

# Impact vasculaire et métabolique de l'hypoxie intermittente et de l'obésité dans un modèle murin

Wojciech Trzepizur

► **To cite this version:**

Wojciech Trzepizur. Impact vasculaire et métabolique de l'hypoxie intermittente et de l'obésité dans un modèle murin. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2014. Français. NNT : 2014ANGE0038 . tel-02171682

**HAL Id: tel-02171682**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02171682>**

Submitted on 3 Jul 2019

**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.

# Thèse de Doctorat

Wojciech TRZEPIZUR

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université d'Angers  
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

**Ecole doctorale Biologie Santé**

**Discipline** : Physiologie, Biologie des organismes, populations, interactions

**Spécialité** : Physiologie et physiopathologie humaine

**Unité de recherche**: Laboratoire SOPAM – INSERM U1063

**Soutenue le 15 décembre 2014**

**Thèse N: 1447**

## Impact vasculaire et métabolique de l'hypoxie intermittente et de l'obésité dans un modèle murin

### JURY

Rapporteurs :	<b>Mme Marie-Pia D'ORTHO</b> , Professeur d'université – Praticien Hospitalier, Université Denis Diderot Paris 7 <b>M. Denis ANGOULVANT</b> , Professeur d'université – Praticien Hospitalier, Université François Rabelais de Tours
Examineurs :	<b>M. Bernard MULLER</b> , Professeur d'université, Université de Bordeaux <b>M. Marc-Antoine CUSTAUD</b> , Maître de conférences – Praticien Hospitalier, Université d'Angers
Directeur de Thèse :	<b>M. Frédéric GAGNADOUX</b> , Professeur d'université – Praticien Hospitalier, Université d'Angers
Co-directeur de Thèse :	<b>M. Ramarosan ANDRIANTSITOHAINA</b> , Directeur de Recherche INSERM, HDR, Université d'Angers



# ***1. SOMMAIRE***

<b>1. Sommaire</b>	<b>2</b>
<b>2. Remerciements</b>	<b>7</b>
<b>3. Liste des abréviations</b>	<b>10</b>
<b>4. Liste des figures et tableaux</b>	<b>14</b>
<b>5. Avant-propos</b>	<b>17</b>
<b>6. Données bibliographiques</b>	<b>19</b>
<b>6.1. Syndrome d'apnées hypopnées du sommeil (SAHOS) et pathologie cardiovasculaire (CV)</b>	<b>19</b>
6.1.1. Le SAHOS	19
6.1.1.1. Physiopathologie	19
6.1.1.2. Définition des évènements respiratoires et du SAHOS	20
6.1.1.3. Epidémiologie	21
6.1.2. SAHOS et morbi-mortalité CV	21
6.1.3. SAHOS et fonction endothéliale	24
<b>6.2. Mécanismes de l'atteinte vasculaire, rôle des microparticules</b>	<b>25</b>
6.2.1. SAHOS, HTA et hyperactivité sympathique	25
6.2.2. SAHOS et dysmétabolisme	27
6.2.2.1. SAHOS et métabolisme glucido-lipidique	27
6.2.2.2. SAHOS et NAFLD	27
6.2.2.3. SAHOS et inflammation	28
6.2.2.4. SAHOS et stress oxydant	30
6.2.2.4.1. Stress oxydant et atteintes métaboliques, hépatiques et vasculaires	30
6.2.2.4.2. Stress oxydant et SAHOS	31

6.2.3.	Les microparticules _____	31
6.2.3.1.	Microparticules plaquettaires et SAHOS _____	33
6.2.3.2.	Microparticules leucocytaires (LMPs) et SAHOS _____	33
6.2.3.3.	Microparticules endothéliales (EMPs) _____	34
6.2.3.4.	Le rôle des MPs dans l'atteinte vasculaire du SAHOS _____	36
6.2.4.	Synthèse des éléments bibliographiques issus des études cliniques _____	39
<b>6.3.</b>	<b>Données bibliographiques issues des modèles expérimentaux _____</b>	<b>40</b>
6.3.1.	Les modèles expérimentaux de SAHOS _____	40
6.3.2.	Le modèle d'hypoxie intermittente _____	41
6.3.3.	HI et métabolisme glucidique _____	42
6.3.4.	HI et métabolisme lipidique _____	44
6.3.5.	HI et foie _____	48
6.3.5.1.	HI et inflammation hépatique _____	48
6.3.5.2.	HI et stress oxydant au niveau hépatique _____	49
6.3.5.3.	Impact biochimiques et histologique de l'HI sur le foie _____	49
6.3.6.	HI et vaisseaux _____	51
6.3.6.1.	HI et inflammation vasculaire _____	51
6.3.6.2.	HI et stress oxydant vasculaire _____	52
6.3.6.3.	HI et fonction endothéliale _____	53
6.3.6.4.	HI et fonction contractile vasculaire _____	54
6.3.6.5.	HI et athérosclérose _____	55
<b>7.</b>	<b>Objectifs des travaux _____</b>	<b>57</b>
<b>8.</b>	<b>Matériel et méthodes _____</b>	<b>59</b>
<b>8.1.</b>	<b>Modèles animaux utilisés _____</b>	<b>59</b>
8.1.1.	Souris C57Bl7 _____	59

8.1.2.	Modèle de régime riche en graisse (RRG)	60
8.1.3.	Modèle d'HI	61
<b>8.2.</b>	<b>Dosages sanguins</b>	<b>62</b>
8.2.1.	Glycémie	62
8.2.2.	Insuline, triglycérides, enzymes hépatiques et cholestérol	63
8.2.3.	Les microparticules	63
<b>8.3.</b>	<b>Dosage des triglycérides hépatiques</b>	<b>64</b>
<b>8.4.</b>	<b>Dosage des activités enzymatiques mitochondriales</b>	<b>65</b>
8.4.1.	Réalisation d'un homogénat hépatique	66
8.4.2.	NADH ubiquinone oxydoréductase (complexe I)	66
8.4.3.	Succinate ubiquinone oxydoréductase (complexe II)	67
8.4.4.	Ubiquinol cytochrome c oxydoréductase (complexe III)	68
8.4.5.	Cytochrome c oxydase (complexe IV)	69
8.4.6.	Citrate synthase	70
8.4.7.	Lactate Deshydrogénase	70
8.4.8.	Calcul des activités	71
<b>8.5.</b>	<b>Réactivité vasculaire</b>	<b>72</b>
<b>8.6.</b>	<b>Dosage des radicaux libres par résonance paramagnétique électronique</b>	<b>73</b>
8.6.1.	Principe	73
8.6.2.	Protocole	73
8.6.3.	Analyse des résultats	74
<b>8.7.</b>	<b>Western Blot</b>	<b>74</b>
8.7.1.	Extraction des protéines	74
8.7.2.	Migration sur gel et transfert sur membrane	75
8.7.3.	Marquage immunologique et révélation	75

8.8.	Analyse statistique _____	76
<b>9.</b>	<b>RESULTATS _____</b>	<b>78</b>
9.1.	Poids des animaux et des organes et pris e alimentaire _____	78
9.2.	Bilan glucido-lipidique des animaux _____	81
9.3.	Microparticules _____	82
9.4.	Métabolisme hépatique _____	83
9.5.	Analyse histologique des foies des animaux _____	85
9.6.	Réactivité vasculaire _____	85
<b>10.</b>	<b>DISCUSSION DES RESULATS _____</b>	<b>91</b>
10.1.	Pertinence des modèles expérimentaux au regard de la pathologie humaine _____	91
10.1.1.	Le modèle animal d’HI _____	91
10.1.2.	Le modèle animal de syndrome métabolique _____	95
10.1.3.	L’effet d’HI et du RRG sur la prise alimentaire et la prise de poids _____	96
10.2.	Résultats expérimentaux et liens physiopathologiques _____	98
10.2.1.	Impact des conditions expérimentales sur le bilan glucido-lipidique _____	98
10.2.2.	Impact des conditions expérimentales sur les MPs circulantes _____	100
10.2.3.	Impact des conditions expérimentales sur le foie _____	102
10.2.4.	Impact vasculaire des conditions expérimentales _____	105
<b>11.</b>	<b>Conclusion générale. Perspectives _____</b>	<b>108</b>
<b>12.</b>	<b>Liste des publications des travaux réalisEs aux cours des années de these _____</b>	<b>110</b>
<b>13.</b>	<b>Bibliographie _____</b>	<b>111</b>





## **2. REMERCIEMENTS**

Je tiens à exprimer ma reconnaissance au Professeur Frédéric Gagnadoux qui me guide depuis mes débuts en pneumologie. Merci vivement pour ton soutien constant et ta disponibilité. J'espère que tu trouveras ici, l'expression de ma reconnaissance.

Je souhaite remercier le Dr Ramaroson Andriantsitohaina, qui m'a accueilli dans son laboratoire depuis de nombreuses années et qui a accompagné mes débuts dans la recherche fondamentale. Je te remercie vivement pour tes conseils scientifiques et pour ton soutien pendant ces années de thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur Patrick Levy qui m'a permis de construire et finaliser ce projet en m'ouvrant les portes de son laboratoire. Je suis très reconnaissant pour cet accueil chaleureux et la richesse des rencontres scientifiques.

Je remercie Madame le Professeur Marie-Pia d'Ortho et Monsieur le Professeur Denis Angoulvant d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mes travaux de thèse. Je leur exprime toute ma gratitude pour l'honneur qu'ils font en jugeant ce travail.

Je remercie également Monsieur le Professeur Bernard Muller et le Docteur Marc-Antoine Custaud de me faire l'honneur de participer à ce jury.

Un grand merci au Docteur Carmen Martinez qui m'a toujours réservé un accueil bienveillant depuis mes premiers pas dans la recherche fondamentale. Merci pour ton soutien scientifique, ta grande disponibilité et ta gentillesse.

Je remercie également :

L'ensemble des membres, anciens et présents, de l'unité INSERM U1063 qui ont contribué par leur soutien, leur aide technique et leur bonne humeur à rendre ces années de thèse plus qu'agréables.

Les membres de l'équipe U1042 HP2 de Grenoble qui m'ont toujours réservé un accueil particulièrement chaleureux dans ces nombreux déplacements. Merci particulièrement à Sandrine et Marie pour avoir veillé sur les souris et pour leur aide indispensable lors de ces semaines de manips. Merci à Claire et Christophe pour leur soutien et leur aide scientifique durant ces 4 années. En espérant vous croiser régulièrement et pourquoi pas, retravailler sur d'autres projets à l'avenir.

Merci à Agnès et Pierrot pour votre accueil familial et chaleureux lors de mes séjours isérois. J'admire votre hospitalité et votre capacité à rendre les gens à l'aise dans votre foyer.

Merci à Céline, Naïg et Caroline pour m'avoir initié au dosage des fameux complexes respiratoires.

Un grand merci à tous mes grands relecteurs pour avoir veillé à ce que certaines de mes défauts n'apparaissent pas trop au grand jour. Merci à Martine, Sylvie, Xavier, Andrzej, Mathieu et

Christophe. (Merci également à Marie, Antoine et Laure qui semblaient tout aussi motivés mais qui ont trouvé de bonnes excuses pour se défilier au dernier moment).

Une belle pensée également pour tous mes amis. J'ai beaucoup de chance de vous avoir. Pour les plus anciens, merci d'être toujours là, et n'hésitez pas à relire mes remerciements des travaux passés : tout reste d'actualité, avec deux ou trois enfants en plus. Et merci aux nouveaux qui se reconnaîtront aussi probablement. Les bandes « amap » et « bdc » sont vraiment de très belles rencontres qui m'impressionnent par leurs capacités d'ouverture, d'accueil et de générosité.

Un grand merci à mes parents et toute ma famille. J'aime cette famille qui s'agrandit, qui se transforme dans cette grande diversité qui la rend si belle.

Un grand merci à toi Christophe, pour être présent dans ma vie.

### **3. LISTE DES ABREVIATIONS**

**8-OHdG:** 8-hydroxydeoxyguanosine

**AASM:** American Academy of Sleep Medicine

**Ach:** Acétylcholine

**AF:** Absorbance Finale

**ALAT:** Alanine transaminase

**ASAT:** Aspartate transaminase

**AVC:** Accident Vasculaire Cérébral

**BSA:** Bovin Serum Albumine

**CCL:** C-C chimiokine ligand

**CMH:** 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine

**COX:** Cyclooxygenase

**CRP:** C-Reactive Protein

**CV:** Cardio-Vasculaire

**DCPIP:** Dichlorophenolindophenol

**DETC:** Diethyldithiocarbamate

**DHE:** Dihydroethidium

**DTNB :** Acide 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoïque)

**DS:** Diète Standard

**EMPs :** Microparticules endothéliales

**eNOS :** Endothelial Nitric Oxide Synthase

**ERO** : Espèces Réactives dérivées de l'Oxygène

**FAS** : Fatty Acid Synthase

**FiO<sub>2</sub>**: Fraction Inspirée d'Oxygène

**HEPES**: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

**HI**: Hypoxie Intermittente

**HIF**: Hypoxia-Inducible transcription Factor

**HOMA**: Homeostasis Model Assessment

**HTA**: Hypertension Artérielle

**IAH** : Index d'Apnée Hypopnée

**ICAM-1** : Intercellular Adhesion Molecule-1

**IL** : Interleukine

**IMC** : Index de Masse Corporelle

**I/R**: Ischémie/ Reperfusion

**IRS** : Insulin Receptor Substrate

**LDH** : Lacticodéshydrogénase

**LDL** : Low-Density Lipoprotein

**LMPs** : Microparticules Leucocytaires

**LPL** : Lipoprotéine Lipase

**MCP-1** : Monocyte Chemoattractant Protein-1

**MDA** : Malondialdehyde

**MIP** : Macrophage Inflammatory Protein

**MPO** : Myeloperoxidase

**MPs** : Microparticules

**NADPH** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

**NAFLD** : Non Alcoholic Fatty Liver Disease

**NF- $\kappa$ B** : Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

**NO**: Monoxyde d'azote

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>**: Anion superoxyde

**OAM**: Orthèse d'Avancée Mandibulaire

**PA**: Pression Artérielle

**PECAM**: Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule

**PI3K**: Phosphoinositide 3-Kinase

**PMPs**: Microparticules Plaquettaires

**PPC**: Pression Positive Continue

**PPP**: Plasma Pauvre en Plaquettes

**RANTES**: Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted

**RPE**: Résonance Paramagnétique Electronique

**RRG**: Régime Riche en Graisses

**SAHOS**: Syndrome d'Apnées Hypopnées Obstructives du Sommeil

**SCAP** : SREBP Cleavage-Activating Protein

**SCD-1** : Stearoyl-CoA Desaturase-1

**SHHS** : Sleep Heart Health Study

**SM:** Syndrome Métabolique

**SOD:** Superoxyde Dismutase

**SREBP:** Sterol Regulatory Element-Binding Proteins

**TBARS:** Thiobarbituric Acid Reactive Substances

**TNF- $\alpha$ :** Tumor Necrosis Factor Alpha

**VAS:** Voies Aériennes Supérieures

**VCAM-1:** Vascular Cell Adhesion Molecule-1

**VLDL:** Very Low-Density Lipoprotein

**WSCS:** Wisconsin Sleep Cohort Study

#### **4. LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX**

**Figure 1 :** Représentation schématique des mécanismes par lesquels le syndrome d'apnées-hypopnées du sommeil pourrait contribuer au développement de l'athérosclérose. (D'après LF Drager, Chest 2011)

**Figure 2 :** Illustration des principaux épitopes portés par les microparticules MPs issues des patients présentant un syndrome d'apnées-hypopnées du sommeil

**Figure 3 :** Illustration des principales voies décrites dans l'atteinte vasculaire induite par les microparticules issues des patients présentant un syndrome d'apnées-hypopnées du sommeil

**Figure 4 :** Voies moléculaires régulant de la lipogenèse au niveau des hépatocytes en réponse à l'hypoxie intermittente (D'après Li et al 2006 Physiol Genomics)

**Figure 5 :** Principales voies métaboliques participant à la dérégulation du métabolisme lipidique induite par l'hypoxie intermittente (HI) (D'après Drager 2011 Best Pract Res Clin Endocrinol Metab)

**Figure 6:** Schéma global du protocole représentant l'exposition des animaux aux différentes diètes (diète standard ou régime riche en graisses) et à l'hypoxie intermittente (ou conditions normoxiques).

**Figure 7:** Dispositif d'hypoxie intermittente mimant le SAHOS chez la souris

**Figure 8 :** Courbes représentant l'évolution du poids des animaux pendant les 8 semaines du protocole



**Figure 9 :** Glycémie (a) et insulïnémie (b) à jeun chez les souris normoxiques recevant une diète standard (NO-DS), en hypoxie intermittente recevant une diète standard (HI-DS), normoxiques recevant un régime riche en graisse (NO-RRG) et en hypoxie intermittente recevant un régime riche en graisse (HI-RRG)

**Figure 10:** Taux circulant de microparticules (MPs) chez les souris normoxiques recevant une diète standard (NO-DS), en hypoxie intermittente recevant une diète standard (HI-DS), normoxiques recevant un régime riche en graisse (NO-RRG) et en hypoxie intermittente recevant un régime riche en graisse (HI-RRG)

**Figure 11:** Courbes concentration–réponse à l’acétylcholine réalisées sur des anneaux aortiques issus de souris normoxiques recevant une diète standard (NO-DS), en hypoxie intermittente recevant une diète standard (HI-DS), normoxiques recevant un régime riche en graisse (NO-RRG) et en hypoxie intermittente recevant un régime riche en graisse (HI-RRG)

**Figure 12:** Production de monoxyde d’azote (NO) et de l’anion superoxyde ( $O_2^-$ ) par les aortes issues de souris normoxiques recevant une diète standard (NO-DS), en hypoxie intermittente recevant une diète standard (HI-DS), normoxiques recevant un régime riche en graisse (NO-RRG) et en hypoxie intermittente recevant un régime riche en graisse (HI-RRG)

**Figure 13:** Western Blot réalisés sur des aortes issues de souris normoxiques recevant une diète standard (NO-DS), en hypoxie intermittente recevant une diète standard (HI-DS), normoxiques recevant un régime riche en graisse (NO-RRG) et en hypoxie intermittente recevant un régime riche en graisse (HI-RRG) en utilisant des anticorps dirigés contre la eNOS (a), la phospho-eNOS Ser 1177 (b) et phospho-eNOS Thr 495 (c)

**Figure 14:** Western Blot réalisés sur des aortes (a) et les foies (b) issus de souris normoxiques recevant une diète standard (NO-DS), en hypoxie intermittente recevant une diète standard (HI-DS), normoxiques recevant un régime riche en graisse (NO-RRG) et en hypoxie intermittente recevant un régime riche en graisse (HI-RRG) en utilisant des anticorps dirigés contre HIF1- $\alpha$

**Tableau 1 :** Effet de l'hypoxie intermittente et du régime riche en graisse sur la prise alimentaire, la prise de poids, le métabolisme lipidique, le poids de la graisse épидидymale et du foie et du contenu hépatique en triglycérides

**Tableau 2 :** Activités glycolytiques et mitochondriales dans les homogénats hépatiques

## **5. AVANT-PROPOS**

Nous nous sommes intéressés dans ce travail de thèse à deux aspects des liens complexes entre le syndrome d'apnées hypopnées du sommeil (SAHOS) et les pathologies vasculaires : la place des microparticules (MPs) circulantes dans les mécanismes reliant le SAHOS et la pathologie vasculaire et l'impact respectif du SAHOS et du surpoids dans les atteintes vasculaires et métaboliques décrites dans ce syndrome.

Ce travail a été rendu possible par la mise en place de collaborations avec deux structures de recherche à la fois au niveau local et national.

Nous avons entrepris en 2007 une collaboration entre le service de pneumologie du CHU d'Angers et l'unité INSERM U1063 SOPAM en nous intéressant au rôle que pourrait jouer un nouvel acteur connu pour avoir un impact vasculaire: les MPs. L'expertise de l'unité SOPAM dans le domaine des MPs et l'expertise du laboratoire du sommeil du service de pneumologie dans le domaine du SAHOS a permis de mettre en place une recherche translationnelle, permettant la caractérisation des MPs issus des patients SAHOS, et l'étude de leur impact *in vitro* et *in vivo* au sein de l'unité INSERM. J'ai participé à ce travail à la fois comme clinicien, en recrutant les patients et en confrontant les données fondamentales aux données cliniques, mais également en participant aux expériences de recherches fondamentales sur la caractérisation des MPs et l'étude de leur impact *in vivo*. Les résultats de ces études ont donné lieu à plusieurs publications. Ces travaux ainsi que les données issues des études des autres équipes de recherche travaillant dans le même domaine ont donné lieu à une revue de la littérature publiée cette année dans l'European Respiratory Journal (195) (Annexe 1). Ce travail de thèse a été l'occasion de poursuivre ces investigations sur un modèle animal du SAHOS.

L'état des connaissances actuelles rend difficile l'évaluation de l'impact respectif du SAHOS et du surpoids, qui lui est souvent associé, sur les vaisseaux et les paramètres métaboliques. Le deuxième objectif de ce travail de thèse était donc de s'affranchir de la problématique rencontrée en recherche clinique en utilisant des modèles animaux. Nous avons mis en place ce projet grâce à une collaboration avec l'unité INSERM U1042 HP2 de Grenoble qui a développé un modèle animal de SAHOS consistant à soumettre des rongeurs à des cycles répétés d'hypoxies réoxygénations appelés hypoxie intermittente (HI). Les résultats issus de cette collaboration ont donné lieu à la rédaction d'un manuscrit actuellement en révision dans la revue Plos One (Annexe 2).

Avant d'exposer les résultats de ce travail, vont être détaillés les éléments bibliographiques portant sur le SAHOS et sur ses conséquences vasculaires ainsi que sur les résultats polymorphes des études utilisant les modèles d'HI.

## **6. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES**

### **6.1. Syndrome d'apnées hypopnées du sommeil (SAHOS) et pathologie cardiovasculaire (CV)**

#### **6.1.1. Le SAHOS**

Le SAHOS est un trouble respiratoire survenant au cours du sommeil, caractérisé par la survenue répétée de collapsus des voies aériennes supérieures (VAS) à l'origine d'interruptions (apnées) ou de diminutions (hypopnées) de la ventilation.

##### **6.1.1.1. *Physiopathologie***

Le SAHOS est lié à la présence d'une obstruction intermittente et répétée des VAS pendant le sommeil. Le siège de cette obstruction est principalement situé au niveau du pharynx (voile du palais et/ou en arrière de la base de langue). Les VAS ne sont constituées d'aucune structure rigide offrant ainsi une plus grande susceptibilité à la déformation. Afin d'assurer la rigidité des VAS nécessaire au passage de l'air et lutter contre la pression négative générée par la contraction diaphragmatique à l'inspiration, les muscles dilatateurs des VAS (dont le plus important est le génioglosse) ont la propriété de se contracter quelques millisecondes avant le diaphragme. Le collapsus apparaît lorsqu'il y a déséquilibre entre la force générée par la contraction des muscles dilatateurs du pharynx et la pression négative générée lors de l'inspiration. L'obstruction des VAS peut être favorisée par un grand nombre de facteurs:

-une réduction anatomique du calibre des VAS : macroglossie, hypertrophie amygdalienne ou vélaire, dépôts graisseux sur les parois des VAS, rétrognathie

-une augmentation de la collapsibilité des VAS (en particulier chez les patients obèses)

-une moindre efficacité de contraction des muscles dilatateurs des VAS.

Chaque obstruction pharyngée s'accompagne de la persistance voire de l'augmentation des efforts respiratoires générant ainsi des épisodes répétés de pression intra-thoracique négative, d'une désaturation de l'oxyhémoglobine artérielle, et enfin d'un micro-éveil salvateur de très courte durée (3 à 15 secondes) permettant la reprise ventilatoire. Ces micro-éveils répétés, souvent non perçus par le patient, entraînent une fragmentation du sommeil.

#### *6.1.1.2. Définition des événements respiratoires et du SAHOS*

Apnée obstructive : Une apnée obstructive se définit par une interruption du débit aérien d'au moins 10 secondes avec persistance des efforts respiratoires.

Apnée centrale : Une apnée centrale est définie par une interruption du débit aérien en l'absence d'efforts respiratoires.

Hypopnée : Une hypopnée est défini par une diminution de la ventilation d'au moins 10 secondes s'accompagnant soit d'une réduction du débit aérien d'au moins 50%, soit de moins de 50% mais accompagnée d'une désaturation en oxyhémoglobine d'au moins 3% et/ou un micro-éveil.

Le diagnostic de SAHOS est retenu devant l'association de symptômes cliniques évocateurs, (sommolence, ronflements, nycturie, céphalées matinales) et d'un index d'apnées hypopnées (IAH ; nombre moyen d'apnées et d'hypopnées par heure de sommeil ou d'enregistrement) supérieur ou égale à 5.

La principale information fournie par l'analyse de la polysomnographie (PSG), examen de référence pour le diagnostic de SAHOS est l'IAH qui est un marqueur de sévérité de la maladie et l'outil objectif principal dans la décision thérapeutique. La PSG renseigne néanmoins sur d'autres paramètres utilisés dans les études cliniques parmi lesquels:

-l'index de désaturation (nombre moyen de chute de la saturation en oxyhémoglobine de plus de 3% ou 4% par heure de sommeil ou d'enregistrement), cet index pouvant être différent de l'IAH, toutes les hypopnées enregistrées ne s'accompagnant pas d'une désaturation.

-le temps passé en dessous de 90% de saturation en oxyhémoglobine au cours de l'enregistrement

-le temps de sommeil total

-le nombre de micro-éveils par heure de sommeil.

### *6.1.1.3. Épidémiologie*

Dans l'étude de référence de Young et col. la prévalence du SAHOS, combinant IAH  $\geq 5$  et somnolence diurne, est évaluée à 4 % chez les hommes et de 2 % chez les femmes de 30 à 60 ans (219). Des études récentes estiment à près de 2 millions le nombre de français qui seraient atteints par cette pathologie.

### *6.1.2. SAHOS et morbi-mortalité CV*

Un lien entre les ronflements et la pathologie CV était suspecté avant même la reconnaissance du SAHOS comme entité clinique (107). Dans les années 80 et 90 des études rétrospectives et cas-témoins ont avancé l'hypothèse d'un impact indépendant du SAHOS sur la mortalité et la morbidité CV. Par la suite, des cohortes cliniques et épidémiologiques incluant un grand nombre de patients ont été constituées permettant à la fois un ajustement statistique plus précis et un suivi

longitudinal permettant de préciser l'influence du SAHOS dans l'incidence des évènements CV. La principale difficulté rencontrée par l'ensemble de ces études était la prise en compte des éléments confondants que représentent les facteurs de risques (FRD) CV au premier rang desquels le surpoids.

En 2005 une étude observationnelle portant sur une cohorte clinique de près de 1500 patients et avec un suivi moyen de plus de 10 ans a mis en évidence une augmentation de l'incidence d'évènements CV fatals et non fatals chez les patients présentant un SAHOS sévère par rapports aux autres groupes (113). Cette augmentation d'incidence n'était pas retrouvée dans le groupe sous PPC suggérant que ce traitement de référence ramène le risque CV à un niveau proche des sujets contrôles.

Ces 6 dernières années, les résultats du suivi de plusieurs cohortes épidémiologiques en population générale ont précisé la morbi-mortalité associée au SAHOS. Une première étude rapporte que le SAHOS sévère augmente la mortalité toute cause confondue avec un risque relatif (RR) de 3,0 (95% IC : 1,4-6,3) et la mortalité CV avec un RR de 5,2 (95% IC : 1,4-19,2) (218). Les données d'une deuxième cohorte retrouvent un RR de mortalité de 1.46 (95% IC: 1.14–1.86) après ajustement pour l'ensemble des FDR avec une augmentation significative qui n'est retrouvée que chez les hommes entre 40 et 70 ans (161). Cette année, une étude portant sur une cohorte clinique de plus de 10000 participants investigués pour suspicion de SAHOS s'appuie sur les données issues des bases de données administratives de santé de l'Ontario (Canada). Elle a étudié l'impact du SAHOS sur un critère composite associant l'incidence d'évènements CV et la mortalité toute cause confondue (81). Après ajustement pour l'ensemble des FDR identifiés, cette étude ne retrouve pas d'association indépendante entre ce critère composite et l'IAH ou l'index de désaturation. D'autres marqueurs issus des enregistrements polysomnographiques semblent



plus pertinents comme facteurs prédictifs indépendants: le temps passé en dessous de 90% de saturation, la durée de sommeil, le nombre d'éveils, les mouvements périodiques des jambes, la fréquence cardiaque et la somnolence.

L'impact du SAHOS sur les atteintes vasculaires et cardiaques a également été étudié. Les études transversales montrent une augmentation de la prévalence des cardiopathies dans le SAHOS indépendamment des facteurs confondants avec un odds ratio à 2,38 (IC 95 % 1,22-4,62) pour l'insuffisance cardiaque et 1,27 (IC 95 % 0,99-1,62) pour les coronaropathies (177). Les hommes de moins de 70 ans avec un SAHOS sévère (IAH  $\geq$  30) ont un risque de développer une coronaropathie augmenté de 68 % par rapport aux hommes ayant un IAH  $<$  5 (57). Le SAHOS sévère serait également un FDR indépendant d'AVC. Les données prospectives récentes de la Sleep Heart Health Study démontrent en effet une association indépendante entre la survenue d'AVC et l'IAH chez les hommes et un RR ajusté de 2,86 (IC 95 % 1,1-7,4) d'AVC chez les hommes ayant un IAH  $>$  19/heure (162).

Bien que la très grande majorité des études cliniques rapportent que les sujets SAHOS présentent un pronostic vasculaire et métabolique péjoratif, certains auteurs suggèrent que dans certaines situations cliniques ou dans des groupes de patients sélectionnés, les phénomènes adaptatifs mis en route chez les patients présentant un SAHOS pourraient leur conférer une protection vis-à-vis des évènements CV ou de limiter leur sévérité.

En effet, dans un travail portant sur 611 sujets âgés ( $>$ 65 ans), Lavie et col. retrouvent un taux de mortalité moins important chez les sujets présentant un SAHOS modéré (ID 20-40) par rapport aux sujets ayant un ID  $<$ 20 /h (93). Les sujets âgés avec SAHOS sévère (ID  $>$  40/h) présentaient un risque de mortalité proche des sujets n'ayant pas de SAHOS ou avec un SAHOS léger.

Une étude prospective observationnelle montre que parmi des sujets admis à l'hôpital pour un évènement coronarien aigu, les sujets SAHOS présentait un taux de troponine-T moins élevé que les sujets non SAHOS après ajustement sur l'ensemble des facteurs CV suggérant une taille d'infarctus plus faible (176). Dans une autre étude réalisée chez des patients hospitalisés pour une occlusion coronaire complète, les auteurs ont mis en évidence un réseau vasculaire collatéral plus important chez les patients SAHOS par rapport aux patients non SAHOS (182).

Une grande variabilité interindividuelle dans la régulation de la sécrétion de VEGF en réponse à un stimulus hypoxique ou ischémique est avancée pour expliquer que le SAHOS puisse avoir des effets délétères chez la majeure partie des patients et protecteur dans certains groupes (172).

### 6.1.3. SAHOS et fonction endothéliale

La fonction endothéliale est utilisée dans les investigations cliniques comme marqueur infra-clinique de souffrance vasculaire. Son intérêt comme facteur prédictif indépendant de survenu d'évènements CV a été démontré dans les populations à risque (149). Elle est le plus souvent évaluée en étudiant la capacité des vaisseaux à se dilater après stimulation par des agents pharmacologiques (Ach) ou des moyens mécaniques (augmentation du flux sanguin) connus pour entraîner un relargage, par les cellules endothéliales, de monoxyde d'azote (NO), puissant vasodilatateur.

Plusieurs études cas-témoins ont retrouvé une altération de la fonction endothéliale chez les sujets SAHOS par rapport aux contrôles appariés et un impact positif du traitement par PPC ou OAM sur l'amélioration de celle-ci (67, 193). Deux études randomisées contrôlées contre PPC placebo ont également retrouvé un impact significatif du traitement sur la fonction endothéliale (32, 86).

## **6.2. Mécanismes de l'atteinte vasculaire, rôle des microparticules**

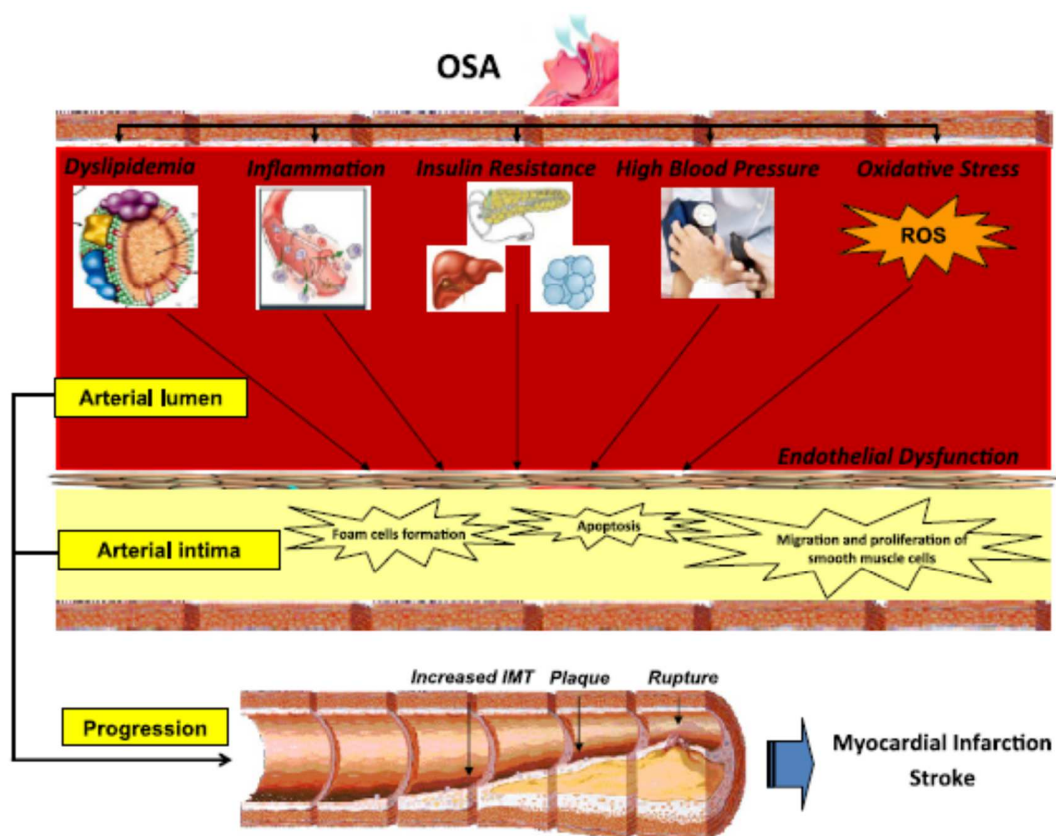
La recherche clinique et translationnelle a permis d'identifier plusieurs facteurs intermédiaires décrits chez les patients présentant un SAHOS et dont le rôle est reconnu dans la genèse ou la progression des pathologies CV et métaboliques. En plus des FDR CV classiques comme le diabète, l'HTA ou la dyslipidémie, ont été proposés : une activation du système nerveux sympathique, une inflammation systémique et un stress oxydant (Figure1). Les études menées au sein de notre laboratoire ont permis d'identifier un mécanisme intermédiaire nouveau : les microparticules.

### **6.2.1. SAHOS, HTA et hyperactivité sympathique**

Une hyperactivité sympathique nocturne et diurne a été décrite dans le SAHOS de longue date (26, 138, 179) ainsi qu'une augmentation des catécholamines plasmatiques et urinaires (53, 114). Celle-ci est favorisée par l'augmentation de la réponse ventilatoire à l'hypoxie et hypercapnie principalement au niveau des chémorécepteurs périphériques (139). En plus d'un effet vasculaire direct favorisant l'HTA et la dysfonction endothéliale, l'hyperactivité sympathique stimule au niveau rénal la sécrétion de rénine qui à son tour augmente les niveaux circulants d'angiotensine II et d'aldostérone (126, 186). Des études randomisées contrôlées ont démontrées que la PPC diminuait l'activité sympathique et le niveau de catécholamines circulantes ou urinaires (87, 122, 223).

Il existe une augmentation de la prévalence de l'HTA chez les sujets qui présentent un SAHOS sévère, indépendamment des autres facteurs de risque avec un OR de 1,37 (IC 95 % 1,03-1,83) (141). Concernant les études d'incidence, les résultats sont plus discordants. Une étude prospective portant sur une cohorte épidémiologique a retrouvé une augmentation du risque de

développer une HTA sur un suivi de 4 ans avec un OR de 2,89 (IC 95 % 1,46-5,64), indépendamment des autres facteurs de risque pour un IAH > 15 (148). Cependant, deux études prospectives plus récentes évaluant l'incidence de l'HTA sur un suivi de 5 ans et de 7,5 ans respectivement dans une cohorte américaine et espagnole sont venues apporter des résultats opposés (25, 144). L'IAH, dans les deux études, n'est pas un facteur de risque de développer une HTA après ajustement sur l'âge et l'index de masse corporelle (IMC).



**Figure 1 :** Représentation schématique des mécanismes par lesquels le syndrome d'apnées hypopnées du sommeil pourrait contribuer au développement de l'athérosclérose. (D'après LF Drager, Chest 2011(41)).

## 6.2.2. SAHOS et dysmétabolisme

### 6.2.2.1. *SAHOS et métabolisme glucido-lipidique*

Il existe une relation indépendante entre le SAHOS et le diabète avec un RR ajusté de 2,3 (IC 95 % 1,28-4,11) chez les sujets ayant un IAH  $\geq 15$  par rapport aux sujets avec un IAH  $< 5$ . Une étude longitudinale récente portant sur une large cohorte clinique retrouve que le SAHOS sévère (IAH $>30/h$ ) augmente le risque de développer un diabète de 30% après ajustement pour l'ensemble des facteurs confondants (82).

Concernant le métabolisme lipidique, les données épidémiologiques montrent une absence d'association entre le SAHOS et le cholestérol total ou le LDL-cholestérol mais une diminution du HDL-cholestérol et une augmentation des triglycérides avec l'IAH croissant (140). Une étude de cohorte clinique récente portant sur 2081 patients investigués pour suspicion de SAHOS a confirmé une association indépendante entre l'index de désaturation d'une part et la diminution du HDL-cholestérol et l'augmentation des triglycérides d'autre part (194).

### 6.2.2.2. *SAHOS et NAFLD*

Une relation indépendante est également suspectée entre le SAHOS et la stéatose hépatique non alcoolique encore appelé « non alcoholic fatty liver disease » (NAFLD) (135). Le NAFLD est l'atteinte hépatique la plus fréquente touchant 30% de la population générale (94). Le NAFLD est reconnu également comme un facteur de risque indépendant vis-à-vis du risque CV (204). Le diagnostic de NAFLD nécessite un prélèvement histologique rendant la réalisation d'études épidémiologiques difficile. Les principales données sont basées sur l'étude de cohortes cliniques qui utilisent des marqueurs biologiques indirects de NAFLD, ou sur des cohortes de patients obèses sujets à une chirurgie bariatrique, chez qui une biopsie hépatique a pu être réalisée en per

opérateur. En 2005, une relation indépendante entre la cytolysé hépatique et le SAHOS a été démontrée sur une cohorte clinique de 163 patients (188). Parmi les patients ayant eu une biopsie, le SAHOS était également un facteur indépendant de stéato-hépatite. Dans une cohorte de 101 patients obèses, la stéatose, l'inflammation et la fibrose hépatique étaient associées de façon indépendante à l'HI, après ajustement sur l'âge, l'obésité et l'insulino-résistance (8). Dans une population plus large de sujets présentant un SAHOS, une relation indépendante a également été observée entre la stéatose hépatique (évaluée par des tests sanguins non invasifs) et l'hypoxémie nocturne (124).

#### 6.2.2.3. *SAHOS et inflammation*

L'inflammation est reconnue comme un mécanisme majeur participant à l'athérogenèse depuis la formation des stries lipidiques jusqu'à la rupture de la plaque (103). De nombreuses études cas-témoins ou portant sur des cohortes cliniques et épidémiologiques ont étudié l'impact du SAHOS sur différents marqueurs d'inflammation, les plus nombreuses et celles ayant inclus le plus grand nombre de patients portent sur la C Réactive Protéine (CRP).

Deux études transversales de grande ampleur, portant sur des sujets japonais, ont retrouvé que l'hypoxie nocturne est un facteur prédictif indépendant d'augmentation de la CRP (133, 213). Ces études étaient cependant limitées par l'utilisation exclusive d'oxymètres comme seul moyen diagnostique du SAHOS. En revanche, parmi les sujets de la Wisconsin Sleep Cohort Study, investigués par PSG, aucune relation indépendante n'a été observée entre la sévérité du SAHOS et les niveaux de CRP après ajustement sur les FDR CV notamment l'IMC (185). L'impact du SAHOS sur le niveau d'IL-6, une chimiokine proinflammatoire produite par le tissu adipeux, est tout aussi discuté. Les mêmes études japonaises suggèrent une relation indépendante entre

SAHOS et niveau d'IL-6 (216), tandis que d'autres auteurs ne retrouvent pas cette association au sein de la Cleveland Family Study (120).

Alors que plusieurs études ouvertes suggèrent un impact de la PPC sur la diminution des marqueurs d'inflammation, aucune étude randomisée contrôlée contre PPC-placebo n'a retrouvé d'impact significatif de la PPC sur ces paramètres (74).

Des études cas-témoins ou sur des cohortes cliniques de faible ampleur ont retrouvé un lien entre le SAHOS et les molécules d'adhésions (VCAM-1 et ICAM-1) (46, 145). Ces molécules favorisent l'interaction entre les leucocytes et l'endothélium vasculaire et seraient associées à une dysfonction endothéliale et un risque CV accru (21, 62).

Enfin, l'inflammation a été recherchée à l'échelle cellulaire principalement sur les cellules circulantes mais également sur des cellules endothéliales veineuses obtenues par grattage endovasculaire. Les polynucléaires neutrophiles issus des patients SAHOS présentent, *in vitro*, une expression accrue de sélectines et une diminution de leur prédisposition à rentrer en apoptose via la voie NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) (45). Une production accrue de cytokines par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> issus de patients SAHOS ainsi qu'une augmentation de leur cytotoxicité ont également été retrouvées (43, 44). D'autres auteurs suggèrent l'implication de la voie de l'acide arachidonique dans l'inflammation vasculaire associée au SAHOS en démontrant une production accrue de leucotriènes par les polynucléaires en culture issus de patients SAHOS et une diminution de cette production après traitement par PPC (96, 181). Une activation de la voie NF- $\kappa$ B a été retrouvée dans les cellules endothéliales veineuses fraîchement prélevées chez des patients SAHOS, chez qui une

dysfonction endothéliale a par ailleurs été documentée (71). Quatre semaines de PPC permettaient de corriger l'ensemble de ces anomalies.

#### 6.2.2.4. *SAHOS et stress oxydant*

##### 6.2.2.4.1. Stress oxydant et atteintes métaboliques, hépatiques et vasculaires

Les ERO sont des atomes ou des molécules possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur l'orbite externe et, par conséquent, sujets aux réactions chimiques (202). La molécule ERO prédominant est le radical superoxyde ( $O_2^-$ ), qui est généré par la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire, principalement au cours de la respiration mitochondriale, mais aussi par plusieurs systèmes enzymatiques, tels que la xanthine oxydase, l'«endothelial Nitric Oxide Synthase» (eNOS) découplée et la «Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADPH) oxydase» (61). L' $O_2^-$  est un radical relativement faible, mais sa réaction avec d'autres molécules peut produire des molécules ERO plus puissantes et plus oxydantes comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le radical hydroxyle ( $OH^\cdot$ ) et des lipides peroxydés. Des radicaux toxiques supplémentaires, telles que le peroxy-nitrite ( $OONO^-$ ), qui est formé par la réaction du  $O_2^-$  avec le principal vasodilatateur, le monoxyde d'azote (NO), contribuent également au stress oxydatif et nitrosatif. Cette réaction se traduit par une diminution de la disponibilité de NO et affecte gravement la fonction endothéliale (18).

Une quantité modérée d'ERO est produite lors du fonctionnement aérobie normal de la cellule. Lorsque l'équilibre est rompu, par augmentation de la production d'ERO ou la diminution de leur dégradation, apparaît alors le stress oxydant. Ces ERO en excès peuvent endommager les différentes biomolécules comme les lipides, les protéines, l'ADN et les carbohydrates et altérer ainsi leurs fonctions biologiques.



L'implication du stress oxydant dans la physiopathologie de très nombreuses pathologies a été avancée: les maladies inflammatoires, le cancer, l'athérosclérose (119) et, plus récemment, le SAHOS.

#### 6.2.2.4.2. Stress oxydant et SAHOS

Les données concernant le stress oxydant dans le SAHOS sont issues d'études cas-témoins et de cohortes cliniques limitées. Un relargage plus important d'ERO par les leucocytes issus de patients SAHOS a été retrouvé (44, 174). Des taux plus élevés de lipides peroxydés ont été retrouvés chez les patients SAHOS par rapport aux sujets contrôles (17, 92). Dans une cohorte clinique portant sur 128 patients pris en charge pour une suspicion de SAHOS, les sujets ayant un SAHOS sévère avaient des taux urinaires de 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) (marqueur du stress oxydant urinaire) plus élevés que les sujets n'ayant pas de SAHOS sévère (IAH<30/h) et une corrélation positive était retrouvée entre le taux de 8-OHdG et l'index de désaturation indépendamment des autres facteurs connus pour influencer le stress oxydant (212).

Les études interventionnelles (non randomisées) suggèrent une diminution du stress oxydant sous PPC (17, 92) et OAM (68). Une seule étude randomisée contrôlée s'est intéressée à l'impact du traitement sur le 8-isoprostane et montre un résultat positif (à noter que l'étude n'a pas été réalisée en intention de traiter mais n'a inclus que les patients observants pour la PPC) (5).

#### 6.2.3. Les microparticules

Les microparticules (MPs) sont des vésicules à contenu cytoplasmique, libérées à partir d'un bourgeonnement membranaire des cellules de la paroi vasculaire et des cellules circulantes sous l'influence de différents stimuli comme l'activation cellulaire, le flux sanguin ou l'apoptose (116). Les MPs se définissent par leur taille comprise entre 0,1 et 1µm et la composition de leur

membrane, riche en phospholipides chargés négativement, en particulier la phosphatidylsérine. Leur composition dépend à la fois de leur cellule d'origine et du stimulus impliqué dans leur genèse. Les MPs peuvent contenir des protéines membranaires et cytosoliques, des facteurs de transcription, du matériel génétique comme des ARN ribosomiaux, messenger et des microARN ainsi que des lipides et organelles provenant de leur cellule d'origine (24). Les MPs peuvent interagir avec leur cellule cible par différentes voies. Les ligands portés par les MPs peuvent interagir directement avec les récepteurs de la cellule cible. Les membranes des MPs peuvent fusionner avec les membranes plasmiques aboutissant ainsi au transfert des composants membranaires et au relargage du contenu cytoplasmique des MPs à l'intérieur de la cellule. Enfin, les MPs peuvent être phagocytées par la cellule cible (47). Toutes ces interactions peuvent aboutir à l'activation ou l'inhibition de voies métaboliques intracellulaires ou à une modification du phénotype cellulaire (200).

Les MPs sont détectables dans le sang chez les sujets sains, en dehors de toute situation pathologique. Néanmoins, des taux élevés de MPs sont retrouvés dans de nombreuses pathologies CV (117), l'hypertension artérielle pulmonaire (199), le diabète (166), les maladies inflammatoires ou cancéreuses (130). Initialement perçues comme des marqueurs circulants de l'atteinte vasculaire, les MPs constituent en réalité, des effecteurs cellulaires susceptibles de moduler de nombreuses fonctions biologiques. Des travaux menés par des membres de l'équipe de l'unité INSERM U1063 ont permis de démontrer l'implication des MPs comme médiatrices et effectrices sur la régulation de la tonicité vasculaire et de la fonction endothéliale (115).

Au cours des dernières années, une collaboration entre le service de pneumologie et l'unité INSERM U1063 a permis de mener plusieurs études sur l'expression des MPs dans le SAHOS et sur les conséquences des MPs *in vitro* et *in vivo*.

### **6.2.3.1. Microparticules plaquettaires et SAHOS**

Les PMPs représentent plus de 60% des MPs circulantes. La présence de glycoprotéines spécifiques de plaquettes et de mégacaryocytes comme CD41, CD62P (P-sélectine), CD 42b ou CD61 permet leur identification. Les résultats concernant les taux circulants de PMPs chez les patients SAHOS sont disparates. Geiser et col. retrouvent une activation plaquettaire à 4 heures du matin chez les patients SAHOS sans pour autant constater de modification des taux de PMPs (55). L'étude cas-témoins réalisée par notre équipe qui a apparié les groupes sur l'âge, l'IMC et les facteurs de risque CV n'a pas montré de différence significative sur les PMPs CD41+ et sur les CD62P+ (issues des plaquettes activées) (160). A contrario, 3 autres études cas-témoins rapportent des augmentations des PMPs (CD31+/CD41+ et CD41+/AV+ PMP) chez les sujets SAHOS et une corrélation positive entre les PMPs circulants et la sévérité du SAHOS (10, 84, 118). Muryama et col. retrouvent une diminution des PMPs sous PPC (118). Par contre, dans une étude randomisée proposant un arrêt de traitement par PPC de 15j chez des patients observant au préalable, aucun impact sur les taux de PMPs n'était noté (12). Les résultats divergents peuvent s'expliquer par des différences techniques dans l'isolation et le comptage des MPs mais également par des divergences dans les critères d'inclusions des patients. Dans l'étude cas-témoin de Maryama, les patients et les témoins n'étaient pas parfaitement appariés pour l'IMC et les facteurs de risque CV. Dans l'étude d'Ayers et col, les patients avait un IMC élevé, 40% étaient hypertendus, et 10% avaient des coronaropathies, facteurs confondants connus pour entraîner une augmentation des PMPs (1).

### **6.2.3.2. Microparticules leucocytaires (LMPs) et SAHOS**

Les LMPs peuvent provenir de l'ensemble des leucocytes: neutrophiles, monocytes, lymphocytes T et B. Les marqueurs caractéristiques d'une origine leucocytaire sont : le CD45 pour les LMPs

issues de l'ensemble des leucocytes, le CD66b pour les LMPs issues des granulocytes, le CD11B pour les LMPs issues des monocytes, granulocytes, macrophages et lymphocytes « natural killer » et le CD62L pour les leucocytes activés.

Toutes les études publiées sur le sujet retrouvent une augmentation des LMPs chez les SAHOS par rapport aux sujets contrôles. Des niveaux élevés de LMPs CD11b+ et CD45+ ont été retrouvés chez des enfants présentant un SAHOS modéré à sévère et le niveau de LMPs CD11b+ corrélait positivement avec la sévérité du SAHOS ( $r=0,0334$ ,  $p<0,001$ ) (Kim). Des niveaux élevés de LMPs CD45+ ont été retrouvés chez des patients présentant un SAHOS peu symptomatique (10). Notre équipe a également retrouvé une augmentation des LMPs d'origine granulocytaires (CD66b+) et des leucocytes activés (CD62L+) chez des patients présentant des désaturations marquées ainsi qu'une corrélation positive entre les LMPs CD62L+ et l'index de désaturation (160). De plus, dans une étude s'intéressant aux différences de taux des MPs entre le soir et le matin, nous avons observé une diminution des LMPs CD62L+ au cours de la nuit chez les sujets contrôles qui contrastait avec une augmentation de ce niveau chez les SAHOS modérés à sévères (196). Enfin, dans l'essai randomisé d'arrêt transitoire de traitement, Ayers et col. ont démontré une augmentation des LMPs CD66b+ après arrêt de la PPC pendant 2 semaines (12). L'ensemble de ces résultats est en faveur d'un lien direct entre le SAHOS et le relargage des LMPs au cours de la nuit.

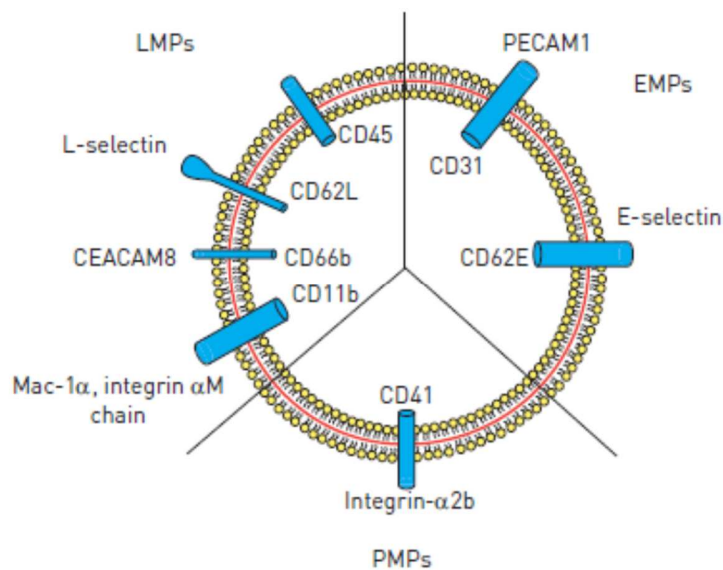
#### 6.2.3.3. *Microparticules endothéliales (EMPs)*

Les marqueurs de surface caractéristiques des EMPs sont nombreux mais souvent peu spécifiques. Pour outrepasser ces difficultés, des stratégies utilisant des combinaisons de plusieurs anticorps multicolores ont été proposées. Les épitopes utilisés sont CD146 (S-endo),

CD31 (Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1, PECAM-1) le plus souvent associés à l'absence de marqueur plaquettaire (CD41- ou CD42b-) et CD62E+ (E-sélective) pour les EMPs issues des cellules endothéliales activées.

Trois études rapportent une augmentation des EMPs dans le SAHOS (70, 84, 221). Jelic et col. retrouvent des taux d'EMPs CD31+/CD42b- quatre fois plus élevés chez les SAHOS par rapport aux sujets contrôles appariés, une corrélation négative entre ce taux et la fonction endothéliale des patients investigués par la vasodilatation médiée par le flux et une diminution après traitement par PPC (70). Dans une seconde étude, le taux de EMPs CD31+/CD42b- est corrélé positivement avec à la fois l'IAH et l'épaisseur intima-media (221). L'arrêt de PPC s'accompagne d'une augmentation des EMPs CD62E+ (issues des cellules endothéliales activées) sans modification des EMPs CD31+/CD41-(12).

A contrario, deux autres études ne retrouvent pas de modification des taux d'EMPs CD146+ et CD31+/CD41- (118, 160). CD146+ est un marqueur constitutif des cellules endothéliales alors que le CD31+ et le CD62E sont associés à l'apoptose ou l'activation cellulaire respectivement. Le CD146 peut donc s'avérer moins sensible que les autres marqueurs pour détecter des modifications précoces. La seconde étude négative portait sur des sujets peu symptomatiques qui présentent d'après certains auteurs, une atteinte vasculaire moins marquée (16, 129) ce qui pourrait expliquer ces résultats divergents.



**Figure 2:** Illustration des principaux épitopes portés par les microparticules (MPs) issues des patients présentant un syndrome d'apnées-hypopnées du sommeil. LMP: MPs d'origine leucocytaire, EMPs: MPs d'origine endothéliale, PMPs: MPs d'origine plaquettaire, CEACAM: carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule; Mac-1: macrophage antigen-1; PECAM: platelet endothelial cell adhesion molecule.

#### 6.2.3.4. *Le rôle des MPs dans l'atteinte vasculaire du SAHOS*

En plus de la caractérisation des MPs dans le SAHOS, notre équipe a réalisé plusieurs études translationnelles en s'intéressant à l'impact vasculaire des MPs issues de patients SAHOS. Ces MPs ont été ré-injectées à des souris permettant d'étudier leur effet *in vitro* et *ex vivo* notamment sur aorte isolée après sacrifice. L'impact des MPs issues de patients SAHOS a également été investigué *in vivo*. Ces MPs ont été incubées avec des cellules endothéliales et leurs effets ont été comparés aux effets des MPS issues de sujets contrôles appariés sur l'âge, le BMI et les facteurs de risque CV.

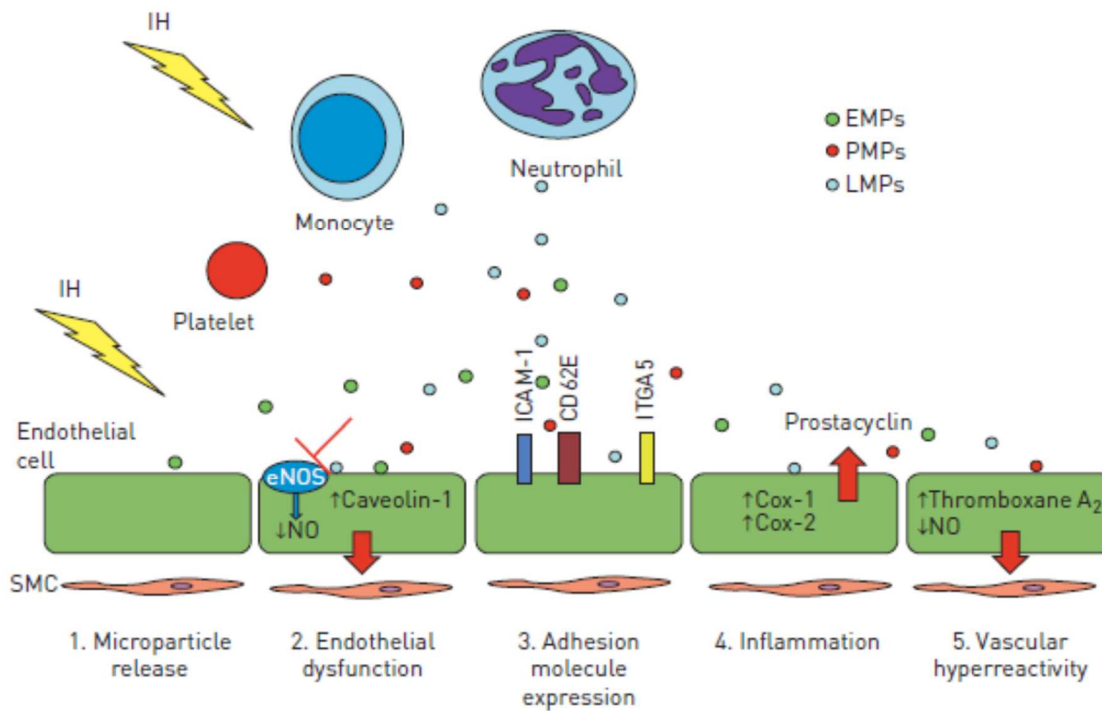
### *SAHOS, MPs et inflammation vasculaire*

Les travaux issus de notre équipe montrent que les MPs sont impliquées dans cette inflammation dépendante des COX. L'incubation de cellules endothéliales avec les MPs issues de patients entraînait une augmentation de l'expression de molécules pro-inflammatoires (CD62E, Cox-2, ICAM-1) (160). L'injection de MPs issues de patients SAHOS aux souris induit une surexpression aortique de COX-1 et de COX-2 et une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires dans le surnageant de ces aortes *ex-vivo* (thromboxane A2, prostacycline, prostaglandine E2) (197).

### *SAHOS, MPs et fonction vasculaire*

Nous avons démontré que les MPs issues de patients SAHOS entraînaient une dysfonction endothéliale à la fois au niveau aortique et au niveau des artères mésentériques. Ces MPs diminuaient la production *in vitro* de NO par des cellules endothéliales en augmentant la phosphorylation de la eNOS sur son site inhibiteur et en augmentant l'expression de la caveoline-1 qui peut séquestrer la eNOS au niveau de la membrane cytoplasmique et diminuer ainsi son activité (160).

L'implication des MPs dans la réponse contractile des vaisseaux a également été étudiée. L'injection de MPs issues de patients SAHOS à des souris entraînait *ex-vivo* une hypercontractilité vasculaire à la sérotonine (5-HT) (197) lorsque l'endothélium était présent et fonctionnel et une hyporéactivité lorsque l'endothélium était enlevé. Cette hyperréactivité était prévenue en présence d'inhibiteur de l'eNOS et de la COX suggérant l'implication de ces deux voies métaboliques dans l'hyper-réactivité vasculaire induite par les MPs issues de patients SAHOS.



**Figure 3:** Illustration des principales voies décrites dans l'atteinte vasculaire induite par les microparticules (MPs) issues des patients présentant un syndrome d'apnée hypopnée du sommeil (SAHOS). 1) Le SAHOS induit une hypoxie intermittente (HI) qui peut stimuler la libération de MPs dérivées des plaquettes (PMPs), des MPs dérivées de l'endothélium (EMPs) et des MPs provenant de leucocytes (LMPs). 2) Les MPs circulantes interagissent avec les cellules endothéliales et contribuent à altérer la fonction endothéliale en augmentant la phosphorylation de la synthase d'oxyde nitrique endothéliale (eNOS) sur son site inhibiteur et l'induction de l'expression de la cavéoline-1. 3) Les MPs favorisent les interactions intercellulaires en augmentant l'expression des molécules d'adhésion vasculaire: la molécule d'adhésion intercellulaire (ICAM) -1, CD62E (E-sélectine) et l'intégrine α5 (ATG5). 4) Les MPs favorisent l'inflammation vasculaire en augmentant l'expression de la cyclooxygénase (Cox) et la sécrétion de prostacycline. 5) Les MPs entraînent l'hyperreactivité vasculaire en réduisant la production



d'oxyde nitrique (NO) et en favorisant la production d'agents vasoconstricteurs. SMC: cellules musculaires lisses.

#### *SAHOS, MPs et angiogenèse*

Un impact du SAHOS sur l'angiogenèse a été retrouvé, avec une augmentation des collatérales coronaires chez les sujets SAHOS (182) et une augmentation du VEGF, principal facteur pro-angiogénique (173). Nous avons testé l'impact des MPS issues des patients SAHOS sur l'angiogenèse (Annexe 3) (198). Le SAHOS augmente la quantité de VEGF portée par les MPs circulantes. Les MPs issues des patients SAHOS augmentent, *in vitro*, la prolifération des cellules endothéliales, leur capacité à produire des capillaires sur un milieu adapté (Matrigel®) et la quantité d'endothelin-1 produite dans le surnageant. Cette augmentation des capacités pro-angiogéniques induite par les MPs issues des patients SAHOS est prévenue en présence d'un antagoniste de l'endothelin-1. Les MPs issues des patients SAHOS ont donc des capacités pro-angiogéniques via une modulation du secrétome des cellules endothéliales.

#### 6.2.4. Synthèse des éléments bibliographiques issus des études cliniques

Alors que les premières études cas-témoins suggéraient un impact fort et indépendamment du SAHOS sur la pathologie CV, les données issues du suivi des grandes cohortes suggèrent un impact moins marqué, avec des significativités retrouvées principalement dans des analyses post-hoc portant sur la population masculine d'âge intermédiaire. Le suivi de cohortes laisse supposer un impact positif de la PPC sur la morbi-mortalité CV. La réalisation d'études contrôlées randomisées prolongées n'est pas réalisable actuellement pour des raisons éthiques au vu des bénéfices déjà reconnus par ailleurs de la PPC. Un impact significatif de la PPC a été démontré dans des études plus courtes sur l'HTA, la dysfonction endothéliale et l'activité sympathique.

L'impact de la PPC a également été testé sur des biomarqueurs CV intermédiaires (stress oxydant, inflammation) et les paramètres glucido-lipidiques mais son efficacité n'est à ce jour pas retrouvée lorsque les essais sont randomisés contre PPC placebo (74). Dans une étude récente, l'impact d'un programme de perte de poids s'avère plus efficace que la PPC sur la diminution de la CRP et l'amélioration des paramètres métaboliques. De plus, l'association PPC-perte de poids n'améliore pas d'avantage les paramètres testés par rapport à la perte de poids seule en dehors d'un impact plus marqué sur la diminution de la PA (29).

La question de la contribution respective de l'obésité et du SAHOS dans la morbi-mortalité CV reste donc ouverte sur la base des données cliniques. Or, en pratique clinique le SAHOS et l'obésité ainsi que ses complications regroupées dans le syndrome métabolique (SM) sont très souvent présents chez les mêmes patients. En effet, 60 % des patients présentant un syndrome métabolique ont un SAHOS associé (40).

La recherche fondamentale utilisant des modèles animaux d'obésité et de SAHOS a permis de s'affranchir de cette problématique rencontrée dans la recherche clinique et de cibler spécifiquement leurs impacts respectifs sur les différents paramètres CV ainsi que sur les mécanismes intermédiaires suspectés.

### **6.3. Données bibliographiques issues des modèles expérimentaux**

#### **6.3.1. Les modèles expérimentaux de SAHOS**

De nombreux modèles animaux ont été proposés pour mimer le SAHOS. Il existe un modèle naturel décrit en 1987 par Hendricks et col : le bulldog anglais (64). Il présente un élargissement du voile du palais et une étroitesse de l'oropharynx. Ce modèle reproduit l'ensemble des aspects de la pathologie humaine allant des désaturations nocturnes à la somnolence excessive. Par la

suite, différents modèles chirurgicaux ont été proposés comme les animaux trachéotomisés permettant des obstructions cycliques de la sonde de trachéostomie (146, 154) ou bien des animaux chez qui l'obstruction partielle est favorisée par injection de collagène au niveau de la base de la langue ou du pharynx (151). Initialement décrit en 1992 par Fletcher et col, le modèle d'HI intermittente s'est progressivement imposé pour investiguer les conséquences du SAHOS (52).

### 6.3.2. Le modèle d'hypoxie intermittente

Le principe est d'exposer des animaux à des cycles d'hypoxie-réoxygénation. Les animaux de grande taille (porcelet), sont le plus souvent ventilés au masque, les animaux de petite taille (rongeurs) étant placés dans une cage ou une chambre à flux contrôlé. Un modèle d'HI de plus grand volume adapté à l'homme a également été développé permettant d'exposer des sujets sains (187). Dans les trois cas, le principe est de faire respirer de façon intermittente un air enrichi en azote afin de créer une hypoxie (la fraction en oxygène varie le plus souvent entre 5% et 10%), en alternance avec de l'oxygène ou de l'air pour la phase de réoxygénation. La durée des phases hypoxiques et normoxiques, de même que la pente de la diminution et de l'augmentation de la  $FiO_2$  sont conditionnées par la taille de l'enceinte, le flux de gaz et le type de mélange gazeux. Des animaux « contrôles » sont classiquement placés dans le même type d'enceinte et exposés à des flux similaires assurant des niveaux comparables de bruit et de turbulence liés à la circulation du gaz.

La durée de l'exposition à l'HI, la fréquence des cycles et l'importance de la chute de la désaturation varient d'une étude à l'autre, rendant difficiles les comparaisons entre les résultats. Les durées d'exposition sont variables de 4h/j (78) à 12h/j (85), voir 24h sur 24h (104). Le plus souvent, l'HI est appliquée durant la journée pour se rapprocher le plus possible des phases de

sommeil des rongeurs. La fréquence des désaturations varie de 1 cycle /h (58) jusqu'à 60 cycles/min (6, 158). De plus, certaines équipes proposent un modèle qui permet, lors des phases d'hypoxie, l'adjonction de CO<sub>2</sub> pour compenser l'hyperventilation induite par l'hypoxie (80).

Le modèle d'HI présente pour principal avantage d'être applicable aux rongeurs, animaux qui, par leur taille, disponibilité, coût, et par le nombre important de modèles transgéniques sont les plus utilisés dans les laboratoires de recherche. Sa justification comme modèle d'étude des complications associées au SAHOS vient des études cliniques et épidémiologiques qui ont permis d'identifier le rôle prépondérant de l'HI, représentée par l'index de désaturation en pratique clinique, dans la morbi-mortalité attribuable au SAHOS. En effet, dans une étude portant sur 51 patients présentant un OSA avec un IAH>15, Cross et col. ont retrouvé une altération de la fonction endothéliale plus marquée chez les patients présentant des désaturations marquées par rapport aux patients non désaturateurs (32). Dans une vaste étude épidémiologique prospective portant sur 6441 sujets, l'index de désaturation était indépendamment associé à la mortalité toutes causes confondues (161). Cette association n'était pas trouvée avec l'index de micro-éveils. Dans une autre étude, la sévérité des désaturations nocturnes représentait le meilleur facteur prédictif de l'épaisseur de la paroi carotidienne et de la présence de plaques d'athérosclérose (14). La capacité de ce modèle à reproduire chez l'animal la majorité des perturbations métaboliques et vasculaires identifiées dans les études cliniques est venue conforter la pertinence du modèle d'HI dans la recherche fondamentale sur le SAHOS.

### 6.3.3. HI et métabolisme glucidique

Les données concernant l'impact de l'HI sur la sensibilité à l'insuline sont hétérogènes. Elles dépendent du stimulus d'HI appliqué, de la durée d'exposition et du modèle animal utilisé (souris mutée, diète riche en graisse, diète riche en cholestérol).

Une courte durée d'HI induit une insulino-résistance dès 9 heures de stimulus lorsque les mesures biochimiques sont réalisées au cours de l'exposition (65). Par contre, si les investigations sont réalisées chez des souris exposées à 5 jours d'HI mais les prélèvements réalisés plusieurs heures après l'arrêt du stimulus, on constate un rebond de sensibilité à l'insuline avec une diminution de la glycémie à jeun sans modification des taux d'insuline aboutissant à une franche diminution de l'index HOMA (156). Une amélioration de la tolérance au glucose était également notée dans ces mêmes conditions expérimentales.

A contrario, une exposition plus prolongée de 4 semaines ou plus à l'HI induit une insulino-résistance avec augmentation modérée de la glycémie à jeun, augmentation plus marquée de l'insulinémie, et altération de la tolérance au glucose quel que soit le moment du prélèvement (168). Cette insulino-résistance est réversible 7 jours après l'arrêt du stimulus (155). Des expériences d'HI menées chez le volontaire sain ont pu confirmer l'impact de l'HI sur la tolérance au glucose chez l'homme (106).

Les modèles d'HI portant sur des souris génétiquement obèses (ob-/ob-) (156) ou recevant un RRG (38) démontrent que les effets de l'HI et de l'RRG sont synergiques sur l'insulino-résistance avec principalement une augmentation majeure de l'insulinémie sans modification de la glycémie traduisant une insulino-résistance débutante, et ce, dès 5 jours d'HI. Par contre, lorsque le RRG et l'HI sont poursuivis simultanément sur une longue période (12 semaines), on note une nette diminution du niveau d'insulinémie sans modification de la glycémie à jeun (169). L'impact important de ces deux stimuli sur la diminution de la prise pondérale est avancé par les auteurs pour expliquer ces résultats.

Les mécanismes à l'origine de l'insulino-résistance induite par l'HI ont pu être précisés. L'HI active le système nerveux sympathique (15) qui induit une lipolyse par l'augmentation de différentes lipases (hormone sensitive lipase) (222). Cette lipolyse entraîne une augmentation des acides gras libres (38). Ces mêmes augmentations de lipolyses et d'acides gras libres accompagnent l'obésité (77). Les acides gras libres s'accumulent au niveau des muscles périphériques et du foie entraînant une lipotoxicité (201). Les acides gras libres diminuent la phosphorylation du récepteur à l'insuline « insulin receptor substrate » (IRS)-1 (muscle) et IRS-2 (foie) diminuant ainsi le transport du glucose stimulé par l'insuline et entraînant donc une insulino-résistance (33). L'augmentation du niveau des catécholamines secondaires à l'activation du système nerveux sympathique peut participer à l'insulino-résistance en augmentant la néoglucogénèse et la glycogénolyse. De même, le stress induit par l'HI augmente le niveau de cortisone sérique dans les premières semaines d'exposition (65). Cette augmentation n'est pas plus retrouvée après 4 semaines d'HI témoignant d'une probable adaptation de l'animal au stress engendré par l'exposition (38).

#### 6.3.4. HI et métabolisme lipidique

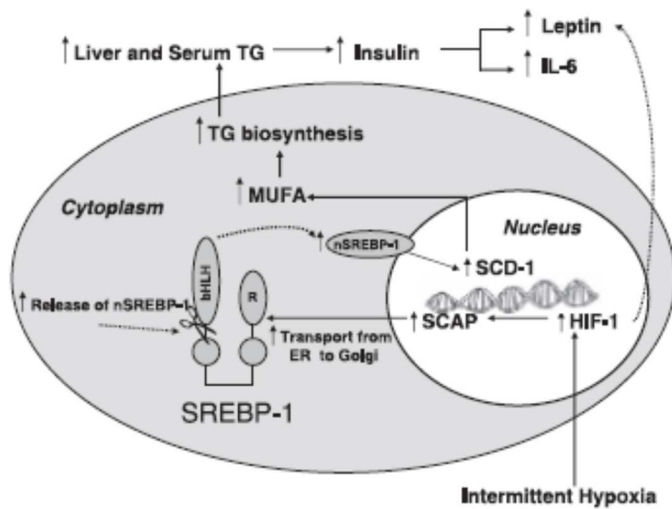
Dans les différentes études sur les niveaux de lipides circulants, l'HI appliquée pendant 5 jours à 12 semaines augmente les niveaux de cholestérol total, de triglycérides et de phospholipides chez les souris recevant un régime normal (102) (101) ainsi que chez les animaux déficitaires pour l'apoprotéine E (7, 75). Le niveau de LDL augmentent pour des durées d'HI prolongées (12 semaines) (168, 169).

Chez les animaux génétiquement obèses (ob-/ob-), l'HI ne modifie pas les niveaux de lipides circulants (99). Chez les animaux soumis au RRG et à l'HI de façon concomitante, l'impact de l'HI semble faible ou nul à 12 semaines (169) ou à 6 mois d'HI (168). Par contre l'impact semble

plus marqué chez les animaux rendus obèse par un RRG puis exposés secondairement à l'HI (38, 39). L'impact prononcé de l'HI sur le métabolisme énergétique globale des animaux soumis à l'HI, avec une diminution de la prise de poids généralement constatée sous HI malgré une prise alimentaire préservée a pu contribuer à ces résultats divergents.

Les mécanismes impliqués dans ces modifications du métabolisme lipidique ont pu être précisés. Des données suggèrent à la fois une augmentation de la lipolyse périphérique, une biosynthèse lipidique accrue en particulier au niveau hépatique et une diminution de la clairance lipidique au niveau de la graisse. Comme détaillé plus haut, l'HI entraîne une augmentation du tonus sympathique (15) induisant ainsi une lipolyse périphérique (90). L'augmentation des acides gras libres décrits dans les études précédentes pourrait relever de ce mécanisme. Par ailleurs, une surexpression des SREBP-1 et de SCD-1 dans le foie a été décrite (100). SREBP est un facteur de transcription présent au niveau des hépatocytes mais également dans les adipocytes ou encore les cellules musculaires, impliqué dans la régulation de nombreuses protéines participant au métabolisme lipidique: l'acetyl coenzyme A (CoA) carboxylase (108) et la SCD-1 (184). La SCD-1 est une molécule qui contrôle la synthèse d'acides gras monoinsaturés qui forment le substrat nécessaire à la synthèse des triglycérides (143). Cette surexpression de SCD-1 et de SREBP-1 était prévenue chez des souris hétérozygote mutées sur HIF-1 $\alpha$  (98). HIF-1 pourrait agir en activant la protéine SREBP cleavage-activating protein (SCAP) dont le promoteur du gène contient un site de liaison d'HIF-1 (137). En effet, SCAP est surexprimée après stimulation par l'HI et cette surexpression est prévenue partiellement chez les souris mutées HIF-1 (98). Finalement Li et col. proposent le schéma suivant (Figure 4) : l'HI induit une surexpression de HIF-1 qui active l'expression de SCAP. SCAP facilite le transport de SREBP-1 du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi ou SREBP est clivé par des protéases spécifiques pour

obtenir sa forme active. SREBP-1 active SCD-1 qui participent à la synthèse accrue d'acides gras monoinsaturés, substrats pour la synthèse des triglycérides avec pour conséquence, une augmentation des triglycérides hépatiques et circulants.

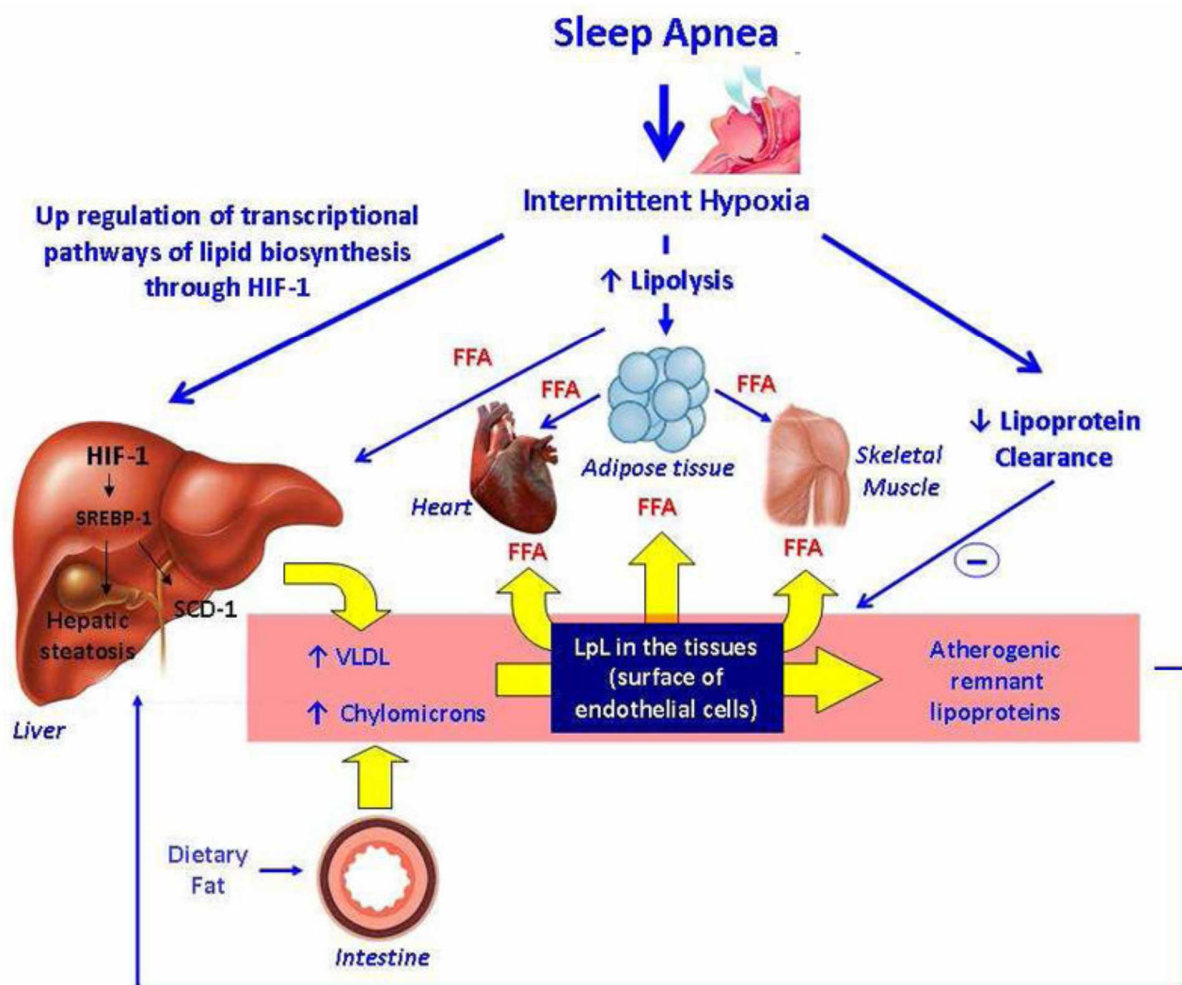


**Figure 4 :** Voies moléculaires régulant de la lipogenèse au niveau des hépatocytes en réponse à l'hypoxie intermittente (D'après Li et al 2006(98)). ER reticulum endoplasmique; MUFA, acides gras monoinsaturés; bHLH, domaine terminal NH2 de SREBP; R, domaine terminal COOH de SREBP.

Une altération de la clairance lipidique induite par l'HI a également été suggérée très récemment. Le gavage des animaux soumis à l'HI par du retinyl-palmitate s'accompagne d'une altération de la clairance des esters de retinyl témoignant d'une altération de la clairance des chylomicrons (39). De plus, l'HI diminue de façon drastique l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL) au niveau de la graisse épidydydale sans modification de l'ARNm correspondant et avec une diminution modérée de l'expression protéique suggérant une régulation post-transcriptionnelle. La LPL est l'enzyme, situé au niveau de l'endothélium du tissu graisseux, qui permet l'hydrolyse des



triglycérides des lipoprotéines plasmatiques: chylomicrons et « Very low-density lipoprotein » (VLDL). Cette hydrolyse est l'étape clé avant leur intégration dans les adipocytes. L'HI s'accompagne également d'une surexpression de l'angiopoietin-like protein 4 (Angptl4), un inhibiteur post transcriptionnel de la LPL (42, 217). L'absence de modification des lipides circulants chez des souris traitées par des anticorps anti Angptl4 et soumis à l'HI renforcent l'hypothèse d'une altération de la clairance lipidique induite par l'HI via la voie LPL-Angptl4 dans les perturbations lipidiques induites par l'HI (214).



**Figure 5 :** Principales voies métaboliques participant à la dérégulation du métabolisme lipidique induite par l'hypoxie intermittente (HI) (D'après Drager 2010 (37)). L'HI entraîne une augmentation de l'expression de HIF-1 qui active SREBP-1 et SCD-1 augmentant ainsi la stéatose hépatique et une augmentation de la sécrétion de lipoprotéines. L'HI augmente la lipolyse au niveau du tissu adipeux augmentant l'afflux d'acides gras libres au niveau hépatique. L'HI inhibe la clairance des lipoprotéines. FFA: Free Fatty Acids, HIF-1: Hypoxia inducible factor 1, SREBP1: Sterol regulatory element binding protein 1, SCD-1: Stearoyl coenzyme A desaturase 1.

### 6.3.5. HI et foie

#### 6.3.5.1. *HI et inflammation hépatique*

Globalement, le niveau d'inflammation hépatique induit par l'HI dépend à la fois de la durée d'exposition mais également des conditions expérimentales associées (diète riche en graisse, modifications génétiques proposant des animaux déficitaires pour la leptine).

Quatre semaines d'HI n'avaient aucun impact sur les niveaux de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 tissulaire hépatique avec même une tendance à une diminution du niveau de MCP-1 (171). Pour des durées plus longues (12 semaines d'HI) une augmentation du niveau d'expression de Nf- $\kappa$ B hépatique a été notée en dehors de toute modification de diète (170).

En revanche, quatre semaines d'HI augmentaient de façon prononcée l'expression de TNF- $\alpha$  et de « macrophage inflammatory protein-2 » (MIP-2) chez des souris préalablement rendues obèses par 12 semaines de RRG (38). De même, six mois d'HI et de RRG appliqués de façon concomitante augmentent le niveau d'IL-1 $\beta$ , IL-6, MIP-2 et TNF- $\alpha$  par rapport aux animaux soumis au RRG seul (168). Ces modifications moléculaires s'accompagnaient d'une modification

histologique avec une inflammation hépatique accrue caractérisée par une infiltration lymphocytaire.

A contrario, dans une étude utilisant une exposition beaucoup plus courte (12 heures) l'HI augmentait l'expression de TNF- $\alpha$  hépatique chez les souris sous régime normal mais diminuait cette expression chez les souris soumises à un RRG (163).

#### ***6.3.5.2. HI et stress oxydant au niveau hépatique***

Les données concernant le stress oxydant au niveau hépatique chez les souris recevant un régime standard sont homogènes. Douze heures (163), 4 semaines (76, 101, 171) et 12 semaines (170) d'HI augmentent les taux de MDA hépatiques.

Les données concernant l'effet de l'HI sur le stress oxydant au niveau hépatique chez des animaux soumis à un RRG sont plus disparates. Drager et col. ne retrouvent aucun changement dans le niveau des MDA hépatiques après 4 semaines d'HI chez des animaux soumis à un régime normal mais une très nette augmentation chez les souris rendues obèses au préalable par 12 d'HI (38). De même, 6 mois de RRG et de HI appliqués de façon concomitante augmentent de façon modérée le niveau de MDA et de myeloperoxydase hépatique (MPO) (168) par rapport au RRG seul.

A contrario, une très courte exposition à l'HI (12 heures) prévient l'augmentation du niveau de MDA observée chez les souris obèses (163).

#### ***6.3.5.3. Impact biochimiques et histologique de l'HI sur le foie***

Des anomalies moléculaires et biochimiques précoces ont été décrites chez les animaux soumis à l'HI. Cinq jours d'HI augmentent le contenu hépatique en triglycérides sans modifier son

contenu en cholestérol ou en phospholipides et augmentent l'expression de la Sterol Regulatory Element-Binding Proteins-1 (SREBP-1) et de la stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1), gènes impliqués dans la lipogenèse (102). Cette accumulation est prévue chez les souris mutée pour l'Hypoxia-inducible transcription factor-1  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) suggérant l'implication d'HIF-1 $\alpha$  dans l'accumulation lipidique hépatique induite par l'HI (98). A 12 semaine d'HI, le contenu hépatique en triglycérides n'était pas modifié, le contenu en glycogène était fortement augmenté et une augmentation sérique des alanine transaminases (ALAT) était notée (170). Ces modifications biochimiques avaient des répercussions histologiques modestes avec un léger ballonnement hépatocellulaire, une raréfaction du cytoplasme et une augmentation du contenu en glycogène évalué par le PAS.

L'impact hépatique de l'HI sur des souris rendues obèses soit par modification génétique ou par un RRG a également été étudié. Chez des souris déficientes pour la leptine (ob-/ob-) et donc prédisposées à l'obésité, 12 semaines d'HI ont également accrue les contenus en triglycérides, et augmenté l'expression de gènes impliqués dans la lipogenèse comme SREBP-1 et SCD-1 et SCD-2 (99). Les souris soumises à 3 à 9 mois d'HI et de RRG (*vs* RRG seul) présentaient au niveau hépatique des marqueurs de stress oxydant, d'inflammation, une augmentation du contenu hépatique en cholestérol et une augmentation des ASAT et ALAT (38, 168, 206). Les deux groupes présentaient une stéatose hépatique microvésiculaire modérée mais le groupe soumis à l'HI présentait des dépôts graisseux plus marqués au niveau de la zone 3 des hépatocytes soit, des différences très modestes.

### 6.3.6. HI et vaisseaux

#### 6.3.6.1. HI et inflammation vasculaire

Les études portant sur les modèles animaux de SAHOS ont permis de s'intéresser plus précisément à l'inflammation tissulaire vasculaire. Dans un modèle de rat soumis à l'HI, il a été mis en évidence une augmentation des interactions entre les leucocytes et les cellules endothéliales et une augmentation du « rolling » leucocytaire par rapport aux animaux contrôles (136). L'HI est associée à une activation des lymphocytes T de la paroi vasculaire, l'expression de ICAM-1, un rolling leucocytaire, des signes précoces de remodelage vasculaire avec épaissement de l'épaisseur intima-media et une surexpression de la chémokine « Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted » (RANTES)/C-C Chemokine Ligand 5 (CCL5) et une infiltration leucocytaire au niveau de la paroi vasculaire (6). Une activation de NF- $\kappa$ B a été retrouvée au niveau des vaisseaux et du cœur de souris soumises à l'HI (60) ainsi que dans un modèle *in vitro* soumettant des cellules endothéliales à l'HI (165). De plus, le processus athérosclérotique induit par l'HI semble ralenti lorsque l'on expose des souris présentant une délétion pour la sous-unité p50 de NF- $\kappa$ B et nourris par un régime riche en graisse (RRG) (180).

Une implication de la voie des COX dans l'inflammation vasculaire du SAHOS a également été suggérée. Huit semaines d'HI entraînent, au niveau du tissu aortique de souris Apo E<sup>-/-</sup>, une surexpression de la COX-1 et de la thromboxane synthétase, enzyme impliquée dans le métabolisme de l'acide arachidonique dépendant de la COX (54). Cette suractivation transcriptionnelle corrèle positivement avec l'augmentation des lésions athérosclérotiques, suggérant l'implication de cette voie dans le processus athérogène induit par l'HI (54).

### 6.3.6.2. *HI et stress oxydant vasculaire*

L'effet de l'HI sur le stress oxydant au niveau vasculaire sont discordants. En 2005, des études d'HI avec des cycles longs (30min/30min) et une courte durée d'exposition ont été menées *ex-vivo* sur des artères cérébrales de rats et retrouvaient une augmentation des ERO après stimulation par l'ajout de NADPH (209). Par la suite, l'équipe d'Albuquerque (Nouveau Mexique) a démontré un impact de l'HI sur le niveau d'ERO vasculaire (192). Leurs études retrouvent une augmentation du stress oxydant au niveau des vaisseaux mésentériques et de l'aorte après 2 semaines d'HI. A contrario, l'équipe de Baltimore du Pr Polotsky a publié deux études négatives sur l'impact de 1, 4 et 12 semaines d'HI sur le niveau de stress oxydant vasculaire à la fois chez des souris C57Bl/6 et chez des souris ApoE<sup>-/-</sup> (75, 76) avec même une tendance à la baisse du niveau de ERO au niveau aortique. Mise à part les différences portant sur les durées d'exposition et les souches génétiques animales utilisées, il existe une différence notable entre les deux équipes sur le modèle d'HI utilisé. Le premier modèle, appelé modèle « eucapnique » permet d'administrer lors des phases d'hypoxie, du dioxyde de carbone, faisant passer le taux de  $\pm 0\%$  lorsque la  $FiO_2$  est à 20% à 5% lorsque la  $FiO_2$  est à 5%. Ce modèle permet une reproduction plus fidèle des modifications métaboliques constatées lors des apnées. Le deuxième modèle fait varier le taux d' $O_2$  sans compensation en  $CO_2$ . La réponse physiologique à l'hypoxémie étant l'hyperventilation, les rongeurs soumis à ce stimulus présentent des hypocapnies transitoires. Or, des différences sur le système CV ont été décrites entre les deux modèles, avec des effets plus marqués dans le modèle « eucapnique » (50). Ces différences méthodologiques peuvent participer aux résultats contradictoires sur le stress oxydant systémique et vasculaire retrouvés dans la littérature.

### 6.3.6.3. *HI et fonction endothéliale*

L'inflammation et les stress oxydant sont deux processus physiopathologiques majeurs incriminés dans l'altération des vaisseaux en particulier des cellules endothéliales. Les résultats très disparates décrits dans les chapitres précédents en fonction des durées d'HI et des conditions associées (notamment le RRG et les modèles génétiques) se retrouvent lorsqu'on s'intéresse à la fonction endothéliale des animaux soumis à l'HI.

Les petites artères de résistances, étudiées essentiellement chez le rat, semblent les plus sensibles à l'HI. En 2005, les études d'HI avec des cycles longs (30min/30min) et une courte durée d'exposition menées *ex-vivo* sur des artères cérébrales de rats retrouvaient une dysfonction endothéliale par activation de la NADPH oxydase et par une possible activation de la voie Nf-kB (209). Dans un protocole d'HI avec cycles de 4 min et une FiO<sub>2</sub> minimale de 10%, la vasodilatation induite par l'ACh au niveau des artères du muscle gracilis était diminuée à partir de 14 j d'HI (152). Cette dysfonction était prévenue par l'allopurinol suggérant l'implication de la xanthine oxydase (35) et par le losartan, suggérant également l'implication du système rénine-angiotensine dans sa genèse (112). Quatorze jours d'HI diminuent la vasodilatation induite par l'ACh au niveau des artères du muscle gracilis et de l'artère cérébrale moyenne (153). Une altération de la fonction endothéliale a également été mise en évidence sur des artères mésentériques de rats soumis pendant 2 semaines à l'HI (183). Dans cette même étude, les animaux soumis en plus à un RRG pendant 6 semaines ne présentaient pas d'altération supplémentaire de la fonction endothéliale par rapport à l'HI seule.

A contrario, 35 jours d'HI n'ont eu aucun impact sur la fonction endothéliale au niveau de l'aorte, de la carotide et du lit mésentérique (95) chez le rat et au niveau des artères de l'arrière-train chez la souris anesthésiée (34). Une étude très récente ne retrouve pas d'effet de 6

semaines d'HI sur la fonction endothéliale aortique de souris recevant un régime normal mais une dysfonction endothéliale lorsque l'exposition à l'HI est accompagnée d'un RRG pendant la même période (13). Dans cette étude, les auteurs notent une augmentation du stress oxydant (MDA) et de l'inflammation systémique (CRP) dans le groupe présentant la dysfonction endothéliale sans modification de l'expression de l'ARNm de la eNOS.

L'expression de la eNOS au niveau des artères mésentériques et de l'aorte a également été étudiée chez des souris soumises à 1 à 8 semaines d'HI (205). Dans cette étude, les 4 premières semaines d'HI n'ont pas d'impact sur cette expression. Une diminution de l'expression de la eNOS apparaît à la 5<sup>ème</sup> semaine et s'accompagne d'une dysfonction endothéliale. L'analyse mécanistique retrouve une stimulation de NF- $\kappa$ B qui a son tour active TNF- $\alpha$  qui diminue l'expression de l'eNOS.

#### *6.3.6.4. HI et fonction contractile vasculaire*

Les données concernant la réponse vasculaire aux agents vasoconstrictifs chez les animaux soumis à l'HI montrent globalement une augmentation de celle-ci qui est cependant variable et inconstante en fonction de l'agent vasoconstrictif utilisé. Plusieurs études retrouvent une vasoconstriction plus marquée à l'endothéline au niveau de la carotide (95), des coronaires (19) et artères mésentériques (2) chez les animaux soumis à l'HI. De plus, des taux plasmatiques accrus d'endothéline ont été retrouvés chez des rats soumis à l'HI (80) ainsi qu'une surexpression des récepteurs à l'endothéline ET-A et ET-B au niveau mésentérique (3) et myocardique (19). L'augmentation de la vasoconstriction induite par l'endothéline chez des rats soumis à l'HI a été prévenue par l'administration d'indométacine, suggérant une implication de la voie des COX (95).



Enfin le système rénine-angiotensine-aldostérone a également été étudié chez les animaux soumis à l'HI. Dès 1999, son implication était évoquée dans les travaux retrouvant une augmentation de la pression artérielle (PA) chez les animaux soumis à l'HI (51). Des rats exposés à l'HI présentaient des taux plus élevés d'angiotensine II circulante (220). L'effet de l'angiotensine II sur la vasoconstriction étudiée *ex vivo*, sur des vaisseaux issus d'animaux soumis à l'HI est cependant peu différent des animaux contrôles. L'exposition chronique à un niveau d'activité sympathique élevé induit par l'HI (91) et à des taux élevés d'angiotensine II qui s'en suit peuvent diminuer la sensibilité vasculaire à cet agoniste et contribuer à diminuer son effet sur les mesures *ex-vivo*.

#### 6.3.6.5. *HI et athérosclérose*

-Remodelage précoce : Des modifications précoces vasculaires ont été décrites chez des animaux soumis à 3 heures d'apnées (animaux trachéotomisés) avec une augmentation du rolling leucocytaire et une augmentation de l'adhésion leucocytaire à la paroi endothéliale (136). Quatorze jours d'HI ont augmenté l'épaisseur intima-média aortique, ont altéré les fibres élastiques, ont augmenté les dépôts mucoïdes, provoqué une hypertrophie des cellules musculaires lisses et une infiltration lymphocytaire adventicielle et peri-adventicielle (6).

-Remodelage tardif : Les premiers travaux démontrant un lien direct entre l'HI et l'athérosclérose ont été réalisés en 2007 par l'équipe de Baltimore du Pr Polotsky (169). L'HI seule, appliquée pendant une période prolongée de 12 semaines n'entraînait pas de lésions athérosclérotiques. Par contre, les souris recevant pendant la même période une alimentation riche en graisse présentaient des plaques d'athérosclérose marquées. Par la suite, des animaux transgéniques,

prompts à l'athérosclérose ont été utilisés. Ainsi deux études ont démontré l'implication de l'HI dans l'athérosclérose induite chez des souris Apo E -/- après 4 à 12 semaines d'HI (7, 75).

## **7. OBJECTIFS DES TRAVAUX**

L'objectif de ce travail est d'étudier l'impact respectif de l'obésité, du SAHOS et des deux conditions réunies sur le profil vasculaire et métabolique en utilisant des modèles animaux. L'utilisation du modèle animale est justifiée par les difficultés rencontrées en pratique clinique où l'obésité et le SAHOS sont très souvent associés rendant le travail analytique difficile. De plus, le modèle animal nous permet d'accéder en plus des dosages sanguins à des études à l'échelle tissulaire.

Le modèle de SAHOS est celui de l'HI détaillé dans l'introduction. Le modèle animal d'obésité est obtenu en proposant une alimentation riche en graisse aux souris.

Comme détaillé dans l'introduction, ces deux modèles ont déjà été utilisés avec des durées d'exposition prolongées pour démontrer un impact synergique de l'HI et des perturbations métaboliques sur l'athérosclérose.

Nous avons choisi de nous intéresser à une étape plus précoce de l'atteinte vasculaire en ciblant la dysfonction endothéliale. Pour cela, nous avons choisi des durées d'exposition aux deux conditions expérimentales moins longues. Ainsi, nous avons utilisé un modèle animal de dysmétabolisme obtenu en proposant une alimentation riche en graisse pendant 6 semaines, modèle dans lequel une dysfonction endothéliale a déjà été démontrée. Nous l'avons comparé à un modèle animal du SAHOS obtenu en exposant des souris à deux semaines d'HI, modèle dans lequel des modifications histologiques et moléculaires au niveau aortique étaient identifiées laissant supposer une dysfonction endothéliale. Ces deux conditions expérimentales ont été appliquées dans un troisième groupe d'animaux afin d'étudier un impact supplémentaire lorsque

les modèles étaient associés. Enfin, un quatrième groupe recevant un régime standard et restant dans des conditions normoxiques représentait le groupe contrôle.

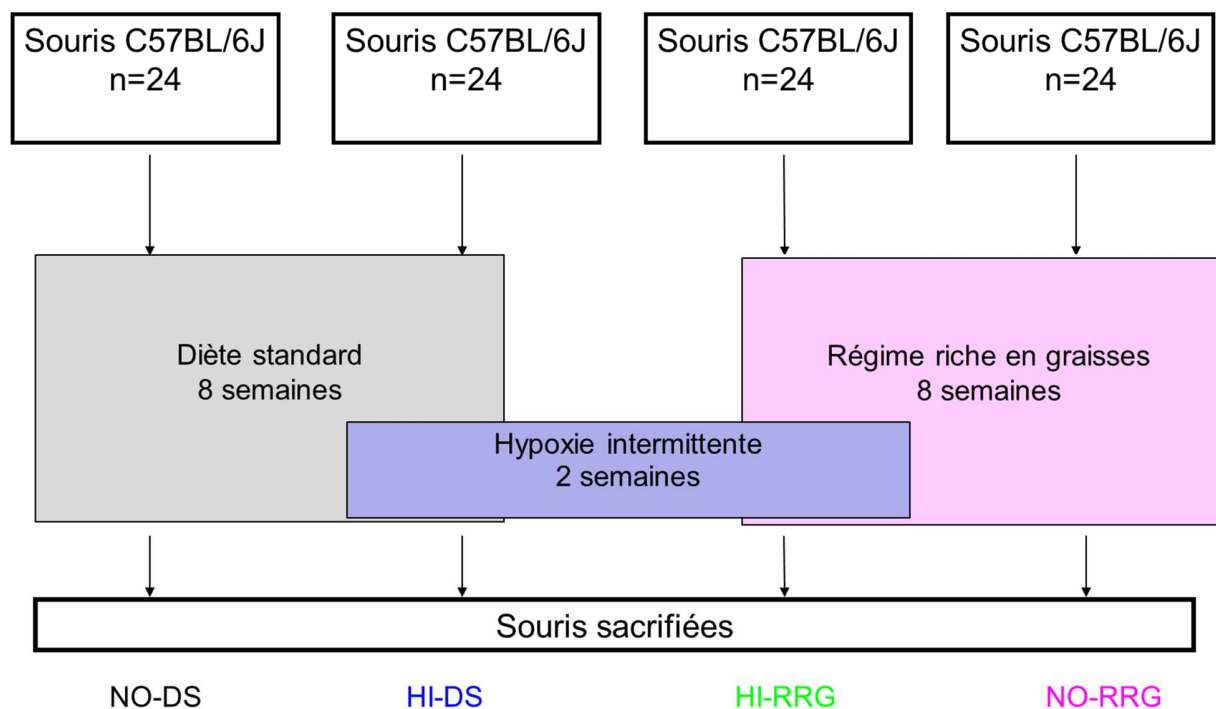
L'objectif principale de ce travail était d'étudier l'impact spécifique de l'HI, d'un RRG et des deux conditions réunies sur la fonction endothéliale, le profil métabolique et hépatique des animaux.

## **8. MATERIEL ET METHODES**

### **8.1. Modèles animaux utilisés**

#### 8.1.1. Souris C57Bl7

Des souris de souche CD7Bl6J mâles provenant du laboratoire Janvier ont été utilisées dans ce protocole. Cette souche de souris permet l'expression d'un grand nombre de mutations, d'où son utilisation fréquente comme fond génétique des modèles transgéniques. Il s'agit de la souche génétique la plus fréquemment utilisée dans l'expérimentation animale. Les souris étaient livrées à l'âge de 7 semaines à l'animalerie et une semaine était laissée pour permettre aux animaux de s'acclimater. A partir de la 8<sup>ème</sup> et jusqu'à la 16<sup>ème</sup> semaine de vie, la nourriture des animaux était contrôlée : la moitié des animaux recevait un régime riche en graisse (RRG) et l'autre moitié recevait une diète standard (DS). De la 14<sup>ème</sup> à la 16<sup>ème</sup> semaine de vie, les animaux des deux groupes étaient à nouveau partagés en deux groupes : une première moitié était soumise à l'HI l'autre moitié restait dans des conditions normoxiques. Quatre groupes d'animaux étaient ainsi obtenus : groupe normoxique recevant une diète standard (NO-DS), groupe hypoxie intermittente- diète standard (HI-DS), groupe normoxique recevant un régime riche en graisse (NO-RRG), groupe hypoxie intermittente recevant un régime riche en graisse (HI-RRG). La prise alimentaire moyenne par groupe (les animaux étaient regroupés par 4 dans les cages) ainsi que le poids des animaux étaient mesurés toutes les semaines. Les animaux étaient laissés à jeun pendant les 8 heures précédant le sacrifice.



**Figure 6 :** Schéma globale du protocole représentant l'exposition des animaux aux différentes diètes (diète standard ou régime riche en graisses) et à l'hypoxie intermittente (ou conditions normoxiques).

Les animaux étaient anesthésiés par injection sous-cutanée de pentobarbital et du sang a été prélevé en intra-cardiaque. Puis, les animaux étaient sacrifiés par exsanguination. Les organes étaient prélevés immédiatement et congelés dans l'azote liquide ou mis dans des solutions spécifiques pour les analyses fonctionnelles. Des échantillons de foie étaient directement conservés dans du formol pour l'analyse histologique (effectuée par le Pr Rousselet-Chapeau).

### 8.1.2. Modèle de régime riche en graisse (RRG)

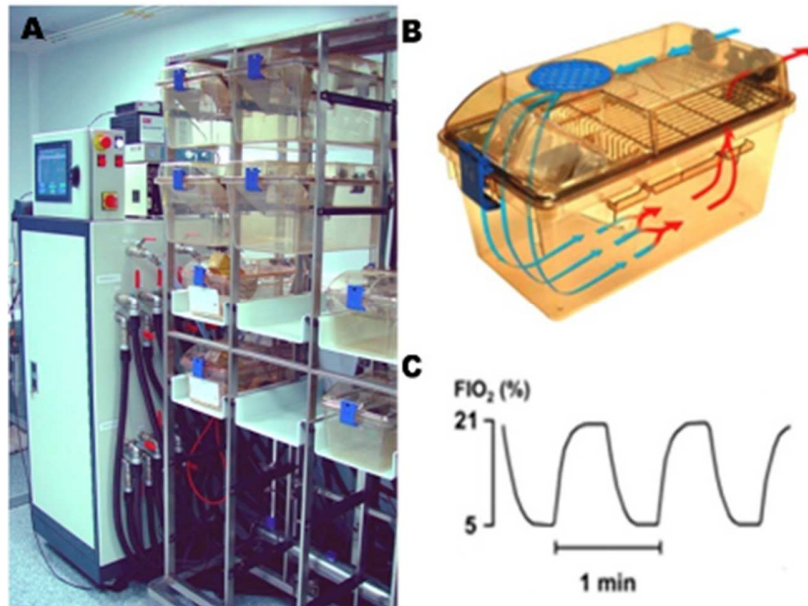
Le modèle de souris dysmétaboliques a été obtenu en apportant aux animaux une nourriture enrichie en graisse appelée diète "high fat diet" et que nous appellerons régime riche en graisse

(RRG) dans ce manuscrit (TD 88137, SAFE, Augy, France) (42% des calories provenant des graisses, 15.2% des protéines et 42.7% des carbohydrates ; 4.5 kcal/g). Les souris ont reçu cette alimentation de la 8<sup>ème</sup> semaine à la 16<sup>ème</sup> semaine de vie. Cette alimentation est caractérisée par sa richesse en graisse saturée. Elle a pour objectif de reproduire un régime humain de type occidental qui s'associe à l'obésité et à l'augmentation du risque CV.

### 8.1.3. Modèle d'HI

Le modèle d'HI utilisé dans ce travail était le modèle développé au laboratoire de HP2 de Grenoble. Il permet de moduler rapidement la concentration en oxygène dans les cages des animaux en administrant un mélange gazeux enrichi en azote. Le choix a été fait de faire varier la FiO<sub>2</sub> de 21% ; conditions normoxiques, à 5%, condition hypoxique, chaque cycle durant une minute (30 secondes FiO<sub>2</sub> 21%, 30 secondes FiO<sub>2</sub> 5%°). Le dispositif permet d'exposer les animaux dans leur propre cage, en groupe, limitant ainsi le stress induit par l'isolation des animaux. Ces cycles d'HI étaient délivrés 8 heures/24 heures pendant la partie diurne du nyctémère où prédomine le sommeil polyphasique des rongeurs.

Les animaux contrôles restant dans les conditions normoxiques (DS-NO et RRG-DO) pendant les 2 dernières semaines de l'expérimentation étaient exposés dans le même type de cage d'HI, afin d'assurer un même niveau de bruit et des perturbations liés au flux d'air.



**Figure 7:** Dispositif d'hypoxie intermittente mimant le SAOS chez la souris. Les cages sont placées sur un portoir (A) distribuant le même air à toutes les cages (B). La fraction en oxygène de l'air des cages est modulée par un enrichissement en azote permettant d'obtenir le cycle d'HI suivant :  $FiO_2=21\%$  durant 30sec puis  $FiO_2=5\%$  durant 30sec (C).

## 8.2. Dosages sanguins

Une fois les animaux sacrifiés, le sang était rapidement prélevé à partir du cœur et placé dans un tube EDTA. Les tubes de sang ont été centrifugés à 1900 g pendant 3 minutes. Le plasma riche en plaquettes a été récupéré et centrifugé à 5000 g pendant 4 minutes pour obtenir le plasma pauvre en plaquettes (PPP). Le PPP était stocké à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour réaliser les analyses ultérieures.

### 8.2.1. Glycémie

La glycémie était mesurée avant sacrifice sur du sang prélevé au niveau de la queue des animaux avec un glucomètre et exprimée en g/l.



### 8.2.2. Insuline, triglycérides, enzymes hépatiques et cholestérol

L'insuline était dosée par une technique d'ELISA automatisée (Enzyme-linked immunosorbent assay) avec des kits LINCO (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Les triglycérides, le cholestérol, les ASAT, ALAT et gamma-GT étaient mesurés par des kits enzymatiques spécifiques de Thermo Scientific (Vantaa, Finland).

### 8.2.3. Les microparticules

Le comptage et le phénotypage des MPs étaient réalisés par cytométrie en flux après marquage par des anticorps spécifiques de l'origine cellulaire des MPs. La cytométrie en flux permet l'énumération et l'analyse de particules en suspension dans un milieu liquide en analysant les signaux optiques ou physiques émis par la particule coupant un faisceau lumineux d'un laser. Généralement appliquée à des cellules, cette technique a été développée et adaptée au laboratoire pour permettre la quantification et le phénotypage des MPs.

Le phénotypage de MPs a été réalisé à partir du PPP suivant l'expression des antigènes membranaires spécifiques. Pour cela, 8 µl de plasma étaient incubés en présence d'un anticorps (1ng/uL) dirigé contre CD61, CD45, TER119, F4/80, et CD54 pour étudier les MPs d'origine plaquettaire, leucocytaire, érythrocytaire, macrophagique, et endothéliale respectivement. Après 45 minutes d'incubation, 8uL de billes Flow-count (Beckman Coulter, Roissy, France) étaient ajoutées pour quantifier la concentration de MPs dans chaque échantillon. Cela permettait de déterminer la concentration circulante en MPs pour chaque groupe de souris. Les échantillons (10.000 événements) étaient ensuite analysés au cytomètre en flux (Beckman Coulter).

### **8.3. Dosage des triglycérides hépatiques**

#### Principe

Les triglycérides hépatiques étaient extraits selon la méthode décrite par Xu et col. (210). Les triglycérides étaient dosés par une méthode enzymatique. Le principe du dosage repose sur le dosage du glycérol issu de l'hydrolyse des triglycérides par la LPL. Le glycérol est ensuite phosphorylé par la glycérol kinase pour former du glycérol-1-phosphate qui va ensuite être oxydé par la glycérol phosphate oxydase pour aboutir à la formation de peroxyde d'hydrogène. La peroxydase catalyse le couplage entre le peroxyde d'hydrogène, la 4-aminoantipyrine (4-AAP) et le sodium N-éthyle-N-(3-sulfopropyl)m-anisidine (ESPA) pour aboutir à la formation d'un colorant, la quinonéimine qui absorbe la lumière à 540 nm. L'augmentation d'absorbance à 540 est donc directement proportionnelle à la concentration de glycérol.

#### Protocole

Un morceau de foie d'environ 100 mg était pesé puis placé dans 1 ml d'éthanol. La préparation était ensuite homogénéisée au Potter (7 allers-retours, 1000 tours/min). L'homogénat était vortexé pendant 2 minutes et centrifugé à 15000 g pendant 10 minutes. Le dosage était ensuite effectué sur le surnageant. Pour le dosage, 10 µl d'eau (blanc), de standard ou d'échantillon étaient ajoutés dans 800 µl de free glycerol reagent (Sigma Aldrich, Lyon, France) et incubés à 37°C pendant 5 minutes. L'absorbance initiale (AI) était ensuite mesurée à 540 nm. La solution était récupérée et mélangée avec 200 µl de triglyceride reagent (Sigma Aldrich, Lyon, France). Le mélange était incubé à 37°C pendant 5 min. L'absorbance finale (AF) était mesurée à 540 nm.

Expression des résultats

La concentration en triglycérides (TG) en mg/g de foie était calculée selon la formule :

$$[\text{TG}] = [\text{standard}] \times \frac{AF \text{ échantillon} - (AI \text{ échantillon} \times F)}{AF \text{ standard} - (AI \text{ blanc} \times F)} \times f \text{ dilution} \times \frac{V \text{ homogénat}}{q \text{ foie}}$$

[standard] : concentration du standard en mg/ml, soit 0,26 ; AI : absorbance initiale, correspondant au glycérol présent avant hydrolyse des triglycérides ; AF : absorbance finale, correspondant au glycérol présent après hydrolyse des triglycérides ; F : permet de rapporter l'AI mesurée dans 0,8 ml à l'AF mesurée dans 1ml.  $F = 0,81/1,01 = 0,8$  ; f dilution: facteur de dilution de l'échantillon dans le milieu réactionnel, soit 100 ; V homogénat : volume de l'homogénat en ml ; Q foie : quantité de foie en g

#### **8.4. Dosage des activités enzymatiques mitochondriales**

Les dosages des activités enzymatiques des complexes I, II, III et IV et de la citrate synthase étaient réalisés sur un homogénat hépatique selon les adaptations de la méthode de Malgat et col. (109) et en accord avec les techniques de consensus AFM (Association Française contre les Myopathies). Le principe des dosages des complexes de la chaîne respiratoire repose sur le transfert d'électrons d'un donneur (substrat) à un accepteur. La mesure par spectrophotométrie de la vitesse d'apparition de l'accepteur réduit ou de disparition du donneur oxydé permet de quantifier l'activité enzymatique associée. Les réactifs utilisés provenaient de chez Sigma Aldrich (Lyon, France) excepté pour l'ATP, le NADH et la lactico-déshydrogénase (LDH) (Roche, Meylan, France), pour le décylubiquinone (Tebu-bio, La Perray-en-Yvelines, France) et pour le cytochrome c oxydé (Acros Organics, Halluin, France).

#### 8.4.1. Réalisation d'un homogénat hépatique

L'homogénat était réalisé à partir d'échantillons de foie conservés dans des tubes secs à -80°C. Environ 30 mg (2x2x2 mm) de foie étaient découpés sur un support « carboglace » (stocké à -80°C) et placés dans des tubes eppendorf 1,5mL puis pesés. Les biopsies étaient rincées en ajoutant du tampon d'extraction (volume équivalent à 10 fois le poids de la biopsie ; uL/mg ; exemple : 300uL pour une biopsie de 30mg). Dans une chambre froide, la biopsie était glissée avec 10 fois son poids de tampon dans un Potter de 2 mL, puis homogénéisée par 4 passages à pleine puissance du moteur. L'homogénat était centrifugé à 650 g à 4°C. Le surnageant était récupéré. L'opération était répétée avec le culot restant en reprenant celui-ci dans le même volume de tampon et en homogénéisant et centrifugeant à nouveau. Les deux surnageants étaient mélangés pour le dosage immédiat.

#### 8.4.2. NADH ubiquinone oxydoréductase (complexe I)

##### Principe

La réaction enzymatique catalysée par le complexe I est la suivante :



Le principe du dosage consiste à mesurer l'oxydation du NADH, dont l'absorbance est mesurée à 340 nm, en présence d'un analogue de l'ubiquinone, le décylubiquinone. Lors de la mesure spectrophotométrique, la diminution de l'absorbance à 340 nm est alors proportionnelle à l'activité du complexe I. Ce dosage est réalisé en présence et en absence de roténone (inhibiteur spécifique du complexe I), afin d'obtenir l'activité d'oxydation du NADH spécifique du complexe I.

## Protocole

Dans un tube en verre, sont ajoutés :

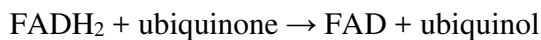
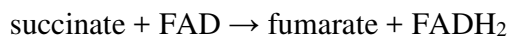
· 222 µl d'eau distillée ; 300 µl de tampon KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (100 mM) ; 45 µl de d'albumine de sérum bovin (BSA) (50 mg/mL) ; 2,5 µl de décylubiquinone (25 mM) ; · +/- 3 µl de roténone (2,5 mM) ; 24 µl d'homogénats (soit 40ug/mL)

Ce mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 2 minutes. La réaction est ensuite initiée par l'ajout de 10 µl de NADH (10mM). L'évolution de l'absorbance à 340 nm est suivie au spectrophotomètre (Beckman DU 640B, Beckman Coulter, Roissy CDG, France), thermostaté à 37°C, pendant 2 minutes. La réaction est réalisée en présence et en absence de roténone.

### 8.4.3. Succinate ubiquinone oxydoréductase (complexe II)

#### Principe

Le complexe II catalyse deux réactions enzymatiques successives :



Le dosage du complexe II fait intervenir un composé chimique de couleur bleue, le dichlorophenolindophenol (DCPIP), qui absorbe la lumière à 600 nm. Lorsque le DCPIP est réduit par l'ubiquinol, il perd sa couleur bleue et n'absorbe plus la lumière. Lors de la mesure spectrophotométrique, la diminution de l'absorbance à 600 nm est alors proportionnelle à

l'activité du complexe II. Dans ce dosage l'ubiquinone est remplacée par un analogue, le décyubiquinone.

#### Protocole

Dans un tube en verre, sont ajoutés :

· 300 µl de tampon KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (100 mM) ; 30 µl de BSA (50 mg/ml) ; 40 µl de succinate (500 mM) ; 60 µl de KCN (10 mM) ; 3 µl d'antimycine A (1 mg/ml) ; 1,5 µl de roténone (2,5mM) ; 140 µl de DCPIP (0,5 mM) ; 9 µl d'homogénats (soit 15 µg/mL).

Ce mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 2 minutes. La réaction est ensuite initiée par l'ajout de 2 µl de décyubiquinone (soit 50 µM). L'évolution de l'absorbance à 600 nm est suivie au spectrophotomètre, thermostaté à 37°C, pendant 2 minutes.

#### 8.4.4. Ubiquinol cytochrome c oxydoréductase (complexe III)

##### Principe

La réaction enzymatique catalysée par le complexe III est la suivante :

**cytochrome c oxydé + ubiquinol → cytochrome c réduit + ubiquinone**

Le principe du dosage repose sur la mesure de la réduction du cytochrome c qui une fois réduit absorbe la lumière à 550 nm. L'augmentation de l'absorbance à 550 nm est alors proportionnelle à l'activité du complexe III. Dans ce dosage l'ubiquinol est remplacé par un analogue, le décyubiquinol. Ce dosage est réalisé en présence et en absence d'antimycine A (inhibiteur spécifique du complexe III), afin d'obtenir l'activité de réduction du cytochrome c spécifique du complexe III.

## Protocole

Dans un tube en verre, sont ajoutés :

· 130 µl d'eau distillée ; 300 µl de tampon KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (200 mM) ; 12 µl de BSA (50 mg/ml) ; 30 µl d'EDTA (1 mM) ; 60 µl de KCN (10 mM) ; 60 µl de cytochrome c oxydé (1 mM) ; +/- 3 µl d'antimycine A (1mg/ml), 6 µl d'homogénats (soit 30 µg/mL).

Ce mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 30 secondes. La réaction est ensuite initiée par l'ajout de 2,5 µl de décylubiquinol (25 mM). L'évolution de l'absorbance à 550 nm est suivie au spectrophotomètre, thermostaté à 37°C, pendant 1 minute.

### 8.4.5. Cytochrome c oxydase (complexe IV)

#### Principe

La réaction enzymatique catalysée par le complexe IV est la suivante :



Le principe du dosage repose sur la mesure de l'oxydation du cytochrome c. Le cytochrome c réduit absorbant la lumière à 550 nm, la diminution de l'absorbance à 550 nm est alors proportionnelle à l'activité du complexe IV.

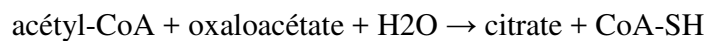
#### Protocole

Dans un tube plastique, 594 µl de cytochrome c réduit (0,08mM) sont incubés à 37°C pendant 3 minutes. La réaction est ensuite initiée par l'ajout de 6 µl d'homogénats (soit 10 à 20/ml). L'évolution de l'absorbance à 550 nm est suivie au spectrophotomètre, thermostaté à 37°C, pendant 1 minute.

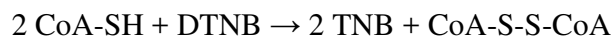
#### 8.4.6. Citrate synthase

##### Principe

La citrate synthase, première enzyme du cycle de Krebs, catalyse la réaction suivante :



Le dosage fait intervenir l'acide 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoïque) ou DTNB. Le DTNB réagit avec les groupements thiols (-SH) du CoA-SH pour former du trinitrobenzène (TNB) selon la réaction suivante :



Le TNB est un composé jaune qui absorbe la lumière à 412 nm. L'augmentation de l'absorbance à 412 nm est donc proportionnelle à l'activité de la citrate synthase.

##### Protocole

Dans un tube en plastique, sont ajoutés :

450 µl d'eau distillée ; 90 µl de DTNB (1 mM) ; 30 µl d'oxaloacétate (10 mM) ; 18 µl d'acétyl-CoA (10 mM) ; 6 µl de triton X 100 (10%)

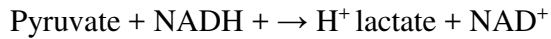
Ce mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 2 minutes. La réaction est ensuite initiée par l'ajout de 6 µl d'homogénats (soit 10 µg/ml). L'évolution de l'absorbance à 412 nm est suivie au spectrophotomètre, thermostaté à 37°C, pendant 90 secondes.

#### 8.4.7. Lactate Deshydrogénase

##### Principe



La LDH catalyse la réaction suivante



Le principe du dosage consiste à mesurer l'oxydation du NADH, dont l'absorbance est mesurée à 340 nm. Lors de la mesure spectrophotométrique, la diminution de l'absorbance à 340 nm est alors proportionnelle à l'activité de la LDH.

Protocole

Dans un tube en verre, sont ajoutés :

955µL de tampon KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (100mM); 25 µL de triton 10X, 5µL de pyruvate (500 mM) ; 5 µL d'homogénat (soit 10µg/mL).

Ce mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 5 minutes. La réaction est ensuite initiée par l'ajout de 10 µl de NADH (15mM). L'évolution de l'absorbance à 340 nm est suivie au spectrophotomètre, thermostaté à 37°C, pendant 90 secondes.

#### 8.4.8. Calcul des activités

L'activité spécifique (AS), en nmol/min /mg, est calculée en utilisant la formule suivante :

$$[\text{AS}] = \frac{\Delta DO}{l \times \epsilon \text{ moléculaire} \times S_n \text{ moléculaire}} \times \frac{V \text{ total}}{V_{\text{essai}} \times \rho}$$

$\Delta DO$  : delta de densité optique mesurée sur la zone linéaire de la courbe de croissance ; V total : volume totale dans la cuve en mL soit 1 ; l : longueur de traversée du faisceaux optique en cm, soit 1 ;  $\epsilon$  moléculaire : coeficient d'extinction à la longueur d'onde utilisée en mM.cm<sup>-1</sup> (cyt c = 18,5 ; NADH = 6,22 ; DTNB = 13,6) ; S<sub>n</sub> mol : nombre stoechiométrique de la molécule dans

l'équation de la réaction ; Vessai : volume ajouté dans la cuvette, en mL soit 0,01,  $\rho$  : masse de protéines (mg.mL) dans 1mL d'homogénats.

### **8.5. Réactivité vasculaire**

Les aortes thoraciques des souris étaient prélevées immédiatement après le sacrifice et incubées dans une solution physiologique tamponnée à l'acides 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic (HEPES) et conservée à 4°C jusqu'aux tests vasculaires (NaCl 130mM ; KCl 4,7mM ; MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 1,17 mM, Glucose 5mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, HEPES 15mM ; ph 7,4). Les prélèvements étaient acheminés par voie postale dans un colis réfrigéré et les tests vasculaires étaient réalisés dès le lendemain soit environ 24 heures après le sacrifice à l'INSERM 1063 SOPAM où un myographe adapté à l'étude des vaisseaux de souris est disponible.

Les aortes étaient alors nettoyées de leur environnement grasseux et découpées en segment de 2mm. Des segments d'aorte avec l'endothélium vasculaire intact étaient montés dans des bains d'organes isolés (myographes) remplis du même liquide physiologique maintenu à 37°C. Les anneaux étaient équilibrés à une tension de 5mN pendant une heure au cours de laquelle la solution physiologique était changée toutes les 15 minutes. La contractilité vasculaire était mesurée de façon isométrique. La contraction était stimulée par ajout d'une solution riche en potassium à deux reprises séparées par une série de lavage permettant un retour à la contraction basale. Lors de la deuxième stimulation, lorsque la contraction au KCl atteignait un plateau, était ajouté un agent contractant, analogue de thromboxane A<sub>2</sub>, l'U46619 (1 uM) (Sigma Aldrich, Lyon, France) permettant d'obtenir la contraction maximale du vaisseau. Le relâchement était à nouveau obtenu par une série de lavages successifs. Les anneaux étaient contractés par ajouts successifs et cumulatifs d'U46619 jusqu'à l'obtention d'une contraction correspondant à 80% de

la contraction maximale. Le relâchement était alors étudié en réalisant des courbes cumulatives concentrations-réponses à l'Ach par paliers successifs de  $10^{-9}$  M à  $10^{-5}$  M.

## **8.6. Dosage des radicaux libres par résonance paramagnétique électronique**

### 8.6.1. Principe

La résonance paramagnétique électronique (RPE) est une technique spectroscopique permettant d'étudier des molécules ou des ions possédant un ou plusieurs électrons non appariés. Le paramagnétisme résultant de la résonance du spin électronique de l'électron permet sa détection par la RPE. L'échantillon à analyser est placé dans une cavité située au centre d'un champ magnétique externe et soumis à un champ magnétique oscillant.

### 8.6.2. Protocole

Dosage de la production de NO

Pour mesurer le radical NO, nous avons utilisé comme capteur de spin, le diéthylthiocarbamate de fer  $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ , qui forme le complexe  $\text{NO-Fe}(\text{DETC})_2$  dont les propriétés paramagnétiques sont détectables par RPE. Le jour du sacrifice, l'aorte thoracique et abdominale étaient nettoyées de leur environnement graisseux, et découpées en anneaux de 2 mm environ puis incubées pendant 45 minutes à  $37^\circ\text{C}$  dans une solution spécifique préalablement dégazée à l'azote pour éliminer l'oxygène (5 mM HEPES, 1 mM L-Arginine, 3 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,3 M BSA, pH 7,4) avec le capteur de spin, le diéthylthiocarbamate (DETC, 1,5 mM) et en présence de  $\text{FeSO}_4$  (400 $\mu\text{M}$ ). La réaction était arrêtée en plaçant les plaques dans la glace. Le spin trap était enlevé et les fragments d'aorte placés dans des seringues de 1mL découpée et congelés dans l'azote liquide puis conservés à  $-80^\circ\text{C}$ .

Dosage de la production d'anion superoxyde

Les anneaux d'aortes étaient préparées selon la même procédure que pour le NO et incubées pendant 45 min à 37°C dans un tampon d'incubation Kreps-Hepes contenant du 1-hydroxy-3-méthoxycarbonyl-2,2,5,5-tétraméthylpyrrolidine (CMH, Noxygen, Mainz, Allemagne) (10 mM), de la deferoxamine (25 M) et du DETC (5 M). La réaction a été stoppée en plaçant les échantillons à 4°C. Les échantillons étaient congelés dans leur tampon d'incubation dans des seringues en plastique en les plongeant dans de l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à analyse.

### 8.6.3. Analyse des résultats

L'analyse était réalisée à l'aide d'un spectromètre Miniscope MS 200 (Magnetech, Berlin, Allemagne) en utilisant un vase Dewar. L'instrumentation a été calibrée à 10mW de puissance des micro-ondes, à 1mT de modulation d'amplitude, à 100kHz de la fréquence de modulation avec un temps d'enregistrement d'un spectre de 120 secondes répété 4 fois de suite. La quantité de NO mesurée était exprimée en unités arbitraires d'absorbance par milligramme de tissus secs.

## 8.7. Western Blot

### 8.7.1. Extraction des protéines

Un morceau d'environ 30 mg de foie congelé était découpé et broyé par un pilon en inox permettant de garder la congélation pendant le broyage à l'aide d'une cuve remplie d'azote liquide. Le broyage était réalisé en ajoutant un tampon d'extraction (50 mM Tris-base, 150 mM

NaCl, 1% Triton, 0,50% Na deoxycholate, 0,10% SDS, 40  $\mu$ L d'antiprotéase) pendant 20 minutes. Le broyat était centrifugé (15000g, 10 min, 4°C) et le surnageant contenant les protéines conservé à -80°C. La mesure de la concentration protéique de ces échantillons a été faite à partir d'une gamme de concentrations croissantes d'albumine sérique bovine (BSA) (0, 0.2, 0.5, 0.8, 1, 1.5 et 2 mg/mL) selon la méthode de Lowry (153 thèse STC) sur plaque 96 puits et mesurée au spectrophotomètre (Biotek, Winooski, Etats-Unis) à la longueur d'onde de 575 nm. Les protéines étaient ensuite dénaturées par incubation dans le tampon contenant du NuPAGE® LDS Sample Buffer et NuPAGE® Reducing Agent (Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis), 10 minutes à 70°C.

#### 8.7.2. Migration sur gel et transfert sur membrane

Trente microgrammes de protéines étaient déposés sur des gels précoulés NuPAGE® Novex® Bis-Tris Mini gels (Invitrogen). L'électrophorèse permettait de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire. Les protéines étaient dénaturées dans un tampon fortement chargé négativement, afin de neutraliser les charges propres de la protéine. La migration des protéines dépend alors uniquement de la longueur de la chaîne protéique permettant une répartition en fonction du poids moléculaire. La migration était réalisée dans une cuve d'électrophorèse (Invitrogen) sous un voltage constant de 150V et un ampérage variant de 60 à 125 mA. Les gels étaient ensuite transférés sur une membrane de nitrocellulose ayant des pores de 0,2  $\mu$ m dans une cuve de transfert verticale (BioRad, Hercules, Etats-Unis). Le transfert des protéines du gel vers la membrane s'effectuait sous une tension constante de 100V pendant 2 heures à 4°C.

#### 8.7.3. Marquage immunologique et révélation

A la fin du transfert, les membranes étaient rincées, trois fois 10 minutes dans un tampon TBS-Tween (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.1 % Tween-20) à température ambiante, puis incubées 90 minutes à température ambiante dans le tampon TBS-Tween contenant 5 % de BSA afin de

saturer les sites de liaison non spécifiques des anticorps. Les membranes étaient ensuite exposées toute la nuit à 4°C ou 2 heures à température ambiante avec l'un des anticorps primaires dilués dans le tampon TBS-Tween contenant 5 % de BSA. Les anticorps suivants ont été utilisés : anti-eNOS (BD Biosciences, San Jose, CA), anti phospho-eNOS Ser 1177, anti phospho-eNOS Thr 495 (Cell Signaling, Beverly, MA) et anti HIF-1 $\alpha$  (Santa Cruz Technology). Après trois lavages de 10 minutes dans le tampon TBS-Tween, les membranes étaient incubées 90 minutes avec un anticorps secondaire conjugué à une peroxydase de Raifort. Les membranes ont été par la suite strippées et l'expression de la  $\beta$ -actine (Sigma-Aldrich) a été évaluée en utilisant un premier anticorps spécifique contre la  $\beta$ -actine suivi d'un anticorps conjugué à la peroxydase. L'immunoréactivité était révélée par un kit de détection (Santa Cruz Technology, Santa Cruz, Etats-Unis), avec production de Luminol, visualisée et photographiée par une caméra à chemiluminescence (Vilber Lourmat). La quantification s'effectuait par analyse densitométrique de la protéine à l'aide du logiciel BIO-1D.

### **8.8. Analyse statistique**

Les résultats ont été exprimés en moyenne  $\pm$  déviation standard (SD) de n observations indépendantes. Les différences entre les groupes étaient recherchées par une analyse de variance à une voie (ANOVA) suivie d'un test de Tukey en cas de positivité ou un test non paramétrique (Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney) en fonction de la distribution des données. Une analyse de variance à deux voies a été utilisée pour comparer les courbes de relâchement à l'Ach.

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées grâce au logiciel GrapPad Prism (GrapPad Software, San Diego, Etats-Unis). Les différences sont considérées comme significatives lorsque  $P < 0,05$  quel que soit le test statistique employé.



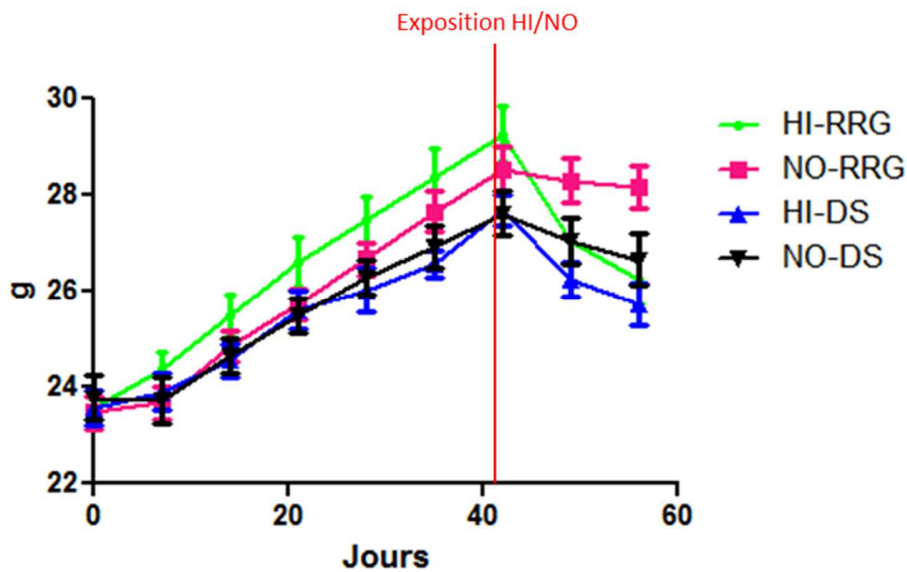
## **9. RESULTATS**

### **9.1. Poids des animaux et des organes et prise alimentaire**

Pendant les 6 premières semaines du protocole, avant l'exposition des animaux à l'HI dans les cages spécifiques à flux d'air contrôlé (ou dans les cages identiques restant dans les conditions normoxiques), les animaux recevant un RRG présentaient une prise de poids plus importante que les animaux recevant une DS (poids des animaux avant l'exposition :  $27,6 \pm 1,7$  g dans le groupe DS vs  $28,9 \pm 1,9$  g dans le groupe RRG). La prise alimentaire était moins importante en poids de nourriture ingérée dans le groupe recevant un RRG ( $3,1 \pm 0,5$  g/j vs  $3,5 \pm 0,5$  g/j pour le groupe recevant une DS). Cependant, en raison d'une composition calorique plus importante ( $4,5$  vs  $3,3$  kcal/g dans les régimes RRG et DS respectivement), les animaux du groupe recevant un RRG avaient une prise calorique plus importante ( $13,9 \pm 2,2$  kcal/j groupe RRG vs  $11,6 \pm 1,5$  kcal/j groupe DS).

Lorsque les animaux étaient soumis à l'HI lors des deux dernières semaines, il était noté une perte de poids importante par rapport aux animaux restant dans les conditions NO (Figure 8). Cette perte de poids était particulièrement marquée dans le groupe d'animaux recevant un RRG. Les animaux restant dans les cages normoxiques mais avec flux d'air contrôlé, présentaient une baisse non significative de leur poids.





**Figure 8 :** Courbes représentant l'évolution du poids des animaux pendant les 8 semaines du protocole. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  déviation standard. L'exposition à l'HI (ou aux cages normoxiques correspondantes) au 42<sup>ème</sup> jour est représentée par la barre rouge. NO normoxique, DS diète standard, HI hypoxie intermittente, RRG regime riche en graisse.

Si l'on s'intéresse à la prise alimentaire moyenne sur les 8 semaines du protocole (Tableau 1), aucune différence n'était notée entre les animaux HI-DS et les animaux NO-DS. Les animaux NO-RRG avaient une prise alimentaire légèrement moins importante que le groupe NO-RRG (différence non significative) mais une prise calorique plus importante. Dans le groupe HI-RRG, la prise alimentaire était plus faible que dans le groupe NO-RRG mais la prise calorique était similaire. La prise de poids totale au cours des 8 semaines était plus faible dans le groupe HI-DS par rapport au groupe NO-RRG (différence non significative). La prise de poids était plus

importante dans le groupe NO-RRG par rapport au groupe NO-RRG. Les souris HI-RRG avaient une prise de poids inférieure par rapport au groupe NO-RRG mais similaire au groupe NO-RRG.

Les souris recevant un RRG présentaient un poids de graisse épидидymale plus importante que les souris SD indépendamment des conditions d'oxygénation que ce soit en valeur absolue ou en pourcentage du poids total des animaux. Aucune différence n'était notée sur le poids des foies des animaux des 4 groupes.

**Tableau 1 : Effet de l'hypoxie intermittente et du régime riche en graisse sur la prise alimentaire, la prise de poids, le métabolisme lipidique, le poids de la graisse épидидymale et du foie et du contenu hépatique en triglycérides.**

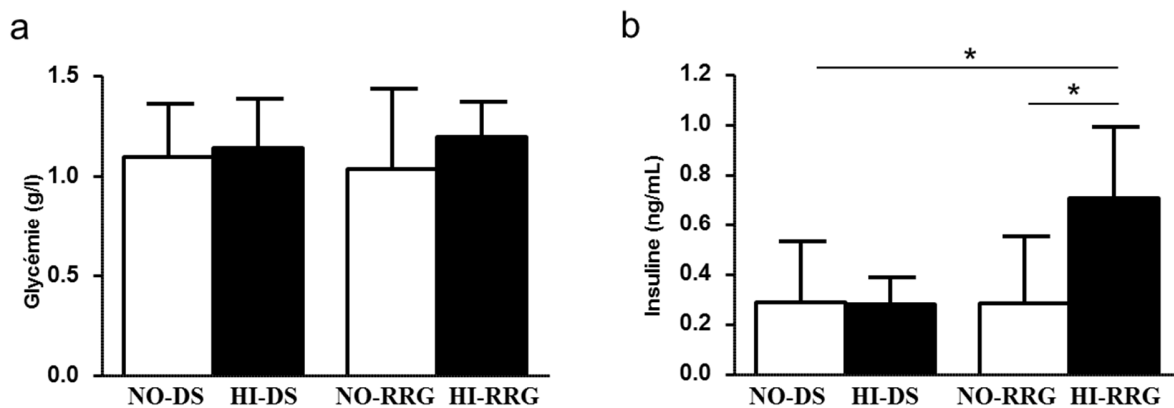
	NO-DS	HI-DS	NO-RRG	HI-RRG
N	24	24	24	24
Prise alimentaire				
g	3.3±0.8	3.4±0.9	3.1±0.8*	2.5±0.6#
kcal	10.9±2.6	11.2±3.0	13.9±3.6*	11.2 ±2.7
Prise de poids, g	2.9±1.8	2.1±1.4	4.3±1.0*	2.0±1.3#
Poids du foie, g	1.2±0.1	1.2±0.2	1.3±0.2	1.1±0.1
Poids du foie/poids totale, %	4.7±0.2	4.7±0.5	4.5±0.5	4.3±0.4
Poids de la graisse épидидymale, g	0.4±0.2	0.4±0.2	0.6±0.2*	0.6±0.2*
Poids graisse épидидymale/poids totale, %	1.5±0,2	1.5±0.3	2.3±0.7*	2.1±0.7*
Cholestérol, g/L	0.95±0.12	0.98±0.15	1.4±0.15*	1.4±0.16*
Triglycérides g/L	0.61±0.14	0.63±0.15	0.60±0.17	0.59±0.11
Triglycérides hépatiques mg/g	192±60	218±60	302±49*	218±245#

\* $p < 0.05$  vs NO-DS. # $p < 0.05$  vs NO-RRG. NO normoxique, DS diète standard, HI hypoxie intermittente, RRG regime riche en graisse.

## 9.2. Bilan glucido-lipidique des animaux

L'HI et le RRG seuls ne modifiaient pas le niveau de glycémie (Figure 9a) et d'insulinémie (Figure 9b) à jeun. Par contre, l'association de ces deux conditions expérimentales entraînait une augmentation drastique du niveau d'insulinémie (x 2,3 par rapport au groupe NO-DS) sans modification de la glycémie.

Aucune différence du bilan lipidique n'était observée dans le groupe d'animaux HI-DS par rapport au groupe NO-DS. Le RRG entraînait une augmentation du niveau de cholestérol total indépendamment des conditions d'oxygénation (HI ou NO). Aucune différence concernant le niveau de triglycérides n'était observée entre les 4 groupes (Tableau 1).

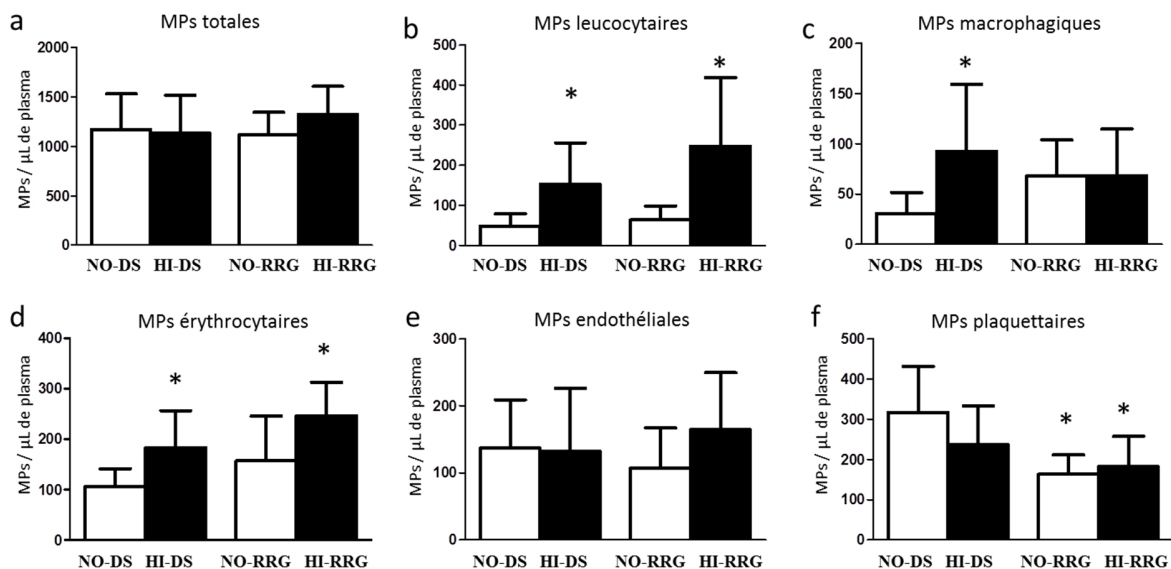


**Figure 9 :** Glycémie (a) et insulinémie (b) à jeun chez les souris normoxiques recevant une diète standard (NO-DS), en hypoxie intermittente recevant une diète standard (HI-DS), normoxiques recevant un régime riche en graisse (NO-RRG) et en hypoxie intermittente recevant un régime riche en graisse (HI-RRG). Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  déviation standard, n=8 souris, \*p<0,05.

### 9.3. Microparticules

Les différentes conditions expérimentales n'ont pas modifié les concentrations circulantes totales des MPs circulantes (Figure 10a).

Par contre l'HI entraîne une augmentation des MPs leucocytaires, macrophagiques et érythrocytaires dans le groupe NO (Figure 10b, 10c et 10d). Le RRG diminuait les concentrations en MPs d'origine plaquettaire (Figure 10f) sans modifier les autres sous-populations de MPs. Le groupe HI-RRG avait un profil de MPs proche du groupe HI-DS avec une augmentation des MPs leucocytaires et érythrocytaires (Figure 10b et 10d) mais sans modification des macrophagiques (Figure 10c). Une baisse des MPs d'origine plaquettaire était également constatée dans ce dernier groupe (Figure 10f).



**Figure 10:** Taux circulants de microparticules (MPs) chez les souris normoxiques recevant une diète standard (NO-DS), en hypoxie intermittente recevant une diète standard (HI-DS), normoxiques recevant un régime riche en graisse (NO-RRG) et en hypoxie intermittente recevant

un régime riche en graisse (HI-RRG). Les histogrammes représentent le taux total de MPs circulantes (a) et l'origine des différentes populations de MPs (b-f). Les valeurs sont exprimées en nombre de MPs/uL de plasma et les données représentent la moyenne  $\pm$  déviation standard de 6-13 souris. \* $p < 0,05$ .

#### **9.4. Métabolisme hépatique**

Le contenu hépatique en triglycérides n'était pas modifié chez les souris HI-DS par rapport aux souris NO-DS. Le groupe NO-RRG présentait une augmentation des triglycérides hépatiques par rapport au groupe NO-DS (Tableau 1). Le niveau de triglycérides hépatiques du groupe HI-RRG était proche du groupe NO-DS suggérant que l'HI a limité l'accumulation des triglycérides hépatiques chez les souris soumises au RRG.

L'activité de la LDH n'était pas modifiée dans le groupe HI-SD par rapport au groupe NO-DS mais augmentée dans le groupe NO-RRG. La LDH est une enzyme impliquée dans la glycolyse anaérobie. Son activité permet d'apprécier les capacités glycolytiques de la cellule en complément de l'étude des complexes qui évalue l'activité oxydative. Cette augmentation de l'activité de la LDH suggère donc une augmentation du métabolisme glycolytique dans ce groupe (Tableau 2). Chez les souris soumise ai HI-RRG, le niveau d'activité de la LDH était proche du groupe NO-DS.

Aucune différence significative n'était notée dans l'activité de la citrate synthase entre les 4 groupes suggérant une absence de modification de la masse mitochondriale dans ces conditions expérimentales. L'HI seule n'a pas modifié l'activité des complexes I, II et IV mais a diminué de

façon significative l'activité du complexe III. Dans le groupe NO-RRG, la fonction mitochondriale était altérée comme en témoigne la diminution de l'activité des complexes I, II et IV. Dans le groupe HI-RRG, l'activité du complexe I était restaurée à un niveau proche du groupe NO-DS, l'activité du complexe II était également diminuée mais de façon moins marquée que dans le groupe NO-RRG (différence non significative). L'activité du complexe III était altérée dans le groupe HI-RRG suggérant un rôle spécifique de l'HI dans cette diminution, indépendamment de la diète reçue. Enfin, dans ce dernier groupe, l'activité du complexe IV était restaurée à un niveau comparable au groupe NO-SD sans différence statistiquement significative avec le groupe NO-RRG.

**Tableau 2 : Activités glycolytique et mitochondriale dans les homogénats hépatiques.**

	NO-DS	HI-DS	NO-RRG	HI-RRG
LDH	2428±575	2731±874	4142±531*	3123±1135
Citrate synthase	303.5±66.1	328.9±59.6	398.1±60.5	357.1±87.7
Complex I	0.48±0.09	0.43±0.07	0.37±0.07*	0.42±0.07
Complex II	0.68±0.12	0.72±0.18	0.42±0.18*	0.51±0.18*
Complex III	0.38±0.12	0.23±0.02*	0.30±0.15	0.21±0.09*
Complex IV	0.47±0.10	0.50±0.15	0.28±0.07*	0.34±0.14

\* $p < 0.05$  vs NO-DS. NO normoxique, DS diète standard, HI hypoxie intermittente, RRG régime riche en graisse. N=6. Les activités de la citrate synthase et de la lacticodéshydrogénase (LDH) sont exprimées en nmol/min/mg de protéine. Les autres résultats sont un ratio entre l'activité enzymatique et l'activité de la citrate synthase.

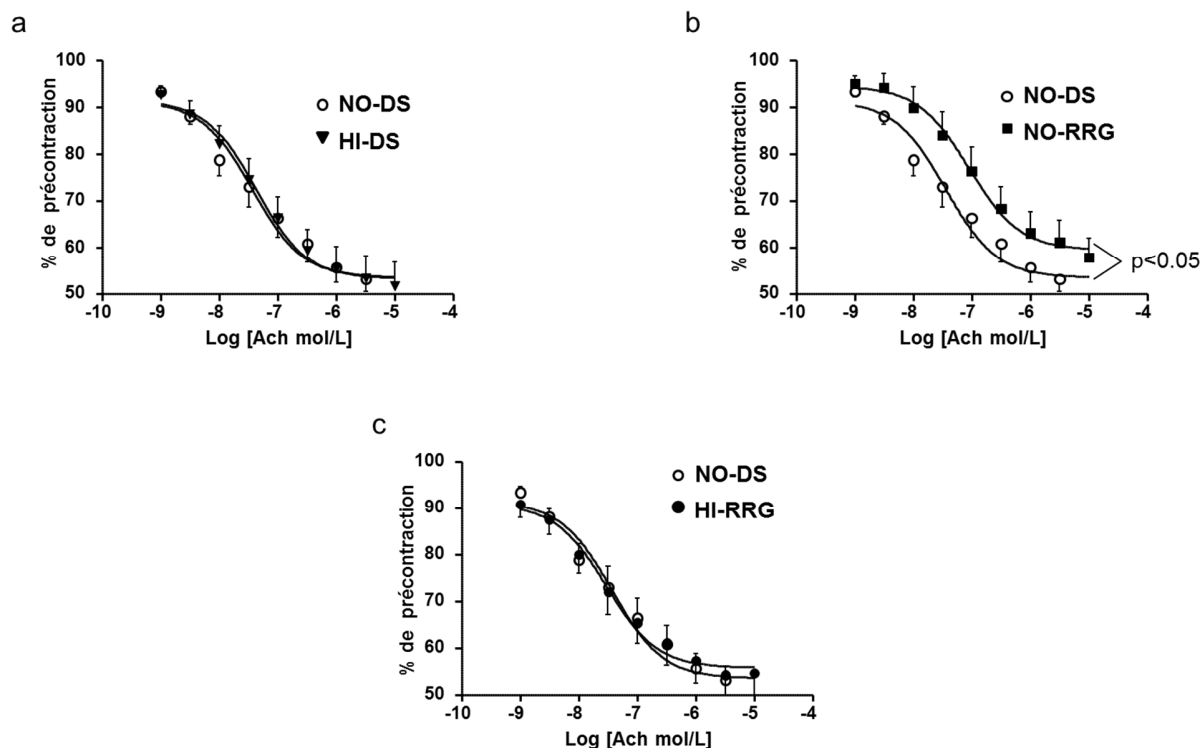
### **9.5. Analyse histologique des foies des animaux**

L'analyse histologique hépatique réalisée par le Pr Rousselet-Chapeau a porté sur 8 prélèvements par groupe. Dans le groupe NO-DS était retrouvée une stéatose spongiocytaire minime à diffuse dans 6 échantillons sur 8. Dans le groupe HI-DS était notée une stéatose spongiocytaire minime à diffuse dans 6 échantillons sur 8. Dans le groupe NO-RRG était retrouvée une stéatose spongiocytaire dans tous les échantillons ainsi que des vacuoles lipidiques dans 4 échantillons sur 8. Enfin, dans le groupe HI-RRG on retrouvait une stéatose spongiocytaire dans tous les échantillons ainsi que des vacuoles lipidiques dans 3 échantillons sur 8.

### **9.6. Réactivité vasculaire**

L'HI associée à la DS n'avait aucun impact sur la relaxation dépendante de l'endothélium au niveau des aortes (Figure 11a). Les anneaux aortiques issus des animaux NO-RRG présentaient une altération de la fonction endothéliale comme en témoigne la diminution du relâchement en réponse à l'Ach par rapport à celui obtenu avec les anneaux d'aortes issus de NO-DS (figure 11b).

Dans le groupe HI-RRG, le relâchement à l'Ach n'était pas différent du groupe NO-SD suggérant que la combinaison des deux conditions expérimentales prévenait la dysfonction endothéliale induite par le RRG seul (Figure 11c)



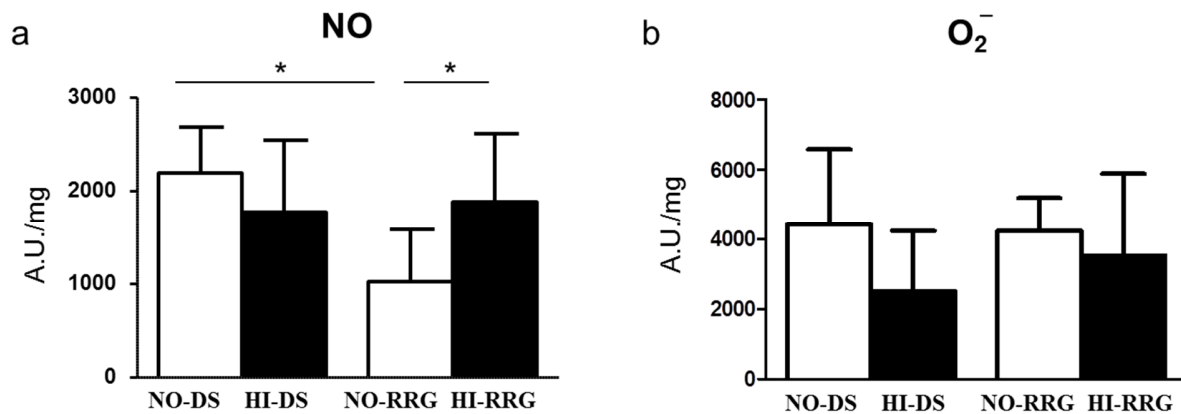
**Figure 11:** Courbes concentration–réponse à l’acétylcholine réalisées sur des anneaux aortiques issus de souris normoxiques recevant une diète standard (NO-DS), en hypoxie intermittente recevant une diète standard (HI-DS), normoxiques recevant un régime riche en graisse (NO-RRG) et en hypoxie intermittente recevant un régime riche en graisse (HI-RRG). Les anneaux aortiques étaient précontractés avec l’U46619, agoniste du thromboxane, en présence d’endothélium fonctionnel, à 80% de la contraction maximale. Les réponses vasculaires sont exprimées en pourcentage de la contraction maximale et représentent la moyenne  $\pm$  déviation standard de 8 souris. \* $p < 0,05$ .

Afin d’analyser les mécanismes moléculaires participant à la dysfonction endothéliale sous RRG et à la préservation de la fonction endothéliale lorsque les deux conditions sont réunies, nous avons analysé *ex-vivo* la capacité des aortes à produire du NO et de l’ $O_2^-$ . Le groupe HI-DS



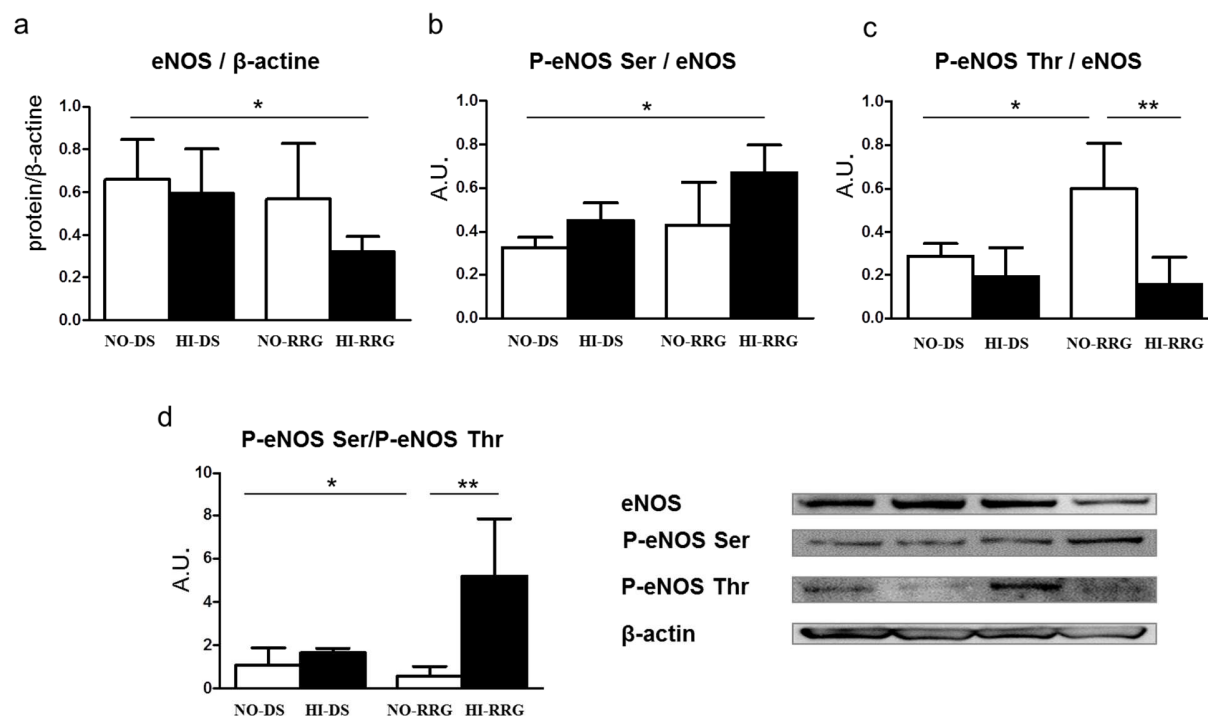
présentait une production aortique de NO proche du groupe NO-DS (Figure 12a). Une diminution de la production de NO a été retrouvée dans le groupe NO-RRG. Enfin, dans le groupe HI-RRG, le niveau de NO était préservé, non différent du groupe NO-DS.

Une tendance à la diminution de la production d' $O_2^-$  était notée dans le groupe HI-DS (différence non significative) (Figure 12b). Aucune différence de production d' $O_2^-$  n'était notée dans les groupe NO-RRG ou HI-RRG par rapport au groupe NO-DS.



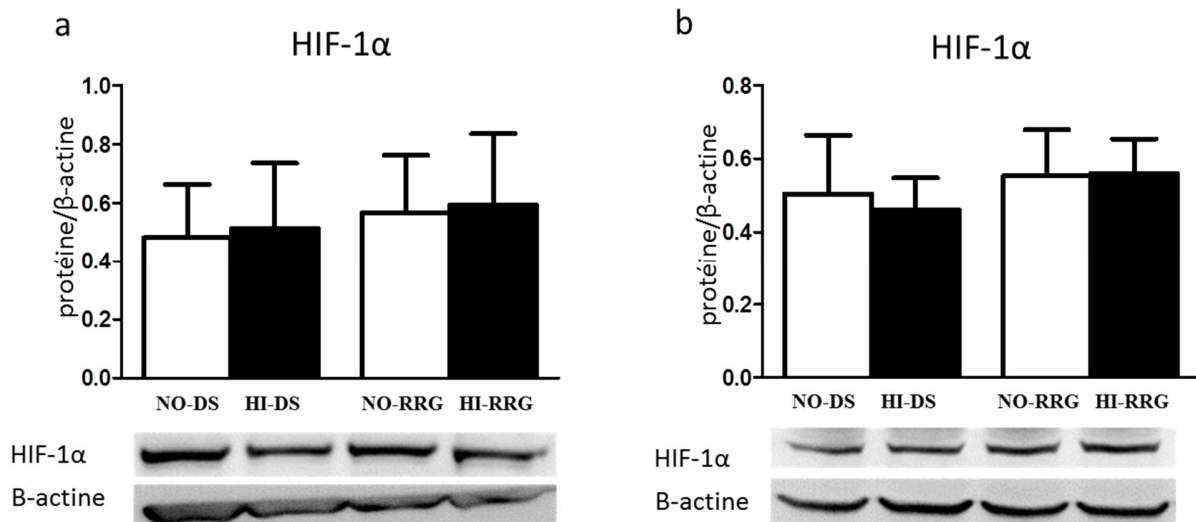
**Figure 12:** Production de monoxyde d'azote (NO) et de l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) par les aortes issues de souris normoxiques recevant une diète standard (NO-DS), en hypoxie intermittente recevant une diète standard (HI-DS), normoxiques recevant un régime riche en graisse (NO-RRG) et en hypoxie intermittente recevant un régime riche en graisse (HI-RRG). Les résultats représentent la moyenne des amplitudes de signal exprimé en unités arbitraires (A.U.) par mg de tissus sec  $\pm$  déviation standard. N=5-7 souris, \*p<0,05.

Pour étudier les mécanismes moléculaires conduisant à la diminution des capacités de production de NO, l'expression de la eNOS et son niveau de phosphorylation sur son site activateur et inhibiteur ont été investigués par western-blot. L'HI seul (groupe HI-DS) n'a pas modifié le niveau d'expression ou de phosphorylation de la eNOS sur les deux sites par rapport au groupe NO-SD (Figure 13). Le régime seul (groupe NO-RRG) n'a pas modifié l'expression globale de la eNOS (Figure 13a). Néanmoins, la phosphorylation sur le site activateur n'était pas modifiée mais la phosphorylation du site inhibiteur était largement augmentée (Figure 13b et 13c). Finalement le ratio P-eNOS Ser/P-eNOS Thr était diminué (Figure 13d) suggérant une diminution de l'activité de la eNOS en accord avec la diminution de la production de NO décrit précédemment (Figure 12). Dans l'aorte des souris soumises à l'HI et au RRG (groupe HI-RRG), l'expression globale de la eNOS était diminuée par rapport aux animaux NO-SD (Figure 13a). Néanmoins, la phosphorylation de la eNOS était augmentée sur le site activateur (Ser 1177) (Figure 13b) et diminuée sur le site inhibiteur (Thr 495) (Figure 13c) avec pour conséquence une large augmentation du ratio P-eNOS Ser/P-eNOS Thr (Figure 13d). La combinaison de la diminution de l'expression de la eNOS et de l'augmentation de son activité peut expliquer la production de NO préservée dans le groupe HI-RRG (Figure 12).



**Figure 13:** Western blot réalisés sur des aortes issues de souris normoxiques recevant une diète standard (NO-DS), en hypoxie intermittente recevant une diète standard (HI-DS), normoxiques recevant un régime riche en graisse (NO-RRG) et en hypoxie intermittente recevant un régime riche en graisse (HI-RRG) en utilisant des anticorps dirigés contre la eNOS (a), la phospho-eNOS Ser 1177 (b) et phospho-eNOS Thr 495 (c). Le ratio entre la phosphorylation de la eNOS sur son site inhibiteur (Thr 495) et activateur (Ser 1177) est représenté figure d. Les histogrammes représentent le ratio de la quantification densitométrique de la protéine d'intérêt et de la protéine servant de référence. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  déviation standard et correspondent à l'analyse de 3-4 souris, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

Nous avons également étudié l'expression de HIF-1 $\alpha$ , facteur de transcription largement étudié dans l'adaptation cellulaire à l'hypoxie soutenue. Aucune différence dans l'expression de HIF-1 $\alpha$  n'a été observée à la fois au niveau aortique (Figure 14a) et hépatique (Figure 14b).



**Figure 14:** Western blot réalisés sur des aortes (a) et les foies (b) issus de souris normoxiques recevant une diète standard (NO-DS), en hypoxie intermittente recevant une diète standard (HI-DS), normoxiques recevant un régime riche en graisse (NO-RRG) et en hypoxie intermittente recevant un régime riche en graisse (HI-RRG) en utilisant des anticorps dirigés contre HIF1- $\alpha$ .

Les histogrammes représentent le ratio de la quantification densitométrique de la protéine d'intérêt et de la protéine servant de référence ( $\beta$ -actine). Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  déviation standard et correspondent à l'analyse de 4 souris.

## ***10.DISCUSSION DES RESULTATS***

### **10.1. Pertinence des modèles expérimentaux au regard de la pathologie humaine**

#### **10.1.1. Le modèle animal d'HI**

Nous avons utilisé le modèle d'HI comme modèle de SAHOS en choisissant d'exposer les animaux pendant deux semaines. Comme détaillé dans l'introduction, ce modèle d'HI, associant une fréquence d'un cycle par minute et une FIO<sub>2</sub> minimale à 5% est le modèle le plus utilisé dans les laboratoires de recherche actuellement pour investiguer les conséquences CV et métaboliques du SAHOS. Au moment de la conception du projet, les résultats des études antérieures nous apprenaient que 2 semaines d'HI induisaient une inflammation aortique et un remodelage débutant (6). De plus, les études portant sur les petites artères musculaires de rat démontraient une dysfonction endothéliale présente dès cette durée d'exposition. Nous pouvions donc nous attendre à trouver une dysfonction endothéliale chez les animaux soumis à l'HI.

Or, notre étude ne retrouve aucun impact de l'HI chez les animaux soumis à la DS et un impact paradoxalement protecteur vis-à-vis de la dysfonction endothéliale induite par le RRG. Cette absence d'effet de l'HI sur la fonction endothéliale aortique de souris a depuis été retrouvée également par d'autres équipes de recherche y compris pour des durée d'exposition à l'HI plus longues (13). Ces résultats nous incitent à une analyse critique du modèle utilisé et de la durée d'exposition choisie.

Comme détaillé dans l'introduction, la justification du modèle d'HI provient principalement des données cliniques suggérant que le phénomène d'hypoxie-réoxygénation (représenté par l'index de désaturations) est l'élément prédictif le plus pertinent vis-à-vis des événements CV. Cette information issue des premières études est remise en question dans les dernières publications ou d'autres paramètres, comme le temps passé sous 90% de saturation ou l'index de micro-éveils semble plus pertinent.

Dans la pathologie clinique, chaque apnée s'accompagne d'une désaturation mais également d'une hypercapnie par hypoventilation alvéolaire transitoire (190). Les modifications de la capnie peuvent entraîner des modifications transitoires du pH avec des épisodes d'acidose respiratoires secondaires. Très peu de données sont disponibles sur les conséquences cliniques de ces modifications transitoires de capnie sous forme d'hypercapnie intermittente. En effet, l'enregistrement de ce paramètre ne fait pas partie des enregistrements polysomnographiques de routine. Des techniques permettant l'enregistrement de la PaCO<sub>2</sub> artérielle, transcutanée ou de fin d'expiration existent et sont reconnues dans les dernières recommandations de la American Academy of Sleep Medicine (AASM) mais ont une utilisation confidentielle (20) et ce paramètre n'est pas disponible dans les grandes cohortes épidémiologiques et cliniques précédemment décrites. Une étude réalisée chez les sujets sains révèle l'activation des chémorécepteurs centraux et périphériques dans l'HTA associée aux épisodes d'inhalation de gaz enrichi en CO<sub>2</sub> (31). Des données récentes suggèrent que l'hypercapnie *per se* pourrait avoir des conséquences en terme de morbidité CV et métabolique. Ainsi, les patients présentant un syndrome obésité hypoventilation (défini par la présence d'une obésité avec un IMC  $\geq 30$  et d'une hypoventilation alvéolaire avec une PaCO<sub>2</sub>  $> 45$  mmHg) ont un pronostic CV plus péjoratif avec une inflammation systémique plus importante, une dysfonction endothéliale (22) et un risque de décès par événement CV plus

marqué par rapport à des sujets obèses ne présentant pas d'hypoventilation alvéolaire (125, 142). Une étude clinique randomisée récente a démontré que la correction de la saturation par une oxygénothérapie nocturne ne modifiait pas la pression artérielle des patients alors que la PPC permettait sa diminution, soulignant que les désaturations n'expliquaient pas à elles seules l'atteinte vasculaire du SAHOS (56).

Or, les animaux du modèle d'HI utilisée dans ce travail présentent à contrario une polypnée compensatrice en réponse à la stimulation des récepteurs sensibles à l'hypoxie, avec pour conséquences, des épisodes d'hypocapnies transitoires et des variations de pH alcalins (79). Pour cette raison, certaines équipes de recherche ont intégré dans la mécanique contrôlant les mélanges gazeux délivrés de façon cyclique, une adjonction de CO<sub>2</sub> lors des cycles hypoxiques ayant pour but de stabiliser le niveau de PaCO<sub>2</sub> des animaux. Ce modèle est couramment appelé modèle « eucapnique » par rapport au modèle « hypocapnique » utilisé dans notre étude. L'existence d'une différence d'impact entre ces deux modèles sur le système CV est probable même si elle reste discutée. L'impact des deux modèles animaux a principalement été comparé sur les chiffres tensionnels. Certaines études notent une augmentation de PA plus importante avec le modèle eucapnique (80, 192). D'autres auteurs ne retrouvent pas cette différence (97). De même, comme discuté dans l'introduction, un stress oxydant au niveau vasculaire a été démontré dans le modèle « eucapnique » (192) alors qu'il est absente dans le modèle « hypocapnique » (75, 76). Ces différences méthodologiques pourraient expliquer les résultats à priori contradictoires de la littérature et ceux retrouvés dans nos travaux sur l'impact de deux semaines d'HI sur la diminution du niveau d'ERO au niveau aortique.

D'autres limitations sont reconnues au modèle d'HI murin. Les modifications de PaO<sub>2</sub> inhérentes au modèle ont des répercussions sur le sommeil de ces animaux. Des études ayant effectué des

enregistrements électroencéphalographiques chez des rongeurs soumis à l'HI ont démontré que ce modèle entraîne une fragmentation du sommeil et des modifications de l'architecture de celui-ci (158, 203).

Enfin, il est difficile de reproduire chez l'animal l'histoire naturelle du SAHOS qui est assez mal connue chez l'homme. L'augmentation de la résistance des VAS s'installe probablement progressivement avec l'apparition par la suite du phénomène d'obstruction. Certains auteurs retrouvent en effet une majoration de l'IAH sur 2 (147) et 10 ans (105) de suivi moyen de sujets non traités, indépendamment de l'évolution pondérale suggérant une progressivité dans l'installation de la maladie. Chez l'homme, il est donc assez probable que l'augmentation des résistances des VAS progresse avec l'âge avancé des patients et l'interaction de différents paramètres connus pour augmenter la collapsibilité des VAS comme le surpoids, les médicaments, l'obstruction nasale. L'impact du SAHOS sur le système CV dans le temps et l'existence de phénomènes adaptatifs est d'autant moins connu et décrit. L'application de cycles d'HI d'emblais maximaux et sévères chez les rongeurs reproduit donc probablement assez mal la pathologie humaine. Il est donc possible que nos résultats concernant l'effet bénéfique de deux semaines d'HI au niveau mitochondriale, métabolique hépatique et vasculaire chez les animaux soumis au RRG correspondent à un processus adaptatif précoce qui s'avère délétère sur le long terme comme décrit dans d'autres études.

Au final, une exposition à l'HI plus longue (de 6 semaines ou plus) et l'utilisation d'un modèle animal contrôlant le niveau de CO<sub>2</sub> paraît plus adapté pour répondre à l'objectif initial du protocole.



### 10.1.2. Le modèle animal de syndrome métabolique

Nous avons utilisé un modèle animal de dysmétabolisme en proposant une alimentation riche en graisse aux animaux pendant 6 semaines.

Différents modèles animaux ont été utilisés pour évaluer l'impact de l'HI sur l'animal obèse. Le modèle génétique de souris déficitaire en leptine a été initialement utilisé. Ces souris développent de façon spontanée une obésité, une insulino-résistance, une dyslipidémie et une stéatose hépatique. Cependant, ce modèle s'éloigne de la pathologie humaine où les taux circulants de leptine sont corrélés à l'IMC (132). De plus, les études cliniques démontrent qu'à corpulence égale, les sujets SAHOS ont des taux circulants de leptine plus élevés que les sujets contrôles (66) et une corrélation est décrite entre les niveaux de leptine et les marqueurs de sévérité de la maladie (191). Or, en plus de son impact sur la satiété et la prise pondérale, la leptine est impliquée dans diverses fonctions physiologiques comme la sensibilité à l'insuline et le contrôle de la vasomotricité (132).

Récemment, les principales études ont préféré l'utilisation des modèles d'obésité induite par un RRG. Dans les études s'intéressant à l'impact du SAHOS dans les modèles d'obésité, des diètes très variées dans leurs contenus ont été utilisées. De plus, la durée de la diète ainsi que sa place par rapport à l'exposition à l'HI sont également très variables. Nous avons utilisé une nourriture dans laquelle, 42% des calories provenaient de matières grasses, 42% des carbohydrates et 15% des protéines. Cette composition est assez proche du régime riche en cholestérol utilisé par Savransky et col. (37% des calories provenaient de matières grasses, 42% des carbohydrates et 21% des protéines) en dehors d'une quantité de cholestérol beaucoup plus importante dans cette dernière étude (12,5 gr/kg vs 1,5 gr/kg). Dans une étude réalisée dans notre laboratoire, l'administration de ce même RRG pendant 9 semaines à des souris, permet d'augmenter la prise

pondérale de façon marquée (poids final de 41,6 gr dans le groupe RRG vs 25,6 pour le contrôle), d'induire une insulino-résistance, une dyslipidémie et une dysfonction endothéliale (123). Cependant, dans notre expérience, l'effet de 8 semaines de diète est beaucoup moins marqué (gain de poids en moyenne de 1,4gr sur 8 semaines dans notre étude vs 16gr sur 9 semaines dans l'étude de Mignrance et col.(123)). La principale différence entre ces deux études pouvant expliquer ces différences marquées porte sur la souche génétique des animaux. Nous avons réalisé nos expériences sur des souris mâle C57BL/6J alors que des souris C57BL/6N ont été utilisées dans celles de Mignrance et col. Or depuis que l'étude a commencée, une publication a mis en évidence une résistance de ces animaux vis-à-vis des diètes induisant l'obésité (83).

Au final, notre diète a permis d'obtenir une obésité modérée avec un poids légèrement supérieur au groupe recevant une DS mais une prise de poids qui se faisait au profit principalement de la graisse abdominale. Or, cette graisse abdominale, mesurée par le tour de taille en pratique clinique est plus pertinente que l'IMC vis-à-vis du risque CV et métabolique. La présence d'une dysfonction endothéliale et d'une dyslipidémie confortent la pertinence de l'utilisation ce modèle dysmétabolique de pré-obésité.

### 10.1.3. L'effet d'HI et du RRG sur la prise alimentaire et la prise de poids

Nous avons trouvé que l'HI entraînait une perte de poids des animaux et que celle-ci était particulièrement marquée chez les animaux soumis au RRG dont le poids finale n'était plus différents de celui des animaux contrôles NO-SD. L'impact de cette perte de poids dans le groupe RRG sur les effets protecteurs vasculaires et hépatiques pourraient être avancé. Néanmoins, plusieurs arguments plaident pour un effet spécifique de la courte durée d'HI, indépendamment des différences pondérales. D'une part, nos constatations sur l'absence de prise de poids dans les groupes RRG-HI sont semblables aux études précédentes qui ont démontré des effets vasculaires

et hépatique délétères de l'HI appliquée sur de plus longue durée. Ainsi, dans l'étude de Savransky et col (169), les souris RRG-HI (souche génétique C57BL/6J, identique à la notre) ne prennent presque pas de poids (0,3 gr sur 12 semaines en moyenne) alors que les animaux contrôles NO-SD prennent 2,7 gr. Ces animaux soumis à l'HI et RRG pendant 12 semaines présentaient néanmoins une athérosclérose aortique marquée suggérant que l'effet pro athérogène du RRG est indépendant de la prise pondérale mais lié aux perturbations glucido-lipidiques induites. De même, l'accentuation de la stéatose et de l'inflammation hépatique induite par 6 mois d'HI dans un modèle de RRG est indépendante de toute prise pondérale (168). D'autre part, l'augmentation de la graisse viscérale, la dyslipidémie persistante et l'insulino-résistance retrouvée dans ce groupe démontrent que les animaux HI-RRG présentent un état dysmétabolique malgré l'absence de prise pondérale marquée. Enfin, l'analyse moléculaire portant sur l'expression et la phosphorylation de la eNOS confirme la mise en route de mécanismes compensateurs spécifiques dans ce modèle.

Cette diminution de la prise pondérale pourrait être expliquée par l'hyper-leptinémie induite à la fois par l'HI et le RRG avec pour conséquences une augmentation du métabolisme des animaux (23) (156). Un effet anorexigène de l'HI chez les animaux soumis au RRG est également notée dans notre étude et dans la littérature même si l'apport énergétique (en kcal/j) reste préservé.

Afin de limiter cette effet de l'HI-RRG sur le poids, certains auteurs ont depuis proposés de sélectionner les animaux les plus lourds pour le groupe HI.

## **10.2. Résultats expérimentaux et liens physiopathologiques**

### **10.2.1. Impact des conditions expérimentales sur le bilan glucido-lipidique**

Deux semaines d'HI chez les animaux recevant un régime normal n'ont pas modifié les paramètres du bilan glucidique. Comme détaillé dans l'introduction, lors de durée d'exposition courte à l'HI (moins de 4 semaines), une perturbation du bilan glucidique n'est constatée que si les dosages sanguins sont réalisés pendant l'exposition à l'HI et qu'aucune différence, voire une amélioration transitoire de la sensibilité à l'insuline peuvent être retrouvée si les prélèvements sont réalisés quelques heures après l'arrêt de l'HI. Huit semaines de RRG n'ont pas eu non plus d'impact significatif sur le bilan glucidique des animaux. La relative résistance de la souche génétique utilisée dans notre travail au régime RRG pourrait expliquer ces résultats (83).

En revanche, notre travail confirme l'impact synergique des deux conditions expérimentales sur l'hyper-insulinémie. Dans les études où les animaux rendus obèses par une diète ou prédisposés génétiquement à l'obésité sont exposés à l'HI, des augmentations importantes de l'insulinémie sont constatées (plus de quatre fois le niveau des animaux contrôles après 6 mois d'HI et RRG (38); augmentation de plus de 600% de l'insuline chez les animaux déficitaires pour la leptine (156)). Cette hyperinsulinémie marquée apparaît dès 5 jours et persiste jusqu'à 4 semaines d'expositions à l'HI. Par contre, elle n'est plus retrouvée pour des expositions simultanées et prolongées au RRG et HI. En effet, 3 à 6 mois de RRG et HI appliqués simultanément ont tendance à diminuer les taux d'insulinémie (168, 169). Le maintien d'une glycémie normale alors que les taux d'insuline sont très élevés laisse supposer l'installation d'une insulino-résistance particulièrement sévère que l'on peut évaluer par le calcul de l'index HOMA. Cependant, la rapidité d'installation (5j), et l'aspect régressif à la poursuite du stimulus pourraient plaider pour l'hypothèse de mécanismes de régulation différents de ceux décrits dans l'insulino-résistance

d'un diabète avancé (167). La participation d'autres hormones connues à la fois pour être sécrétées lors de l'HI et pour avoir un impact sur la glycémie pourrait intervenir. Ainsi, un relargage de catécholamines sécrétées lors de l'hyperactivité sympathique secondaire à l'HI peut stimuler directement la néoglucogenèse et la glycogénolyse. De plus, les corticostéroïdes relargués suite à l'activation par l'HI de l'axe hypothalamo-hypophysaire peuvent inhiber la glycogénogenèse et augmenter la néoglucogenèse (215). L'hypothèse de la participation de ces modifications hormonales au maintien d'une glycémie normale malgré l'hyperinsulinémie en plus ou à la place d'une insulino-résistance classique peut donc être avancée. L'étude de la cinétique de la glycémie, de l'insulinémie, des catécholamines et des corticostéroïdes en fonction de la durée de l'exposition à l'HI pourrait conforter cette hypothèse.

L'exposition à l'HI n'a eu aucun impact sur le bilan lipidique des animaux soumis au régime normal. Comme détaillé dans l'introduction, la plupart des études rapportent une augmentation du niveau de triglycérides et du cholestérol dès 5 jours d'HI avec des différences, qui bien que significatives, restent modérées (maximum 20% d'augmentation) (102). Ces différences s'avèrent plus marquées pour des durées d'expositions plus longues (169). A contrario, d'autres études ne retrouvent pas de modification du bilan lipidique chez le rat après 3, 6 et 9 mois d'HI (48). Certaines études suggèrent un impact plus marqué des diètes riches en graisse sur les perturbations métaboliques chez des souris jeunes (72). L'âge des souris, plus avancé dans notre étude, pourrait expliquer ces divergences. Le RRG a augmenté les taux de cholestérol sans modifier les taux de triglycérides. Les données de la littérature sont également très divergentes sur l'impact des RRG sur le bilan lipidique. Les résultats dépendent du régime utilisé, de la durée du régime mais également de la souche génétique de souris utilisée. Comme indiqué précédemment, les souris C57BL/6J présentent une relative résistance au RRG ce qui pourrait

expliquer des perturbations du bilan lipidiques moins marquées que dans d'autres études (83). Enfin, nos résultats concernant l'absence d'impact de l'HI chez les animaux soumis au RRG sont assez conformes aux données de la littérature (99, 102, 168). Une majoration des perturbations lipidiques associées à l'obésité n'ayant été décrite que pour des niveaux d'obésité importants et des durées d'HI beaucoup plus soutenues de 6 mois ou plus (38).

#### 10.2.2. Impact des conditions expérimentales sur les MPs circulantes

Il n'existe, à notre connaissance, aucune étude publiée s'intéressant à l'impact de l'HI sur les taux circulants de MPs. Comme détaillé dans l'introduction, les données de la littérature les plus robustes suggèrent une augmentation des LMPs chez les patients présentant un SAHOS (195). En effet les trois études publiées ayant investiguées les LMPs retrouvent leur augmentation chez les patients SAHOS par rapport aux contrôles. Une augmentation des LMPs a été retrouvée au cours de la nuit chez les patients présentant un SAHOS sévère, qui contraste avec leur diminution chez les sujets contrôles. Enfin l'arrêt du traitement par PPC, chez des patients bien traités auparavant s'accompagne d'une augmentation du niveau de LMPs. Nos données issues du modèle animal viennent conforter ces données cliniques en retrouvant une augmentation des LMPs CD45+ (leucocytaires) dans le groupe de souris HI et RRG-HI et des F4/80+ (macrophagiques) dans le groupe HI. Notre étude démontre que l'HI entraîne une augmentation des LMPs indépendamment du poids des animaux. La place des LMPs comme biomarqueur spécifique du SAHOS est donc confortée par ces résultats. Des études cliniques à plus grande échelle sont nécessaires pour proposer ce dosage comme un outil clinique. Néanmoins, les différences majeures dans les techniques de caractérisations des MPs entre les différents laboratoires mais également une variabilité intra et inter-individuelles de ce dosage rendent difficile l'utilisation des MPs dans la pratique clinique (11).

Cette élévation des LMPs renforce l'hypothèse d'un impact de l'HI sur les leucocytes circulants. Alors que les données concernant les niveaux des marqueurs d'inflammation circulants détaillés dans l'introduction (CRP, IL-6) dans le SAHOS restent discutés, les données concernant l'impact de l'HI sur l'activation des leucocytes sont plus cohérentes. Les polynucléaires neutrophiles issus des patients SAHOS présentent, *in vitro*, une expression accrue de sélectines et une diminution de leur prédisposition à rentrer en apoptose (45). Les lymphocytes issus des patients SAHOS présentent une production accrue de cytokines (43). Sachant que les cellules activées sont connues pour augmenter le relargage de MPs (200), l'augmentation du taux de LMPs pourrait témoigner de l'activation des leucocytes circulants dans le SAHOS. L'étude des capacités des leucocytes issus des patients SAHOS à produire *in vitro* des LMPs viendrait conforter cette hypothèse.

On note également une augmentation des MPs TER119+, d'origine érythrocytaire dans le groupe HI et HI-RRG. Le modèle d'HI est connu pour entraîner une augmentation d'hématocrite (159). Une élévation du nombre d'érythrocytes pourrait donc participer à l'augmentation des ces MPs érythrocytaires.

Notre étude ne permet cependant pas de préciser l'impact de ces modifications des taux circulants de MPs sur les paramètres vasculaires et métaboliques. Au vu de l'absence de toute modification significative des paramètres testés chez les animaux soumis à 2 semaines d'HI, l'impact de ces modifications des taux de MPs avec cette durée d'exposition semble faible ou nul. Une étude qui consisterait en l'injection de ces MPs issues des 4 groupes d'animaux à d'autres souris non exposées pourrait préciser ce dernier point. Le rendement dans l'isolation des MPs étant faible, le sacrifice d'un nombre important d'animaux exposés serait nécessaire pour permettre l'injection d'une souris.

### 10.2.3. Impact des conditions expérimentales sur le foie

L'HI n'a eu aucun impact histologique sur le foie des animaux recevant une DS dans notre modèle expérimental et le contenu en triglycérides n'était pas modifié. La durée d'HI s'avère probablement trop courte pour reproduire les effets hépatiques délétères des désaturations. Comme détaillé dans l'introduction, des arguments cliniques de plus en plus robustes existent pour témoigner d'un lien entre le SAHOS et la NAFLD. Des modifications biochimiques et moléculaires ont également été retrouvées dans les modèles animaux d'HI avec une augmentation du contenu en triglycérides, des marqueurs de stress oxydant et d'inflammation, une surexpression de gènes impliqués dans la lipogenèse et des modifications histologiques pour des expositions très prolongées (12 à 24 semaines) (157, 170).

Par contre, les animaux soumis au RRG présentaient une augmentation du contenu en triglycérides et des vacuoles lipidiques dans la moitié des échantillons analysés. Les animaux soumis au RRG présentent une dysfonction mitochondriale avec une diminution de l'activité des complexes mitochondriaux. Dans les modèles de RRG, l'afflux d'acides gras libres au niveau des hépatocytes peut altérer le fonctionnement mitochondriale (59). Or, la mitochondrie est directement impliquée dans la  $\beta$ -oxydation de ces acides gras. Son dysfonctionnement aboutit donc à un défaut de métabolisme des acides gras et à leur accumulation hépatocytaire participant ainsi au processus de stéatose (150). De plus, un dysfonctionnement mitochondriale aboutit à une production accrue d'ERO provoquant un stress oxydant qui fait partie des mécanismes incriminés dans la stéato-hépatite (164).

Les animaux HI-RRG présentaient un contenu en triglycérides qui n'était pas différents des animaux contrôles suggérant un impact de l'HI sur la prévention de l'augmentation des triglycérides hépatiques constatée chez les animaux recevant un RRG. La diminution des



marqueurs de l'inflammation (TNF- $\alpha$ ) et du stress oxydant (MDA) au niveau hépatique constatée chez des animaux obèses soumis à une courte durée d'HI pourrait relever d'un même mécanisme protecteur (163). Notre étude apporte un élément nouveau pouvant expliquer cet effet préventif d'une courte exposition à l'HI en restaurant l'activité des complexes mitochondriaux I et IV altérés dans le modèle RRG seul.

L'adaptation mitochondriale à des conditions d'hypoxie soutenue a largement été investiguée et décrite. La mitochondrie, par l'intermédiaire notamment de son complexe III pourrait jouer le rôle de senseur à la chute d'O<sub>2</sub> et agirait en augmentant la production d'ERO à ce niveau (178). Cette augmentation de stress oxydant participerait à la stabilisation de HIF-1 $\alpha$ , qui à son tour permettrait la mise en route des mécanismes moléculaires permettant l'adaptation cellulaire aux conditions hypoxiques (27, 28). La diminution de l'activité du complexe III chez les animaux HI et HI-RRG pourrait relever du même processus adaptatif.

Notre étude ne retrouve pas d'impact de l'HI sur l'activité des autres complexes mitochondriaux. Par contre, l'HI semble prévenir la diminution des activités des complexes I et IV induit par le RRG. Ces activités mitochondriales préservées pourraient permettre un métabolisme des acides gras et limiter ainsi leur accumulation sous forme de triglycérides constatée dans le groupe RRG.

Très peu d'études se sont intéressées à l'impact de l'HI, comme modèle de SAHOS, sur la mitochondrie. Les deux études retrouvées dans la littérature s'intéressaient spécifiquement aux mitochondries neuronales. Une étude effectuée par oxygraphie sur des mitochondries isolées à partir de cerveaux de rats soumis à l'HI pendant 10 à 14 jours rapporte une altération des activités respiratoires stade 3 et 4 qui s'accompagne d'une augmentation des marqueurs de stress oxydant au niveau cérébral (36). Une étude très récente s'est intéressée à l'impact de 35 jours d'HI (cycles

90s-90s) d'intensités différentes (FiO<sub>2</sub> à 10% et 6%) sur la taille de l'infarctus cérébral après occlusion de l'artère cérébrale moyenne. Cette étude retrouve un effet protecteur de l'HI modérée (FiO<sub>2</sub> 10%) et un effet délétère de l'HI plus sévère (FiO<sub>2</sub> 6%) avec augmentation de la zone infarctée. Les investigations réalisées sur les mitochondries isolées de cerveau démontrent une diminution pour l'HI modéré et une augmentation pour l'HI sévère de la susceptibilité à la dépolarisation mitochondriale induite par le calcium et de la production d'ERO mitochondriaux (69). A noter que la fonction vasculaire cérébrale n'était pas modifiée par les différentes conditions d'HI dans cette étude et que les effets bénéfiques et délétères étaient attribués à un effet préconditionnement au niveau parenchymateux neuronal.

Plusieurs études se sont intéressées en revanche, à l'aspect protecteur de l'HI sur la fonction mitochondriale. Ces études utilisaient des modèles d'HI hypobares avec des cycles d'HI longs (4 et 5 heures). Une première étude retrouve un effet protecteur de l'HI sur la dysfonction mitochondriale hépatique induite *in vitro* par l'acide salicylique (9). Une deuxième étude a investigué le rôle spécifique de la mitochondrie dans l'effet pré conditionnement CV de l'HI dans les lésions d'I/R (208). L'étude démontre que 4 semaines d'HI améliorent le métabolisme énergétique mitochondriale (augmentent l'expression et l'activité de l'ATP-synthase, préviennent la réduction du contenu myocardique en ATP induit par l'I/R).

La prévention de l'altération des activités des complexes mitochondriaux induit par le RRG par l'HI de courte durée pourrait relever d'un même mécanisme permettant d'améliorer les capacités oxydatives des mitochondries par l'HI.

#### 10.2.4. Impact vasculaire des conditions expérimentales

Dans ce travail, nous décrivons un effet paradoxalement protecteur au niveau vasculaire de l'HI dans le modèle murin de SM. Comme détaillé dans l'introduction, une très large littérature issue de la recherche clinique et fondamentale existe sur les effets délétères du SAHOS sur le pronostic métabolique et vasculaire des patients. Mais il existe également des données cliniques beaucoup plus rares suggérant un effet paradoxalement protecteur du SAHOS dans certaines conditions cliniques ou expérimentales sur certains paramètres vasculaires. Ces effets protecteurs vasculaires sont souvent comparés à l'effet conditionnement vasculaire connu dans le milieu cardiologique depuis les années quatre-vingts : un effet bénéfique de série répétées et brèves d'ischémies coronaires sub-létales pour limiter la taille des lésions myocardiques lors d'un infarctus à la fois dans un modèle animal (134) et chez l'homme (189). Des résultats similaires ont été retrouvés par la suite en utilisant l'HI comme alternatif à l'I/R. Ainsi, l'application de 13 cycles d'HI hypobare (8h/j et 5j/semaines ; équivalent à 7000 mètres d'altitude soit une  $PaO_2=65\text{mmHg}$ ) avant une occlusion coronaire a permis de réduire la zone infarctée de la zone à risque de 56,7 à 27,7% (88).

Notre étude démontre une restauration de la fonction endothéliale chez les souris soumises au RRG en restauration la capacité des aortes à produire du NO. Une amélioration de la fonction endothéliale sous HI a déjà été retrouvée chez des rats hypertendus(111).

L'étude moléculaire démontre une phosphorylation de la eNOS sur son site activateur et une diminution de sa phosphorylation sur son site inhibiteur. L'impact du conditionnement vasculaire sous forme de brèves ischémies-reperfusions ainsi que de l'HI sur la phosphorylation de l'eNOS, favorable à la production de NO, a déjà été retrouvé dans des études antérieures. Une des voies moléculaires décrite dans le conditionnement vasculaire est la voie dite RISK pour « Reperfusion-Induced Salvage Kinase ». Elle implique l'activation de la voie PI3Kinase-Akt

(phosphatidylinositol-3-Kinase-Akt) (extracellular signal regulated kinase) (63). Une fois phosphorylé, Akt permet à son tour la phosphorylation de la eNOS sur son site activateur et augmente la capacité de synthèse du NO. L'effet de l'HI sur la phosphorylation de l'eNOS via une phosphorylation de l'Akt a également été démontré récemment au niveau des cardiomyocytes avec un protocole d'HI proposant des cycles plus longs (5 cycles de 2 min FiO<sub>2</sub> 6-8% - 3 min FiO<sub>2</sub> 20% pendant 14j) (121).

D'autres part, toutes les études évaluant l'impact de l'HI dans les modèles animaux d'obésité (RRG ou modèles transgéniques) retrouvent une augmentation drastique de l'insulinémie avec des augmentations allant jusqu'à 10 fois le niveau des animaux contrôles comme détaillé dans le chapitre sur le bilan glucidique. Or, l'insuline, en dehors de ces effets métaboliques largement connus dans la régulation de la glycémie, présente des effets vasculaires spécifiques. En effet, l'insuline permet une augmentation de la production vasculaire du NO via une voie moléculaire impliquant Akt et la eNOS (89, 110). La liaison de l'insuline à son récepteur endothélial induit sa phosphorylation et activation via une activité kinase intrinsèque entraînant ainsi la phosphorylation de l'IRS (131). La phosphorylation de l'IRS active différentes kinases de la voie Akt et PI3K. Akt active alors la eNOS grâce à une phosphorylation sur son résidu activateur (sérine 1177) (127, 128). La capacité de l'insuline à préserver la vasorelaxation coronaire via une activation de la voie Akt/eNOS a déjà été retrouvée chez des rats Zucker présentant une résistance à l'insuline (30). L'hypothèse de la participation de l'hyperinsulinémie dans la préservation de la fonction endothéliale via la phosphorylation de la eNOS dans une configuration favorable à la production de NO peut donc être avancée. L'hyperinsulinémie constatée dans ce modèle pourrait donc être un mécanisme compensateur adapté aux besoins vasculaires plus que le marqueur d'une perturbation du métabolisme glucidique, dont la sévérité,

évaluée par l'index HOMA paraît disproportionnée par rapport à la durée d'exposition à l'HI. Ce mécanisme compensateur est de plus, transitoire puisque dans le travail de Savransky et col. retrouvant une athérosclérose aortique avancée après 12 semaines d'HI et de RRG, les niveaux d'insuline et de glycémie sont revenus à des niveaux proches des animaux contrôles (169). La mise en évidence d'une prolifération des cellules  $\beta$ -pancréatiques lors de courtes expositions à l'HI suivie d'une mort cellulaire suite à exposition prolongée vient appuyer l'hypothèse d'un mécanisme compensateur transitoire qui s'épuise lorsque l'HI est poursuivi (207, 211). Des investigations supplémentaires portant sur les voies métaboliques impliquées (phosphorylation de l'IRS, d'Akt) permettraient de conforter cette hypothèse.

Enfin, le rôle important de la mitochondrie dans les effets observés dans le conditionnement vasculaire est avancé. L'activation d'Akt précédemment décrite peut permettre d'activer à son tour le GSK-3 $\beta$  (glycogen synthetase kinase 3 $\beta$ ) qui entraîne au niveau mitochondriale l'inhibition de l'ouverture du mPTP (mitochondrial Permeability Transition Pore ou pore de transition de perméabilité mitochondriale) canal dont l'ouverture aboutit à l'établissement d'un équilibre de la concentration en protons de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne inhibant ainsi la production d'ATP et pouvant aboutir à la mort par nécrose notamment dans les lésions ischémiques (49, 73). Extrapoler les résultats obtenus sur les activités mitochondriales hépatiques aux résultats obtenus sur la restauration de la fonction endothéliale est difficile, et la faible quantité de tissu vasculaire n'a pas permis d'effectuer ces tests sur les cellules vasculaires. L'étude de l'impact de l'HI sur l'activité mitochondriale endothéliale sur un modèle *in vitro* permettrait d'apporter des précisions sur le rôle de la mitochondrie dans les effets vasculaires de l'HI.

## ***11. CONCLUSION GENERALE. PERSPECTIVES***

Ce travail a mis en évidence un mécanisme adaptatif vasculaire et hépatique dans notre modèle animal de RRG et HI. Les premiers résultats, portant notamment sur la fonction endothéliale des animaux, nous sont rapidement apparus contraire à l'hypothèse de travail initiale qui envisageait un effet additif ou synergique de l'HI et du RRG sur l'altération de la fonction endothéliale. Nous avons alors choisi de poursuivre les investigations afin d'apporter des éléments de réponses mécanistiques aux résultats obtenus.

Ces résultats viennent conforter l'hypothèse d'effets contradictoires et polymorphes de l'HI. Les publications des dernières années avançaient l'hypothèse d'une différence entre les cycles d'HI courts et profonds (comme notre modèle) qui auraient principalement des effets néfastes sur les organes et les cycles plus longs (de plusieurs minutes à plusieurs heures) et moins profonds (FiO<sub>2</sub> proche de 10%) qui pouvaient présenter des aspects bénéfiques(4). Notre travail, mais également une analyse détaillée de la littérature montrent cependant que les cycles courts, construits comme modèle animal du SAHOS, peuvent également entraîner une amélioration de différents paramètres biologiques s'ils sont appliqués pour des durées brèves entre 12 heures et deux semaines: diminution de stress oxydant ou de l'inflammation induit par des modèles d'obésité, amélioration de la fonction endothéliale. L'HI de courte durée permet donc une amélioration de certains marqueurs biologiques considérés comme bénéfiques en terme de santé. Cependant, l'extrapolation de ces données à la pratique clinique reste délicate. D'une part dans notre modèle, l'amélioration vasculaire se fait au prix d'une hyperinsulinémie marquée potentiellement délétère. D'autre part, l'application à l'expérimentation clinique pose des questions techniques mais également éthiques majeures, une bonne oxygénation étant considérée comme un principe de base de notre physiologie et comme un élément clef pour la bonne santé. Ces barrières ont

déjà été franchies dans certains domaines de la santé comme dans la santé du sport où l'HI est déjà utilisée pour améliorer les performances des athlètes. Elle aurait pour impact un effet « entraînement » de la cellule, qui, en s'adaptant aux conditions d'hypoxie transitoire aurait des capacités oxydatives améliorées. Dans le domaine des maladies CV, des études expérimentales portant sur l'effet conditionnement de l'HI ou bien encore comme thérapeutique anti-hypertensive apportent des résultats prometteurs. Dans ce dernier domaine, l'étape d'un essai clinique chez les sujets hypertendus a d'ailleurs été franchie avec des résultats encourageants (175).

Ce travail a permis d'aborder un champ d'investigations nouveau: l'impact de l'HI et donc des désaturations nocturnes sur la fonction mitochondriale. Alors que la mitochondrie constitue l'organe finale nécessitant un apport de l'organisme en O<sub>2</sub>, les données de la littérature sur l'impact de l'HI sur le fonctionnement mitochondrial restent très limitées. Certains auteurs attribuent, à titre d'exemple, le stress oxydant associé au SAHOS en majeure partie à la mitochondrie, en se basant exclusivement sur les données provenant d'expérience d'hypoxie soutenue. Or, de nombreuses études ont depuis démontré que l'HI et l'hypoxie soutenue avaient des conséquences moléculaires et métaboliques très différentes. Dans notre étude, en nous basant sur l'analyse de l'activité des complexes mitochondriaux, aucun impact n'a été noté après deux semaines d'HI seules. Une analyse plus détaillée, portant sur des durées d'exposition plus longues pourrait permettre de préciser les modifications adaptatives ou délétères potentielles de la mitochondrie dans le SAHOS et le rôle de cet organe dans le stress oxydant et la pathologie CV et métabolique associée au SAHOS.

## ***12. LISTE DES PUBLICATIONS DES TRAVAUX REALISES AUX COURS***

### ***DES ANNEES DE THESE***

**Trzepizur W**, Gaceb A, Arnaud C, Ribuot C, Levy P, Martinez MC, Gagnadoux F, Andriantsitohaina R. Vascular and hepatic impact of short-term intermittent hypoxia in a mouse model of metabolic syndrome (en revision dans Plos One)

**Trzepizur W**, Martinez MC, Priou P, Andriantsitohaina R, Gagnadoux F. Microparticles and vascular dysfunction in obstructive sleep apnea. Eur Respir J 2014 Jul;44(1):207-216

Tual-Chalot S, Gagnadoux F, **Trzepizur W**, Priou P, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Circulating microparticles from obstructive sleep apnea syndrome patients induce endothelin-mediated angiogenesis. Biochim Biophys Acta. 2014 Feb;1842(2):202-7



### ***13. BIBLIOGRAPHIE***

1. Agouni A, Ducluzeau PH, Benameur T, Faure S, Sladkova M, Duluc L, Leftheriotis G, Pechanova O, Delibegovic M, Martinez MC, and Andriantsitohaina R. Microparticles from patients with metabolic syndrome induce vascular hypo-reactivity via Fas/Fas-ligand pathway in mice. *PLoS One* 6: e27809, 2011.
2. Allahdadi KJ, Duling LC, Walker BR, and Kanagy NL. Eucapnic intermittent hypoxia augments endothelin-1 vasoconstriction in rats: role of PKCdelta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H920-927, 2008.
3. Allahdadi KJ, Walker BR, and Kanagy NL. Augmented endothelin vasoconstriction in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension* 45: 705-709, 2005.
4. Almendros I, Wang Y, and Gozal D. The Polymorphic and Contradictory Aspects of Intermittent Hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 307:129-40, 2014.
5. Alonso-Fernandez A, Garcia-Rio F, Arias MA, Hernanz A, de la Pena M, Pierola J, Barcelo A, Lopez-Collazo E, and Agusti A. Effects of CPAP on oxidative stress and nitrate efficiency in sleep apnoea: a randomised trial. *Thorax* 64: 581-586, 2009.
6. Arnaud C, Beguin PC, Lantuejoul S, Pepin JL, Guillermet C, Pelli G, Burger F, Buatois V, Ribuot C, Baguet JP, Mach F, Levy P, and Dematteis M. The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition. *Am J Respir Crit Care Med* 184: 724-731, 2011.

7. Arnaud C, Poulain L, Levy P, and Dematteis M. Inflammation contributes to the atherogenic role of intermittent hypoxia in apolipoprotein-E knock out mice. *Atherosclerosis* 219: 425-43, 2013.
8. Aron-Wisnewsky J, Minville C, Tordjman J, Levy P, Bouillot JL, Basdevant A, Bedossa P, Clement K, and Pepin JL. Chronic intermittent hypoxia is a major trigger for non-alcoholic fatty liver disease in morbid obese. *J Hepatol* 56: 225-233, 2013.
9. Ascensao A, Goncalves IO, Lumini-Oliveira J, Marques-Aleixo I, Dos Passos E, Rocha-Rodrigues S, Machado NG, Moreira AC, Oliveira PJ, Torrella JR, and Magalhaes J. Endurance training and chronic intermittent hypoxia modulate in vitro salicylate-induced hepatic mitochondrial dysfunction. *Mitochondrion* 12: 607-616, 2012.
10. Ayers L, Ferry B, Craig S, Nicoll D, Stradling JR, and Kohler M. Circulating cell-derived microparticles in patients with minimally symptomatic obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 33: 574-580, 2009.
11. Ayers L, Kohler M, Harrison P, Sargent I, Dragovic R, Schaap M, Nieuwland R, Brooks SA, and Ferry B. Measurement of circulating cell-derived microparticles by flow cytometry: sources of variability within the assay. *Thromb Res* 127: 370-377, 2011.
12. Ayers L, Stoewhas AC, Ferry B, Stradling J, and Kohler M. Elevated Levels of Endothelial Cell-Derived Microparticles following Short-Term Withdrawal of Continuous Positive Airway Pressure in Patients with Obstructive Sleep Apnea: Data from a Randomized Controlled Trial. *Respiration* 85:478-85, 2013.
13. Badran M, Golbidi S, Devlin A, Ayas N, and Laher I. Chronic intermittent hypoxia causes endothelial dysfunction in a mouse model of diet-induced obesity. *Sleep Med* 15: 596-602, 2014.

14. Baguet JP, Hammer L, Levy P, Pierre H, Launois S, Mallion JM, and Pepin JL. The severity of oxygen desaturation is predictive of carotid wall thickening and plaque occurrence. *Chest* 128: 3407-3412, 2005.
15. Bao G, Metreveli N, Li R, Taylor A, and Fletcher EC. Blood pressure response to chronic episodic hypoxia: role of the sympathetic nervous system. *J Appl Physiol (1985)* 83: 95-101, 1997.
16. Barbe F, Mayoralas LR, Duran J, Masa JF, Maimo A, Montserrat JM, Monasterio C, Bosch M, Ladaria A, Rubio M, Rubio R, Medinas M, Hernandez L, Vidal S, Douglas NJ, and Agusti AG. Treatment with continuous positive airway pressure is not effective in patients with sleep apnea but no daytime sleepiness. a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 134: 1015-1023, 2001.
17. Barcelo A, Miralles C, Barbe F, Vila M, Pons S, and Agusti AG. Abnormal lipid peroxidation in patients with sleep apnoea. *Eur Respir J* 16: 644-647, 2000.
18. Beckman JS and Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271: C1424-1437, 1996.
19. Belaidi E, Joyeux-Faure M, Ribuot C, Launois SH, Levy P, and Godin-Ribuot D. Major role for hypoxia inducible factor-1 and the endothelin system in promoting myocardial infarction and hypertension in an animal model of obstructive sleep apnea. *J Am Coll Cardiol* 53: 1309-1317, 2009.
20. Berry RB, Budhiraja R, Gottlieb DJ, Gozal D, Iber C, Kapur VK, Marcus CL, Mehra R, Parthasarathy S, Quan SF, Redline S, Strohl KP, Davidson Ward SL, and Tangredi MM. Rules for scoring respiratory events in sleep: update of the 2007 AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events. Deliberations of the Sleep Apnea Definitions Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. *J Clin Sleep Med* 8: 597-619, 2012.

21. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Peetz D, Hafner G, Tiret L, and Meyer J. Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation* 104: 1336-1342, 2001.
22. Borel JC, Roux-Lombard P, Tami ier R, Arnaud C, Monneret D, Arnol N, Baguet JP, Levy P, and Pepin JL. Endothelial dysfunction and specific inflammation in obesity hypoventilation syndrome. *PLoS One* 4: e6733, 2009.
23. Breslow MJ, Min-Lee K, Brown DR, Chacko VP, Palmer D, and Berkowitz DE. Effect of leptin deficiency on metabolic rate in ob/ob mice. *Am J Physiol* 276: E443-449, 1999.
24. Camaioni C, Gustapane M, Cialdella P, Della Bona R, and Biasucci LM. Microparticles and microRNAs: new players in the complex field of coagulation. *Intern Emerg Med* 8: 291-296, 2013.
25. Cano-Pumarega I, Duran-Cantolla J, Aizpuru F, Miranda-Serrano E, Rubio R, Martinez-Null C, de Miguel J, Egea C, Cancelo L, Alvarez A, Fernandez-Bolanos M, and Barbe F. Obstructive sleep apnea and systemic hypertension: longitudinal study in the general population: the Vitoria Sleep Cohort. *Am J Respir Crit Care Med* 184: 1299-1304, 2011.
26. Carlson JT, Hedner J, Elam M, Ejjnell H, Sellgren J, and Wallin BG. Augmented resting sympathetic activity in awake patients with obstructive sleep apnea. *Chest* 103: 1763-1768, 1993.
27. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, and Schumacker PT. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing. *J Biol Chem* 275: 25130-25138, 2000.
28. Chandel NS and Schumacker PT. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *J Appl Physiol (1985)* 88: 1880-1889, 2000.

29. Chirinos JA, Gurubhagavatula I, Teff K, Rader DJ, Wadden TA, Townsend R, Foster GD, Maislin G, Saif H, Broderick P, Chittams J, Hanlon AL, and Pack AI. CPAP, weight loss, or both for obstructive sleep apnea. *N Engl J Med* 370: 2265-2275; 2014.
30. Contreras C, Sanchez A, Garcia-Sacristan A, Martinez MC, Andriantsitohaina R, and Prieto D. Preserved insulin vasorelaxation and up-regulation of the Akt/eNOS pathway in coronary arteries from insulin resistant obese Zucker rats. *Atherosclerosis* 217: 331-339, 2011.
31. Cooper VL, Pearson SB, Bowker CM, Elliott MW, and Hainsworth R. Interaction of chemoreceptor and baroreceptor reflexes by hypoxia and hypercapnia - a mechanism for promoting hypertension in obstructive sleep apnoea. *J Physiol* 568: 677-687, 2005.
32. Cross MD, Mills NL, Al-Abri M, Riha R, Vennelle M, Mackay TW, Newby DE, and Douglas NJ. Continuous positive airway pressure improves vascular function in obstructive sleep apnoea/hypopnoea syndrome: a randomised controlled trial. *Thorax* 63: 578-583, 2008.
33. Delarue J and Magnan C. Free fatty acids and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10: 142-148, 2007.
34. Dematteis M, Julien C, Guillermet C, Sturm N, Lantuejoul S, Mallaret M, Levy P, and Gozal E. Intermittent hypoxia induces early functional cardiovascular remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 177: 227-235, 2008.
35. Dopp JM, Philippi NR, Marcus NJ, Olson EB, Bird CE, Moran JJ, Mueller SW, and Morgan BJ. Xanthine oxidase inhibition attenuates endothelial dysfunction caused by chronic intermittent hypoxia in rats. *Respiration* 82: 458-467, 2011.
36. Douglas RM, Ryu J, Kanaan A, Del Carmen Rivero M, Dugan LL, Haddad GG, and Ali SS. Neuronal death during combined intermittent hypoxia/hypercapnia is due to mitochondrial dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 298: C1594-1602, 2010.

37. Drager LF, Jun JC, and Polotsky VY. Metabolic consequences of intermittent hypoxia: relevance to obstructive sleep apnea. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 24: 843-851, 2010.
38. Drager LF, Li J, Reinke C, Bevans-Fonti S, Jun JC, and Polotsky VY. Intermittent hypoxia exacerbates metabolic effects of diet-induced obesity. *Obesity (Silver Spring)* 19: 2167-2174, 2011.
39. Drager LF, Li J, Shin MK, Reinke C, Aggarwal NR, Jun JC, Bevans-Fonti S, Sztalryd C, O'Byrne SM, Kroupa O, Olivecrona G, Blaner WS, and Polotsky VY. Intermittent hypoxia inhibits clearance of triglyceride-rich lipoproteins and inactivates adipose lipoprotein lipase in a mouse model of sleep apnoea. *Eur Heart J* 33: 783-790, 2012.
40. Drager LF, Lopes HF, Maki-Nunes C, Trombetta IC, Toschi-Dias E, Alves MJ, Fraga RF, Jun JC, Negrao CE, Krieger EM, Polotsky VY, and Lorenzi-Filho G. The impact of obstructive sleep apnea on metabolic and inflammatory markers in consecutive patients with metabolic syndrome. *PLoS One* 5: e12065, 2010.
41. Drager LF, Polotsky VY, and Lorenzi-Filho G. Obstructive sleep apnea: an emerging risk factor for atherosclerosis. *Chest* 140: 534-542, 2011.
42. Drager LF, Yao Q, Hernandez KL, Shin MK, Bevans-Fonti S, Gay J, Sussan TE, Jun JC, Myers AC, Olivecrona G, Schwartz AR, Halberg N, Scherer PE, Semenza GL, Powell DR, and Polotsky VY. Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis via activation of adipose angiopoietin-like 4. *Am J Respir Crit Care Med* 188: 240-248, 2013.
43. Dyugovskaya L, Lavie P, Hirsh M, and Lavie L. Activated CD8+ T-lymphocytes in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 25: 820-828, 2005.
44. Dyugovskaya L, Lavie P, and Lavie L. Increased adhesion molecules expression and production of reactive oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 934-939, 2002.

45. Dyugovskaya L, Polyakov A, Lavie P, and Lavie L. Delayed neutrophil apoptosis in patients with sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 177: 544-554, 2008.
46. El-Solh AA, Mador MJ, Sikka P, Dhillon RS, Amsterdam D, and Grant BJ. Adhesion molecules in patients with coronary artery disease and moderate-to-severe obstructive sleep apnea. *Chest* 121: 1541-1547, 2002.
47. Faille D, El-Assaad F, Mitchell AJ, Alessi MC, Chimini G, Fusai T, Grau GE, and Combes V. Endocytosis and intracellular processing of platelet microparticles by brain endothelial cells. *J Cell Mol Med* 16: 1731-1738, 2012.
48. Feng SZ, Tian JL, Zhang Q, Wang H, Sun N, Zhang Y, and Chen BY. An experimental research on chronic intermittent hypoxia leading to liver injury. *Sleep Breath* 15: 493-502, 2011.
49. Ferrera R, Bopassa JC, Angoulvant D, and Ovize M. Post-conditioning protects from cardioplegia and cold ischemia via inhibition of mitochondrial permeability transition pore. *J Heart Lung Transplant* 26: 604-609, 2007.
50. Fletcher EC. Cardiovascular consequences of obstructive sleep apnea: experimental hypoxia and sympathetic activity. *Sleep* 23 Suppl 4: S127-131, 2000.
51. Fletcher EC, Bao G, and Li R. Renin activity and blood pressure in response to chronic episodic hypoxia. *Hypertension* 34: 309-314, 1999.
52. Fletcher EC, Lesske J, Behm R, Miller CC, 3rd, Stauss H, and Unger T. Carotid chemoreceptors, systemic blood pressure, and chronic episodic hypoxia mimicking sleep apnea. *J Appl Physiol (1985)* 72: 1978-1984, 1992.

53. Fletcher EC, Miller J, Schaaf JW, and Fletcher JG. Urinary catecholamines before and after tracheostomy in patients with obstructive sleep apnea and hypertension. *Sleep* 10: 35-44, 1987.
54. Gautier-Veyret E, Arnaud C, Back M, Pepin JL, Petri MH, Baguet JP, Tamisier R, Levy P, and Stanke-Labesque F. Intermittent hypoxia-activated cyclooxygenase pathway: role in atherosclerosis. *Eur Respir J* 42: 404-413, 2013.
55. Geiser T, Buck F, Meyer BJ, Bassetti C, Haerberli A, and Gugger M. In vivo platelet activation is increased during sleep in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Respiration* 69: 229-234, 2002.
56. Gottlieb DJ, Punjabi NM, Mehra R, Patel SR, Quan SF, Babineau DC, Tracy RP, Rueschman M, Blumenthal RS, Lewis EF, Bhatt DL, and Redline S. CPAP versus oxygen in obstructive sleep apnea. *N Engl J Med* 370: 2276-2285, 2014.
57. Gottlieb DJ, Yenokyan G, Newman AB, O'Connor GT, Punjabi NM, Quan SF, Redline S, Resnick HE, Tong EK, Diener-West M, and Shahar E. Prospective study of obstructive sleep apnea and incident coronary heart disease and heart failure: the sleep heart health study. *Circulation* 122: 352-360, 2010.
58. Gozal D, Daniel JM, and Dohanich GP. Behavioral and anatomical correlates of chronic episodic hypoxia during sleep in the rat. *J Neurosci* 21: 2442-2450, 2001.
59. Grattagliano I, de Bari O, Bernardo TC, Oliveira PJ, Wang DQ, and Portincasa P. Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease--from origin to propagation. *Clin Biochem* 45: 610-618, 2012.
60. Greenberg H, Ye X, Wilson D, Htoo AK, Hendersen T, and Liu SF. Chronic intermittent hypoxia activates nuclear factor-kappaB in cardiovascular tissues in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 343: 591-596, 2006.



61. Grisham MB, Granger DN, and Lefer DJ. Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free Radic Biol Med* 25: 404-433, 1998.
62. Haim M, Tanne D, Boyko V, Reshef T, Goldbourt U, Leor J, Mekori YA, and Behar S. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and long-term risk of acute coronary events in patients with chronic coronary heart disease. Data from the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) Study. *J Am Coll Cardiol* 39: 1133-1138, 2002.
63. Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM, and Yellon DM. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H971-976, 2005.
64. Hendricks JC, Kline LR, Kovalski RJ, O'Brien JA, Morrison AR, and Pack AI. The English bulldog: a natural model of sleep-disordered breathing. *J Appl Physiol (1985)* 63: 1344-1350, 1987.
65. Iiyori N, Alonso LC, Li J, Sanders MH, Garcia-Ocana A, O'Doherty RM, Polotsky VY, and O'Donnell CP. Intermittent hypoxia causes insulin resistance in lean mice independent of autonomic activity. *Am J Respir Crit Care Med* 175: 851-857, 2007.
66. Ip MS, Lam KS, Ho C, Tsang KW, and Lam W. Serum leptin and vascular risk factors in obstructive sleep apnea. *Chest* 118: 580-586, 2000.
67. Ip MS, Tse HF, Lam B, Tsang KW, and Lam WK. Endothelial function in obstructive sleep apnea and response to treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 169: 348-353, 2004.
68. Itzhaki S, Dorchin H, Clark G, Lavie L, Lavie P, and Pillar G. The effects of 1-year treatment with a Herbst mandibular advancement splint on obstructive sleep apnea, oxidative stress, and endothelial function. *Chest* 131: 740-749, 2007.

69. Jackman KA, Zhou P, Faraco G, Peixoto PM, Coleman C, Voss HU, Pickel V, Manfredi G, and Iadecola C. Dichotomous effects of chronic intermittent hypoxia on focal cerebral ischemic injury. *Stroke* 45: 1460-1467, 2014.
70. Jelic S, Lederer DJ, Adams T, Padeletti M, Colombo PC, Factor P, and Le Jemtel TH. Endothelial repair capacity and apoptosis are inversely related in obstructive sleep apnea. *Vasc Health Risk Manag* 5: 909-920, 2009.
71. Jelic S, Padeletti M, Kawut SM, Higgins C, Canfield SM, Onat D, Colombo PC, Basner RC, Factor P, and LeJemtel TH. Inflammation, oxidative stress, and repair capacity of the vascular endothelium in obstructive sleep apnea. *Circulation* 117: 2270-2278, 2008.
72. Ji C, Dai Y, Jiang W, Liu J, Hou M, Wang J, Buren J, and Li X. Postnatal overfeeding promotes early onset and exaggeration of high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease through disordered hepatic lipid metabolism in rats. *J Nutr Biochem*, 2014 (*sous presse*).
73. Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, Ziman BD, Wang S, Ytrehus K, Antos CL, Olson EN, and Sollott SJ. Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest* 113: 1535-1549, 2004.
74. Jullian-Desayes I, Joyeux-Faure M, Tamisier R, Launois S, Borel AL, Levy P, and Pepin JL. Impact of obstructive sleep apnea treatment by continuous positive airway pressure on cardiometabolic biomarkers: A systematic review from sham CPAP randomized controlled trials. *Sleep Med Rev*, 2014 (*sous presse*).
75. Jun J, Reinke C, Bedja D, Berkowitz D, Bevans-Fonti S, Li J, Barouch LA, Gabrielson K, and Polotsky VY. Effect of intermittent hypoxia on atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 209: 381-386, 2010.

76. Jun J, Savransky V, Nanayakkara A, Bevans S, Li J, Smith PL, and Polotsky VY. Intermittent hypoxia has organ-specific effects on oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R1274-1281, 2008.
77. Kahn SE, Hull RL, and Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444: 840-846, 2006.
78. Kalaria RN, Spoor L, Laude EA, Emery CJ, Thwaites-Bee D, Fairlie J, Oakley AE, Barer DH, and Barer GR. Hypoxia of sleep apnoea: cardiopulmonary and cerebral changes after intermittent hypoxia in rats. *Respir Physiol Neurobiol* 140: 53-62, 2004.
79. Kanagy NL. Vascular effects of intermittent hypoxia. *Ilar J* 50: 282-288, 2009.
80. Kanagy NL, Walker BR, and Nelin LD. Role of endothelin in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension* 37: 511-515, 2001.
81. Kendzerska T, Gershon AS, Hawker G, Leung RS, and Tomlinson G. Obstructive sleep apnea and risk of cardiovascular events and all-cause mortality: a decade-long historical cohort study. *PLoS Med* 11: e1001599, 2014.
82. Kendzerska T, Gershon AS, Hawker G, Tomlinson G, and Leung RS. Obstructive sleep apnea and incident diabetes. A historical cohort study. *Am J Respir Crit Care Med* 190: 218-225, 2014.
83. Kern M, Knigge A, Heiker JT, Kosacka J, Stumvoll M, Kovacs P, Bluher M, and Kloting N. C57BL/6JRj mice are protected against diet induced obesity (DIO). *Biochem Biophys Res Commun* 417: 717-720, 2012.
84. Kim J, Bhattacharjee R, Kheirandish-Gozal L, Spruyt K, and Gozal D. Circulating microparticles in children with sleep disordered breathing. *Chest* 140: 408-417, 2011.

85. Klein JB, Barati MT, Wu R, Gozal D, Sachleben LR, Jr., Kausar H, Trent JO, Gozal E, and Rane MJ. Akt-mediated valosin-containing protein 97 phosphorylation regulates its association with ubiquitinated proteins. *J Biol Chem* 280: 31870-31881, 2005.
86. Kohler M, Craig S, Nicoll D, Leeson P, Davies RJ, and Stradling JR. Endothelial function and arterial stiffness in minimally symptomatic obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 178: 984-988, 2008.
87. Kohler M, Pepperell JC, Casadei B, Craig S, Crosthwaite N, Stradling JR, and Davies RJ. CPAP and measures of cardiovascular risk in males with OSAS. *Eur Respir J* 32: 1488-1496, 2008.
88. Kolar F, Jezkova J, Balkova P, Breh J, Neckar J, Novak F, Novakova O, Tomasova H, Srbova M, Ost'adal B, Wilhelm J, and Herget J. Role of oxidative stress in PKC-delta upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H224-230, 2007.
89. Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, Ha SW, Igarashi M, Yamauchi T, Feener EP, Herbert TP, Rhodes CJ, and King GL. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin. *Circulation* 101: 676-681, 2000.
90. Lafontan M and Langin D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res* 48: 275-297, 2009.
91. Lai CJ, Yang CC, Hsu YY, Lin YN, and Kuo TB. Enhanced sympathetic outflow and decreased baroreflex sensitivity are associated with intermittent hypoxia-induced systemic hypertension in conscious rats. *J Appl Physiol (1985)* 100: 1974-1982, 2006.
92. Lavie L, Vishnevsky A, and Lavie P. Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. *Sleep* 27: 123-128, 2004.

93. Lavie P and Lavie L. Unexpected survival advantage in elderly people with moderate sleep apnoea. *J Sleep Res* 18: 397-403, 2009.
94. Lazo M and Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective. *Semin Liver Dis* 28: 339-350, 2008.
95. Lefebvre B, Godin-Ribuot D, Joyeux-Faure M, Caron F, Bessard G, Levy P, and Stanke-Labesque F. Functional assessment of vascular reactivity after chronic intermittent hypoxia in the rat. *Respir Physiol Neurobiol* 150: 278-286, 2006.
96. Lefebvre B, Pepin JL, Baguet JP, Tamisier R, Roustit M, Riedweg K, Bessard G, Levy P, and Stanke-Labesque F. Leukotriene B4: early mediator of atherosclerosis in obstructive sleep apnoea? *Eur Respir J* 32: 113-120, 2008.
97. Lesske J, Fletcher EC, Bao G, and Unger T. Hypertension caused by chronic intermittent hypoxia--influence of chemoreceptors and sympathetic nervous system. *J Hypertens* 15: 1593-1603, 1997.
98. Li J, Bosch-Marce M, Nanayakkara A, Savransky V, Fried SK, Semenza GL, and Polotsky VY. Altered metabolic responses to intermittent hypoxia in mice with partial deficiency of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Physiol Genomics* 25: 450-457, 2006.
99. Li J, Grigoryev DN, Ye SQ, Thorne L, Schwartz AR, Smith PL, O'Donnell CP, and Polotsky VY. Chronic intermittent hypoxia upregulates genes of lipid biosynthesis in obese mice. *J Appl Physiol (1985)* 99: 1643-1648, 2005.
100. Li J, Nanayakkara A, Jun J, Savransky V, and Polotsky VY. Effect of deficiency in SREBP cleavage-activating protein on lipid metabolism during intermittent hypoxia. *Physiol Genomics* 31: 273-280, 2007.

101. Li J, Savransky V, Nanayakkara A, Smith PL, O'Donnell CP, and Polotsky VY. Hyperlipidemia and lipid peroxidation are dependent on the severity of chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* (1985) 102: 557-563, 2007.
102. Li J, Thorne LN, Punjabi NM, Sun CK, Schwartz AR, Smith PL, Marino RL, Rodriguez A, Hubbard WC, O'Donnell CP, and Polotsky VY. Intermittent hypoxia induces hyperlipidemia in lean mice. *Circ Res* 97: 698-706, 2005.
103. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420: 868-874, 2002.
104. Lin MT, Hessinger DA, Pearce WJ, and Longo LD. Developmental differences in Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel activity in ovine basilar artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H701-709, 2003.
105. Lindberg E, Elmasry A, Gislason T, Janson C, Bengtsson H, Hetta J, Nettelbladt M, and Boman G. Evolution of sleep apnea syndrome in sleepy snorers: a population-based prospective study. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 2024-2027, 1999.
106. Louis M and Punjabi NM. Effects of acute intermittent hypoxia on glucose metabolism in awake healthy volunteers. *J Appl Physiol* (1985) 106: 1538-1544, 2009.
107. Lugaresi E, Cirignotta F, Coccagna G, and Piana C. Some epidemiological data on snoring and cardiocirculatory disturbances. *Sleep* 3: 221-224, 1980.
108. Magana MM, Lin SS, Dooley KA, and Osborne TF. Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase promoter requires two interdependent binding sites for sterol regulatory element binding proteins. *J Lipid Res* 38: 1630-1638, 1997.
109. Malagat MLT DG, Mazat JP. *Enzymatic and polarographic measurements of the respiratory chain complexes. In: Mitochondrial Diseases.* Berlin, 1999.

110. Manrique C, Lastra G, and Sowers JR. New insights into insulin action and resistance in the vasculature. *Ann N Y Acad Sci* 1311: 138-150, 2014.
111. Manukhina EB, Jasti D, Vanin AF, and Downey HF. Intermittent hypoxia conditioning prevents endothelial dysfunction and improves nitric oxide storage in spontaneously hypertensive rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 236: 867-873, 2011.
112. Marcus NJ, Philippi NR, Bird CE, Li YL, Schultz HD, and Morgan BJ. Effect of AT1 receptor blockade on intermittent hypoxia-induced endothelial dysfunction. *Respir Physiol Neurobiol* 183: 67-74, 2012.
113. Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, and Agusti AG. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet* 365: 1046-1053, 2005.
114. Marrone O, Riccobono L, Salvaggio A, Mirabella A, Bonanno A, and Bonsignore MR. Catecholamines and blood pressure in obstructive sleep apnea syndrome. *Chest* 103: 722-727, 1993.
115. Martin S, Tesse A, Hugel B, Martinez MC, Morel O, Freyssinet JM, and Andriantsitohaina R. Shed membrane particles from T lymphocytes impair endothelial function and regulate endothelial protein expression. *Circulation* 109: 1653-1659, 2004.
116. Martinez MC, Tesse A, Zobairi F, and Andriantsitohaina R. Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H1004-1009, 2005.
117. Martinez MC, Tual-Chalot S, Leonetti D, and Andriantsitohaina R. Microparticles: targets and tools in cardiovascular disease. *Trends Pharmacol Sci* 32: 659-665, 2011.

118. Maruyama K, Morishita E, Sekiya A, Omote M, Kadono T, Asakura H, Hashimoto M, Kobayashi M, Nakatsumi Y, Takada S, and Ohtake S. Plasma levels of platelet-derived microparticles in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *J Atheroscler Thromb* 19: 98-104, 2012.
119. McCord JM and Edeas MA. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomed Pharmacother* 59: 139-142, 2005.
120. Mehra R, Storfer-Isser A, Kirchner HL, Johnson N, Jenny N, Tracy RP, and Redline S. Soluble interleukin 6 receptor: A novel marker of moderate to severe sleep-related breathing disorder. *Arch Intern Med* 166: 1725-1731, 2006.
121. Milano G, Abruzzo PM, Bolotta A, Marini M, Terraneo L, Ravara B, Gorza L, Vitadello M, Burattini S, Curzi D, Falcieri E, von Segesser LK, and Samaja M. Impact of the phosphatidylinositide 3-kinase signaling pathway on the cardioprotection induced by intermittent hypoxia. *PLoS One* 8: e76659, 2013.
122. Mills PJ, Kennedy BP, Loreda JS, Dimsdale JE, and Ziegler MG. Effects of nasal continuous positive airway pressure and oxygen supplementation on norepinephrine kinetics and cardiovascular responses in obstructive sleep apnea. *J Appl Physiol (1985)* 100: 343-348, 2006.
123. Mingorance C, Duluc L, Chalopin M, Simard G, Ducluzeau PH, Herrera MD, Alvarez de Sotomayor M, and Andriantsitohaina R. Propionyl-L-carnitine corrects metabolic and cardiovascular alterations in diet-induced obese mice and improves liver respiratory chain activity. *PLoS One* 7: e34268.
124. Minville C, Hilleret MN, Tamisier R, Aron-Wisnewsky J, Clement K, Trocme C, Borel JC, Levy P, Zarski JP, and Pepin JL. Nonalcoholic fatty liver disease, nocturnal hypoxia, and endothelial function in patients with sleep apnea. *Chest* 145: 525-533, 2012.



125. Mokhlesi B and Tulaimat A. Recent advances in obesity hypoventilation syndrome. *Chest* 132: 1322-1336, 2007.
126. Moller DS, Lind P, Strunge B, and Pedersen EB. Abnormal vasoactive hormones and 24-hour blood pressure in obstructive sleep apnea. *Am J Hypertens* 16: 274-280, 2003.
127. Montagnani M, Golovchenko I, Kim I, Koh GY, Goalstone ML, Mundhekar AN, Johansen M, Kucik DF, Quon MJ, and Draznin B. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances mitogenic actions of insulin in endothelial cells. *J Biol Chem* 277: 1794-1799, 2002.
128. Montagnani M, Ravichandran LV, Chen H, Esposito DL, and Quon MJ. Insulin receptor substrate-1 and phosphoinositide-dependent kinase-1 are required for insulin-stimulated production of nitric oxide in endothelial cells. *Mol Endocrinol* 16: 1931-1942, 2002.
129. Montserrat JM, Garcia-Rio F, and Barbe F. Diagnostic and therapeutic approach to nonsleepy apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 176: 6-9, 2007.
130. Mostefai HA, Andriantsitohaina R, and Martinez MC. Plasma membrane microparticles in angiogenesis: role in ischemic diseases and in cancer. *Physiol Res* 57: 311-320, 2008.
131. Muniyappa R, Montagnani M, Koh KK, and Quon MJ. Cardiovascular actions of insulin. *Endocr Rev* 28: 463-491, 2007.
132. Munzberg H and Morrison CD. Structure, production and signaling of leptin. *Metabolism*, 2014 (*sous presse*).
133. Muraki I, Tanigawa T, Yamagishi K, Sakurai S, Ohira T, Imano H, Kitamura A, Kiyama M, Sato S, Shimamoto T, Konishi M, and Iso H. Nocturnal intermittent hypoxia and C reactive protein among middle-aged community residents: a cross-sectional survey. *Thorax* 65: 523-527, 2010.

134. Murry CE, Jennings RB, and Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74: 1124-1136, 1986.
135. Musso G, Cassader M, Olivetti C, Rosina F, Carbone G, and Gambino R. Association of obstructive sleep apnoea with the presence and severity of non-alcoholic fatty liver disease. A systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 14: 417-431, 2013.
136. Nacher M, Farre R, Montserrat JM, Torres M, Navajas D, Bulbena O, and Serrano-Mollar A. Biological consequences of oxygen desaturation and respiratory effort in an acute animal model of obstructive sleep apnea (OSA). *Sleep Med* 10: 892-897, 2009.
137. Nakajima T, Hamakubo T, Kodama T, Inazawa J, and Emi M. Genomic structure and chromosomal mapping of the human sterol regulatory element binding protein (SREBP) cleavage-activating protein (SCAP) gene. *J Hum Genet* 44: 402-407, 1999.
138. Narkiewicz K, van de Borne PJ, Cooley RL, Dyken ME, and Somers VK. Sympathetic activity in obese subjects with and without obstructive sleep apnea. *Circulation* 98: 772-776, 1998.
139. Narkiewicz K, van de Borne PJ, Montano N, Dyken ME, Phillips BG, and Somers VK. Contribution of tonic chemoreflex activation to sympathetic activity and blood pressure in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation* 97: 943-945, 1998.
140. Newman AB, Nieto FJ, Guidry U, Lind BK, Redline S, Pickering TG, and Quan SF. Relation of sleep-disordered breathing to cardiovascular disease risk factors: the Sleep Heart Health Study. *Am J Epidemiol* 154: 50-59, 2001.
141. Nieto FJ, Young TB, Lind BK, Shahar E, Samet JM, Redline S, D'Agostino RB, Newman AB, Lebowitz MD, and Pickering TG. Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. Sleep Heart Health Study. *Jama* 283: 1829-1836, 2000.

142. Nowbar S, Burkart KM, Gonzales R, Fedorowicz A, Gozansky WS, Gaudio JC, Taylor MR, and Zwillich CW. Obesity-associated hypoventilation in hospitalized patients: prevalence, effects, and outcome. *Am J Med* 116: 1-7, 2004.
143. Ntambi JM and Miyazaki M. Regulation of stearyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog Lipid Res* 43: 91-104, 2004.
144. O'Connor GT, Caffo B, Newman AB, Quan SF, Rapoport DM, Redline S, Resnick HE, Samet J, and Shahar E. Prospective study of sleep-disordered breathing and hypertension: the Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med* 179: 1159-1164, 2009.
145. Ohga E, Nagase T, Tomita T, Teramoto S, Matsuse T, Katayama H, and Ouchi Y. Increased levels of circulating ICAM-1, VCAM-1, and L-selectin in obstructive sleep apnea syndrome. *J Appl Physiol (1985)* 87: 10-14, 1999.
146. Parker JD, Brooks D, Kozar LF, Render-Teixeira CL, Horner RL, Douglas Bradley T, and Phillipson EA. Acute and chronic effects of airway obstruction on canine left ventricular performance. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 1888-1896, 1999.
147. Pendlebury ST, Pepin JL, Veale D, and Levy P. Natural evolution of moderate sleep apnoea syndrome: significant progression over a mean of 17 months. *Thorax* 52: 872-878, 1997.
148. Peppard PE, Young T, Palta M, and Skatrud J. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N Engl J Med* 342: 1378-1384, 2000.
149. Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroroberto P, Verdecchia P, and Schillaci G. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation* 104: 191-196, 2001.

150. Pessayre D, Fromenty B, and Mansouri A. Mitochondrial injury in steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 16: 1095-1105, 2004.
151. Philip P, Gross CE, Taillard J, Bioulac B, and Guilleminault C. An animal model of a spontaneously reversible obstructive sleep apnea syndrome in the monkey. *Neurobiol Dis* 20: 428-431, 2005.
152. Philippi NR, Bird CE, Marcus NJ, Olson EB, Chesler NC, and Morgan BJ. Time course of intermittent hypoxia-induced impairments in resistance artery structure and function. *Respir Physiol Neurobiol* 170: 157-163, 2010.
153. Phillips SA, Olson EB, Morgan BJ, and Lombard JH. Chronic intermittent hypoxia impairs endothelium-dependent dilation in rat cerebral and skeletal muscle resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H388-393, 2004.
154. Pinto JM, Garpestad E, Weiss JW, Bergau DM, and Kirby DA. Hemodynamic changes associated with obstructive sleep apnea followed by arousal in a porcine model. *J Appl Physiol (1985)* 75: 1439-1443, 1993.
155. Polak J, Shimoda LA, Drager LF, Undem C, McHugh H, Polotsky VY, and Punjabi NM. Intermittent hypoxia impairs glucose homeostasis in C57BL6/J mice: partial improvement with cessation of the exposure. *Sleep* 36: 1483-1490, 2013.
156. Polotsky VY, Li J, Punjabi NM, Rubin AE, Smith PL, Schwartz AR, and O'Donnell CP. Intermittent hypoxia increases insulin resistance in genetically obese mice. *J Physiol* 552: 253-264, 2003.
157. Polotsky VY, Patil SP, Savransky V, Laffan A, Fonti S, Frame LA, Steele KE, Schweitzer MA, Clark JM, Torbenson MS, and Schwartz AR. Obstructive sleep apnea, insulin resistance, and steatohepatitis in severe obesity. *Am J Respir Crit Care Med* 179: 228-234, 2009.

158. Polotsky VY, Rubin AE, Balbir A, Dean T, Smith PL, Schwartz AR, and O'Donnell CP. Intermittent hypoxia causes REM sleep deficits and decreases EEG delta power in NREM sleep in the C57BL/6J mouse. *Sleep Med* 7: 7-16, 2006.
159. Poulain L, Thomas A, Rieusset J, Casteilla L, Levy P, Arnaud C, and Dematteis M. Visceral white fat remodelling contributes to intermittent hypoxia-induced atherogenesis. *Eur Respir J* 43: 513-522, 2014.
160. Priou P, Gagnadoux F, Tesse A, Mastronardi ML, Agouni A, Meslier N, Racineux JL, Martinez MC, Trzepizur W, and Andriantsitohaina R. Endothelial dysfunction and circulating microparticles from patients with obstructive sleep apnea. *Am J Pathol* 177: 974-983, 2010.
161. Punjabi NM, Caffo BS, Goodwin JL, Gottlieb DJ, Newman AB, O'Connor GT, Rapoport DM, Redline S, Resnick HE, Robbins JA, Shahar E, Unruh ML, and Samet JM. Sleep-disordered breathing and mortality: a prospective cohort study. *PLoS Med* 6: e1000132, 2009.
162. Redline S, Yenokyan G, Gottlieb DJ, Shahar E, O'Connor GT, Resnick HE, Diener-West M, Sanders MH, Wolf PA, Geraghty EM, Ali T, Lebowitz M, and Punjabi NM. Obstructive sleep apnea-hypopnea and incident stroke: the sleep heart health study. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 269-277, 2010.
163. Reinke C, Bevans-Fonti S, Drager LF, Shin MK, and Polotsky VY. Effects of different acute hypoxic regimens on tissue oxygen profiles and metabolic outcomes. *J Appl Physiol (1985)* 111: 881-890, 2011.
164. Rolo AP, Teodoro JS, and Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med* 52: 59-69, 2011.
165. Ryan S, Taylor CT, and McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation* 112: 2660-2667, 2005.

166. Sabatier F, Darmon P, Hugel B, Combes V, Sanmarco M, Velut JG, Arnoux D, Charpiot P, Freyssinet JM, Oliver C, Sampol J, and Dignat-George F. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* 51: 2840-2845, 2002.
167. Savage DB, Petersen KF, and Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev* 87: 507-520, 2007.
168. Savransky V, Bevans S, Nanayakkara A, Li J, Smith PL, Torbenson MS, and Polotsky VY. Chronic intermittent hypoxia causes hepatitis in a mouse model of diet-induced fatty liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293: G871-877, 2007.
169. Savransky V, Nanayakkara A, Li J, Bevans S, Smith PL, Rodriguez A, and Polotsky VY. Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis. *Am J Respir Crit Care Med* 175: 1290-1297, 2007.
170. Savransky V, Nanayakkara A, Vivero A, Li J, Bevans S, Smith PL, Torbenson MS, and Polotsky VY. Chronic intermittent hypoxia predisposes to liver injury. *Hepatology* 45: 1007-1013, 2007.
171. Savransky V, Reinke C, Jun J, Bevans-Fonti S, Nanayakkara A, Li J, Myers AC, Torbenson MS, and Polotsky VY. Chronic intermittent hypoxia and acetaminophen induce synergistic liver injury in mice. *Exp Physiol* 94: 228-239, 2009.
172. Schultz A, Lavie L, Hochberg I, Beyar R, Stone T, Skorecki K, Lavie P, Roguin A, and Levy AP. Interindividual heterogeneity in the hypoxic regulation of VEGF: significance for the development of the coronary artery collateral circulation. *Circulation* 100: 547-552, 1999.
173. Schulz R, Hummel C, Heinemann S, Seeger W, and Grimminger F. Serum levels of vascular endothelial growth factor are elevated in patients with obstructive sleep apnea and severe nighttime hypoxia. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 67-70, 2002.

174. Schulz R, Mahmoudi S, Hattar K, Sibelius U, Olschewski H, Mayer K, Seeger W, and Grimminger F. Enhanced release of superoxide from polymorphonuclear neutrophils in obstructive sleep apnea. Impact of continuous positive airway pressure therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 566-570, 2000.
175. Serebrovskaya TV, Manukhina EB, Smith ML, Downey HF, and Mallet RT. Intermittent hypoxia: cause of or therapy for systemic hypertension? *Exp Biol Med (Maywood)* 233: 627-650, 2008.
176. Shah N, Redline S, Yaggi HK, Wu R, Zhao CG, Ostfeld R, Menegus M, Tracy D, Brush E, Appel WD, and Kaplan RC. Obstructive sleep apnea and acute myocardial infarction severity: ischemic preconditioning? *Sleep Breath* 17: 819-826, 2013.
177. Shahar E, Whitney CW, Redline S, Lee ET, Newman AB, Javier Nieto F, O'Connor GT, Boland LL, Schwartz JE, and Samet JM. Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: cross-sectional results of the Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 19-25, 2001.
178. Solaini G, Baracca A, Lenaz G, and Sgarbi G. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1797: 1171-1177, 2010.
179. Somers VK, Dyken ME, Clary MP, and Abboud FM. Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep apnea. *J Clin Invest* 96: 1897-1904, 1995.
180. Song D, Fang G, Mao SZ, Ye X, Liu G, Gong Y, and Liu SF. Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis by NF-kappaB-dependent mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1822: 1650-1659, 2012.
181. Stanke-Labesque F, Pepin JL, de Jouvencel T, Arnaud C, Baguet JP, Petri MH, Tamisier R, Jourdil JF, Levy P, and Back M. Leukotriene B4 pathway activation and atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *J Lipid Res* 53: 1944-1951, 2012.

182. Steiner S, Schueller PO, Schulze V, and Strauer BE. Occurrence of coronary collateral vessels in patients with sleep apnea and total coronary occlusion. *Chest* 137: 516-520, 2010.
183. Sweazea KL, Kanagy NL, and Walker BR. Increased adiposity does not exacerbate impaired vasodilation in rats exposed to eucapnic intermittent hypoxia. *Respiration* 81: 47-56, 2011.
184. Tabor DE, Kim JB, Spiegelman BM, and Edwards PA. Identification of conserved cis-elements and transcription factors required for sterol-regulated transcription of stearoyl-CoA desaturase 1 and 2. *J Biol Chem* 274: 20603-20610, 1999.
185. Taheri S, Austin D, Lin L, Nieto FJ, Young T, and Mignot E. Correlates of serum C-reactive protein (CRP)--no association with sleep duration or sleep disordered breathing. *Sleep* 30: 991-996, 2007.
186. Takahashi S, Nakamura Y, Nishijima T, Sakurai S, and Inoue H. Essential roles of angiotensin II in vascular endothelial growth factor expression in sleep apnea syndrome. *Respir Med* 99: 1125-1131, 2005.
187. Tamisier R, Gilmartin GS, Launois SH, Pepin JL, Nespoulet H, Thomas R, Levy P, and Weiss JW. A new model of chronic intermittent hypoxia in humans: effect on ventilation, sleep, and blood pressure. *J Appl Physiol (1985)* 107: 17-24, 2009.
188. Tanne F, Gagnadoux F, Chazouilleres O, Fleury B, Wendum D, Lasnier E, Lebeau B, Poupon R, and Serfaty L. Chronic liver injury during obstructive sleep apnea. *Hepatology* 41: 1290-1296, 2005.
189. Thibault H, Piot C, Staat P, Bontemps L, Sportouch C, Rioufol G, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Aupetit JF, Finet G, Andre-Fouet X, Macia JC, Raczka F, Rossi R, Itti R,



Kirkorian G, Derumeaux G, and Ovize M. Long-term benefit of postconditioning. *Circulation* 117: 1037-1044, 2008.

190. Tilkian AG, Guilleminault C, Schroeder JS, Lehrman KL, Simmons FB, and Dement WC. Hemodynamics in sleep-induced apnea. Studies during wakefulness and sleep. *Ann Intern Med* 85: 714-719, 1976.

191. Tokuda F, Sando Y, Matsui H, Koike H, and Yokoyama T. Serum levels of adipocytokines, adiponectin and leptin, in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Intern Med* 47: 1843-1849, 2008.

192. Troncoso Brindeiro CM, da Silva AQ, Allahdadi KJ, Youngblood V, and Kanagy NL. Reactive oxygen species contribute to sleep apnea-induced hypertension in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H2971-2976, 2007.

193. Trzepizur W, Gagnadoux F, Abraham P, Rousseau P, Meslier N, Saumet JL, and Racineux JL. Microvascular endothelial function in obstructive sleep apnea: Impact of continuous positive airway pressure and mandibular advancement. *Sleep Med* 10: 746-752, 2009.

194. Trzepizur W, Le Vaillant M, Meslier N, Pigeanne T, Masson P, Humeau MP, Bizieux-Thaminy A, Goupil F, Chollet S, Ducluzeau PH, and Gagnadoux F. Independent association between nocturnal intermittent hypoxemia and metabolic dyslipidemia. *Chest* 143: 1584-1589, 2013.

195. Trzepizur W, Martinez MC, Priou P, Andriantsitohaina R, and Gagnadoux F. Microparticles and vascular dysfunction in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 44: 207-216, 2014.

196. Trzepizur W, Priou P, Paris A, Nardi J, Tual-Chalot S, Meslier N, Urban T, Andriantsitohaina R, Martinez MC, and Gagnadoux F. Nocturnal release of leukocyte-derived microparticles in males with obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 37: 1293-1295, 2011.

197. Tual-Chalot S, Fatoumata K, Priou P, Trzepizur W, Gaceb A, Contreras C, Prieto D, Martinez MC, Gagnadoux F, and Andriantsitohaina R. Circulating microparticles from patients with obstructive sleep apnea enhance vascular contraction: mandatory role of the endothelium. *Am J Pathol* 181: 1473-1482, 2012.
198. Tual-Chalot S, Gagnadoux F, Trzepizur W, Priou P, Andriantsitohaina R, and Martinez MC. Circulating microparticles from obstructive sleep apnea syndrome patients induce endothelin-mediated angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1842: 202-207, 2014.
199. Tual-Chalot S, Guibert C, Muller B, Savineau JP, Andriantsitohaina R, and Martinez MC. Circulating microparticles from pulmonary hypertensive rats induce endothelial dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 261-268, 2010.
200. Tual-Chalot S, Leonetti D, Andriantsitohaina R, and Martinez MC. Microvesicles: intercellular vectors of biological messages. *Mol Interv* 11: 88-94, 2011.
201. Unger RH, Clark GO, Scherer PE, and Orci L. Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta* 1801: 209-214, 2010.
202. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, and Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-84, 2007.
203. Veasey S. Insight from animal models into the cognitive consequences of adult sleep-disordered breathing. *Ilar J* 50: 307-311, 2009.
204. Villanova N, Moscatiello S, Ramilli S, Bugianesi E, Magalotti D, Vanni E, Zoli M, and Marchesini G. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 42: 473-480, 2005.

205. Wang B, Yan B, Song D, Ye X, and Liu SF. Chronic intermittent hypoxia down-regulates endothelial nitric oxide synthase expression by an NF-kappaB-dependent mechanism. *Sleep Med* 14: 165-171, 2013.
206. Wang H, Tian JL, Feng SZ, Sun N, Chen BY, and Zhang Y. The organ specificity in pathological damage of chronic intermittent hypoxia: an experimental study on rat with high-fat diet. *Sleep Breath* 17: 957-965, 2013.
207. Wang N, Khan SA, Prabhakar NR, and Nanduri J. Impairment of pancreatic beta-cell function by chronic intermittent hypoxia. *Exp Physiol* 98: 1376-1385; 2013.
208. Wang ZH, Cai XL, Wu L, Yu Z, Liu JL, Zhou ZN, Liu J, and Yang HT. Mitochondrial energy metabolism plays a critical role in the cardioprotection afforded by intermittent hypobaric hypoxia. *Exp Physiol* 97: 1105-1118, 2012.
209. Xie H, Ray PE, and Short BL. NF-kappaB activation plays a role in superoxide-mediated cerebral endothelial dysfunction after hypoxia/reoxygenation. *Stroke* 36: 1047-1052, 2005.
210. Xu H, Wilcox D, Nguyen P, Voorbach M, Suhar T, Morgan SJ, An WF, Ge L, Green J, Wu Z, Gimeno RE, Reilly R, Jacobson PB, Collins CA, Landschulz K, and Surowy T. Hepatic knockdown of mitochondrial GPAT1 in ob/ob mice improves metabolic profile. *Biochem Biophys Res Commun* 349: 439-448, 2006.
211. Xu J, Long YS, Gozal D, and Epstein PN. Beta-cell death and proliferation after intermittent hypoxia: role of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 46: 783-790, 2009.
212. Yamauchi M, Nakano H, Maekawa J, Okamoto Y, Ohnishi Y, Suzuki T, and Kimura H. Oxidative stress in obstructive sleep apnea. *Chest* 127: 1674-1679, 2005.

213. Yao M, Tachibana N, Okura M, Ikeda A, Tanigawa T, Yamagishi K, Sato S, Shimamoto T, and Iso H. The relationship between sleep-disordered breathing and high-sensitivity C-reactive protein in Japanese men. *Sleep* 29: 661-665, 2006.
214. Yao Q, Shin MK, Jun JC, Hernandez KL, Aggarwal NR, Mock JR, Gay J, Drager LF, and Polotsky VY. Effect of chronic intermittent hypoxia on triglyceride uptake in different tissues. *J Lipid Res* 54: 1058-1065, 2013.
215. Yokoe T, Alonso LC, Romano LC, Rosa TC, O'Doherty RM, Garcia-Ocana A, Minoguchi K, and O'Donnell CP. Intermittent hypoxia reverses the diurnal glucose rhythm and causes pancreatic beta-cell replication in mice. *J Physiol* 586: 899-911, 2008.
216. Yokoe T, Minoguchi K, Matsuo H, Oda N, Minoguchi H, Yoshino G, Hirano T, and Adachi M. Elevated levels of C-reactive protein and interleukin-6 in patients with obstructive sleep apnea syndrome are decreased by nasal continuous positive airway pressure. *Circulation* 107: 1129-1134, 2003.
217. Yoshida K, Shimizugawa T, Ono M, and Furukawa H. Angiotensin-like protein 4 is a potent hyperlipidemia-inducing factor in mice and inhibitor of lipoprotein lipase. *J Lipid Res* 43: 1770-1772, 2002.
218. Young T, Finn L, Peppard PE, Szklo-Coxe M, Austin D, Nieto FJ, Stubbs R, and Hla KM. Sleep disordered breathing and mortality: eighteen-year follow-up of the Wisconsin sleep cohort. *Sleep* 31: 1071-1078, 2008.
219. Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, and Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med* 328: 1230-1235, 1993.
220. Yuan ZM, Chen BY, Wang PX, Li SY, Chen YL, and Dong LX. [Changes of angiotensin II and its receptor during the development of chronic intermittent hypoxia-induced hypertension in rats]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 27: 577-580, 2004.

221. Yun CH, Jung KH, Chu K, Kim SH, Ji KH, Park HK, Kim HC, Lee ST, Lee SK, and Roh JK. Increased circulating endothelial microparticles and carotid atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *J Clin Neurol* 6: 89-98, 2010.
222. Zechner R, Kienesberger PC, Haemmerle G, Zimmermann R, and Lass A. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J Lipid Res* 50: 3-21, 2009.
223. Ziegler MG, Mills PJ, Loreda JS, Ancoli-Israel S, and Dimsdale JE. Effect of continuous positive airway pressure and placebo treatment on sympathetic nervous activity in patients with obstructive sleep apnea. *Chest* 120: 887-893, 2001.

## ***14. ANNEXES***

**Annexe 1:** Microparticles and vascular dysfunction in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* (2014).

**Annexe 2:** Vascular and hepatic impact of short-term intermittent hypoxia in a mouse model of metabolic syndrome (en revision dans Plos One).

**Annexe 3:** Circulating microparticles from obstructive sleep apnea syndrome patients induce endothelin-mediated angiogenesis *Biochimica et Biophysica Acta* (2014)

# Thèse de Doctorat

Wojciech TRZEPIZUR

## Impact vasculaire et métabolique de l'hypoxie intermittente et de l'obésité dans un modèle murin

### Vascular and metabolic impact of short-term intermittent hypoxia and obesity in mice

#### Résumé

L'augmentation constante de l'obésité dans les populations occidentales accroît la prévalence de nombreuses maladies liées au surpoids parmi lesquelles le syndrome d'apnées hypopnées du sommeil (SAHOS). Le SAHOS et l'obésité représentent deux facteurs de risque indépendants du développement de maladie cardiovasculaires (CV) et métaboliques. Etant souvent associés en pratique clinique, l'étude de leurs effets vasculaires et métaboliques spécifiques est difficile. Pour nous affranchir de cette problématique, nous avons étudié chez la souris, les effets respectifs et combinés d'un régime riche en graisse et/ou de 15 jours d'exposition à des conditions d'hypoxie intermittente (HI) mimant le SAHOS, sur les paramètres vasculaires et métaboliques. L'HI seule n'avait aucun impact sur le bilan-glucido lipidique, la fonction mitochondriale hépatique et la fonction vasculaire des animaux. Les animaux soumis au RRG présentaient une dyslipidémie, une stéatose hépatique, une dysfonction mitochondriale ainsi qu'une dysfonction endothéliale. Lorsque l'HI était appliquée aux animaux recevant le RRG, l'ensemble de ces dysfonctions vasculaires, hépatiques et mitochondriales était prévenu mais une hyperinsulinémie marquée était notée.

Ce travail illustre les effets polymorphes de l'HI qui, pour des durées d'exposition courtes, pourrait présenter des effets bénéfiques sur les altérations associées à l'obésité qui contrastent avec les effets délétères à plus long terme décrits dans le SAHOS.

#### Mots clés

hypoxie intermittente, obésité, dysfonction endothéliale, dysfonction mitochondriale

#### Abstract

The rapidly growing problem of obesity in the last decades increases the prevalence of many overweight associated diseases including obstructive sleep apnea (OSA). Both OSA and obesity are considered as independent cardio-vascular and metabolic risk factors. The frequent association of OSA and obesity in clinical setting makes difficult to investigate their independent contribution to metabolic and vascular diseases. In the present thesis, we aimed to evaluate the impact of a short term intermittent hypoxia (IH), (animal model of OSA), of a high fat diet (HFD), and of both experimental conditions together (IH and HFD) on the vascular and metabolic outcomes. Short term IH alone had no impact on glucose and lipids levels and mitochondrial and vascular function. Animals fed with HFD presented dyslipidemia, hepatic steatosis, mitochondrial and endothelial dysfunction. Interestingly, when short term IH was applied to HFD fed mice, insulin level was increased, restored endothelial function and mitochondrial activity was restored and limited liver lipid accumulation was limited.

Those data underline the polymorphic effects of IH that might target beneficial outcomes when applied for a short term in obesity, which contrast with the deleterious long term outcomes observed in OSA.

#### Key Words

intermittent hypoxia, obesity, mitochondrial dysfunction, endothelial dysfunction

INSERM U1063 - SOPAM "Stress Oxydant et Pathologies Métaboliques"  
Faculté de Médecine d'Angers, IBS-IRIS 4, rue Larrey – CHU 49933 ANGERS