oxiselect, Cell Biolabs Inc, San Diego, CA). Serum levels of peripheral blood biomarkers proposed in IPF were measured using the following ELISA kits: Surfactant Protein A (SPA) (BioVender LM, Czech Republic), matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) and intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 (R&D Systems Europe, Lille, France).

#### Statistical analysis

Means and SD were reported for the continuous variables, except for blood biomarkers expressed as medians and interquartiles. Normally distributed continuous variables were analysed with one-way ANOVA and, when allowed by the F value, results were compared by the modified least significant difference (Fisher's PLSD), adjusted by the Bonferroni correction for multiple comparisons. The Kruskal-Wallis test with Dunn's correction was used in comparisons of non-normally distributed continuous variables. The Pearson correlation coefficient was employed to examine the relation between PFT variables, age, body mass index (BMI) and AHI. Categorical variables are reported as number and percentage, and were analysed by the Chi-squared test or Fisher exact test. For association between AHI groups ( $<15$ ,  $15-30$  and  $\geq 30$  events $\cdot\text{h}^{-1}$ ), interactions between ischaemic heart disease and potential confounders were tested, and subgroup analyses were performed with the Bonferroni correction for multiple testing. A p-value  $<0.05$  was considered as statistically significant. Analyses were carried out using R statistical software version 3.1.2.

## Results

### Study population

The diagnosis of incident IPF was made in 67 subjects during the inclusion period. Five subjects were not included because of prior diagnosis of OSA, and two subjects because of unstable dyspnoea. Among the 60 subjects eligible for the study, 45 were included and successfully completed PSG. Characteristics and treatments of the study population are given in table 1 (see supplementary material for the characteristics of non-included patients). Only 22.2% of included subjects received prednisone (mean duration of treatment before PSG:  $5.2\pm 2.7$  months).

### Polysomnography

Forty subjects (88.8%) had OSA as defined by an AHI  $>5$  events $\cdot\text{h}^{-1}$  of sleep (table 2). Twelve subjects (26.6%) had mild OSA ( $5 \leq \text{AHI} < 15$  events $\cdot\text{h}^{-1}$ ), 10 subjects (22.2%) had moderate OSA ( $15 \leq \text{AHI} < 30$  events $\cdot\text{h}^{-1}$ ) and 18 subjects (40%) had severe OSA ( $\text{AHI} \geq 30$  events $\cdot\text{h}^{-1}$ ) (table 2). Apnoeas and hypopnoeas represented  $35\pm 26.2\%$  and  $62.9\pm 26.7\%$  of all respiratory events, respectively. Sleep apnoeas were mostly obstructive or mixed, central apnoeas representing less than 5% of sleep apnoeas (table 2). Careful analysis of respiratory tracings revealed no evidence for Cheyne-Stokes breathing (CSB), periodic breathing or sleep-related alveolar hypoventilation. Also, snoring was detected in all subjects with abnormal AHI, as well as features evoking upper airway obstruction such as airflow limitation or thoracoabdominal paradox. Mean nocturnal arterial oxygen saturation measured by pulse oximetry ( $\text{SpO}_2$ ) was significantly decreased in the severe OSA group while the percentage of total sleep time spent with  $\text{SpO}_2 < 90\%$  and the oxygen desaturation index (ODI) were significantly increased (table 2). As shown in figure 1, there was no correlation between baseline  $\text{SpO}_2$  in room air and AHI or ODI.

TABLE 1 Participant characteristics

Characteristic	Result
<b>Subjects</b>	45
<b>Age years</b>	68.8±8.7
<b>Sex M/F</b>	38/7
<b>BMI kg·m<sup>-2</sup></b>	28±3.5
BMI ≤25	8 (17.8)
25 < BMI ≤30	24 (53.3)
30 < BMI ≤35	12 (26.7)
BMI >35	1 (2.2)
<b>Ethnic origin</b>	
Caucasian	33 (73.3)
North African	12 (26.7)
TLC % predicted	72.2±16.4
FVC % predicted	72.8±20.3
DLCO % predicted	45.1±18.9
<b>Medications</b>	
Sleeping pills	1 (2)
IPF medication	17 (37.7)
Prednisone <sup>#</sup>	10 (22.2)
N-Acetylcysteine	10 (22.2)
Immunosuppressive drug	6 (13.3)
Clinical trial	5 (11.1)
<b>Supplemental oxygen therapy<sup>¶</sup></b>	6 (13.3)

Data are presented as n, n/n, n (%) or mean±SD unless otherwise stated. BMI: body mass index; TLC: total lung capacity; FVC: forced vital capacity; DLCO: diffusing capacity of the lung for carbon monoxide; IPF: idiopathic pulmonary fibrosis. <sup>#</sup>Mean duration of prednisone treatment before polysomnography (PSG) was 5.2±2.7 months. <sup>¶</sup>: Four patients required nocturnal home oxygen therapy at the time of the study.

#### Correlation between demographic and PFT variables and PSG parameters

There was no significant difference between the four groups (no OSA, mild, moderate and severe OSA) regarding age, BMI (table 2), PFT and arterial blood gas variables (table 3). AHI did not correlate with age, BMI, FVC, TLC, FEV<sub>1</sub> or DLCO (Supplementary figure S1).

#### Comorbidities

To analyse the prevalence of comorbidities and cardiovascular risk factors, the study population was divided into three groups: patients with no OSA or mild OSA (AHI <15 events·h<sup>-1</sup>) (n=17; mean AHI 8.5±4.3 events·h<sup>-1</sup>), patients with moderate OSA (15 ≤AHI <30 events·h<sup>-1</sup>) (n=10; mean AHI 22.6±3.4 events·h<sup>-1</sup>), patients with severe OSA (AHI ≥30 events·h<sup>-1</sup>) (n=18; mean AHI 60.5±25.4 events·h<sup>-1</sup>). There was no significant difference between groups regarding age, BMI, PFT variables, smoking status, the presence or absence of hyperlipidaemia or prednisone treatment (table 4). As shown in table 4, GER tended to be more frequent in the severe OSA group (p=0.08). The prevalence of diabetes was not significantly different between groups (p=0.41). All subjects with severe OSA suffered from at least one CVD among the following, hypertension, IHD, stroke/transient ischaemic attack, aortic aneurysm and peripheral arteriosclerosis, compared with 40% of subjects with moderate OSA and 41.2% of subjects with no/mild OSA (p=0.0001). When cardiovascular comorbidities were considered separately, IHD appeared to be highly prevalent in the severe OSA group, affecting 61.1% of subjects, significantly more frequent than in the moderate OSA group (30% of subjects) and in the no/mild OSA group (11.8% of subjects) (p=0.009, univariate analysis). Subgroup analysis showed that the association between severe OSA and IHD was independent of cardiovascular comorbidities, age, BMI, smoking history, hyperlipidaemia, but revealed an interaction with the presence of diabetes (p=0.04). All patients with diabetes and severe OSA (n=5) had a history of IHD.

#### HRCT findings

HRCT scans were reviewed in a subset of 34 subjects including 12 subjects with no/mild OSA, eight subjects with moderate OSA and 14 subjects with severe OSA, with no significant difference between groups regarding demographic variables and PFT data (Supplementary table E1). Mean fibrosis score was low in all groups consistent with early stage of IPF, with no difference between groups (table 5). Staging of coronary artery calcifications revealed that the percentage of subjects with moderate-to-severe (grade 3 and

TABLE 2 Demographic and polysomnographic data

Variable	No OSA <sup>#</sup>	Mild OSA <sup>¶</sup>	Moderate OSA <sup>+</sup>	Severe OSA <sup>§</sup>	p-value
Subjects	5	12	10	18	
Age years	61±10.9	67.6±7.5	72.1±7.7	69.8±8.6	0.11
Sex M/F	3/2	9/3	9/1	16/1	
BMI kg·m <sup>-2</sup>	27.7±4.3	27.8±2.5	27.3±4	28.6±3.7	0.79
ESS	7±4.2	6.4±3.2	6.2±4.1	8.9±4	0.13
AHI events·h <sup>-1</sup>	3±1.7	10.8±2.6	22.6±3.4	60.5±25	<0.0001
Apnoea index events·h <sup>-1</sup>	0.5±0.6	1.4±2	8.2±4.7	33.7±30	0.0002
Obstructive and mixed apnoeas %	-	95±9.1	97.2±4.7	97.8±4	
Mean SpO <sub>2</sub> %	93.4±1.1	93.6±1.3	92.7±2.1	91.2±2.3	0.01
Time SpO <sub>2</sub> is <90% %TST	4.3±5.5	2.9±3.6	9.1±24.1	26.8±30.1	0.03
ODI (≥3%) events·h <sup>-1</sup>	1.7±1.4	5.1±5.4	10.1±4.4	50±35.1	<0.0001
TST min	381±130	389±99	398±85	387±89	0.99
Sleep efficiency %	64.6±26	66±17	70.9±16	69.6±11	0.83
Sleep stage					
N1 %TST	12.4±9.9	17±9.7	18.2±15.7	21.5±13.4	0.52
N2 %TST	50.9±9	46.9±12.8	44±8.8	51.6±16.3	0.49
N3 %TST	20.5±6.6	18.9±6	21±10.3	14.4±7.7	0.14
REM %TST	16.2±6.4	17.2±7.5	16.9±8.1	12.5±6.2	0.25
Arousal index events·h <sup>-1</sup>	12.6±10.3	23.3±26.3	28.4±29.7	26.1±13.1	0.66
Periodic limb movement index events·h <sup>-1</sup>	8.1±9.2	11.9±19.9	9.3±18.2	25.5±34.8	0.37

Data are presented as n, n/n or mean±SD unless otherwise stated. OSA: obstructive sleep apnoea; AHI: apnoea-hypopnoea index; BMI: body mass index; ESS: Epworth Sleepiness Scale; SpO<sub>2</sub>: arterial oxygen saturation measured by pulse oximetry; TST: total sleep time; ODI: oxygen desaturation index; REM: rapid eye movement. <sup>#</sup>: AHI <5 events·h<sup>-1</sup>. <sup>¶</sup>: 5 ≤AHI <15 events·h<sup>-1</sup>. <sup>+</sup>: 15 ≤AHI <30 events·h<sup>-1</sup>. <sup>§</sup>: AHI ≥30 events·h<sup>-1</sup>.

4) calcifications was significantly higher in the severe OSA group (85.7%) than in the other groups (33.3% and 25% of subjects in the no/mild OSA group and the moderate OSA group, respectively) ( $p=0.002$ ). The positive predictive value of having OSA with coronary artery calcifications higher than grade 2 was 0.78.

#### Oxidative stress and IPF biomarkers in peripheral blood

Blood samples were available in 29 patients, 13 patients with no/mild OSA, five subjects with moderate OSA and 11 patients with severe OSA, with no difference in demographic and PFT characteristics between groups (supplementary table E2). Serum 8-OH-DG levels (detecting DNA oxidative damage) were significantly increased in the moderate and severe OSA groups compared with the no/mild OSA group ( $p=0.03$  and  $p=0.04$ , respectively) (figure 2A). Concerning IPF biomarkers (figure 2B–E), no difference between groups regarding SPA serum levels was observed (figure 2B). There was a trend to an increase in ICAM-1 levels in the severe OSA group ( $p=0.10$  compared with the no/mild OSA group) (figure 2C). Finally, serum levels of MMP-7 were significantly increased in the severe OSA group compared with the no/mild OSA group ( $p=0.04$ ) (figure 2D). Indeed, there was a positive correlation between ODI and MMP-7 serum levels ( $r=0.59$ ;  $p=0.001$ ) (figure 2E).

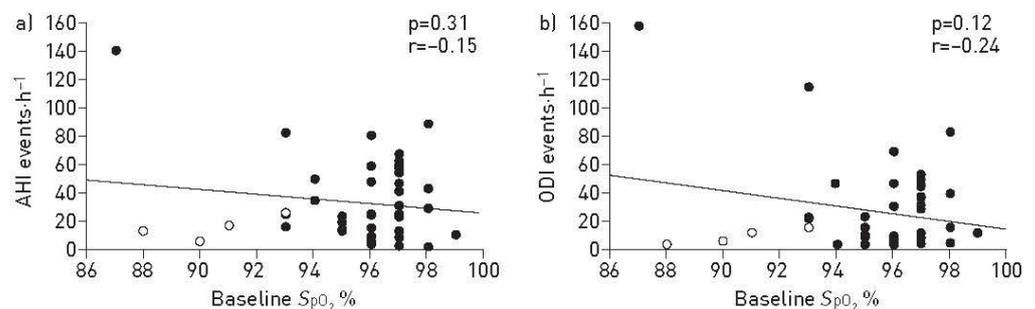


FIGURE 1 Scatter plots of baseline SpO<sub>2</sub> [arterial oxygen saturation measured by pulse oximetry] in room air with (a) apnoea-hypopnoea index [AHI] and (b) oxygen desaturation index [ODI]. Each data point represents one study subject (n=45). Empty circles indicate subjects that received supplementary oxygen during polysomnography [PSG] (n=4). Regression lines (black lines) and Pearson correlation coefficients are indicated.

TABLE 3 Physiological characteristics. The GAP index (absolute and relative frequency) was calculated according to gender, age and physiologic data (% predicted FVC and  $DL_{CO}$ ). The composite physiologic index (CPI) was calculated according to the formula  $CPI=91-[0.65\times\%$  predicted  $DL_{CO}]-[0.53\times\%$  predicted FVC] $+[0.34\times\%$  predicted FEV1).

Variable	No OSA <sup>#</sup>	Mild OSA <sup>¶</sup>	Moderate OSA <sup>+</sup>	Severe OSA <sup>§</sup>	p-value
<b>Subjects</b>	5	12	10	18	
<b>GAP index</b>					0.97
Stage I	2 (40%)	5 (41.7%)	5 (50%)	6 (33.3%)	
Stage II	1 (20%)	6 (50%)	3 (30%)	9 (50%)	
Stage III	2 (40%)	1 (8.3%)	2 (20%)	3 (16.7%)	
<b>CPI</b>	51.7±20.07	46.1±14.44	47.9±17.16	50.1±14.31	0.86
<b>FVC %</b>	65.9±25.8	75.1±16	71.1±23.6	64.2±20.2	0.83
<b>FEV1 %</b>	68.6±21.7	75.5±15.5	75.6±26.9	78.7±22	0.82
<b>FEV1/FVC</b>	77.5±7.2	78.8±6.5	79±8.3	78.5±8.6	0.99
<b>TLC %</b>	66.1±18	71.7±14.3	73.2±16.3	73.8±18	0.83
<b><math>DL_{CO}</math> %</b>	42.7±21.5	48.4±21.6	47.9±20.9	42.5±16.4	0.81
<b><math>Pa_{O_2}</math> mmHg</b>	83±17.6	78.2±12.9	79.7±10.1	79.2±11.7	0.91
<b><math>Pa_{CO_2}</math> mmHg</b>	37±2	38.3±4.2	41.1±4.1	39.8±8.3	0.57
<b><math>Sp_{O_2}</math> %</b>	95.6±3.4	95.6±3.1	95.5±1.8	96.2±2.7	0.92

Data are presented as n, n (%) or mean±SD unless otherwise stated. OSA: obstructive sleep apnoea; AHI: apnoea-hypopnoea index; FVC: forced vital capacity; FEV1: forced expiratory volume in 1 s; TLC: total lung capacity;  $DL_{CO}$ : diffusing capacity of the lung for carbon monoxide;  $Pa_{O_2}$ : arterial oxygen tension;  $Pa_{CO_2}$ : arterial carbon dioxide tension;  $Sp_{O_2}$ : arterial oxygen saturation measured by pulse oximetry. #: AHI <5 events·h<sup>-1</sup>. ¶: 5 ≤AHI <15 events·h<sup>-1</sup>. +: 15 ≤AHI <30 events·h<sup>-1</sup>. §: AHI ≥30 events·h<sup>-1</sup>.

## Discussion

The main findings of this prospective study are the following: 1) OSA, particularly severe OSA, was highly prevalent in a French population of patients with incident IPF, and AHI was not correlated with age, BMI and PFT variables; 2) cardiovascular comorbidities, particularly IHD, were more frequently found in IPF patients with severe OSA than in IPF patients with no OSA or mild-to-moderate OSA, and the presence of moderate-to-severe coronary artery calcifications on HRCT was strongly associated with severe OSA; 3) 8-OH-DG and MMP-7 serum levels were increased in patients with incident IPF and severe OSA, and there was a trend to an increase in ICAM-1 in this group.

TABLE 4 Comorbidities and cardiovascular risk factors at inclusion

Characteristic	No OSA or mild OSA <sup>#</sup>	Moderate OSA <sup>¶</sup>	Severe OSA <sup>+</sup>	p-value
<b>Subjects</b>	17	10	18	
<b>GER</b>	4 (23.5)	1 (10)	9 (50)	0.08
<b>Cardiovascular disease<sup>§</sup></b>	7 (41.2)	4 (40)	18 (100)	<0.0001
Hypertension	6 (35.3)	3 (30)	10 (55.6)	0.37
Ischaemic heart disease	2 (11.8)	3 (30)	11 (61.1)	0.009
Stroke/transient ischaemic attack	0 (0)	0 (0)	3 (16.7)	0.23
Peripheral arteriosclerosis	0 (0)	0 (0)	3 (16.7)	0.22
Aortic aneurysm	0 (0)	0 (0)	1 (5.6)	1
<b>Thromboembolic disease</b>	1 (5.9)	2 (20)	1 (5.6)	0.43
<b>Pulmonary hypertension</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1
<b>Diabetes mellitus</b>	2 (11.8)	1 (10)	5 (27.8)	0.41
<b>Hyperlipidaemia</b>	5 (29.4)	3 (30)	9 (50)	0.42
<b>Smoking status</b>				0.06
Never a smoker	5 (29.4)	7 (70)	3 (16.7)	
Former smoker	8 (47.1)	3 (30)	12 (66.7)	
Current smoker	4 (23.5)	0 (0)	3 (16.7)	
<b>Prednisone treatment</b>	6 (35.3)	1 (10)	3 (16.7)	0.24

Data are presented as n or n (%) unless otherwise stated. OSA: obstructive sleep apnoea; AHI: apnoea-hypopnoea index; GER: gastroesophageal reflux. #: AHI <5 events·h<sup>-1</sup>. ¶: 5 ≤AHI <30 events·h<sup>-1</sup>. +: AHI ≥30 events·h<sup>-1</sup>. §: Some patients had more than one diagnosis.

TABLE 5 High-resolution computed tomography (HRCT) data

Data	No or mild OSA <sup>#</sup>	Moderate OSA <sup>¶</sup>	Severe OSA <sup>*</sup>	p-value
Subjects	12	8	14	
Fibrosis score	105.8±42.8	139.4±55.9	104.7±30.7	0.15
Coronary artery calcifications (grade >2)	4 (33.3)	2 (25)	12 (85.7)	0.005

Data are presented as n, n (%) or mean±SD unless otherwise stated. OSA: obstructive sleep apnoea; AHI: apnoea-hypopnoea index. <sup>#</sup>: AHI <15 events·h<sup>-1</sup>. <sup>¶</sup>: 15 ≤AHI <30 events·h<sup>-1</sup>. <sup>\*</sup>: AHI ≥30 events·h<sup>-1</sup>.

Our results show that 62.2% of patients with incident IPF had a moderate-to-severe OSA defined by an AHI ≥15 events·h<sup>-1</sup>. This is clearly higher than the prevalence of moderate-to-severe OSA in adults older than 60 years, estimated to be approximately 20% by the Sleep Heart Health Study [30]. Indeed, 40% of our patients had severe OSA (AHI ≥30 events·h<sup>-1</sup>). Here, we did not classify hypopnoeas as obstructive or central events, as the American Academy of Sleep Medicine guidelines 2007 for scoring of respiratory events stated this classification should not be performed without a quantitative assessment of respiratory effort [27]. However, on careful examination, PSG tracings in patients with abnormal AHI were found to be typical of classical OSA. First, the proportion of obstructive or mixed apnoeas was very high, over 95% of total apnoeic events, and we did not observe any episode of CSB or periodic breathing. Second, snoring was always detected, and there was evidence of upper airway obstruction such as airflow limitation and/or thoracoabdominal paradox during hypopnoeic events. Another important methodological point is the fact that the number of respiratory events might be overestimated in patients with restrictive lung disease and low baseline S<sub>p</sub>O<sub>2</sub> when PSG is performed without nocturnal O<sub>2</sub> supplementation. In our population of

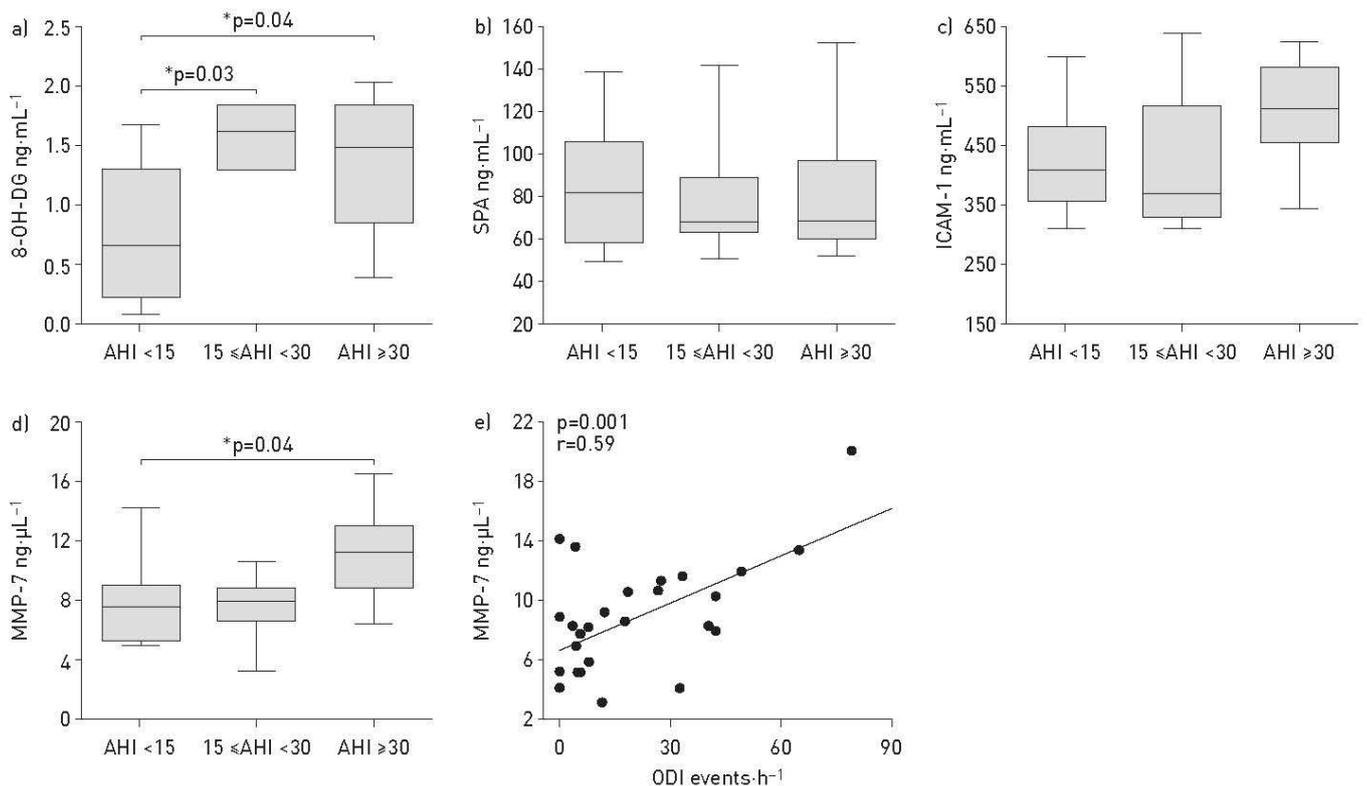


FIGURE 2 Peripheral blood biomarkers of oxidative stress and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). A box plot of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-DG) [a] illustrates oxidative DNA damage while plots of surfactant protein A (SPA) [b], intercellular adhesion molecule (ICAM-1) [c], and matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) [d] illustrate potential IPF biomarkers in subjects with no/mild OSA (AHI <15 events·h<sup>-1</sup>) (n=13), moderate OSA (15 ≤AHI <30 events·h<sup>-1</sup>) (n=5), and severe OSA (AHI ≥30 events·h<sup>-1</sup>) (n=11). Median values and interquartile ranges are represented by horizontal black lines and the upper and lower bounds of the box, respectively. A scatter plot of oxygen desaturation index (ODI) with MMP-7 serum level [e] is also shown with regression line and Pearson correlation coefficient as indicated. OSA: obstructive sleep apnoea; AHI: apnoea-hypopnoea index; \*: p-values of <0.05 were determined by ANOVA and Bonferroni correction.

incident IPF, only four patients had a baseline  $S_{pO_2}$  (measured in room air) lower than 93%, and three of these patients received  $O_2$  supplementation during PSG. The remaining patient without  $O_2$  supplementation during PSG had a very high AHI (140 events·h<sup>-1</sup>) but also a very high index of obstructive apnoeas (122·h<sup>-1</sup>), consistent with severe OSA. Indeed, in the present study, baseline  $S_{pO_2}$  in room air correlated neither with AHI nor with ODI (figure 1), indicating that the high prevalence of OSA in this study was not due to overestimation of respiratory events.

The prevalence of moderate-to-severe OSA we observed in newly diagnosed IPF patients is similar to that reported in the cross-sectional study of LANCASTER *et al.* [3], studying patients at various stages of IPF severity. It is much higher than the prevalence previously reported in two smaller series of incident IPF by REID *et al.* [31] and MERMIGKIS *et al.* [4] (22% and 15%, respectively). Importantly, only 22.2% of our patients were receiving prednisone at the time PSG was performed (mean duration of treatment 5.2 months). Another interesting point is that AHI was not correlated with BMI, unlike previously reported [2, 3], suggesting that obesity was not a major risk factor for OSA in incident IPF. It has been proposed that restrictive lung diseases could favour OSA as the decrease in lung volume was experimentally shown to induce upper airway instability [7–9]. However, the relationship between lung function and AHI in IPF patients is controversial. MERMIGKIS *et al.* [2] reported that AHI negatively correlated with FEV<sub>1</sub> but LANCASTER *et al.* [3] found no correlation between AHI, lung volume or DLCO. In the present study, lung volume was only mildly decreased and the mean lung fibrosis score on HRCT was low, consistent with early-stage IPF. There was no correlation between AHI, spirometry and DLCO values. Taken together, these data suggest that in our cohort of incident IPF, OSA was not likely to be the consequence of progressive lung restriction.

Because moderate-to-severe OSA is a well-recognised risk factor for cardiovascular and metabolic diseases [19–25], we wondered whether OSA was associated with comorbid conditions in our study population. The prevalence of comorbidities was compared among groups of patients with no/mild OSA, moderate OSA, and severe OSA. Patients with no OSA (n=5) and patients with mild OSA (n=12) were pooled in the same group for statistical analyses because mild OSA is highly prevalent in adults over 60 (affecting approximately one-third of the general population [30]) and most often asymptomatic. However, the association of mild OSA with cardiovascular/metabolic diseases remains unproven (see ref. [32] for review). Our data show that 100% of patients with severe OSA had a history of CVD *versus* 40–41% in other groups, but there was no significant difference among groups concerning diabetes mellitus. Among CVD patients, IHD was strongly associated with severe OSA, affecting 61% of patients, independently of cardiovascular comorbidities and cardiovascular risk factors (table 4), except diabetes. In line with this observation, 85% of IPF patients with severe OSA exhibited moderate-to-severe coronary artery calcifications (grade 3–4) on HRCT *versus* only 25–33% of patients with no/mild OSA or moderate OSA. Previous studies have reported a higher prevalence of IHD in IPF patients than in matched chronic obstructive pulmonary disease or emphysema patients for instance, independently of common coronary artery risk factors [13–17]. Patients with significant coronary artery disease at the time of IPF diagnosis appear to have worse outcomes than patients without [16]. Furthermore, the rate ratio of first-time IHD events was shown to be twice higher in IPF patients than in matched controls, even after adjusting for classical CVD risk factors [17]. Therefore, the strong association we observed between incident IPF, severe OSA and IHD suggests that severe OSA could be an important and underdiagnosed risk factor for IHD in IPF patients.

The pathophysiological mechanisms of cardiovascular and metabolic diseases in OSA include sympathetic activation as well as oxidative stress and inflammation because of chronic intermittent hypoxia, leading to endothelial and/or adipose tissue dysfunction [25]. Consistent with this, in IPF patients with moderate-to-severe OSA compared with those with no or mild OSA, we observed a significant increase in systemic oxidative stress as assessed by 8-OH-DG serum levels (reflecting oxidative DNA damage). Interestingly, oxidative stress has also been evidenced in the lung of IPF patients, and is likely to be involved in the pathophysiology of the disease [1]. We therefore compared a panel of selected blood biomarkers shown to have a prognostic value in IPF among groups, to evaluate whether they would be modulated by OSA and/or oxidative stress. We were particularly interested in biomarkers reflecting alveolar epithelial cell activation/injury such as MMP-7 and SPA, because alveolar epithelial cell injury is thought to play a key role in the pathophysiology of IPF [1]. Indeed, these cells are directly exposed to acute changes in alveolar gas composition (*i.e.* hypoxia–reoxygenation cycles) because of repeated sleep apnoeas, which could induce oxidative stress and subsequent cell injury. ICAM-1, a soluble adhesion molecule reflecting endothelial dysfunction, was also studied. Serum levels of ICAM-1 tended to be higher in patients with severe OSA than in other groups (p=0.10). Measurements of epithelial biomarkers provided discordant results: while MMP-7 serum levels were significantly increased in the severe OSA group and correlated well with ODI, SPA levels were not different between groups. Blood concentrations of ICAM-1, SPA and MMP-7 have been shown to be significantly and independently associated with

mortality/disease progression in IPF [34, 35]. However, ICAM-1 and MMP-7 are certainly not specific for IPF inasmuch as they can also be increased in OSA, especially as IHD is associated [36–38]. OSA and IHD may therefore represent potential confounding factors. The increase in MMP-7 (and to a lesser degree in ICAM-1) blood levels observed here might reflect the disease activity of IPF, the presence of OSA or IHD, or both. One limitation of the present study is the relatively small size of our cohort and the fact that blood samples were not available for all patients. It would certainly be interesting to assess whether additional blood biomarkers, such as KL-6 or Surfactant Protein D, may be more specific of alveolar epithelial cell activity/injury in IPF in a larger cohort of IPF patients with and without sleep apnoeas to determine whether their levels are affected or not by OSA.

In conclusion, severe OSA is highly prevalent in patients with newly diagnosed IPF, and is strongly associated with the presence of IHD. We advocate that nocturnal PSG should be performed at the time of IPF diagnosis to detect occult OSA, especially when moderate-to-severe coronary artery calcifications are observed on HRCT scan.

### Acknowledgements

The authors would like to thank the following for their help: Breuil-Crockett, Flora (Avicenne Hospital, Bobigny, France); Essalhi, Mohamed and Juvin, Karine (both at Georges Pompidou European Hospital, Paris, France); Glérant, Jean-Charles, Turquier, Segolene, Traclet, Julie, Khouatra, Chahera and Zeghmar, Sabrina (all at Hôpital Louis Pradel, Lyon, France); Borie, Raphaël and Stoica, Maria (both at Bichat Hospital, Paris, France). In addition they would like to thank Simon, Chantal (Jean Verdier Hospital, Bondy, France) for technical assistance.

### References

- 1 King TE Jr, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 2011; 378: 1949–1961.
- 2 Mermigkis C, Chapman J, Golish J, et al. Sleep-related breathing disorders in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Lung* 2007; 185: 173–178.
- 3 Lancaster LH, Mason WR, Parnell JA, et al. Obstructive sleep apnea is common in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2009; 136: 772–778.
- 4 Mermigkis C, Stagaki E, Tryfon S, et al. How common is sleep-disordered breathing in patients with idiopathic pulmonary fibrosis? *Sleep Breath* 2010; 14: 387–390.
- 5 Mermigkis C, Bouloukaki I, Antoniou K, et al. Obstructive sleep apnea should be treated in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Sleep Breath* 2015; 19: 385–391.
- 6 Milioli G, Bosi M, Poletti V, et al. Sleep and respiratory sleep disorders in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sleep Med Rev* 2016; 26: 57–63.
- 7 Bradley TD, Brown JG, Grossman RF, et al. Pharyngeal size in snorers, nonsnorers, and patients with obstructive sleep apnea. *N Engl J Med* 1986; 315: 1327–1331.
- 8 Sériès F, Cormier Y, Lampron N, et al. Influence of lung volume in sleep apnoea. *Thorax* 1989; 44: 52–57.
- 9 Heinzer RC, Stanchina ML, Malhotra A, et al. Lung volume and continuous positive airway pressure requirements in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 114–117.
- 10 Raghu G. The role of gastroesophageal reflux in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Med* 2003; 115: 60–64.
- 11 Pialoux V, Hanly PJ, Foster GE, et al. Effects of exposure to intermittent hypoxia on oxidative stress and acute hypoxic ventilatory response in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180: 1002–1009.
- 12 Ley B, Collard HR, King TE Jr. Clinical course and prediction of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 431–440.
- 13 Kizer JR, Zisman DA, Blumenthal NP, et al. Association between pulmonary fibrosis and coronary artery disease. *Arch Intern Med* 2004; 164: 551–556.
- 14 Hubbard RB, Smith C, Le Jeune I, et al. The association between idiopathic pulmonary fibrosis and vascular disease: a population-based study. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 1257–1261.
- 15 Izbicki G, Ben-Dor I, Shitrit D, et al. The prevalence of coronary artery disease in end-stage pulmonary disease: is pulmonary fibrosis a risk factor? *Respir Med* 2009; 103: 1346–1349.
- 16 Nathan SD, Basavaraj A, Reichner C, et al. Prevalence and impact of coronary artery disease in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* 2010; 104: 1035–1041.
- 17 Dalleywater W, Powell HA, Hubbard RB, et al. Risk factors for cardiovascular disease in people with idiopathic pulmonary fibrosis: a population-based study. *Chest* 2015; 147: 150–156.
- 18 Hyldgaard C, Hilberg O, Bendstrup E. How does comorbidity influence survival in idiopathic pulmonary fibrosis? *Respir Med* 2014; 108: 647–653.
- 19 Peker Y, Kraiciz H, Hedner J, et al. An independent association between obstructive sleep apnoea and coronary artery disease. *Eur Respir J* 1999; 14: 179–184.
- 20 Peppard PE, Young T, Palta M, et al. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N Engl J Med* 2000; 342: 1378–1384.
- 21 Shahar E, Whitney CW, Redline S, et al. Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: cross-sectional results of the Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 19–25.
- 22 Moee T, Franklin KA, Holmström K, et al. Sleep-disordered breathing and coronary artery disease: long-term prognosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1910–1913.
- 23 Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, et al. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet* 2005; 365: 1046–1053.
- 24 Ip MS, Lam B, Ng MM, et al. Obstructive sleep apnea is independently associated with insulin resistance. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 670–676.
- 25 Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ, et al. Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol Rev* 2010; 90: 47–112.

- 26 American Thoracic Society. ATS/ERS international consensus classification of idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Crit Care Med* 2002; 165: 277–304.
- 27 Iber C, Ancoli-Israel S, Stuart Quan M. The American Academy of Sleep Medicine Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events: Rules, Terminology, and Technical Specifications. 1st Edn. Westchester, American Academy of Sleep Medicine, 2007.
- 28 Sumikawa H, Johkoh T, Colby TV, *et al.* Computed tomography findings in pathological usual interstitial pneumonia: relationship to survival. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 433–439.
- 29 Nathan SD, Weir N, Shlobin OA, *et al.* The value of computed tomography scanning for the detection of coronary artery disease in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology* 2011; 16: 481–486.
- 30 Young T, Shahar E, Nieto FJ, *et al.* Predictors of sleep-disordered breathing in community-dwelling adults: the Sleep Heart Health Study. *Arch Intern Med* 2002; 162: 893–900.
- 31 Reid T, Vennelle M, McKinley M, *et al.* Sleep-disordered breathing and idiopathic pulmonary fibrosis. Is there an association? *Sleep Breath* 2015; 19: 719–721.
- 32 McNicholas WT, Bonsignore MR, Lévy P, *et al.* Mild obstructive sleep apnoea: clinical relevance and approaches to management. *Lancet Respir Med* 2016; 4: 826–834.
- 33 Lee JS, Collard HR, Anstrom KJ, *et al.* Anti-acid treatment and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis: an analysis of data from three randomised controlled trials. *Lancet Respir Med* 2013; 1: 369–376.
- 34 Richards TJ, Kaminski N, Baribaud F, *et al.* Peripheral blood proteins predict mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185: 67–76.
- 35 Song JW, Do KH, Jang SJ, *et al.* Blood biomarkers MMP-7 and SP-A: predictors of outcome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2013; 143: 1422–1429.
- 36 El-Solh AA, Mador MJ, Sikka P, *et al.* Adhesion molecules in patients with coronary artery disease and moderate-to-severe obstructive sleep apnea. *Chest* 2002; 121: 1541–1547.
- 37 Nadeem R, Molnar J, Madbouly EM, *et al.* Serum inflammatory markers in obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *J Clin Sleep Med* 2013; 9: 1003–1012.
- 38 Nilsson L, Jonasson L, Nijm J, *et al.* Increased plasma concentration of matrix metalloproteinase-7 in patients with coronary artery disease. *Clin Chem* 2006; 52: 1522–1527.

# **Obstructive sleep apnoea and related comorbidities in incident idiopathic pulmonary fibrosis**

T. Gille, M. Didier, M. Boubaya, L. Moya, A. Sutton, Z. Carton, F. Baran-Marszak,  
D. Sadoun-Danino, D. Israël-Biet, V. Cottin, F. Gagnadoux, B. Crestani, M.-P. d'Ortho,  
P.-Y. Brillet, D. Valeyre, H. Nunes, and C. Planès

## **Online Supplementary Material**

### **Methods:**

**Characteristics of subjects not included in the study:** among the 60 subjects eligible for the study, 49 agreed to participate and signed informed consent, and 11 refused to participate. However, 4 subjects withdrew consent before undergoing overnight polysomnography. Finally, 45 subjects were included in the study and 15 were not. Demographic and pulmonary function testing (PFT) characteristics were comparable in the study population and in the group of not included subjects, except that not included subjects were slightly older than included subjects ( $73.5 \pm 13.5$  versus  $68.8 \pm 8.7$  yrs,  $p=0.02$ ).

**Rules for scoring respiratory events.** Respiratory events were scored by board-certified sleep medicine physicians according to the American Academy of Sleep Medicine 2007 guidelines [27]. Briefly, an obstructive apnoea was defined as a cessation of airflow ( $\geq 90\%$  compared with baseline) lasting at least 10 s in which there was persistence of respiratory efforts. Hypopnoea was defined as a decrease in airflow of 30% to 90% lasting at least 10 s with either an  $O_2$  desaturation  $\geq 3\%$  and/or and EEG arousal. OSA was defined as an AHI  $>$

5 events per hour of sleep. OSA was considered mild if AHI was  $\geq 5/h$  but  $< 15/h$ , moderate if AHI was  $\geq 15/h$  but  $< 30/h$ , and severe if AHI was  $\geq 30/h$ .

**Criteria for acute exacerbation and slow progression in patients with IPF (COFI study):**

*Acute exacerbation of IPF* was defined by the following criteria: (i) rapid worsening of dyspnoea within less than one month, (ii) with a decrease in PaO<sub>2</sub>  $> 10$  mmHg as compared to the results of the previous scheduled visit, (iii) new opacities at HRCT (diffuse ground-glass attenuation or consolidations), (iv) in the absence of infection, heart failure, pulmonary embolism, or other identifiable cause.

*Slow progression of IPF* was defined by the following criteria: (i) significant worsening of lung function (decrease in FVC  $> 10\%$  of predicted value or decrease in DLCO  $> 15\%$  of predicted value) as compared to the results at inclusion, (ii) within more than 6 months, (iii) in the absence of infection, heart failure, pulmonary embolism, or other identifiable cause.

**Supplementary Table E1.** Demographic and PFT characteristics of subjects explored by HRCT.

Characteristics	No OSA or Mild-to-Moderate OSA (AHI<30) [n = 20]	Severe OSA (AHI≥30) [n = 14]	<i>p</i> value
Age yrs	68.6 ± 8.8	68.9 ± 9	0.9
Male/Female	16/4	14/0	0.07
BMI kg.m <sup>-2</sup>	28.1 ± 3.1	28.3 ± 4	0.87
Smoking status n (%)			0.06
Never smoker	8 (40%)	1 (7.1%)	
Former smoker	7 (35%)	10 (71.4%)	
Current smoker	5 (25%)	3 (21.4%)	
AHI events.h <sup>-1</sup>	14.8 ± 7.6	61.9 ± 28.4	<b>&lt; 0.0001</b>
ODI events.h <sup>-1</sup>	7 ± 5.5	52.7 ± 39.6	<b>&lt; 0.0001</b>
FVC %	69 ± 18.6	70.3 ± 13.2	0.83
DLCO %	45.5 ± 21.5	41.2 ± 16.9	0.54

Data are given as means ± SD, or number and %. BMI, body mass index; AHI, apnoea-hypopnoea index; ODI, oxygen desaturation index (≥3%); FVC, forced vital capacity; DLCO, diffusion capacity of carbon monoxide.

**Supplementary Table E2.** Demographic and PFT characteristics of subjects with blood sampling.

Characteristics	No OSA or Mild-to-Moderate OSA (AHI < 30) [n = 18]	Severe OSA (AHI ≥ 30) [n = 11]	p value
Age yrs	67.8 ± 8.6	71.7 ± 10.2	0.27
Male/Female	14/4	11/0	0.09
BMI kg.m <sup>-2</sup>	28 ± 2.1	28 ± 4.2	0.96
Smoking status n(%)			0.21
Never smoker	7 (38.9%)	1 (9.1%)	
Former smoker	7 (38.9%)	7 (63.6%)	
Current smoker	4 (22.2%)	3 (27.3%)	
AHI events.h <sup>-1</sup>	13.9 ± 7.6	56.6 ± 17.6	<b>&lt; 0.0001</b>
ODI events.h <sup>-1</sup>	6.9 ± 75.9	40 ± 20.7	<b>&lt; 0.0001</b>
FVC %	73.5 ± 15.6	79.6 ± 22.4	0.39
DLCO %	47.9 ± 21.5	43.1 ± 18.8	0.55

Data are given as means ± SD, or number and %. BMI, body mass index; AHI, apnoea-hypopnoea index; ODI, oxygen desaturation index (≥3%); FVC, forced vital capacity; DLCO, diffusion capacity of carbon monoxide.

**Supplementary Table E3.** Medical outcomes at 3-year follow-up.

	AHI < 30 [n = 23]	IAH ≥ 30 [n = 17]	<i>p</i> value	IAH ≥ 30 No CPAP [n = 7]	IAH ≥ 30 CPAP [n = 10]	<i>p</i> value
	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
Acute exacerbation of IPF	7 (30.4)	4 (23.5%)	0.63	1 (14.3%)	3 (33.3%)	0.45
Slowly progressive IPF	14 (60.9%)	10 (58.8%)	0.9	3 (42.9%)	7 (70%)	0.26
Pulmonary hypertension	3 (13%)	4 (23.5%)	0.39	1 (14.3%)	3 (33.3%)	0.45
Cardiovascular outcome <sup>†</sup>	4 (17.4%)	5 (29.4%)	0.37	1 (14%)	4 (40%)	0.25

AHI, apnoea-hypopnoea index; CPAP: continuous positive airway pressure therapy.

<sup>†</sup>: including myocardial infarction or acute coronary insufficiency that needed coronary artery bypass surgery or percutaneous transluminal angiography, stroke, cardiac arrhythmia.

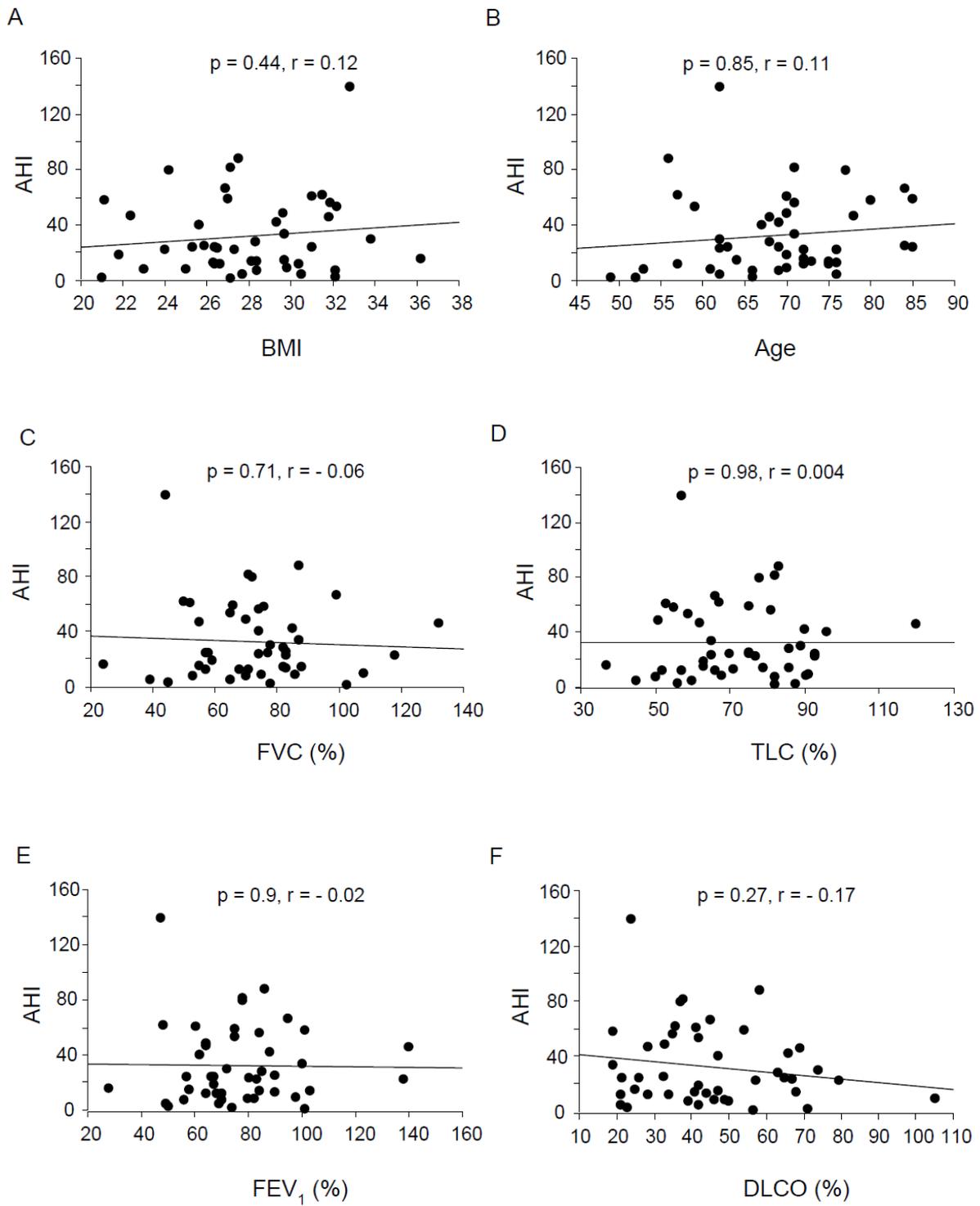
**Supplementary Table E4.** Characteristics at the time of inclusion of subjects with severe OSA treated or not with CPAP, and treatment regimens received during the 3-year follow-up period.

	IAH $\geq$ 30 No CPAP [n = 7]	IAH $\geq$ 30 CPAP [n = 10]	<i>p</i> value
Characteristics at inclusion			
Age yrs	72.7 $\pm$ 11	68 $\pm$ 7	0.30
Male/Female	7/0	9/1	
BMI kg.m <sup>-2</sup>	28.1 $\pm$ 3.9	28.7 $\pm$ 3.7	0.78
AHI events.h <sup>-1</sup>	71.4 $\pm$ 12.9	54.3 $\pm$ 16.6	0.19
ODI events.h <sup>-1</sup>	57.1 $\pm$ 48.8	59.3 $\pm$ 44.8	0.92
FVC %	76.1 $\pm$ 17.8	67.2 $\pm$ 11.6	0.23
DLCO %	36.3 $\pm$ 16.5	44.2 $\pm$ 14.6	0.32
Treatment regimen during follow-up n (%)			
None	1 (14.3%)	3 (30%)	0.45
Prednisone alone	1 (14.3%)	1 (10%)	0.79
Prednisone + IS	1 (14.3%)	0 (0%)	0.22
Prednisone + NAC	1 (14.3%)	0 (0%)	0.21
Prednisone + clinical trial	3 (42.8%)	1 (10%)	0.12
NAC alone	0 (0%)	2 (20%)	0.21
Clinical trial alone	0 (0%)	3 (30%)	0.11
Anti-acid treatment	6 (86%)	9 (90%)	0.79

Data are given as means  $\pm$  SD, or number and %. CPAP: continuous positive airway pressure therapy; BMI, body mass index; AHI, apnoea-hypopnoea index; ODI, oxygen desaturation index ( $\geq$ 3%); FVC, forced vital capacity; DLCO, diffusion capacity of carbon monoxide; NAC: N-acetyl-cystein; IS, immunosuppressive drug; anti-acid treatment including proton-pump inhibitors or histamine-receptor-2 blockers.

**Legend of supplementary Figure S1.** Scatter plots of AHI with BMI (A), age (B), FVC (C), TLC (D), FEV<sub>1</sub> (E) and DLCO (F). Each data point represents one study subject (n=45). Regression lines (black lines) and Pearson correlation coefficients are indicated.

Supplementary Fig S1



**Annexe 2 :**

**Delbrel E, Soumare A, Naguez A, Label R, Bernard O, Bruhat A, Fournoux P, Tremblais G, Marchant D, Gille T, Bernaudin JF, Callard P, Kambouchner M, Martinod E, Valeyre D, Uzunhan Y, Planès C, Boncoeur E. Hypoxia induces Endoplasmic Reticulum stress in Alveolar Epithelial cells: Potential role in Lung Fibrosis. Article soumis à *l'Eur Respir J*.**

(page de garde)

HYPOXIA INDUCES ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS AND CHOP  
EXPRESSION IN ALVEOLAR CELLS: POTENTIAL ROLE IN LUNG FIBROSIS

Eva Delbrel<sup>1</sup>, Abdoulaye Soumare<sup>1</sup>, Adnan Naguez<sup>1</sup>, Rabab Label<sup>1</sup>, Olivier Bernard<sup>1</sup>, Alain Bruhat<sup>3</sup>, Pierre Fafournoux<sup>3</sup>, Geoffrey Tremblais<sup>1</sup>, Dominique Marchant<sup>1</sup>, Thomas Gille<sup>1,2</sup>, Jean-François Bernaudin<sup>1,2,4</sup>, Patrice Callard<sup>4</sup>, Marianne Kambouchner<sup>2</sup>, Emmanuel Martinod<sup>1,2</sup>, Dominique Valeyre<sup>1,2</sup>, Yurdagül Uzunhan<sup>1,2</sup>, Carole Planès<sup>1,2</sup>, Emilie Boncoeur<sup>1</sup>

**Affiliations:** <sup>1</sup>Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire ‘Hypoxie & Poumon’ (EA 2363), F-93017 Bobigny, France. <sup>2</sup>APHP, Hôpital Avicenne, F-93017 Bobigny, France. <sup>3</sup>Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UMR-1019 Nutrition Humaine, Centre INRA Auvergne Rhône-Alpes, Clermont Auvergne Université, 63122 Saint Genès Champanelle, France. <sup>4</sup>Sorbonne Université, Faculté de Médecine, 75013 Paris, France

**Correspondence:** Dr Emilie Boncoeur Laboratoire ‘Hypoxie & Poumon’ (EA 2363) UFR SMBH 74 rue Marcel Cachin F-93017 Bobigny, France [emilie.boncoeur@univ-paris13.fr](mailto:emilie.boncoeur@univ-paris13.fr)  
Phone: (33) 1 48 38 77 19 – Fax: (33) 1 48 38 89 24

Take-home message:

"The ER stress associated CHOP transcription factor is expressed in hypoxic microenvironment and regulated by HIF-1a contributing to alveolar epithelial cell dysfunction in IPF"

**Annexe 3 :**

**Uzunhan Y, Bernard O, Marchant D, Dard N, Vanneaux V, Larghero J, Gille T, Clerici C, Valeyre D, Nunes H, Boncoeur E, Planès C. Mesenchymal stem cells protect from hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. 23 déc 2015;310(5):L439- 51.**

(première page)

## CALL FOR PAPERS | *Translational Research in Acute Lung Injury and Pulmonary Fibrosis*

### Mesenchymal stem cells protect from hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition

Yurdagül Uzunhan,<sup>1,2</sup> Olivier Bernard,<sup>1</sup> Dominique Marchant,<sup>1</sup> Nicolas Dard,<sup>1</sup> Valérie Vanneaux,<sup>3</sup> Jérôme Larghero,<sup>3</sup> Thomas Gille,<sup>1,2</sup> Christine Clerici,<sup>4,5</sup> Dominique Valeyre,<sup>1,2</sup> Hilario Nunes,<sup>1,2</sup> Emilie Boncoeur,<sup>1\*</sup> and Carole Planès<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire Hypoxie & Poumon, Bobigny, France; <sup>2</sup>AP-HP, Hôpital Avicenne, Bobigny, France; <sup>3</sup>AP-HP, Hôpital Saint Louis, Unité de Thérapie Cellulaire et CIC de Biothérapies, Paris, France; <sup>4</sup>Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; <sup>5</sup>Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Inserm U1152, Paris, France; and <sup>5</sup>AP-HP, Hôpital Bichat, Paris, France

Submitted 15 April 2015; accepted in final form 22 December 2015

Uzunhan Y, Bernard O, Marchant D, Dard N, Vanneaux V, Larghero J, Gille T, Clerici C, Valeyre D, Nunes H, Boncoeur E, Planès C. Mesenchymal stem cells protect from hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 310: L439–L451, 2016. First published December 23, 2015; doi:10.1152/ajplung.00117.2015.—Administration of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells (hMSC) reduces lung inflammation, fibrosis, and mortality in animal models of lung injury, by a mechanism not completely understood. We investigated whether hMSC would prevent epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by hypoxia in primary rat alveolar epithelial cell (AEC). In AEC cultured on semipermeable filters, prolonged hypoxic exposure (1.5% O<sub>2</sub> for up to 12 days) induced phenotypic changes consistent with EMT, i.e., a change in cell morphology, a decrease in transepithelial resistance (R<sub>te</sub>) and in the expression of epithelial markers [zonula occludens-1 (ZO-1), E-cadherin, AQP-5, TTF-1], together with an increase in mesenchymal markers [vimentin,  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)]. Expression of transcription factors driving EMT such as SNAIL1, ZEB1, and TWIST1 increased after 2, 24, and 48 h of hypoxia, respectively. Hypoxia also induced TGF- $\beta$ <sub>1</sub> mRNA expression and the secretion of active TGF- $\beta$ <sub>1</sub> in apical medium, and the expression of connective tissue growth factor (CTGF), two inducers of EMT. Coculture of AEC with hMSC partially prevented the decrease in R<sub>te</sub> and in ZO-1, E-cadherin, and TTF-1 expression, and the increase in vimentin expression induced by hypoxia. It also abolished the increase in TGF- $\beta$ <sub>1</sub> expression and in TGF- $\beta$ <sub>1</sub>-induced genes ZEB1, TWIST1, and CTGF. Finally, incubation with human recombinant KGF at a concentration similar to what was measured in hMSC-conditioned media restored the expression of TTF-1 and prevented the increase in TWIST1, TGF- $\beta$ <sub>1</sub>, and CTGF in hypoxic AEC. Our results indicate that hMSC prevent hypoxia-induced alveolar EMT through the paracrine modulation of EMT signaling pathways and suggest that this effect is partly mediated by KGF.

epithelial-mesenchymal transition; alveolar epithelial cells; hypoxia; transforming growth factor- $\beta$ <sub>1</sub>; keratinocyte growth factor

RECENT STUDIES HAVE REPORTED the beneficial effects of bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem (stromal) cell (MSC) in experimental models of acute lung injury (ALI) and pulmonary fibrosis, suggesting the potential interest of MSC in future cell therapies in clinical lung diseases (2, 14, 25–27, 33–35, 42). Intravenous or intra-alveolar administration of MSC attenuates the severity of lung damage, reduces lung inflammation and fibrosis, and increases survival of rodents after bleomycin, endotoxin-induced lung injury, live bacteria, or ventilator-induced injury. The efficacy of MSC therapy has been mostly attributed to paracrine anti-inflammatory, anti-infectious, or immunomodulatory functions (14, 18, 23, 26, 33–34). Interestingly, recent studies reported that MSC could also exert paracrine or juxtacrine protective effects on alveolar epithelial cells (AEC) by ameliorating cell energetic, reducing apoptosis, or restoring vectorial alveolar sodium transport (12, 19, 25, 34). On the basis of previous studies, we and others identified potential soluble factors that could be responsible for the observed beneficial paracrine effects of MSC, such as keratinocyte growth factor (KGF), IL-1 receptor antagonist (IL-1ra), and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (12, 25, 33–34).

The protective effect of MSC (or MSC-conditioned media) on stressed AEC is particularly important because AEC [namely alveolar type 2 (AT2) cells] play a key role in distal lung tissue homeostasis and repair, and because AEC are often altered or dysfunctional during lung injury. When submitted to acute injury like in ALI (6, 31) or to discrete but recurrent microinjuries like in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) (22), AEC may undergo abnormal activation with production of proinflammatory or profibrotic mediators, massive apoptosis, or epithelial-mesenchymal transition (EMT), which lead to inefficient or aberrant alveolar repair and contribute to pulmonary fibrosis. EMT is a cellular process during which epithelial cells transdifferentiate into motile mesenchymal cells while losing their epithelial characteristics (24, 50). This phenotypic switch is mediated by key transcription factors such as SNAIL, zinc-finger E-box binding (ZEB), and basic helix-loop-helix transcription factors including TWIST (24). EMT can be induced in AEC by transforming growth factor- $\beta$ <sub>1</sub> (TGF- $\beta$ <sub>1</sub>) or endothelin-1 and by oxidative stress (10, 20, 21, 53). Indeed, it

\* E. Boncoeur and C. Planès contributed equally to this work.

Address for reprint requests and other correspondence: C. Planès, EA 2363, UFR SMBH, 74 rue Marcel Cachin, F-93017 Bobigny, France (e-mail: carole.planes@avc.aphp.fr).

**Annexe 4 :**

**Goolaerts A, Pellan-Randrianarison N, Larghero J, Vanneaux V, Uzunhan Y, Gille T, Dard N, Planès C, Matthey M, Clerici C. Conditioned media from mesenchymal stromal cells restore sodium transport and preserve epithelial permeability in an in vitro model of acute alveolar injury. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 1 juin 2014;306(11):L975-985.**

(première page)

## CALL FOR PAPERS | *Translational Research in Acute Lung Injury and Pulmonary Fibrosis*

### Conditioned media from mesenchymal stromal cells restore sodium transport and preserve epithelial permeability in an in vitro model of acute alveolar injury

Arnaud Goolaerts,<sup>1</sup> Nadia Pellan-Randrianarison,<sup>1,2</sup> Jérôme Larghero,<sup>2,3</sup> Valérie Vanneaux,<sup>2,3</sup> Yurdagül Uzunhan,<sup>4,5</sup> Thomas Gille,<sup>4,5</sup> Nicolas Dard,<sup>4</sup> Carole Planès,<sup>4,5</sup> Michael A. Matthay,<sup>1,2</sup> and Christine Clerici<sup>1,2,6</sup>

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U773, Paris, France; <sup>2</sup>Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Unité Mixte de Recherche 773 and Unité Mixte de Recherche 940, Paris, France; <sup>3</sup>AP-HP, Hôpital Saint Louis, Unité de Thérapie Cellulaire et CIC de Biothérapies, Paris, France; <sup>4</sup>University Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; <sup>5</sup>Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, EA2363, Bobigny, France; <sup>6</sup>AP-HP, Hôpital Avicenne, Bobigny, France; and <sup>6</sup>AP-HP, Hôpital Bichat, Paris, France

Submitted 4 September 2013; accepted in final form 27 March 2014

Goolaerts A, Pellan-Randrianarison N, Larghero J, Vanneaux V, Uzunhan Y, Gille T, Dard N, Planès C, Matthay MA, Clerici C. Conditioned media from mesenchymal stromal cells restore sodium transport and preserve epithelial permeability in an in vitro model of acute alveolar injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 306: L975–L985, 2014. First published March 28, 2014; doi:10.1152/ajplung.00242.2013.—Mesenchymal stromal cells (MSCs) or their media (MSC-M) were reported to reverse acute lung injury (ALI)-induced decrease of alveolar fluid clearance. To determine the mechanisms by which MSC-M exert their beneficial effects, an in vitro model of alveolar epithelial injury was created by exposing primary rat alveolar epithelial cells (AECs) to hypoxia (3% O<sub>2</sub>) plus cytomix, a combination of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ . MSC-M were collected from human MSCs exposed for 12 h to either normoxia (MSC-M) or to hypoxia plus cytomix (HCYT-MSC-M). This latter condition was used to model the effect of alveolar inflammation and hypoxia on paracrine secretion of MSCs in the injured lung. Comparison of paracrine soluble factors in MSC media showed that the IL-1 receptor antagonist and prostaglandin E<sub>2</sub> were markedly increased while keratinocyte growth factor (KGF) was twofold lower in HCYT-MSC-M compared with MSC-M. In AECs, hypoxia plus cytomix increased protein permeability, reduced amiloride-sensitive short-circuit current (AS-I<sub>sc</sub>), and also decreased the number of  $\alpha$ -epithelial sodium channel ( $\alpha$ -ENaC) subunits in the apical membrane. To test the effects of MSC media, MSC-M and HCYT-MSC-M were added for an additional 12 h to AECs exposed to hypoxia plus cytomix. MSC-M and HCYT-MSC-M completely restored epithelial permeability to normal. MSC-M, but not HCYT-MSC-M, significantly prevented the hypoxia plus cytomix-induced decrease of ENaC activity and restored apical  $\alpha$ -ENaC channels. Interestingly, KGF-deprived MSC-M were unable to restore amiloride-sensitive sodium transport, indicating a possible role for KGF in the beneficial effect of MSC-M. These results indicate that MSC-M may be a preferable therapeutic option for ALI.

growth factors; membrane transport; hypoxia; inflammation; mesenchymal stem cells; sodium channels

ACUTE LUNG INJURY (ALI) IS a major clinical syndrome manifested by an inflammatory response with injury to the lung endothe-

lium and the alveolar epithelium that leads to acute respiratory failure (53). Although mortality has declined with improved supportive care, especially lung protective ventilation and a conservative fluid strategy, the overall mortality of ALI remains high, ~25–40% (51). No pharmacological therapies have yet been found to improve clinical outcomes in ALI (8), thus underscoring the need for novel therapeutic strategies (40).

There has been a rapidly growing interest in the potential value of stem cell therapies as therapeutic approaches in multiple clinical disorders, including myocardial infarction, diabetes, and hepatic and acute renal failure (34). Moreover, recent studies indicate that bone marrow-derived, multipotent mesenchymal (stem) stromal cells (MSCs) have therapeutic efficacy in experimental models of ALI in adult animals. Intravenous or intra-alveolar administration of MSCs attenuates the severity of lung damage, reduces lung inflammation and fibrosis, and increases survival of rats after bleomycin, endotoxin-induced lung injury, and live bacteria or ventilator-induced injury (34, 41, 44). The potential mechanisms through which MSC therapy improves lung function include lung engraftment, anti-inflammatory, or immunomodulatory functions, and antiapoptotic effects (1, 19, 27, 28). However, although MSCs delivered by the intravenous route engraft in mice lungs after bleomycin injury (44), other reports have shown that engraftment of MSCs in the lung is very low (<5%) (9, 21). Interestingly, most studies reported striking protective effects of MSC therapy despite low engraftment rates, supporting the concept that the protective effects may be largely mediated through production of paracrine mediators that constitute the MSC secretome (29, 33, 43). This assumption has been confirmed by another recent study reporting that the cultured medium of MSC themselves can reverse hyperoxia-induced lung injury in a perinatal mouse model (4).

The direct delivery of MSCs for treating acute respiratory distress syndrome (ARDS) is reasonable to test for safety and efficacy in the clinical setting, but if the cultured media of MSCs were as effective as the MSCs themselves, it would be a simpler treatment that might have fewer potential side effects that

Address for reprint requests and other correspondence: C. Clerici, UMR 700 and Dept. of Physiology, 46 Rue Henri Huchard, 75722 Paris Cedex 18, France (e-mail: christine.clerici@bch.aphp.fr).

# RÉSUMÉ

## Réponses des cellules épithéliales alvéolaires à l'hypoxie et à l'hypoxie intermittente

Thomas Gille (travail réalisé sous la direction du Pr Carole Planès)

EA 2363 « Hypoxie et Poumon » (Directrice : Pr Carole Planès), UFR SMBH, Université Paris 13, Bobigny

L'hypoxie alvéolaire est un phénomène fréquent, rencontré dans la plupart des maladies cardio-respiratoires, pouvant perturber le fonctionnement normal des cellules épithéliales alvéolaires (CEA). Notamment, il a été montré que l'hypoxie est responsable d'une altération des capacités de transport vectoriel actif d'ions sodium ( $\text{Na}^+$ ) et d'eau à travers l'épithélium alvéolaire, qui permet de réguler le volume du fluide alvéolaire en conditions physiologiques et de le réabsorber en cas d'œdème pulmonaire. Par ailleurs, chez les patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique (FPI), on observe une forte prévalence du syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS), pourvoyeur d'une hypoxie intermittente chronique (HIC) volontiers sévère. Sur la base d'arguments expérimentaux issus de la littérature scientifique, l'hypothèse a été formulée que l'HIC pourrait participer aux agressions alvéolaires répétées qui sont le point de départ de la FPI, dans laquelle un dérèglement du dialogue entre CEA et fibroblastes aboutit à une réparation aberrante, l'activation anormale des fibroblastes et l'apparition d'une fibrose désorganisant l'architecture pulmonaire. Toutefois, les effets de l'HIC dans ce contexte sont encore très mal connus.

Dans une première partie de ce travail, nous nous sommes intéressés aux effets d'une hypoxie aiguë et sévère (8 %  $\text{O}_2$  pendant 24 h *in vivo* ; 0,5 à 3 %  $\text{O}_2$  pendant 1 à 6 h *in vitro*) sur l'activité du canal sodique épithélial (ENaC), qui constitue la principale porte d'entrée de  $\text{Na}^+$  au pôle apical des CEA. Nous avons confirmé que l'hypoxie induit une diminution rapide, importante et réversible par la terbutaline de l'activité d'ENaC, passant par une diminution de son expression de surface due à une internalisation accrue des canaux exprimés à la membrane, sans modification du *pool* cellulaire total. L'étude *in vivo* et *in vitro* des voies impliquées a montré que cette endocytose accrue est médiée par l'activité de l'ubiquitine-protéine ligase Nedd4-2, et qu'elle était prévenue par un traitement antioxydant (N-acétylcystéine), ce qui laisse suggérer que la génération de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) serait impliquée dans le recrutement de Nedd4-2 en condition hypoxique.

Dans une deuxième étude, des souris C57BL/6J ont été soumises à une double agression alvéolaire avec instillation intratrachéale de bléomycine (3,5 UI/g) ou de sérum physiologique à J0, puis exposition à une hypoxie intermittente (HI) (nadir de  $\text{FiO}_2$  à 6 % ; 40 cycles /h ; 8 h/j) ou à l'air intermittent (AI) pendant 4, 8 ou 21 jours avant sacrifice. Ce modèle a confirmé le rôle délétère de l'HI sur la fibrogenèse pulmonaire car les souris ayant reçu la bléomycine et exposées ensuite à l'HI ont présenté une mortalité 2 fois plus importante que celles laissées en AI, avec majoration de l'inflammation alvéolaire dans la phase précoce (jusqu'à J8) et de la fibrose pulmonaire au temps tardif (J21). Les poumons de ces souris présentaient un déséquilibre de la balance entre molécules oxydantes / enzymes antioxydantes, et une apoptose augmentée des CEA.

Ces données soulignent l'importance des voies de signalisation cellulaire de l'hypoxie en conditions physiologiques et dans la pathogénie des maladies respiratoires.