



**HAL**  
open science

# EFFETS DE LA PRIVATION AIGUE DE SOMMEIL SUR LA REGULATION DE LA PRESSION ARTERIELLE ET LE CONTROLE DE LA VASOMOTRICITE

Fabien Sauvet

► **To cite this version:**

Fabien Sauvet. EFFETS DE LA PRIVATION AIGUE DE SOMMEIL SUR LA REGULATION DE LA PRESSION ARTERIELLE ET LE CONTROLE DE LA VASOMOTRICITE. Physiologie [q-bio.TO]. Université d'Angers, 2011. Français. NNT : . tel-00984355

**HAL Id: tel-00984355**

**<https://theses.hal.science/tel-00984355>**

Submitted on 28 Apr 2014

**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.

**EFFETS DE LA PRIVATION AIGUE DE SOMMEIL SUR LA  
REGULATION DE LA PRESSION ARTERIELLE ET  
LE CONTROLE DE LA VASOMOTRICITE**

**THESE DE DOCTORAT**

**Spécialité : physiologie et physiopathologie**

**ECOLE DOCTORALE : Biologie-santé**

**Présentée et soutenue publiquement**

**le : 14 décembre 2011**

**  : l'Ecole du Val de Gr ce, Paris**

**par : Fabien SAUVET**

**Devant le jury ci-dessous :**

- M. **Mounir CHENNAOUI** (examineur), commandant, IRBA, Brétigny sur Orge  
Mme **Geneviève FLORENCE** (examineur), vétérinaire en chef, IRBA, Brétigny sur Orge  
M. **Georges LEFTHERIOTIS** (examineur), professeur des universités - praticien hospitalier, Université d'Angers  
M. **Damien LEGER** (rapporteur), professeur des universités - praticien hospitalier, Université Paris V  
M. **Jean-Louis SAUMET** (rapporteur), professeur des universités - praticien hospitalier, Université - Lyon I

**Directeurs de thèse :**

- Pr. Georges LEFTHERIOTIS, Laboratoire de biologie neurovasculaire et mitochondriale intégrée, UMR CNRS 6214-INSERM 771, Faculté de médecine, Université d'Angers  
Dr. Geneviève FLORENCE, Institut de recherche biomédicale des armées, Brétigny sur Orge

---

Les travaux présentés dans ce document ont été financé par la Direction Générale de l'Armement, contrats d'objectif : 10co703, 08co704 et 06co026.

# **Effets de la privation aiguë de sommeil sur la régulation de la pression artérielle et le contrôle de la vasomotricité.**

## **RESUME (<1700 caractères)**

Les troubles du sommeil sont associés à une augmentation de l'activité du système nerveux sympathique, de la pression artérielle (PA) et une inflammation qui peuvent induire une dysfonction endothéliale. Les mécanismes impliqués dans cette dysfonction et les effets de la privation aiguë et totale de sommeil (PTS) ne sont pas encore élucidés. L'objectif de ce travail est d'évaluer l'effet de la PTS sur la vasomotricité et les liens avec des modifications de la PA et de la réponse immuno-inflammatoire.

Dans une première partie, chez l'homme sain, nous observons au cours de 40 heures de PTS, une diminution de la vasodilatation cutanée induite par l'acétylcholine et une augmentation des concentrations plasmatiques de marqueurs de l'activation endothéliale. Cette dysfonction apparaît avant les modifications de la PA et est associée à une augmentation de la concentration plasmatique de TNF- $\alpha$  et de la production d'ARNm du TNF- $\alpha$  par les cellules de la lignée blanche. Nous montrons également au cours d'un test d'immersion de la main dans l'eau froide (30 minutes, 5°C) et la récupération, une diminution de la température digitale et de la conductance vasculaire cutanée, associées à l'augmentation de la concentration plasmatique d'endothéline-1.

Dans une deuxième partie, réalisée chez des rats sympathectomisés (résérpine), nous démontrons que la diminution des vasodilatations dépendante de l'endothélium, après 24 heures de PTS, est indépendante des modifications de la PA. Cette altération est liée à une diminution de l'activité des voies de production du NO et des prostacyclines (PGI<sub>2</sub>) et est associée à une augmentation des concentrations plasmatiques de TNF- $\alpha$  et d'IL-6.

En conclusion, l'ensemble des résultats suggère que la PTS est un stress suffisant pour induire une dysfonction endothéliale, responsable d'une altération de la vasomotricité. Celle-ci semble être initialement la conséquence de la réponse immuno-inflammatoire.

**Mots clés :** privation totale de sommeil, réactivité vasculaire, laser-Doppler, iontophorèse, activation endothéliale, cytokine pro-inflammatoire, pression artérielle, système nerveux autonome, acétylcholine, méthacholine



# **Effects of acute total sleep deprivation on blood pressure regulation and vasomotor control**

## **ABSTRACT**

Sleep deprivation is associated with an increase in sympathetic nervous system activity, blood pressure (BP) and pro-inflammatory status that may induce endothelial dysfunction, a key factor in the development of cardiovascular diseases. Mechanisms that link endothelial dysfunction to total sleep deprivation (TSD) are not actually known. The aim of our work was to assess the impact of TSD on vasomotricity and relationships with BP changes and immuno-inflammatory responses.

In the first part, we observed, in healthy young men, that 40 hours TSD induce a decrease of acetylcholine (ACh)-induced vasodilatation and an increase in plasma levels of endothelial activation markers. This endothelial dysfunction appeared before the increase in BP and sympathetic activity and was associated with higher plasma levels of TNF- $\alpha$ , and TNF- $\alpha$  mRNA levels in white blood cells. In a second study, we showed that 29 hours TSD induce a decrease in digital skin temperature and vascular conductance during a cold water immersion test (30 min, 5°C bath) and during the subsequent passive rewarming. This decrease of local tolerance to cold, found without modification in BP and central temperature, was associated with an increase of plasma levels of endothelin-1.

In the second part, we demonstrated that the decrease of endothelial- and current- induced vasodilation observed after 24 hours of awaking were independent of BP changes, in sympathectomised (reserpined) rats. We also observed a decrease of NO and prostacyclines (PGI<sub>2</sub>) pathways activity after TSD. These results were associated with an increase in plasma levels of TNF- $\alpha$ , and IL-6.

In conclusion, our results suggest that TSD, in healthy subjects, is a sufficient stress to trigger an endothelial dysfunction and low grade inflammation, leading to a decrease in vascular reactivity. This phenomenon is initially independent on changes in BP and sympathetic activity and is the consequence of immuno-inflammatory responses.

**Keywords:** total sleep deprivation, endothelial dysfunction, laser-Doppler, endothelial activation, pro-inflammatory cytokines, blood pressure, autonomic nervous system, acetylcholine, methacholine

# TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS.....	3
INTRODUCTION GENERALE.....	5
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	9
<b>I. Structure et fonctions des vaisseaux sanguins .....</b>	<b>9</b>
<b>II. Endothélium et contrôle de la vasomotricité.....</b>	<b>11</b>
II.1. Facteurs vasodilatateurs .....	11
II.1.1. Monoxyde d'azote .....	11
II.1.2. Prostacycline .....	13
II.1.3. Facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium.....	13
II.2. Facteurs vasoconstricteurs .....	14
II.2.1. Facteurs dérivés de l'acide arachidonique.....	14
II.2.2. Endothéline-1 .....	14
II.2.3. Angiotensine II.....	16
II.2.4. Espèces radicalaires de l'oxygène .....	16
II.3. Synthèse .....	17
<b>III. Méthodes d'évaluation de la fonction endothéliale.....</b>	<b>18</b>
III.1. Evaluation de la réactivité vasculaire.....	18
III.1.1. Stimuli utilisés pour évaluer la réactivité vasculaire .....	18
III.1.2. Méthodes <i>in vitro</i> .....	20
III.1.3. Méthodes <i>in vivo</i> .....	21
III.2. Marqueurs biologiques de la dysfonction endothéliale .....	28
III.2.1. Marqueurs solubles de l'activation endothéliale .....	29
III.2.2. Marqueurs de l'inflammation .....	30
III.2.3. Endothéline-1 .....	31
III.2.4. Autres variables biologiques .....	31
III.3. Conséquences de la dysfonction endothéliale .....	32
III.3.1. Conséquences à court terme .....	32
III.3.2. Conséquences à moyen et long terme.....	33
III.4. Synthèse .....	34
<b>IV. Réponses vasculaires à la privation de sommeil chez le sujet sain.....</b>	<b>35</b>
IV.1. Conséquences de la restriction de sommeil.....	35
IV.2. Réponses à la privation aiguë et totale de sommeil.....	39
IV.2.1. La pression artérielle .....	39
IV.2.2. La vasomotricité .....	40
IV.2.3. Les marqueurs biologiques.....	41
IV.3. Synthèse .....	43
<b>PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS SCIENTIFIQUES .....</b>	<b>44</b>
<b>TRAVAIL DE THESE.....</b>	<b>45</b>
<b>I. Première partie : effet de la privation de sommeil sur la réactivité vasculaire.....</b>	<b>45</b>
I.1. 1 <sup>ère</sup> étude : « Effet de la privation aiguë de sommeil sur la fonction endothéliale de sujets sains »... 46	46
I.1.1. Objectifs de l'étude.....	46
I.1.2. Matériels et méthodes.....	46
I.1.3. Résultats .....	54
I.1.4. Tableaux de résultats .....	60
I.1.5. Synthèse et discussion .....	62

I.2.	2 <sup>ème</sup> étude: « Effet de la privation totale de sommeil sur la tolérance locale au froid ».....	65
I.2.1.	Objectifs de l'étude .....	65
I.2.2.	Matériels et méthodes .....	66
I.2.3.	Résultats.....	71
I.2.4.	Tableaux de résultats.....	75
I.2.5.	Synthèse et discussion.....	79
I.3.	3 <sup>ème</sup> étude : « Evaluation de la variabilité de la mesure de la vasodilatation dépendante de l'endothélium » .....	81
I.3.1.	Objectifs de l'étude .....	81
I.3.2.	Matériels et méthodes .....	82
I.3.3.	Résultats .....	86
I.3.4.	Tableaux de résultats.....	89
I.3.5.	Synthèse et discussion.....	91
I.4.	Synthèse des résultats obtenus chez l'homme .....	92
<b>II.</b>	<b>Deuxième partie : rôle du système nerveux autonome et de l'activité des eNOS et des COX-1 dans la diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium induite par la privation totale de sommeil. 93</b>	
II.1.	Objectifs de l'étude.....	93
II.2.	Eléments de choix méthodologique.....	93
II.3.	Matériels et méthodes.....	94
II.3.1.	Animaux.....	94
II.3.2.	Privation de sommeil.....	95
II.3.3.	Télémetrie .....	96
II.3.4.	Evaluation de la réactivité vasculaire.....	97
II.3.5.	Protocoles expérimentaux .....	99
II.3.6.	Analyses statistiques .....	101
II.4.	Résultats .....	101
II.4.1.	Effet de la PTS sur le PA et le système nerveux autonome .....	101
II.4.2.	Effet de la PTS sur la vasodilatation induite par le courant .....	104
II.4.3.	Effet de la PTS sur la vasodilatation induite par ACh et SNP .....	104
II.4.4.	Effet de l'inhibition des voies du NO et PGI <sub>2</sub> .....	105
II.4.5.	Réponse endocrinienne et inflammatoire.....	107
II.5.	Synthèse et discussion .....	108
	<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>111</b>
<b>I.</b>	<b>Hypothèses.....</b>	<b>112</b>
I.1.	Hypothèse « sympathique ».....	112
I.2.	Hypothèse immuno-inflammatoire.....	113
I.2.1.	La privation de sommeil entraîne une inflammation de bas grade.....	113
I.2.2.	L'augmentation du TNF- $\alpha$ , conséquence de l'activation des monocytes ?.....	114
I.2.3.	Relation entre l'inflammation de bas grade et les altérations de la vasomotricité.....	115
<b>II.</b>	<b>Conséquences de la dysfonction endothéliale .....</b>	<b>118</b>
<b>III.</b>	<b>Intérêt de la méthode d'évaluation de la vasodilatation dépendante de l'endothélium .....</b>	<b>119</b>
	<b>CONCLUSION .....</b>	<b>121</b>
	<b>PERSPECTIVES.....</b>	<b>123</b>
<b>I.</b>	<b>Compréhension des mécanismes.....</b>	<b>123</b>
<b>II.</b>	<b>Contre-mesures .....</b>	<b>124</b>
<b>III.</b>	<b>Restriction de sommeil.....</b>	<b>125</b>
	<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>127</b>
	<b>PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES .....</b>	<b>143</b>

# Liste des abréviations

- ACh : chlorure d'acétylcholine  
AChE : acétylcholinestérase  
ACTH : hormone adrénocorticotrope  
ADN : acide désoxyribonucléique  
Ag II : angiotensine II  
AKT : protéine kinase B  
ANP : peptide natriurétique atrial (*atrial natriuretic peptide*)  
ARNm : acide ribonucléique messager  
Baseline : ligne de base  
BH4 : tétrahydrobioptérine  
CaM : calmoduline  
CIV : vasodilatation induite par le courant (*current induced vasodilatation*)  
CIVD : vasodilatation induite par le froid (*cold induced vasodilatation*)  
COX-1 : cyclooxygénase de type-1  
COX-2 : cyclooxygénase de type-2  
CRP : protéine C-Réactive (*C-reactive protein*)  
CV : coefficient de variation  
CVC : conductance vasculaire cutanée  
EDHF : facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (*endothelial derived hyperpolarizing factor*)  
eNOS : monoxyde d'azote synthase endothéliale (*endothelial nitric oxide synthase*)  
ESM : erreur standard à la moyenne  
ET-1 : endothéline-1  
FC : fréquence cardiaque  
FMD : dilatation induite par le flux (*flow mediated dilation*)  
GCs : guanylate cyclase soluble  
GMPc : guanosine monophosphate cyclique  
i.m. : intra-musculaire  
i.p. : intra-péritonéal  
i.v. : intra-veineux  
ICAM-1 : molécule d'adhésion intracellulaire-1 (*Intercellular adhesion molecule-1*)  
IL-1 $\beta$  : interleukine-1 $\beta$   
IL-1ra : antagoniste du récepteur de l'interleukine-1  
IL-6 : interleukine-6  
iNOS : monoxyde d'azote synthase neuronale (*neuronal nitric oxide synthase*)  
IP3 : inositol-1,4,5-triphosphate

KO : *knock-out*

Laser : amplification de la lumière par émission stimulée de radiations (*light activation by stimulated emission of radiation*)

LDF : mesure du débit par laser-Doppler (*laser-Doppler flowmetry*)

L-NNA : N<sup>G</sup>-Nitro-L-arginine

LPS : lipopolysaccharide

MCh : chlorure de méthacholine, β-méthyl ester synthétique de l'acétylcholine

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NF-κB : facteur nucléaire-κB (*nuclear factor κB*)

NN : nuit normale

nNOS: monoxyde d'azote synthase inductible (*inductible nitric oxide synthase*)

NO : monoxyde d'azote (*nitric oxide*)

NO<sub>2</sub><sup>-</sup> : ion nitrite

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> : ion nitrate

NOS : monoxyde d'azote synthase (*nitric oxide synthase*)

PAD : pression artérielle diastolique

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

PAM : pression artérielle moyenne

PAS : pression artérielle systolique

PGE<sub>2</sub> : prostaglandine G<sub>2</sub>

PGI<sub>2</sub> : prostaglandine I<sub>2</sub> (prostacycline)

PTS : privation totale de sommeil = durée d'éveil continu

Qc : débit cardiaque

ROS: espèce réactive de l'oxygène (*reactive oxygen species*)

SkBF: débit sanguin cutané (*skin blood flow*)

SNA : système nerveux autonome

SNP : nitroprussiate de sodium (*sodium nitroprussiate*)

SRAA: système rénine angiotensine aldostérone

Tfi : température digitale (*finger temperature*)

TNF-RI : récepteur soluble du TNF-α de type I (également connu comme le TNF-P55/P60)

TNF-α : facteur de nécrose tumorale-α (*Tumor necrosis factor-α*)

Tre : température rectale (*rectal temperature*)

Tsk : température cutanée (*skin temperature*)

$\bar{T}sk$  : température cutanée moyenne (*mean skin temperature*)

TXA<sub>2</sub> : thromboxane A<sub>2</sub>

VCAM-1 : molécule d'adhésion vasculaire-1 (*vascular cell adhesion molecule*)

## **Introduction générale**

Dans notre société moderne, le temps consacré au sommeil a diminué (moins 1,5 heures de sommeil par nuit en 100 ans) au profit des activités professionnelles, sociales, sportives et des divertissements (Sabanayagam et Shankar 2010). Dans les métiers de la santé et de la sécurité (militaires, pompiers, police...), du fait des rythmes de travail et des opérations soutenues qui ne permettent aucun repos, les personnels subissent également des restrictions et des privations de sommeil prolongées (Ellingstad et Heimstra 1970; Lieberman et al. 2002; Marsh 1983). Si les conséquences cardiovasculaires de la privation chronique de sommeil sont bien connues (Gangwisch et al. 2006), les effets de la privation aiguë et totale sont encore l'objet de débats scientifiques (Kamperis et al. 2010; Pagani et al. 2009). Des travaux récents suggèrent que la privation aiguë de sommeil induit des adaptations cardiovasculaires qui pourraient favoriser l'apparition de pathologies (Amir et al. 2004; Frey et al. 2007).

La restriction chronique de sommeil (moins de 6 heures de sommeil par nuit) est associée avec une augmentation de l'incidence de pathologies cardiovasculaires telles que l'hypertension artérielle, les pathologies coronaires, l'athérosclérose, la mort subite ou les troubles du rythme cardiaque (Gangwisch et al. 2006; Hall et al. 2008). La physiopathologie de ces maladies est dominée par une augmentation chronique de l'activité du système nerveux sympathique (Bonnet et Arand 2007; Gangwisch et al. 2006). Celle-ci est responsable d'une augmentation de la pression artérielle, d'un syndrome inflammatoire (Meier-Ewert et al. 2004) et d'une dysfonction endothéliale (Takase et al. 2004). Il est maintenant admis que la dysfonction endothéliale est un marqueur prédictif précoce du développement de pathologies cardiovasculaires (Vita et Keaney 2002). En pratique clinique, l'observation d'une atteinte de la vasodilatation dépendante de l'endothélium est souvent utilisée pour caractériser une dysfonction endothéliale (Cracowski et al. 2006). En effet, l'endothélium vasculaire synthétise et libère des médiateurs (vasodilatateurs et vasoconstricteurs) impliqués dans le contrôle de la vasomotricité, propriété des vaisseaux sanguins à modifier leur diamètre en réponse à des stimuli physiques ou chimiques (Furchgott et Zawadzki 1980; Khazaei et al. 2008). Actuellement, la cinétique d'apparition de ces altérations et les mécanismes qui lient la restriction chronique de sommeil aux pathologies cardiovasculaires sont encore mal connus (Gangwisch et al. 2006; Mullington et al. 2009). De même, les modifications cardiovasculaires induites par la privation aiguë et totale de sommeil font toujours l'objet de débats (Kato et al. 2000; Pagani et al. 2009; Wolk et al. 2005; Zhong et al. 2005).

Il semble cependant que 24 heures d'éveil continu, définis comme 24 heures de privation totale de sommeil, inhibent la diminution nocturne et physiologique de la pression artérielle mais n'entraînent pas d'augmentation persistante de celle-ci (Pagani et al. 2009). Lors de privations plus longues (plus de 36 heures d'éveil continu) ou associées à une contrainte physique ou mentale, il a été constaté une

augmentation de l'activité du système nerveux sympathique et de la fréquence cardiaque (Kato et al. 2000; Zhong et al. 2005). Celles-ci favorisent l'augmentation modérée de la pression artérielle (Kato et al. 2000; Miro et al. 2002). Cependant, cette augmentation est associée à la diminution de l'activité nerveuse musculaire sympathique et à l'absence de modification des résistances vasculaires périphériques (Kato et al. 2000; Ogawa et al. 2003). Il semble donc que l'augmentation de la pression artérielle soit plutôt la conséquence d'une augmentation de la fréquence et du débit cardiaque que d'une augmentation des résistances vasculaires périphériques. L'augmentation de l'activité du système nerveux sympathique ne permet pas, à elle seule, d'expliquer l'ensemble des réactions observées (Kato et al. 2000).

Dans des travaux récents, une diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium a été observée chez des médecins après une nuit de garde à l'hôpital (Amir et al. 2004). Cette étude a, pour la première fois, mis en évidence que la privation aiguë de sommeil pouvait directement altérer la fonction endothéliale et la vasomotricité. Cependant, ces résultats ont été obtenus au cours d'une privation de sommeil associée à une période de travail en ambiance stressante, ce qui est un facteur connu de diminution de la réactivité vasculaire (Amir et al. 2004; Hijmering et al. 2002). Actuellement, l'effet de la privation aiguë et totale de sommeil sur la vasomotricité n'a jamais été évalué chez des sujets sains, en l'absence de contrainte psychologique ou environnementale surajoutée.

Par ailleurs, la privation aiguë et totale de sommeil induit, chez des sujets sains, une augmentation de la concentration plasmatique de marqueurs biologiques indirects de la dysfonction endothéliale, tels que les protéines d'adhésion (*intercellular adhesion molecule-1* et sélectine-E) (Frey et al. 2007), et de cytokines pro-inflammatoires (*tumor necrosis factor- $\alpha$* , interleukine-1 $\beta$  et l'interleukine-6) (Dinges et al. 1995; Frey et al. 2007; Vgontzas et al. 2007). L'augmentation de la concentration plasmatique de ces marqueurs est associée à des modifications de la vasomotricité (Iversen et al. 1999) et a été observée dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires (Constans et Conri 2006).

L'altération de la vasomotricité, en particulier de la capacité des vaisseaux à se dilater, pourrait être un facteur de risque d'intolérance aux contraintes environnementales et à l'exercice prolongé et intense. En effet, l'adaptation à ces contraintes nécessite une réactivité vasculaire intacte (Johnson et Kellogg 2010; Roustit et al. 2010b). Il a ainsi été observé que la privation aiguë de sommeil était un facteur favorisant la survenue de coups de chaleur d'exercice (Chen et al. 2009; Coris et al. 2004; Epstein et Roberts 2011; Hubbard 1990) mais aussi de pathologies induites par le froid (Marsh 1983; Rintamaki 2000). Cependant, les mécanismes physiopathologiques impliqués n'ont pas encore été approfondis.

Les liens physiologiques entre la privation totale de sommeil et l'altération de la fonction endothéliale ne sont toujours pas clairement identifiés. Cette dysfonction pourrait être la conséquence de l'augmentation de l'activité du système nerveux sympathique (Hijmering et al. 2002; Panza et al. 1991) et/ou de modifications de la pression artérielle (Chae et al. 2001).

**L'ensemble de ces données nous amène à émettre l'hypothèse** que la privation aiguë et totale de sommeil, chez des sujets sains, altère la fonction endothéliale et induit des modifications de la vasomotricité. Nos travaux auront pour objectif principal d'évaluer l'effet de la privation aiguë de

sommeil sur la réactivité vasculaire et sur les marqueurs biologiques de la dysfonction endothéliale. Nous essayerons également d'identifier les liens d'une éventuelle dysfonction avec une augmentation de la pression artérielle, de l'activité du système nerveux autonome et des modifications immuno-inflammatoires.

Dans un premier chapitre de rappels bibliographiques, nous verrons que l'endothélium est au cœur du contrôle local de la vasomotricité et décrirons les principales voies métaboliques impliquées dans la réactivité vasculaire. Nous définirons ensuite les méthodes d'évaluation de la réactivité vasculaire évoquées dans les rappels bibliographiques, la partie expérimentale ou la discussion. Nous présenterons également les données actuelles concernant les effets cardiovasculaires de la privation de sommeil. Dans un second chapitre nous présenterons les travaux expérimentaux réalisés chez l'homme puis, avec une approche plus mécaniste, chez l'animal. Une discussion générale et l'évocation de perspectives concluront ce travail.





# Rappels bibliographiques

## I. Structure et fonctions des vaisseaux sanguins

Le système artériel est classiquement subdivisé en deux grands secteurs, en fonction des propriétés mécaniques et structurales de leur paroi : un secteur de « conductances », formé d'artères élastiques, de gros calibre ( $> 500 \mu\text{m}$ ) qui opposent une très faible résistance au débit sanguin et un secteur « résistif » constitué d'artères distales et d'artérioles de petit diamètre riches en fibres musculaires lisses. Le rayon artériel, et par conséquent les résistances périphériques, dépendent directement de ces cellules musculaires dont la contraction et la relaxation modifient le diamètre du vaisseau. Les artères de conductance ont une fonction essentiellement hydraulique de transport du sang vers les différents lits vasculaires, tandis que les artères de résistance contrôlent les débits sanguins locaux grâce à leur activité vasomotrice. La paroi artérielle est constituée de 3 tuniques individualisées : l'adventice, la média et l'intima (Khazaei et al. 2008; Korthuis 2011). Selon les secteurs artériels concernés, la structure et l'importance relative de chaque tunique varient et confèrent à ces secteurs leurs propriétés caractéristiques.

**L'adventice** est la couche la plus périphérique. Elle est constituée de tissu conjonctif, de terminaisons nerveuses (permettant la libération de neurotransmetteurs actifs sur la média) et de *vasa vasorum* (vascularisation nutritive des vaisseaux). Les terminaisons nerveuses sont particulièrement nombreuses sur les artères de faible calibre ( $< 200 \mu\text{m}$ ).

**La média**, couche centrale et épaisse de la paroi artérielle, est constituée essentiellement de cellules musculaires lisses, insérées dans une matrice extracellulaire.

**L'intima** est la couche la plus interne, elle est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales ancrées sur une base extracellulaire de tissu conjonctif.

L'endothélium vasculaire, interface obligatoire entre le sang et les tissus, n'est pas une simple barrière inerte. Il agit comme un véritable organe endocrine et possède une grande variété de fonctions qui ont un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie vasculaire (Khazaei et al. 2008). L'endothélium sécrète des substances qui modifient la résistance vasculaire en agissant sur les cellules musculaires lisses (Furchgott et Zawadzki 1980). L'endothélium contrôle également l'agrégation plaquettaire, la perméabilité vasculaire, la prolifération et la croissance cellulaire. Enfin, il sécrète des substances qui participent à l'adhésion et la transmigration des cellules de la lignée blanche à travers la paroi vasculaire (Khazaei et al. 2008).

A l'état basal, les artères sont dans un état de semi-contraction, appelé tonus vasomoteur, qui permet la variation du diamètre artériel et maintient un certain niveau de résistance vasculaire (Korthuis 2011). Le tonus basal artériolaire et la vasomotricité sont la résultante d'un équilibre entre des mécanismes vasodilatateurs et vasoconstricteurs qui incluent (Figure 1) :

- le système nerveux autonome qui libère principalement des neuromédiateurs vasoconstricteurs (noradrénaline, adrénaline...) mais aussi vasodilatateurs (acétylcholine, purines, sérotonine, substance P...) selon les territoires vasculaires concernés ;
- des facteurs véhiculés par le sang ou produits par les cellules sanguines qui se fixent sur des récepteurs endothéliaux ou musculaires (catécholamines, sérotonine, insuline, angiotensine II...);
- des facteurs locaux produits par les cellules endothéliales qui agissent sur les cellules musculaires lisses. Ces facteurs peuvent avoir un effet vasoconstricteur ou vasodilatateur.
- des facteurs physiques : thermiques (chaleur, froid) et mécaniques induits par la compression externe ou liés aux variations du flux sanguin dans le vaisseau comme l'étirement de la paroi, ou le cisaillement encore appelé *shear stress*). Ces facteurs agissent sur les cellules endothéliales ou les cellules musculaires lisses.

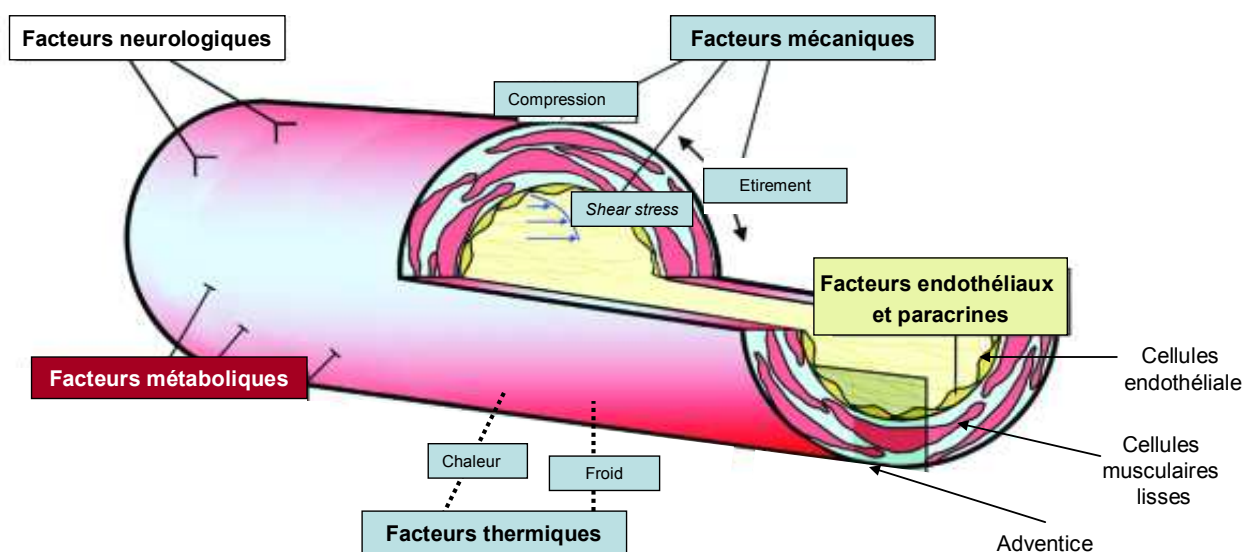


Figure 1. Principaux mécanismes intervenant dans le contrôle de la vasomotricité (modifié d'après Korthuis 2011).

La pression artérielle (PA) est principalement régulée par des modifications du débit cardiaque et des résistances vasculaires périphériques. Ces dernières sont, selon la loi de Poiseuille, localement proportionnelles à la viscosité du sang, à la longueur des vaisseaux sanguins et inversement proportionnelles à leur rayon (à la puissance 4). Les artères, notamment celles de petit calibre, ont la capacité de modifier leur diamètre en réponse à des stimuli locaux (métaboliques, chimiques, mécaniques ou physiques), aux hormones circulantes ou à l'activité du système nerveux autonome. Cette propriété,

appelée vasomotricité, permet de contrôler la répartition des débits sanguins périphériques selon les nécessités métaboliques et d'assurer la perfusion tissulaire. La vasomotricité est également un mécanisme de protection des vaisseaux contre les contraintes de cisaillement (*shear stress*) (Khazaei et al. 2008).

Les dysfonctions de l'endothélium sont habituellement mises en évidence en clinique par des anomalies de la vasomotricité dépendant de l'endothélium. Elles ont été observées dans de nombreuses situations qui favorisent le développement de pathologies cardiovasculaires (Khazaei et al. 2008).

## II. Endothélium et contrôle de la vasomotricité

L'endothélium répond à une multitude de stimuli chimiques, physiques et humoraux par la synthèse et la libération de facteurs, appelés vasoactifs, qui sont impliqués dans le contrôle de la vasomotricité dépendante de l'endothélium (Khazaei et al. 2008). Les propriétés de ces stimuli déterminent la nature et la quantité de facteurs vasoactifs libérés. Nous décrirons dans ce chapitre les principaux facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs.

### II.1. Facteurs vasodilatateurs

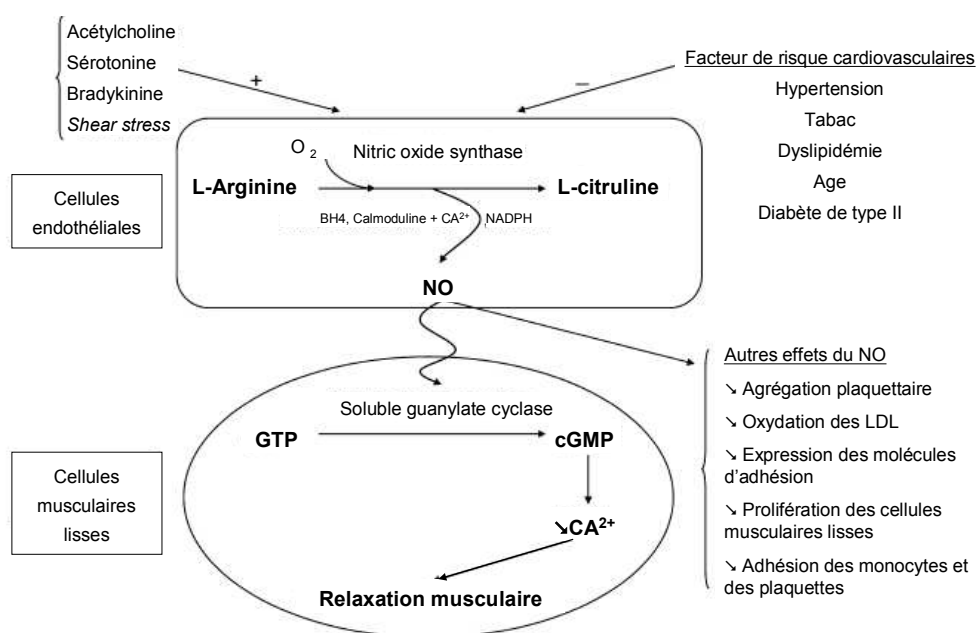
#### II.1.1. Monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) est le principal facteur endothélial vasodilatateur. Le NO est formé à partir de la L-arginine par une enzyme nommée NO synthase (NOS), en présence de cofacteurs tels que NADPH (nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate, un donneur d'électron), l'oxygène, la tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>)... Le NO est un radical libre gazeux liposoluble et hydrosoluble. Il possède une demi-vie très courte (3 à 5 secondes). Il est catabolisé par l'oxygène (O<sub>2</sub>) en nitrite et en nitrate (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Il peut être également transformé par l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) en peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) (Walford et Loscalzo 2003).

Il existe 3 isoformes de la NOS : la nNOS (NOS neuronale), la eNOS (NOS endothéliale) et la iNOS (NOS inducible). Les 2 premières sont constitutivement exprimées et activées par des mécanismes de phosphorylation dépendant ou non du calcium. La troisième isoforme (iNOS) est synthétisée en réponse à divers stimuli infectieux ou inflammatoires (interféron- $\gamma$ , lipopolysaccharides bactériens, interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ )...) ce qui entraîne une forte production de NO (de l'ordre du  $\mu$ M) sur une longue durée (plusieurs jours) (Alderton et al. 2001). L'expression de iNOS est essentiellement observée dans les cellules du système immunitaire et dans une moindre mesure dans les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales

eNOS est essentiellement présente dans les cellules endothéliales. Elle joue un rôle clé dans la régulation du tonus vasculaire, bien qu'elle produise de faibles quantités de NO (de l'ordre du nM)

(Walford et Loscalzo 2003). Le NO produit par les eNOS peut diffuser vers la lumière du vaisseau ou du côté abluminal (Walford et Loscalzo 2003). Le NO libéré réagit notamment dans les cellules musculaires lisses avec le fer du groupement hème de la guanylate cyclase soluble (GCs) et entraîne son activation qui va produire du 3,5-guanosine monophosphate cyclique (GMPc). L'influx de GMPc dans les cellules musculaires lisses provoque alors une réduction de la concentration de calcium intracellulaire qui entraîne une hyperpolarisation et une relaxation des fibres musculaires (Khazaei et al. 2008). Le NO participe également à d'autres fonctions endothéliales. Il inhibe la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses ainsi que la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire (Figure 2). Il prévient également l'agrégation plaquettaire et facilite la dissolution d'agrégats plaquettaires (Khazaei et al. 2008).



**Figure 2. Effets du monoxyde d'azote (NO) sur le système cardiovasculaire (Khazaei et al. 2008).** NADPH : nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate, BH<sub>4</sub> : tétrahydrobioptérine, GTP : guanosine triphosphate, cGMP : guanosine monophosphate cyclique. (Khazaei et al. 2008).

L'activité de eNOS peut être modulée au niveau de l'expression, de la localisation et de l'activité elle-même (Wu 2002). La production de NO est notamment stimulée par stimuli mécaniques (cisaillement sanguin ou étirement) (Corson et al. 1996) et par la fixation sur les cellules endothéliales de nombreux facteurs comme l'insuline, l'histamine, l'acétylcholine, la bradykinine ou des facteurs de croissance endothéliaux (Khazaei et al. 2008). Les facteurs connus pour réduire l'expression et l'activité de eNOS sont notamment : le TNF- $\alpha$ , les lipopolysaccharides, l'érythropoïétine, l'hypoxie et les fortes concentrations d'acides gras oxydés (Wu 2002). L'activité des NOS est également inhibée par des analogues synthétiques de la L-arginine telles que la N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME) ou la N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine (L-NNA) qui sont particulièrement spécifiques des formes constitutives de NOS (Boer et al. 2000).

### **II.1.2. Prostacycline**

La prostacycline ( $\text{PGI}_2$ ) est synthétisée dans les cellules endothéliales à partir de l'acide arachidonique par les cyclooxygénases de type-1 (COX-1) (Fitzgerald 2004).  $\text{PGI}_2$  est formée en réaction à l'augmentation des forces de cisaillement, à l'hypoxie et à divers médiateurs qui libèrent également du NO (ATP, bradykinine, histamine, thrombine, acétylcholine...) (Fitzgerald 2004). Elle provoque la relaxation des cellules musculaires lisses en activant l'adénylate-cyclase et en augmentant la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC). La demi-vie de  $\text{PGI}_2$  est de l'ordre de la minute ce qui rend son dosage plasmatique difficile.  $\text{PGI}_2$  est ensuite hydrolysée en 6-kéto-PGF $1_\alpha$  qui est un métabolite stable mais inactif. Dans de nombreux vaisseaux sanguins,  $\text{PGI}_2$  joue un rôle secondaire dans la relaxation dépendante de l'endothélium, son effet venant surtout s'ajouter à celui du NO. L'inhibition des COXs induit plutôt une diminution de la durée que de l'amplitude de la vasodilatation dépendante de l'endothélium (Durand et al. 2004). Des travaux récents ont mis en évidence des interactions importantes entre les voies de synthèse du NO et de  $\text{PGI}_2$  (Marcelin-Jimenez et Escalante 2001). La synthèse de  $\text{PGI}_2$  augmente lors de la diminution de la biodisponibilité du NO, ce qui confère à  $\text{PGI}_2$  un rôle compensateur et protecteur. Par ailleurs, une diminution de la production de  $\text{PGI}_2$  a été observée dans le diabète, l'inflammation, les pathologies cardiovasculaires et le vieillissement (Fitzgerald 2004). Comme le NO, la  $\text{PGI}_2$  est un puissant inhibiteur de l'agrégation plaquettaire et de l'adhésion des plaquettes aux cellules endothéliales (Lamontagne et al. 1992).

### **II.1.3. Facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium**

Des facteurs vasodilatateurs, résistant à la combinaison d'inhibiteurs de la eNOS et des COXs, ont été décrits dans de nombreux vaisseaux sanguins, humains et animaux, résistifs ou de diamètre moyen, y compris les artères coronaires (Chen et Suzuki 1990; Gaubert et al. 2007). Encore mal connus pour certains, ces facteurs ont été regroupés sous le terme de facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (EDHFs) car ils induisent une relaxation des cellules musculaires lisses via des mécanismes d'hyperpolarisation cellulaire (Chen et Suzuki 1990). Cette hyperpolarisation a pour principal effet d'empêcher l'activation des canaux calciques dépendants du potentiel de membrane et de favoriser ainsi la diminution de la concentration cytosolique en calcium des cellules musculaires lisses. La formation d'EDHFs peut être induite par la liaison aux cellules endothéliales d'agonistes tels que l'acétylcholine, la bradykinine et la substance P (Chen et Suzuki 1990). La part relative des EDHFs dans la vasodilatation dépendante de l'endothélium est variable. Elle est notamment liée à l'espèce, à l'organe, à la taille des vaisseaux et à l'âge. Les EDHFs ont également un rôle compensateur dans la microvascularisation lorsque les voies des NO et  $\text{PGI}_2$  sont altérées (Gaubert et al. 2007). La nature chimique des EDHFs suscite encore de nombreuses interrogations. Elle semble être variable d'un lit vasculaire à l'autre. Plusieurs substrats ont été décrits comme étant de potentiel EDHFs : les métabolites des cytochromes P450 comme les acides epoxyeicosatriénoïques (EETs) (Campbell et al. 1996), les ions

potassium, le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Graier et al. 1999) et les jonctions gap myo-endothéliales (Beny 1999).

## **II.2. Facteurs vasoconstricteurs**

L'endothélium produit également une grande quantité de facteurs vasoconstricteurs, regroupés sous le terme d'EDCFs (*endotheliumm-derived contacting factors*). Leur nature dépend notamment des stimuli, du lit vasculaire, de l'âge et de l'espèce. Nous décrirons en particulier les dérivés du métabolisme de l'acide arachidonique, l'endothéline-1 (ET-1), l'angiotensine II et les radicaux libres dérivés de l'oxygène (Khazaei et al. 2008).

### **II.2.1. Facteurs dérivés de l'acide arachidonique**

Les cyclooxygénases de type-1 (COX-1) produisent également des médiateurs vasoconstricteurs (Miller et Vanhoutte 1985). En effet, l'acide arachidonique peut être également transformé par les COX-1 en prostaglandine G<sub>2</sub>, un métabolite instable qui sera rapidement converti en prostaglandine H<sub>2</sub>, le précurseur des prostanoïdes tels que le thromboxane A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>) (Hecker et Ullrich 1989). La PGH<sub>2</sub> et le TXA<sub>2</sub> libérés par les cellules endothéliales peuvent se lier au récepteur des thromboxanes (TP) des cellules musculaires lisses. L'activation de ce récepteur conduit à la production d'inositol tri-phosphate et de diacylglycérol. Cette réaction induit une augmentation de la concentration intracytosolique de calcium et la contraction musculaire (Murtha et al. 1999).

Il faut toutefois noter que dans les cellules endothéliales, PGI<sub>2</sub> est le métabolite principal de l'acide arachidonique produit par les COX-1 (Miller et Vanhoutte 1985). De plus, dans des conditions physiologiques, l'effet de petites quantités de prostanoïdes vasoconstricteurs libérés par les cellules endothéliales est masqué par la production de PGI<sub>2</sub>, de NO et d'EDHFs (Robson et al. 1980). Sous l'effet de stimuli chimiques, en particulier de cytokines pro-inflammatoire ou d'espères radicalaires dérivées de l'oxygène, la production de TXA<sub>2</sub> peut augmenter considérablement (Caughey et al. 2001). En revanche, TXA<sub>2</sub> est le principal métabolite formé par les COXs présentes dans les plaquettes. Le sens de la balance PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> déterminera donc l'effet des COXs sur la vasomotricité (Robson et al. 1980).

### **II.2.2. Endothéline-1**

Une autre substance vasoconstrictrice produite par l'endothélium est l'endothéline. Il en existe 3 isoformes : les endothélines 1 (ET-1), 2 et 3. L'augmentation d'ET-1 est associée à la progression de nombreuses pathologies du fait de ses propriétés vasoconstrictives durables mais aussi de sa capacité à induire un remodelage vasculaire, une fibrose, une prolifération cellulaire, une apoptose et à produire du





### II.2.3. Angiotensine II

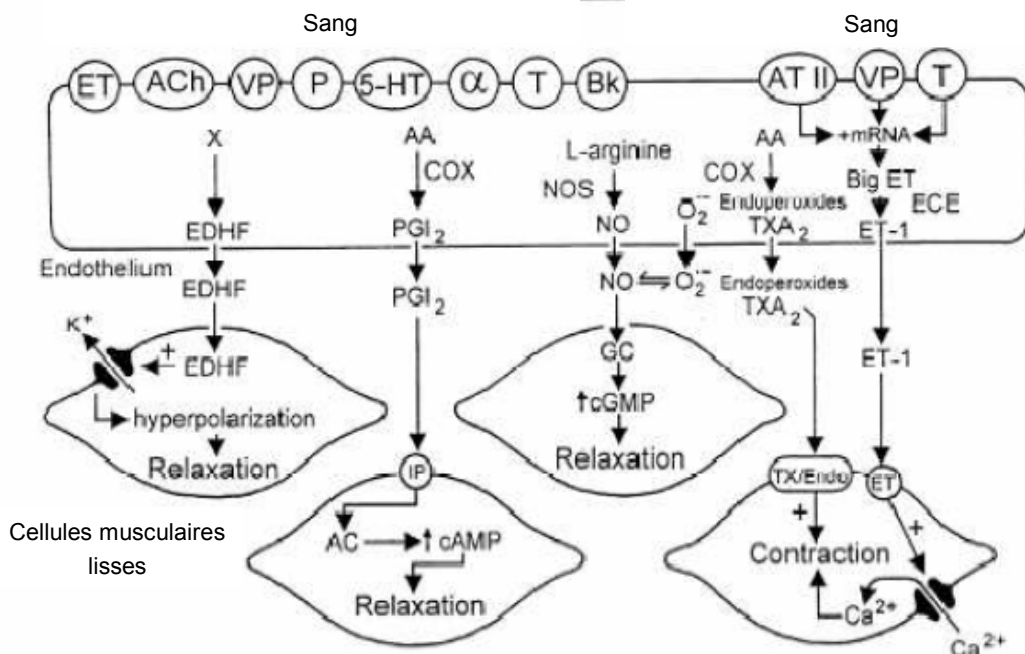
Les cellules endothéliales présentent à leur surface l'enzyme de conversion (ECA) qui permet de transformer l'angiotensine I en angiotensine II. Cette dernière pourra alors exercer son activité vasoconstrictrice en se fixant sur des récepteurs spécifiques exprimés à la surface des cellules musculaires lisses. L'endothélium participe donc au contrôle de l'activité du système rénine-angiotensine-aldostérone. La plupart des effets vasculaires observés avec l'angiotensine II sont liés à sa liaison aux récepteurs de type 1 (AT1). Ce récepteur est majoritairement exprimé sur les cellules du système cardiovasculaire et en particulier dans les cellules musculaires lisses. Toutefois, son effet est atténué par la présence de récepteurs de type 2 (AT2) sur les cellules endothéliales. La liaison de l'angiotensine II à ce récepteur entraîne une production de NO et de PGI<sub>2</sub> (Gigante et al. 1998). L'angiotensine II active également de nombreuses voies de signalisation qui contribuent au remodelage vasculaire, à l'hypertrophie et à l'hyperplasie des cellules musculaires lisses (Higuchi et al. 2007).

### II.2.4. Espèces radicalaires de l'oxygène

Le stress oxydatif se définit comme une élévation anormale des concentrations de différents radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS, *reactiv oxygen species*) très fortement oxydatifs. Parmi ces molécules, il y a l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), le radical hydroxyl (OH<sup>-</sup>) (Hamilton et al. 2001). Les cellules endothéliales peuvent produire différentes espèces réactives de l'oxygène en réponse aux forces de cisaillement et à des hormones telles que la bradykinine et l'angiotensine II (Vanhoutte 2001). Les principales enzymes produisant des O<sub>2</sub><sup>-</sup> sont les NADPH oxydases, la xanthine oxydase, la lipooxygénase, les oxydases mitochondriales, les NOS (Guzik et al. 2000) et les COXs (Vanhoutte 2001). L'interaction de O<sub>2</sub><sup>-</sup> avec le NO entraîne la formation de peroxydites (ONOO<sup>-</sup>). Cette liaison induit une diminution de la biodisponibilité et donc des effets vasodilatateurs du NO (Vanhoutte 2001). Le radical O<sub>2</sub><sup>-</sup> est également un facteur vasoconstricteur. L'augmentation de la production d'espèces radicalaires dérivées de l'oxygène est donc associée à une diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium par action directe sur les cellules musculaires lisses ou indirecte en diminuant la biodisponibilité du NO (Taddei et al. 2006).

### II.3. Synthèse

La pression artérielle est régulée par des modifications du débit cardiaque et des résistances périphériques. Les modifications du diamètre des artères distales, principal déterminant des résistances vasculaires, sont contrôlées par des interactions complexes entre le système nerveux autonome, les hormones circulantes et des facteurs locaux produits par l'endothélium ou les cellules circulantes. Les cellules endothéliales contribuent à la régulation du tonus vasculaire en libérant plusieurs facteurs vasodilatateurs (NO, PGI<sub>2</sub>, EDHFs) et vasoconstricteurs (ET-1, TXA<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>, angiotensine II, O<sub>2</sub><sup>-</sup>...) (Figure 4). Ces facteurs jouent un rôle primordial dans le maintien du tonus vasculaire, la répartition des débits sanguins régionaux et le maintien de l'intégrité vasculaire. Ils adaptent notamment le diamètre des vaisseaux aux besoins métaboliques et aux variations de pression. En pratique clinique ou en recherche, le contrôle de la vasomotricité, en particulier la vasodilatation dépendante de l'endothélium, est la fonction endothéliale la plus étudiée. En présence de facteurs de risque cardiovasculaire, la vasodilatation dépendante de l'endothélium est altérée alors que la production de médiateurs vasoconstricteurs et pro-agrégants est maintenue ou stimulée. **Le terme dysfonction endothéliale fait alors référence à une diminution de la production ou la biodisponibilité des médiateurs vasodilatateurs produits par l'endothélium.** La dysfonction endothéliale est un marqueur précoce du développement de nombreuses pathologies cardiovasculaires (Vila et Salaices 2005).



**Figure 4. Mécanismes endothéliaux des molécules présentes dans le sangs et ayant un effet sur le tonus vasculaire.** AA : acide arachidonique, ACh : acétylcholine, AT II : angiotensine II, BK : bradykinine, COX : cyclooxygénase, ECE : enzyme de conversion de l'endothéline, ET : endothéline-1, O<sub>2</sub><sup>-</sup> : anion superoxyde, P : purines, PGI<sub>2</sub> : prostacycline, NO : monoxyde d'azote, NOS : NO synthase, T : thrombine, VP : vasopressine, TXA<sub>2</sub> : thromboxane A<sub>2</sub>, 5-HT : sérotonine, α : α-adrénergique (Vanhoutte et al. 2009).

### III. Méthodes d'évaluation de la fonction endothéliale

L'objectif de ce chapitre est de décrire les méthodes d'évaluation de la fonction endothéliale utilisées dans nos travaux ou citées dans la revue de la littérature. Nous verrons tout d'abord les méthodes d'évaluation de la vasomotricité, encore appelée réactivité vasculaire, et les principaux stimuli utilisés. Les méthodes biologiques utilisées en pratique courante seront ensuite présentées.

#### III.1. Evaluation de la réactivité vasculaire

##### III.1.1. Stimuli utilisés pour évaluer la réactivité vasculaire

###### *a Stimuli mécaniques*

L'endothélium contribue, par la libération de facteurs actifs sur les cellules musculaires lisses, à l'adaptation du diamètre artériel en réponse à l'augmentation du débit sanguin. Ce dernier induit des contraintes mécaniques et notamment une contrainte de cisaillement (*shear stress*) définie comme une force de frottement exercée tangentiellement sur les cellules endothéliales. L'augmentation du débit sanguin est largement utilisée chez l'homme pour provoquer une vasodilatation induite par une augmentation du flux sanguin appelée *flow-mediated dilatation* (FMD). La FMD est provoquée par la levée d'une compression ischémique réalisée sur un membre à l'aide d'un brassard à tension. La membrane cellulaire de l'endothélium contient des canaux potassiques spécialisés, comme les canaux potassiques activés par le calcium, qui s'ouvrent en réponse aux forces de cisaillement (*shear stress*) (Cooke et al. 1991). L'ouverture de ces canaux entraîne une hyperpolarisation de la membrane et une entrée de calcium dans le cytosol. eNOS est alors activée par des mécanismes de phosphorylation dépendante du calcium comme la voie AKT/kinases-dépendante. Les forces de cisaillement induisent également une augmentation la production de PGI<sub>2</sub> et d'EDHFs (Corson et al. 1996). Au final, ces voies métaboliques activées entraînent une vasodilatation dépendante de l'endothélium.

D'autres stimuli mécaniques peuvent être utilisés. Il a notamment été mis en évidence l'existence d'un couplage entre la mécano-sensibilité et la vasodilatation cutanée. En appliquant une pression progressive et non douloureuse (0 à 20 kPa) sur la peau, on peut observer une vasodilatation à proximité du point de pression (Fromy et al. 2000). Celle-ci peut être évaluée en mesurant la variation de débit sanguin cutané à l'aide d'un laser-Doppler. Cette technique est cependant extrêmement délicate à mettre en œuvre. En pratique, la réponse dilatatrice à la pression pourrait être un mécanisme de protection naturel de la peau (prévention des escarres) face à une compression externe (Fromy et al. 2000).

### ***b Stimuli thermiques***

L'exposition au chaud provoque une vasodilatation dépendant en partie de l'endothélium. Selon que l'exposition est locale ou générale, les mécanismes impliqués sont différents (Kellogg 2006; Kellogg et al. 2007). L'exposition locale d'une surface cutanée à une source de chaleur entraîne une vasodilatation et une augmentation du débit sanguin cutané en deux phases : un premier pic, transitoire, survenant dans les 10 premières minutes puis un plateau après 30 à 50 minutes d'exposition au chaud. Le pic initial est lié à la stimulation des nerfs sensitifs par l'augmentation de la température cutanée (Minson et al. 2001). Cette stimulation provoque un réflexe d'axone qui entraîne la libération de neurotransmetteurs vasodilatateurs (substance P, neurokinine A, *calcitonin gene-related peptide*...) (Charkoudian 2003). Au contraire, la phase plus tardive en plateau est largement induite par l'augmentation de la production de NO par les cellules endothéliales (Minson et al. 2001). Le flux sanguin cutané maximal est atteint pour une température supérieure à 42°C (Charkoudian 2003).

Lors de l'exposition générale au chaud, on observe une vasodilatation active dépendant de l'activation de nerfs sympathiques cholinergiques présents sur la peau non-glabre. Cette activation est également responsable de la sudation. L'ACH libérée entraîne la production de NO (Kellogg 2006). Le VIP (*vasoactive intestinal peptide*) pourrait être un co-neuromédiateur de cette vasodilatation. Kellogg et al. (2007) ont montré que la production de NO est liée à l'activation des eNOS mais aussi des nNOS présentes dans les terminaisons nerveuses (Kellogg et al. 2009). La vasodilatation active représente 80 à 95% du processus. Elle est associée à d'autres mécanismes comme la disparition du tonus vasoconstricteur sympathique liée à une diminution de l'affinité des récepteurs adrénergiques de type  $\alpha_2$  (Kellogg 2006).

L'exposition au froid (locale ou générale). Elle entraîne une vasoconstriction qui limite la perte de chaleur et un frisson qui produit de la chaleur. La vasoconstriction réduit les débits sanguins cutanés qui peuvent devenir négligeables pendant l'exposition à des froids extrêmes (Daanen 2003; Kellogg 2006). La température cutanée chute et peut alors atteindre des températures basses qui favorisent les gelures. Cependant, l'exposition des extrémités au froid (< 15 °C) entraîne une vasodilatation induite par le froid (CIVD, *cold induced vasodilatation*), dite paradoxale (Lewis 1930). Elle survient après 10 à 15 minutes lors d'une immersion de la main dans l'eau froide. La CIVD induit une reperfusion et un réchauffement des tissus qui préviennent la survenue de gelures (Daanen 2003). La réponse vasculaire de la peau humaine exposée au froid met en jeu des mécanismes neurologiques réflexes et des facteurs locaux (Kellogg 2006). Dans la peau, le rôle de l'innervation sympathique dans la vasoconstriction initiale est bien caractérisée (Kellogg 2006). Schématiquement, la réponse vasoconstrictrice au froid est induite par une rapide et sélective augmentation de l'activité des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques après l'activation de voies métaboliques associées aux protéines Rho-kinases (Bailey et al. 2004).

Cependant, les mécanismes indépendants de l'innervation qui interviennent dans la réponse prolongée, en particulier ceux qui induisent la CIVD, sont toujours mal connus (Kellogg 2006). Plusieurs facteurs peuvent être impliqués : une altération de la biodisponibilité du NO, l'ouverture d'anastomoses artérioveineuses, une augmentation de la viscosité sanguine et des modifications de l'affinité des récepteurs (Kellogg 2006; Racchi et al. 1997).

### ***c Administrations de molécules vasoactives***

Des substances telles que l'acétylcholine, la méthacholine, l'adénosine, la noradrénaline, la substance P, la bradykinine ou la sérotonine sont souvent utilisées comme stimuli pharmacologiques (Cracowski et al. 2006; Cracowski et Roustit 2010). Ces agonistes se lient principalement à des récepteurs couplés aux protéines G sur les cellules endothéliales. Cette liaison entraîne une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, responsable des différents effets vasoactifs. L'acétylcholine est devenue le stimulus pharmacologique le plus utilisé pour l'exploration fonctionnelle de la vasodilatation dépendante de l'endothélium. Elle se lie à des récepteurs muscariniques de type M2 sur la membrane des cellules endothéliales ce qui provoque une augmentation de la synthèse de NO, de PGI<sub>2</sub> et d'EDHFs via des mécanismes dépendant du calcium (Gaubert et al. 2007; Khazaei et al. 2008). La vasodilatation induite par l'acétylcholine est principalement liée au NO dans de nombreux territoires vasculaires. Cependant de nombreux facteurs physiologiques et pathologiques altèrent la biodisponibilité du NO (vieillesse, diabète, hypertension artérielle...). Des études *in vivo* ont montré que les EDHFs sont des mécanismes compensateurs lorsque la biodisponibilité du NO est altérée (Gaubert et al. 2007). D'autre part, la protéine eNOS peut aussi être activée par une autre voie métabolique, indépendante du calcium. De nombreux autres molécules peuvent être utilisés et notamment des substances libérant spontanément du NO qui agit directement sur les cellules musculaires lisses. Ces « donneurs de NO » comme le nitroprussiate de sodium (SNP) induisent une vasodilatation qui est indépendante de l'endothélium.

### **III.1.2. Méthodes *in vitro***

L'utilisation d'anneaux aortiques isolés de lapin a initialement permis de démontrer le rôle obligatoire de l'endothélium dans la relaxation vasculaire dépendante de l'endothélium (Furchgott et Zawadzki 1980). Cette méthode de bains d'organes isolés est devenue la technique standard d'exploration de la fonction endothéliale *ex vivo*. L'évaluation de la réponse vasodilatatrice (dépendante et indépendante de l'endothélium) est réalisée sur des segments artériels de conductance (aorte, artère fémorale...) ou de résistance (artère mésentérique, artère coronaire...) à l'aide d'un myographe. Cette technique a permis initialement d'identifier et de comprendre les mécanismes délétères de certaines pathologies sur la fonction endothéliale (Angus et Wright 2000).

L'intérêt de cette technique est de pouvoir tester la réactivité vasculaire sur des tissus préalablement exposés à des agents pharmacologiques ou chimiques (cytokines...) qui favorisent ou inhibent la relaxation musculaire lisse dépendante de l'endothélium. Il faut cependant signaler la nature artificielle de ces mesures qui ne reflètent pas le comportement physiologique des cellules endothéliales confrontées notamment à des variations permanentes du flux sanguin. Cette technique est également délicate et les résultats sont influencés par les procédures d'anesthésie et d'euthanasie des animaux mais aussi de prélèvement et de conditionnement des préparations tissulaires (Rinaldi 2001).

### **III.1.3. Méthodes *in vivo***

#### ***a Méthodes invasives***

Chez l'homme, les premières études de la vasodilatation dépendante de endothélium ont été réalisées en mesurant par angiographie les variations du diamètre des artères coronaires en réponse à la perfusion *in situ* d'acétylcholine ou d'adénosine (Cox et al. 1989a; Ludmer et al. 1986; Takase et al. 2005). Ces études ont mis en évidence des altérations de la fonction endothéliale chez des sujets atteints de pathologies coronariennes (Cox et al. 1989a). Elles ont également permis de démontrer que l'apparition de la dysfonction endothéliale précède le développement de l'athérosclérose (Leung et al. 1993). Cependant, la nature extrêmement invasive de cette technique, qui nécessite un cathétérisme cardiaque, limite son usage (Anderson et al. 1995). Actuellement, de nouvelles techniques d'échographie-doppler vasculaire ont remplacé l'angiographie pour évaluer la fonction endothéliale des artères coronaires (Deanfield et al. 2005; Kiviniemi et al. 2006). Ces méthodes permettent notamment de calculer le débit sanguin de réserve coronaire (*coronary flow velocity reserve*), un index de la capacité des vaisseaux coronaires à se dilater (Kiviniemi et al. 2006).

Les variations de la résistance vasculaire peuvent également être évaluées par la mesure du débit sanguin d'un membre à l'aide d'un système de pléthysmographie par occlusion veineuse. Cependant, la cathétérisation de l'artère brachiale et l'injection artérielle de substances vasodilatatrices (acétylcholine, adénosine...) limitent leur utilisation à grande échelle (Chowienzyk et al. 1994; Cockcroft et al. 1994).

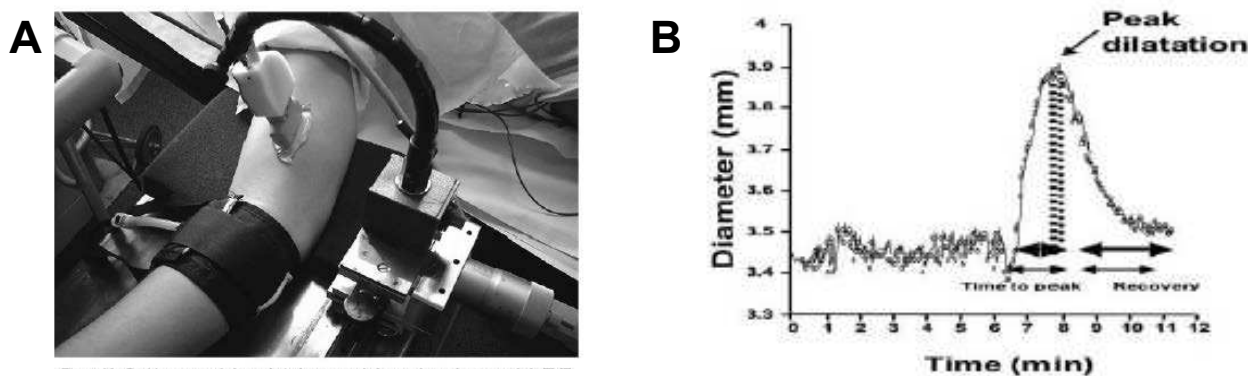
Chez l'animal, des techniques hémodynamiques ont été développées parallèlement aux méthodes d'exploration *in vivo* de la fonction endothéliale chez l'homme. En effet, des cathéters peuvent être placés au niveau de l'aorte, du sinus coronarien ou des artères fémorales afin de mesurer les variations des flux sanguins en réponse à l'injection intra-artérielle ou intra-veineuse de substances vasoactives (Berdeaux et al. 1994; Cox et al. 1989b). Généralement, ces mesures sont réalisées sur des animaux anesthésiés ce qui peut altérer les réponses hémodynamiques observées.

### *b Méthodes non invasives*

En alternative aux tests invasifs d'évaluation de la réactivité vasculaire, plusieurs méthodes non invasives ont été développées afin de mesurer la réactivité vasculaire périphérique. L'utilisation de ces méthodes est justifiée par l'existence de liens très forts entre les valeurs de réactivité vasculaire mesurées au niveau de l'artère coronaire et les valeurs observées au niveau de la circulation périphérique (Anderson et al. 1995; Gokce et al. 2002b; Suwaidi et al. 2000).

#### La flow mediated dilation (FMD).

La réactivité vasculaire de l'artère coronaire, induite par l'acétylcholine, est fortement corrélée avec la réactivité vasculaire de l'artère brachiale, induite par une augmentation du flux sanguin (FMD) (Anderson et al. 1995; Gokce et al. 2002b; Suwaidi et al. 2000). La méthode la plus utilisée consiste à mesurer, à l'aide d'un appareil d'échographie-Doppler à haute résolution, les variations de diamètre de l'artère brachiale ou radiale à la suite d'une ischémie courte de l'avant-bras (Celermajer et al. 1992; Deanfield et al. 2005). Cette ischémie est induite par un brassard généralement gonflé à 20 mmHg au dessus de la pression artérielle systolique pendant 2 à 5 minutes. La levée de la compression provoque une augmentation transitoire du flux sanguin et des contraintes de cisaillement qui provoquent la production de substances vasodilatatrices (Deanfield et al. 2005) (Figure 5). La FMD de l'artère brachiale est habituellement considérée comme un marqueur de la vasodilatation dépendante du NO (Cracowski et al. 2006).



**Figure 5. Positionnement de la sonde à ultrasons et du brassard pour la mesure de la vasodilatation induite par le flux (FMD) de l'artère brachiale (A) et signal de FMD (B).** Le brassard d'occlusion d'un sphygmomanomètre placé au niveau distal de l'artère brachiale est rapidement gonflé (200 mmHg) puis progressivement dégonflé. La mesure en continu du diamètre de l'artère brachiale est réalisée à l'aide d'une sonde à ultrasons, pendant et après le dégonflement du ballonnet d'occlusion. La FMD est exprimée en variation du diamètre de l'artère brachiale (Deanfield et al. 2005).

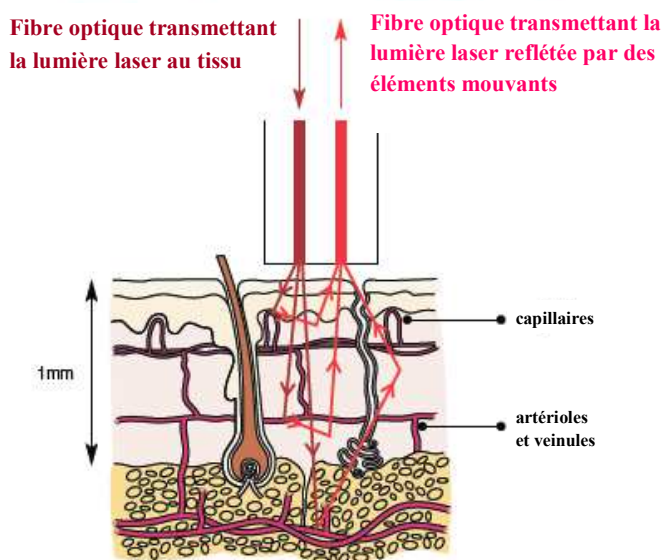
En pratique clinique, les résultats de la FMD sont souvent comparés à ceux obtenus par l'administration parentérale d'un donneur de NO, comme la nitroglycérine, qui va induire une vasodilatation indépendante de l'endothélium. La FMD est une technique attractive parce qu'elle est non-invasive et qu'elle permet la réalisation de mesures répétées. De plus, l'altération de la FMD est concomitante à la survenue de pathologies, notamment chez des patients à faible risque cardiovasculaire (Schachinger et al. 2000). Cependant, chez des sujets sains, le rôle pronostique de la FMD pour prédire le risque de survenue de pathologies cardiovasculaires semble moins pertinent (Fathi et al. 2004; Frick et al. 2005; Yeboah et al. 2008).

En dépit d'une utilisation fréquente, cette technique a des limites méthodologiques (Corretti et al. 2002). La FMD n'est pas seulement liée à la production endothéliale de NO mais aussi aux substances produites par l'ischémie et à une relaxation réflexe des cellules musculaires lisses (Pyke et al. 2010). Des modifications mineures de la position de la sonde, du ballonnet d'occlusion ou de la durée d'occlusion peuvent modifier la validité et la reproductibilité de la mesure (Pyke et al. 2010). De plus, la FMD demeure une technique dépendante de l'opérateur qui nécessite un entraînement et une pratique importante (Corretti et al. 2002; Thijssen et al. 2011). Il existe actuellement une variabilité importante entre les opérateurs et entre les laboratoires (Pyke et Tschakovsky 2005). La méthode de réalisation de la FMD est actuellement en cours de standardisation (Thijssen et al. 2011).

### **Laser doppler et mesure du débit sanguin cutané.**

Le laser-Doppler est la technique la plus utilisée pour évaluer les variations de débit sanguin cutané (Johnson 1984; Saumet et al. 1988). Cette technique permet une mesure en continu du flux sanguin cutané dans un volume de peau d'environ 1 mm<sup>3</sup>. La mesure est le plus souvent réalisée au niveau de l'avant-bras ou de la pulpe des doigts. Un faisceau lumineux de faible énergie et de longueur d'onde constante (780 nm) est transmis au tissu par une fibre optique. Une partie des photons sera réfléchi par les structures mobiles présentes dans la peau, en particulier les globules rouges. Cette lumière réfléchi de longueur d'onde différente sera alors recueillie par une autre fibre optique et analysée (Figure 6). Le principe de la mesure est celui de l'effet Doppler-Fizeau qui veut que la vitesse de déplacement d'objets mobiles est proportionnelle à la différence de longueur d'onde mesurée. La perfusion sanguine sera alors estimée par le produit de la vitesse et du volume sanguin mesurés. Elle sera exprimée en unités arbitraires de perfusion (PU). Les résultats sont souvent présentés en variation de conductance vasculaire cutanée (CVC), calculée comme le rapport de la perfusion sanguine sur la pression artérielle moyenne. La conductance est l'inverse de la résistance. Elle varie dans le même sens que le débit et le flux sanguin et donne une mesure plus physiologique et fonctionnelle des variations de la perfusion sanguine (Parthimos et al. 1996).





**Figure 6. Principe de la mesure du débit sanguin cutané par laser-Doppler** (Moor-Instruments 2007).

L'un des avantages du laser-Doppler est sa résolution temporelle qui permet une évaluation en temps réel de la perfusion sanguine. Son inconvénient est sa faible résolution spatiale. De nouvelles techniques comme le *laser-Doppler Imaging* (LDI) permettent d'augmenter la résolution spatiale grâce à un système de balayage. Néanmoins, cette méthode induit une perte de l'information temporelle. L'utilisation de ces appareils, encore coûteux, améliorerait la répétabilité de la mesure (Jadhav et al. 2007; Roustit et al. 2010a).

Il est maintenant bien admis que l'étude de la vasodilatation dépendante de l'endothélium au niveau cutané est une mesure représentative de la fonction endothéliale générale (Anderson et al. 1995; Holowatz et al. 2005). Elle procure des informations pronostiques importantes sur le risque vasculaire (Jadhav et al. 2007; Khan et al. 2008). Il a été montré que l'évaluation de la réactivité vasculaire cutanée était très bien corrélée à la mesure de la FMD d'artères de conductance. Ce résultat souligne l'étroite relation entre des mesures faites sur des artères de gros calibre et celles faites sur des artérioles cutanées (<100  $\mu\text{m}$ ) (Debbabi et al. 2009; Hansell et al. 2004). Cependant, il y a un intérêt particulier à étudier la microcirculation cutanée. Elle est le site initial des lésions endothéliales chez des sujets qui ont un risque de développer une pathologie cardiovasculaire (Brodsky et al. 2004). Il a été démontré que les lésions endothéliales microvasculaires peuvent précéder les lésions des artères de conductance de plus gros diamètre (Sullivan et al. 1983) et être prédictives de futures pathologies cardiovasculaires (Liao et al. 2004).

La réactivité vasculaire peut être finement évaluée en mesurant les modifications du débit sanguin ou de la conductance vasculaire cutanée en réponse à des modifications du débit sanguin, de la température cutanée ou à l'application locale de substances vasoactives (Cracowski et al. 2006).

**Hyperhémie réactionnelle.** Cette technique d'évaluation de la variation du débit sanguin cutané, appelée *post-occlusive reactive hyperaemia* (PORH) est basée comme la FMD sur la mesure de l'augmentation de la conductance vasculaire cutanée en réponse à la levée d'une brève occlusion artérielle. Des données contradictoires ont été publiées concernant l'implication de la voie du NO dans la réponse hyperhémique cutanée (Medow et al. 2007; Wong et al. 2003). Comme pour la FMD, les mécanismes impliqués dans la vasodilatation sont nombreux (Cracowski et al. 2006; Cracowski et Roustit 2010). Cependant, alors qu'au niveau des vaisseaux de gros calibre le NO est le principal vasodilatateur, l'inhibition des eNOS modifie peu la réponse hyperhémique cutanée (Wong et al. 2003). Plusieurs travaux ont démontré que les EDHFs étaient fortement impliquées dans la réponse hyperhémique (Lorenzo et Minson 2007; Minson et al. 2001). Cette vasodilatation est également liée à la production de PGI<sub>2</sub> (Binggeli et al. 2003; Larkin et Williams 1993). La reproductibilité de cette technique est assez faible, notamment au niveau de l'avant-bras (Roustit et al. 2010a).

**Chauffage cutané local.** L'exposition locale au chaud survient dès que la température cutanée dépasse la température de thermoneutralité comprise entre 32 et 34°C. Elle atteint sa valeur maximale à 42°C. Le chauffage local provoque une vasodilatation en deux temps. La phase initiale est dépendante de l'activation des nerfs sensitifs dans les premières minutes (Minson et al. 2001). La seconde phase, en plateau, survient après 30 à 50 minutes d'exposition au chaud et dépend principalement de la production endothéliale de NO (Arildsson et al. 2000; Minson et al. 2001). La reproductibilité de la mesure est également assez faible, en particulier au niveau de l'avant-bras (Roustit et al. 2010b).

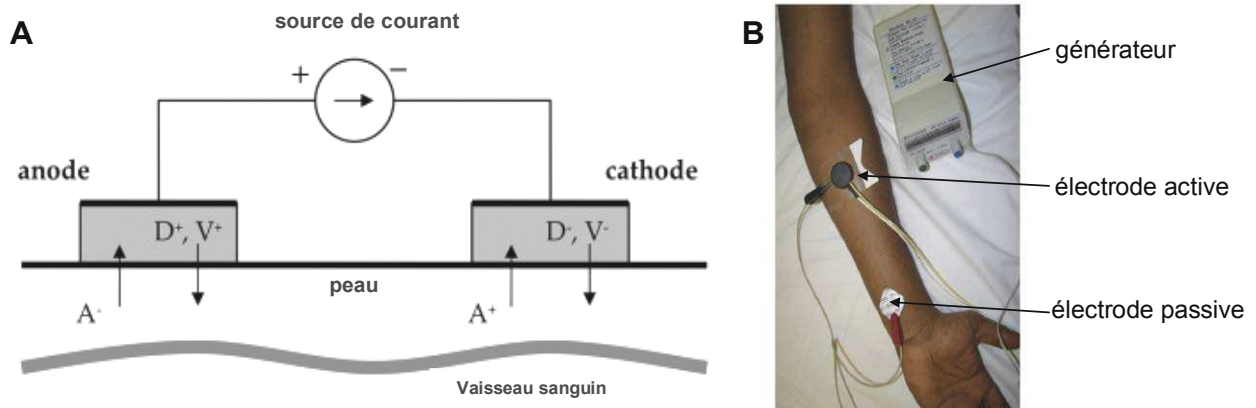
**Application locale de froid.** De nombreuses techniques ont été utilisées pour évaluer la réactivité vasculaire cutanée au froid : immersion de la main ou des doigts (Maver et Struel 2000), application locale de froid (Roustit et al. 2010b) sur la peau ou exposition générale au froid. Actuellement, le test de 30 minutes d'immersion de la main en eau froide (5°C) est considéré, chez l'homme, comme un test reproductible et simple d'évaluation de la fonction microvasculaire cutanée (O'Brien 2005; Roustit et al. 2010b) et du risque de gelure (Van der Struijs et al. 2008). Ce test permet en outre d'observer des vasodilatations induites par le froid (CIVD) liées en partie à la production endothéliale de métabolites vasodilatateurs (Kellogg 2006; Racchi et al. 1997). D'autres tests d'exposition au froid ont été proposés, à des températures plus élevées (15°C), pour caractériser les pathologies cutanées comme le syndrome de Raynaud (Roustit et al. 2010b). Ils ne permettent cependant pas d'observer de CIVD.

**Application locale de substances vasoactives.** L'exploration de la fonction endothéliale cutanée peut être réalisée en administrant localement des substances vasoactives. L'administration de ces substances ne s'accompagne pas d'effets hémodynamiques systémiques ou de stimulation du système nerveux central. En l'absence d'éventuels effets confondants liés notamment aux modifications de la pression artérielle, elle permet l'étude de l'endothélium dans son environnement physiologique (Joannides et al. 2006). De

nombreuses substances peuvent être utilisées : vasodilatatrices (ACh, bradykinine, insuline, substance P) ou vasoconstrictrices (noradrénaline...). Ces dernières nécessitent souvent de réaliser une vasodilatation préalable. Plusieurs techniques d'application locale de substances vasoactives sont possibles : microdialyse (Kellogg et al. 2005), injection intradermique (Opazo Saez et al. 2005), injection sous-cutanée (Gaubert et al. 2007) ou iontophorèse transdermique (Algotsson et al. 1995; Tesselaar et Sjoberg 2011).

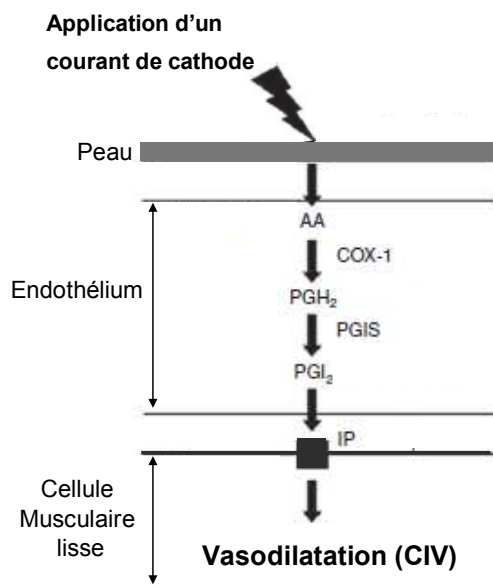
**L'iontophorèse transdermique** est une technique non invasive et indolore de transport, à travers la peau intacte, de volumes très faibles de drogues sous forme ionisée. Le transport est réalisé grâce à un courant électrique de faible intensité (0,05 à 0,4 mA) créé sur la peau entre deux électrodes. La technique consiste à faire migrer des ions en solution selon leur charge vers une électrode de polarité inverse au moyen d'un potentiel électrique. Le sens de la migration dépend de leur charge, de la quantité de drogue délivrée, de l'intensité, de la durée du courant et de la surface d'application. Combinée à un laser-Doppler, la réaction vasculaire induite par la drogue délivrée peut être étudiée en mesurant les modifications du débit sanguin local (Kalia et al. 2004). Cette technique est par ailleurs indépendante de l'opérateur.

Depuis une décennie, l'évaluation de la réactivité vasculaire par la méthode couplée laser-Doppler-iontophorèse d'acétylcholine a été largement utilisée pour évaluer la fonction endothéliale dans de nombreuses situations physiologiques ou pathologiques (Andreassen et al. 1998; Cracowski et al. 2006; Debbabi et al. 2009; Henricson et al. 2007). La vasodilatation cutanée induite par l'ACh au niveau de l'avant-bras est corrélée avec de nombreux marqueurs systémiques de la fonction endothéliale tels que la production de NO (corrélation positive), la concentration plasmatique d'endothéline-1 (corrélation négative) (Elherik et al. 2002), la fonction coronaire microvasculaire (Khan et al. 2008) et avec la FMD de l'artère brachiale (Debbabi et al. 2009). Cette vasodilatation dépendante de l'endothélium est comparée à celle obtenue après administration d'un donneur exogène de NO qui provoque une vasodilatation indépendante de l'endothélium.



**Figure 7. Principe de l'iontophorèse. A. Représentation schématique de l'iontophorèse transdermique.**  $V^+$  et  $V^-$  sont les ions chargés positivement et négativement présents dans la solution qui vont diffuser sous l'effet du courant et entraîner une vasodilatation ou une vasoconstriction.  $D^+$  et  $D^-$  sont les co-ions chargés positivement et négativement dans les solutions qui ne vont pas diffuser à travers la peau du fait de leur taille.  $A^+$  et  $A^-$  sont les ions traversant la peau en sens inverse, vers l'électrode, sous l'effet du courant. **B. La iontophorèse transdermique en pratique.** Un générateur de courant délivre un courant d'intensité contrôlée à travers la peau à partir d'une électrode active, contenant la substance devant être introduite dans la peau. Cette électrode possède en son centre une sonde laser-Doppler. Une électrode passive permet le transfert du courant électrique (Tesselaar et Sjöberg 2011).

Cependant, les contraintes techniques sont nombreuses et des précautions doivent être prises concernant la nature du solvant (Khan et al. 2004), la durée et l'intensité du courant (Ferrell et al. 2002) pour que la reproductibilité de la mesure soit correcte (Cracowski et al. 2006; Tesselaar et al. 2009; Tesselaar et Sjöberg 2011; Turner et al. 2008). La stimulation électrique provoquée par le courant électrique induit notamment, à la cathode et à l'anode, une vasodilatation (*current-induced vasodilation*, CIV) et une augmentation du débit sanguin cutané (Durand et al. 2002b; Gohin et al. 2011; Grossmann et al. 1995). La vasodilatation est beaucoup plus importante à la cathode qu'à l'anode (3 fois environ) (Durand et al. 2002b; Tartas et al. 2005a) et ces effets propres du courant rendent parfois difficile l'individualisation des effets de la substance utilisée. Elle est principalement dépendante de l'activation réflexe des COX-1 et de la production de prostaglandines  $PGI_2$  (Figure 8) (Durand et al. 2002b). Les COX-2 et les eNOS ne semblent pas impliquées dans la vasodilatation induite par le courant (Durand et al. 2002b; Gohin et al. 2011; Tartas et al. 2005a; Tartas et al. 2004). Certains auteurs ont proposé d'utiliser le courant de cathode comme méthode d'évaluation de la vasodilatation dépendante de la production de  $PGI_2$  (Gohin et al. 2011).



**Figure 8. Voie de signalisation pour la vasodilatation induite par le courant de cathode chez le rat.** AA : acide arachidonique, CIV : vasodilatation induite par le courant, COX : cyclooxygénase ; IP : récepteur à la prostacycline,  $PGH_2$  : prostaglandine  $H_2$ ,  $PGI_2$  : prostacycline, PGIS : prostacycline synthase. (Gohin et al. 2011)

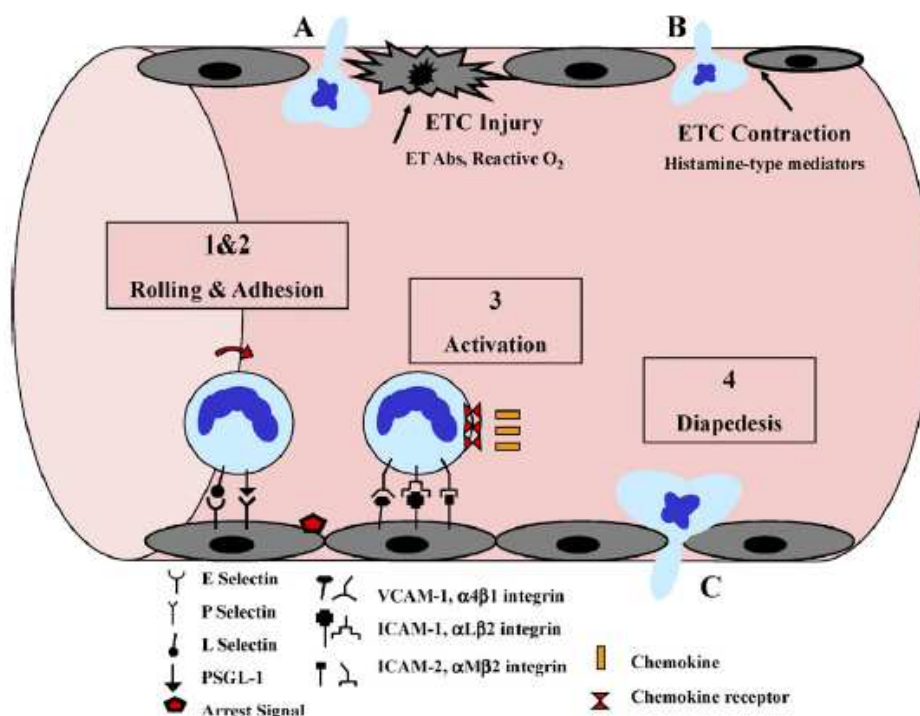
En marge des techniques précédemment décrites, des démarches plus indirectes et plus mécaniques ont été associées à une exploration non invasive de la fonction endothéliale afin d'évaluer le tonus vasculaire périphérique. Ainsi, des variations de la rigidité artérielle, contrôlée en partie par l'endothélium, peuvent être évaluées par la mesure de la vitesse de propagation de l'onde de pouls (*pulse wave velocity*, PWV). Cette mesure est réalisée au niveau des artères périphériques à l'aide d'un tonomètre appliqué au niveau des artères carotides ou radiales. D'autres paramètres de la rigidité artérielle comme l'index d'augmentation de la pression artérielle (ou Aix, *augmentation index*) sont utilisés. Il a été montré qu'une augmentation de l'Aix était observée chez des sujets à risque cardiovasculaire (Woodman et Watts 2003). Cependant, les liens entre ces techniques et les méthodes de référence d'exploration de la fonction endothéliale n'ont pas encore été démontrés. Les mécanismes impliqués notamment dans la régulation de la rigidité artérielle par l'endothélium restent largement méconnus.

### III.2. Marqueurs biologiques de la dysfonction endothéliale

Ces marqueurs présentent l'avantage de leur simplicité d'exploitation puisqu'ils sont réalisés à partir de prélèvements sanguins. L'augmentation de leur concentration plasmatique est corrélée avec l'incidence des pathologies cardiovasculaires et/ou l'atteinte de la vasodilatation dépendante de l'endothélium. Cependant, ils ne sont pas spécifiques d'un territoire artériel donné et ils peuvent nécessiter des conditions délicates de prélèvement ou d'analyse non disponibles en routine. Nous ne présenterons dans ce travail que les marqueurs accessibles par des méthodes biologiques courantes.

### III.2.1. Marqueurs solubles de l'activation endothéliale

Il existe une relation étroite entre inflammation et pathologies cardiovasculaires. L'activation endothéliale est définie comme la synthèse par l'endothélium de protéines qui interviennent dans la réponse inflammatoire et en particulier dans l'adhésion des leucocytes et leur migration à travers la paroi vasculaire (Figure 9) (Khazaei et al. 2008). L'activation endothéliale est déclenchée par les contraintes mécaniques (*shear stress*) ou des stimuli biochimiques comme les cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6...) ou les facteurs de croissance (*vascular growth endothelial factor*). Ces substances sont apportées par le sang ou produites localement par les cellules endothéliales et/ou par des cellules du compartiment vasculaire. L'augmentation de la concentration plasmatique de protéines d'adhésion intercellulaire et vasculaire (*intrecellular adhesion molecule* [ICAM-1], *vascular cell adhesion molecule* [VCAM-1] et Sélectine-E) témoigne de l'activation endothéliale. Ces protéines sont exprimées à la surface des cellules endothéliales lors de lésions endothéliales ou en réponse aux cytokines pro-inflammatoires circulantes. Ces molécules participent au processus inflammatoire en permettant l'adhésion des monocytes sur l'endothélium, puis leur migration dans l'intima (Figure 9).



**Figure 9. Migration leucocytaire à travers l'endothélium activé.** (A et B) Lésion des jonctions entre les cellules endothéliales du fait d'une lésion (induite par des anticorps contre l'endothélium ou des espèces radicalaires de l'oxygène) ou la contraction des cellules endothéliales (par des médiateurs histaminergiques). (C) Transmigration à travers la paroi en 4 étapes : (1 et 2) *rolling* et adhésion aux molécules d'adhésion (sélectines). (3) Activation, production de chimiokines, augmentation de l'expression des molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1 et ICAM-2) et activation des intégrines. (4) Interaction entre les molécules d'adhésion et les intégrines puis transmigration dans l'espace interstitiel via les jonctions entre les cellules endothéliales (diapédèse). Abs : anticorps, ET : cellules endothéliales, PSGL-1 : P-selectine glycoprotéine ligand-1 (Khazaei et al. 2008).

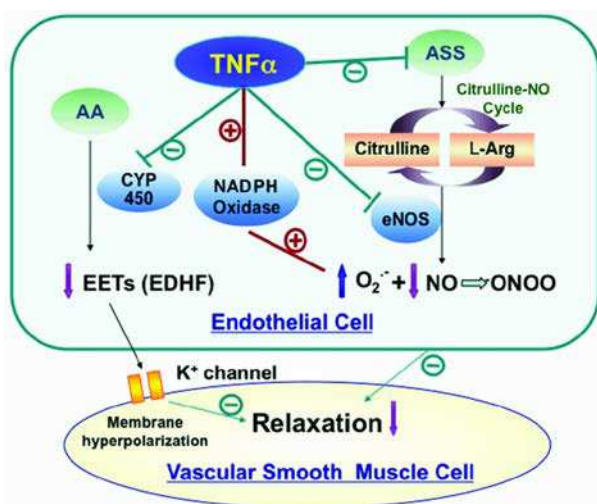
Les formes solubles de ces molécules peuvent être dosées dans le plasma ou le sérum. Des taux circulants élevés, corrélés à une diminution de la réactivité endothéliale, ont été rapportés dans l'hypertension artérielle et l'athérosclérose (Meier-Ewert et al. 2004; Shearer et al. 2001; Vgontzas et al. 2004). De plus, l'augmentation des taux de marqueurs de l'activation endothéliale, en particulier ICAM-1, sont prédictifs de la survenue d'une pathologie coronarienne (Hwang et al. 1997; Rohde et al. 1998).

### III.2.2. Marqueurs de l'inflammation

Chez des sujets asymptomatiques, une augmentation du risque de développer une maladie cardiovasculaire a été observée avec le nombre de globules blancs (Zalokar et al. 1981) et de sous-types de globules blancs tels que les monocytes (Olivares et al. 1993) ou les neutrophiles (Horne et al. 2005).

*Cytokines pro-inflammatoires.* Chez l'homme, l'augmentation de la concentration plasmatique de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) est associée à une diminution du tonus vasculaire via la liaison avec des récepteurs endothéliaux (Iversen et al. 1999). In vivo, Il-6 et TNF- $\alpha$  altèrent la vasodilatation dépendante de l'endothélium (Bhagat et Vallance 1997; Orshal et Khalil 2004). Il a également été rapporté qu'IL-6 et TNF- $\alpha$  pouvaient être associées au développement de pathologies cardiovasculaires et de la dysfonction endothéliale (Constance et Conri 2006). De nombreux travaux ont mis en évidence que le TNF- $\alpha$  jouait un rôle pivot dans les altérations de la fonction micro et macrovasculaire et entraînait une dysfonction endothéliale (Vila et Salaices 2005; Zhang et al. 2009) (Figure 10).

L'augmentation des cytokines pro-inflammatoires dans les pathologies cardiovasculaires peut être liée d'une part à l'augmentation de la pression artérielle, qui augmente le *shear stress* et induit la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules endothéliales, et d'autre part, à l'augmentation de l'activité du système nerveux sympathique (Calabro et al. 2003).



**Figure 10. Rôle du TNF- $\alpha$  dans la dysfonction endothéliale.** CYP 450 : Cytochrome P450 ; EETs : acides epoxyeicosatriénoïques ; AA acide arachidonique (Vila et Salaices 2005).

La protéine C réactive (CRP) est un marqueur d'inflammation d'origine hépatique qui favorise la synthèse endothéliale des molécules d'adhésion et le recrutement des monocytes à la surface de l'endothélium. Sa concentration plasmatique est inversement corrélée à la réactivité endothéliale artériolaire de l'avant-bras. La CRP a un effet direct sur la fonction vasculaire (Clapp et al. 2005) en déprimant eNOS, favorisant la production d'endothéline-1 et en stimulant la coagulation par la production de PAI-1 (*plasminogène activator inhibitor*) et du facteur nucléaire- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Ce dernier contrôle de très nombreux gènes impliqués dans l'athérosclérose et la production de protéines d'adhésion et de cytokines pro-inflammatoires. La CRP ultrasensible constitue un facteur prédictif de la survenue des accidents cardiovasculaires chez les sujets sains et coronariens (Clapp et al. 2005; Dohi et al. 2007; Fichtlscherer et al. 2000; Mullington et al. 2009). L'intérêt de ce marqueur est sa stabilité et sa demi-vie, plus longue que celle des cytokines. De plus, il n'y a pas de rythme circadien de la concentration de CRP (Meier-Ewert et al. 2001). Cependant, produite essentiellement par le foie, elle est peu spécifique de l'endothélium et son taux plasmatique peut être influencé par de multiples phénomènes inflammatoires extravasculaires qui rendent son interprétation parfois difficile (Schindler et al. 2004; Yiu et al. 2011). Des travaux récents suggèrent que la CRP peut également être produite par les cellules musculaires lisses sous l'effet de cytokines pro-inflammatoires (Calabro et al. 2003).

### III.2.3. Endothéline-1

L'endothéline joue un rôle dans le développement des pathologies cardiovasculaires. Des taux circulants importants ont été observés parallèlement à une diminution de la réactivité endothéliale coronaire (Lerman et al. 1995). Cependant, ces taux ne reflètent pas directement l'activité tissulaire de l'endothéline, qui a une action autocrine et paracrine. De plus, l'augmentation des concentrations plasmatiques d'endothéline manque de sensibilité pour prédire la survenue de pathologies cardiovasculaires. En dépit de nombreux travaux depuis plus de 20 ans et de l'intérêt relatif des antagonistes de l'ET-1 dans le traitement de certaines pathologies, comme l'hypertension pulmonaire (Palmer et Love 2011; Palmer 2009) ou l'insuffisance cardiaque congestive (Moe et al. 2003), le rôle précis de l'ET-1 dans la physiologie vasculaire et la physiopathologie est toujours discuté.

### III.2.4. Autres variables biologiques

*Les chimiokines.* Elles sont également des marqueurs de l'inflammation. L'augmentation des MCP-1 (*monocytes chemo-attractant protein-1*) pendant le recrutement des monocytes (*rolling* et adhésion) est associée à l'activation de l'endothélium et à la production de protéines d'adhésion. Une MCP-1 participe également aux lésions myocardiques et à la dysfonction contractile du myocarde (Mascareno et al. 2001). Le TNF- $\alpha$  stimule l'expression de MCP-1 par les cellules endothéliales et les macrophages (Yang et al. 2009).



*Les facteurs pro-thrombotiques* ne sont pas strictement des marqueurs de la dysfonction endothéliale mais ils reflètent l'état inflammatoire associé à la dysfonction endothéliale (Constans et Conri 2006). Ils sont libérés par les cellules endothéliales et régulent l'activité fibrinolytique. Des taux élevés de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1) ont été observés dans l'athérosclérose (Jansson et al. 1993). De plus, des études prospectives ont montré l'intérêt prédictif de ce marqueur dans la survenue d'accidents cardiovasculaires chez le sujet sain et chez le coronarien (Jansson et al. 1993). Cependant, la spécificité de ces marqueurs est relativement faible car ils sont également libérés par des cellules non endothéliales comme les leucocytes et le tissu adipeux. Ils sont formés sous l'effet de l'augmentation des forces de cisaillement, de l'hypoxie et de cytokines pro-inflammatoires.

*Microparticules circulantes d'origine endothéliale.* Plus récemment, leur dosage a été proposé comme marqueur de l'activation, de lésion et d'apoptose endothéliale. La production de microparticules membranaires est un élément initial de l'inflammation vasculaire (Morel et al. 2006; Schouten et al. 2008). Elles possèdent un caractère pathogène pro-coagulant et une élévation de leur taux plasmatique a été observée en présence de syndromes coronariens aigus ou d'hypertension artérielle (Angelot et al. 2009; Mallat et Tedgui 2000). Cependant, leur rôle n'est pas complètement bien compris. Certains auteurs ont même décrit un rôle anti-inflammatoire et protecteur. De plus la quantité de sang nécessaire pour réaliser leur dosage est importante, ce qui limite leur utilisation (Tual-Chalot et al. 2010).

### **III.3. Conséquences de la dysfonction endothéliale**

Le terme de dysfonction endothéliale définit une perte complète ou partielle de l'équilibre endothélial entre les facteurs vasodilatateurs et constricteurs, pro- et anti-inflammatoires, pro- et antiagrégants plaquettaires ou pro- et anti-prolifératifs. Cependant sur le plan clinique, la dysfonction endothéliale est assimilée à une détérioration de la vasodilatation dépendante de l'endothélium, principalement provoquée par une altération de la disponibilité du NO (Andreotti et al. 1988; Celermajer et al. 1992; Vanhoutte et Shimokawa 1989). L'apparition d'une dysfonction endothéliale aura des conséquences à moyen et long terme, mais aussi à court terme.

#### **III.3.1. Conséquences à court terme**

Le NO a un rôle protecteur de la paroi vasculaire (Vanhoutte 2009) et la réduction de la biodisponibilité du NO, en particulier de la relaxation dépendante de l'endothélium, est un facteur de vulnérabilité. Le NO prévient notamment la survenue de vasoconstrictions anormales (spasme vasculaire) des artères coronaires (Vanhoutte et Shimokawa 1989) qui favorisent la formation de caillots à l'intérieur des vaisseaux coronaires (Pries et al. 2008). Les pathologies coronaires sont caractérisées par de longues périodes de stabilité clinique entrecoupées d'évènements abrupts qui peuvent déclencher des syndromes

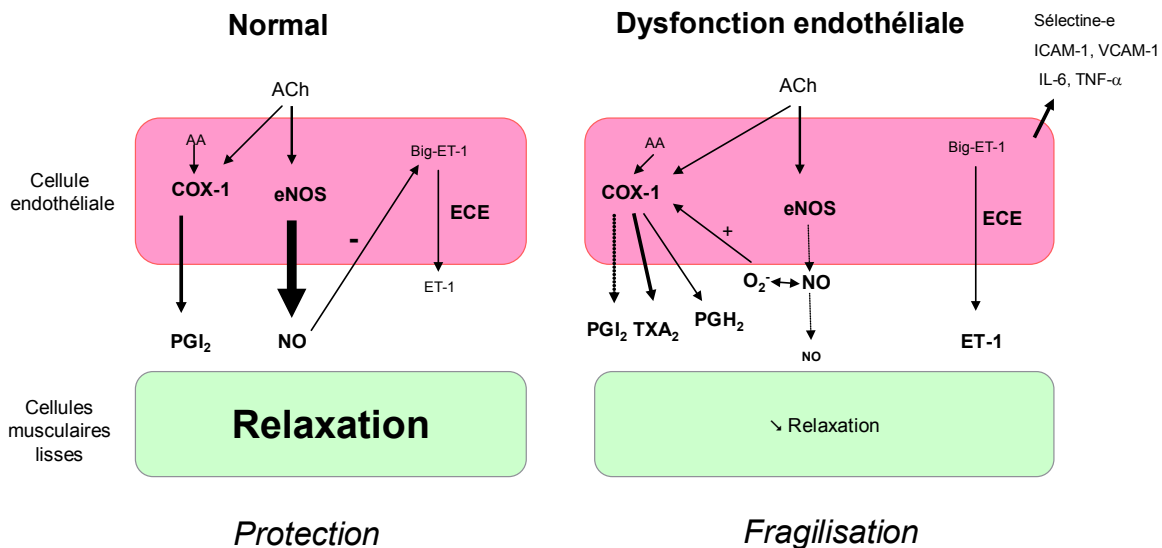
coronariens aigus. Ces évènements peuvent survenir au cours d'un épisode infectieux (Gokce et al. 2002a) ou d'un stress qui entraînent une diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium (Hijmering et al. 2002; Meier et al. 1998).

A court terme, les atteintes de la vasomotricité sont également un mécanisme potentiel d'intolérance aux contraintes environnementales (Cui et al. 2005; Sawada 1996). Lors d'une exposition locale ou générale au chaud, les patients, dont la fonction endothéliale est altérée, ont également une réponse vasodilatatrice diminuée alors que la réponse sudorale est conservée (Charkoudian 2003; Cui et al. 2005). De même, l'altération de la fonction endothéliale est un facteur de diminution de la vasodilatation paradoxale (Sawada 1996) qui survient lors d'une exposition locale au froid. Ce phénomène est un mécanisme de protection contre les gelures (Daanen 2003).

### **III.3.2. Conséquences à moyen et long terme**

De nombreuses études ont montré qu'une dysfonction endothéliale apparaît très précocément dans le développement de nombreuses pathologies cardiovasculaires, précédant même les premières manifestations cliniques (Bonetti et al. 2003; Le Brocq et al. 2008). Elle constitue un marqueur de risque prédictif à moyen et long termes de la survenue de pathologies cardiovasculaires (Perticone et al. 2001; Vita et Keane 2002) et de la progression de l'athérosclérose (Gokce et al. 2002b; Lerman et al. 1995; Schachinger et al. 2000). L'athérosclérose, cause majeure de morbidité cardiovasculaire, est un processus inflammatoire impliquant une interaction entre les cellules endothéliales, les globules blancs, des cytokines inflammatoires et certains facteurs de croissance (Lind 2003). Une première étape dans le développement de l'athérosclérose est l'installation d'un processus inflammatoire de bas grade et l'activation des cellules endothéliales. Cet état va entraîner des modifications des voies du NO et des COXs. La réduction de l'activité du NO issu de l'endothélium contribue à l'altération de la relaxation vasculaire, à la stimulation de l'agrégation plaquettaire, à l'augmentation de la prolifération des cellules musculaires lisses, aux interactions endothélium-leucocytes et à la levée de l'inhibition de la production de l'endothéline-1 (Kubes et al. 1991) (Figure 11). L'adhésion des monocytes et leur différenciation en macrophages est nécessaire à leur pénétration à l'intérieur des vaisseaux athérosclérotiques. Lorsque l'inflammation est installée, elle stimule la migration ainsi que la prolifération des cellules musculaires lisses. Si cet état perdure, la paroi intima-média des vaisseaux sanguins s'épaissit progressivement. On parle alors d'une lésion athérosclérotique de niveau intermédiaire. L'état inflammatoire entraîne également une augmentation du nombre de macrophages et de lymphocytes T en provenance de la circulation sanguine (Libby et al. 2006; Ross 1999).

L'adhésion des leucocytes à la paroi vasculaire n'est pas seulement importante pendant les phases initiales de l'athérosclérose. Elle favorise également l'instabilité et la rupture de la plaque d'athérome (Crea et al. 1997). Enfin, le NO inhibe également l'agrégation des plaquettes, la production de protéines d'adhésion et la production et l'action de l'endothéline-1, peptide vasoconstricteur.



**Figure 11. Effet de l'acétylcholine et dysfonction endothéliale** AA : acide arachidonique, eNOS : NO synthase endothéliale, ECE : enzyme de conversion de l'endothéline-1 (ET-1). (Vanhoutte et al. 2009)

### III.4. Synthèse

Plusieurs techniques ont été utilisées pour évaluer la vasodilatation dépendante de l'endothélium. Bien que ces techniques évaluent la fonction endothéliale des vaisseaux périphériques, il est maintenant admis que ces mesures sont représentatives de la fonction endothéliale générale (Anderson et al. 1995). Il existe cependant des différences physiologiques importantes entre les mécanismes impliqués dans la vasodilatation induite par le *shear stress*, la chaleur et l'iontophorèse d'acétylcholine (Henricson et al. 2007; Koeppen et al. 2004).

Dans notre travail, nous avons choisi d'évaluer la réactivité vasculaire cutanée induite par l'iontophorèse d'acétylcholine (vasodilatation) ou l'application locale de froid (vasoconstriction). Ces techniques non invasives, ont été utilisées de façon identique chez l'homme et chez l'animal. Il conviendra cependant d'évaluer la reproductibilité de la méthode utilisée ainsi que l'effet de la vasodilatation induite par le courant.

La dysfonction endothéliale a été décrite comme un phénotype pro-athérogène complexe. Elle est caractérisée par une diminution du tonus vasculaire et par une altération de la production et de la biodisponibilité du NO. Elle est associée à une inflammation à bas bruit (bas grade) et à la production de radicaux libres oxydants. L'aspect le plus étudié de la fonction endothéliale est la régulation du tonus vasculaire. La dysfonction endothéliale fait alors référence à un déséquilibre dans la production ou la biodisponibilité des médiateurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs endothéliaux (Khazaei et al. 2008; Taddei et al. 2006). Un tel déséquilibre a été impliqué dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires (Khazaei et al. 2008) et il pourrait être à court terme un facteur de diminution de la tolérance aux contraintes qui induisent une vasodilatation telles que les contraintes thermiques et l'exercice prolongé (Charkoudian 2003).

## **IV. Réponses vasculaires à la privation de sommeil chez le sujet sain**

Le sommeil est un important modulateur de la pression artérielle et de l'activité du système nerveux autonome (Kamperis et al. 2010). Une diminution de la pression artérielle liée à une diminution de la fréquence cardiaque et du débit cardiaque est observée pendant les périodes de sommeil à ondes lentes (Kamperis et al. 2010; Wolk et al. 2005). Ces modifications sont notamment la conséquence d'une diminution de l'activité du système nerveux sympathique et d'une augmentation de l'activité parasympathique (Furlan et al. 1990).

Nous n'aborderons pas dans ce travail les effets cardiovasculaires liés aux pathologies du sommeil. Nous limiterons notre étude de la bibliographie aux effets, chez l'homme sain et l'animal, de restrictions ou de privations de sommeil rencontrées lors de situations expérimentales ou réelles. Ces situations sont très variées. Cependant, la restriction de sommeil peut être définie comme une diminution, de 25 à 50 %, de la quantité de sommeil pendant une période allant de quelques jours (restriction aiguë) à supérieure à plusieurs semaines ou années (restriction chronique) (Faraut et al. 2011). Enfin, la privation totale de sommeil est définie comme une période d'éveil continu, sans aucun sommeil, pendant une période allant de 1 à 4 jours (Meier-Ewert et al. 2004; Pagani et al. 2009).

### **IV.1. Conséquences de la restriction de sommeil**

Dans les pays occidentaux, le temps consacré au sommeil diminue progressivement (Sabanayagam et Shankar 2010). Actuellement, plus de 20 % des adultes aux USA déclarent dormir moins de 6 heures par nuit et 8 % moins de 5 heures (Sabanayagam et Shankar 2010). Plusieurs études épidémiologiques rapportent une mortalité plus importante, quelle que soit la cause, chez les sujets dormant moins de 5 heures par nuit par rapport à ceux qui dorment plus de 7 heures (Ha et Park 2005; Kripke et al. 2002; Kripke et al. 1979; Wolk et al. 2005). Le système cardiovasculaire est particulièrement affecté après quelques années de restriction chronique de sommeil, même modérée (Mallon et al. 2002; Wingard et Berkman 1983). L'incidence des pathologies augmente avec la diminution du temps de sommeil quotidien (Gangwisch et al. 2006; Hall et al. 2008). Plus spécifiquement, dans une étude prospective sur 5 ans avec 4810 sujets en bonne santé et de moins de 60 ans, Gangwisch et al. (2006) ont mis en évidence chez les personnes dormant moins de 5 heures par nuit une augmentation du risque de développer une hypertension. Un risque accru d'angors, d'infarctus du myocarde et de mort subite a également été observé chez des patients dormant moins de 6 heures par nuit (King et al. 2008; Sabanayagam et Shankar 2010). Ce résultat a été obtenu indépendamment du sexe, de l'âge, de la consommation de tabac ou d'alcool, d'antécédents d'hypertension artérielle et de la quantité d'activité physique.

Les pathologies observées semblent être la conséquence de l'augmentation chronique de l'activité du système nerveux sympathique et de la perturbation des rythmes circadiens (Ayas et al. 2003; Bonnet et Arand 2007; Gangwisch et al. 2006; Liu et Tanaka 2002). Ces modifications pourraient aussi favoriser l'apparition d'une hypertension artérielle (Gangwisch et al. 2006) et d'un syndrome inflammatoire

chronique (Gangwisch et al. 2006; Meier-Ewert et al. 2004). De plus, la quantité de sommeil est inversement corrélée à l'augmentation de la concentration plasmatique d'Il-6, d'ICAM-1, d'ET-1 (Mills et al. 2007; Weil et al. 2010) traduisant une activation endothéliale.

Afin de comprendre les mécanismes liant la restriction de sommeil à l'apparition de pathologies, de nombreux travaux expérimentaux ont évalué les effets de la restriction aiguë de sommeil chez le sujet sain. Cependant, les protocoles sont très différents (intensité de la restriction, durée de l'étude.....) ce qui entraîne des résultats parfois discordants.

Une seule nuit de restriction de sommeil (moins de 5 heures de sommeil versus 8 heures) semble être un stress suffisant pour entraîner une augmentation de la pression artérielle, de la fréquence cardiaque et de l'activité du système nerveux sympathique (Lusardi et al. 1996; Tochikubo et al. 1996). Un résultat identique est observé au cours d'expérimentations plus longues (4 heures de sommeil par nuit pendant 6 nuits) (Spiegel et al. 1999). En revanche, après 4 nuits consécutives de 4 heures de sommeil, Muenster et al (2000) n'ont pas observé de différence au repos, mais une augmentation plus importante de la pression artérielle après un stress orthostatique.

Cependant, tous les déterminants de la pression artérielle ne sont pas affectés par la restriction de sommeil. En effet, chez l'animal, la restriction de sommeil induit une augmentation de la pression artérielle mais pas de modification de la concentration d'angiotensine II (Perry et al. 2011a; van der Wouden et al. 2006). Certains auteurs ont même observé une diminution de l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) (Visniauskas et al. 2011) et une diminution des concentrations plasmatiques d'angiotensine II (Perry et al. 2011b; Visniauskas et al. 2011). Chez l'homme, une augmentation de l'activité de la rénine plasmatique a été observée après 14 jours de restriction de sommeil (6 heures par nuit) chez des sujets maintenus couchés (*bed rest*) (Grenon et al. 2004).

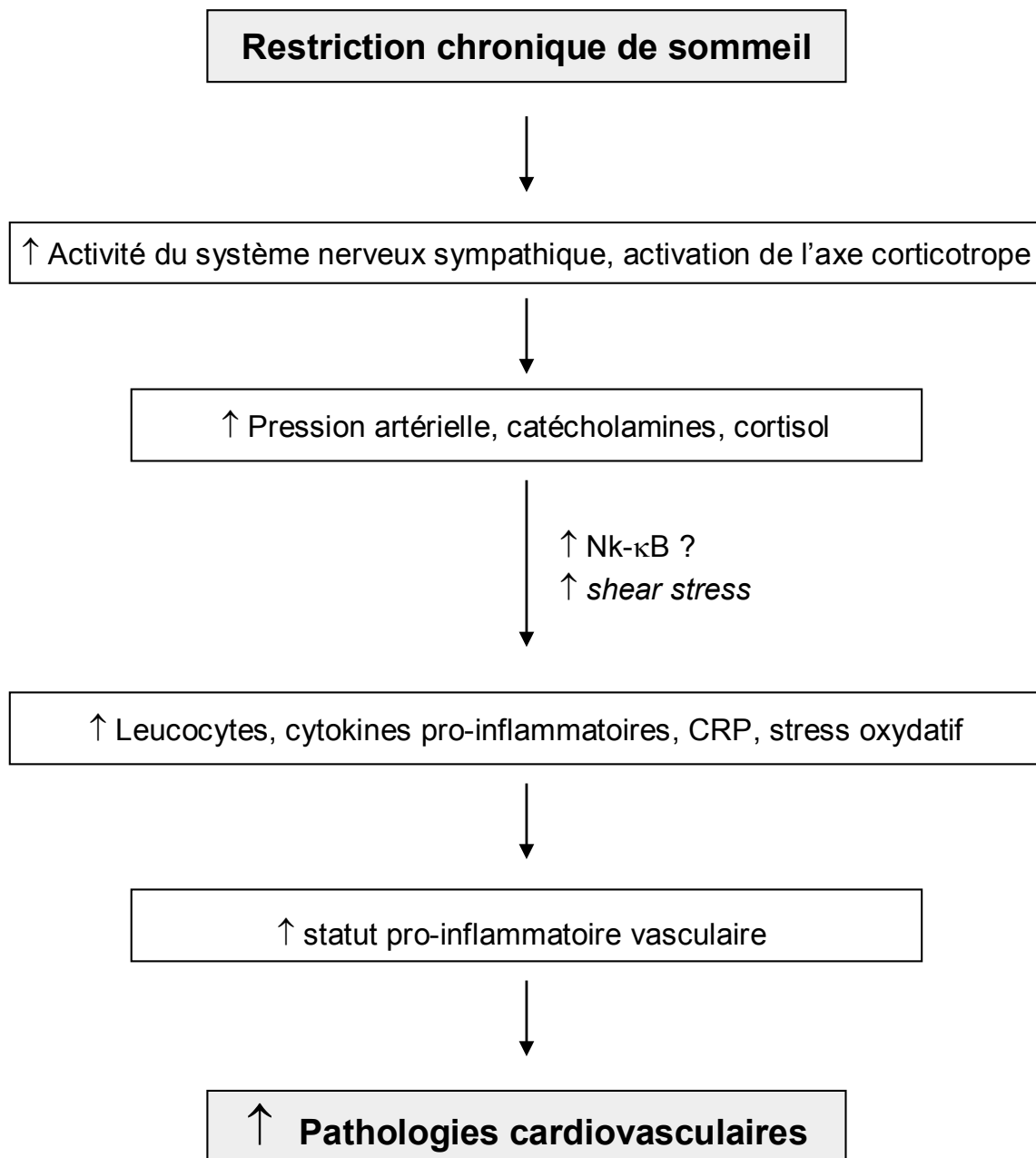
D'autre part, plusieurs équipes ont récemment décrit, chez des sujets sains, une altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium après des durées très courtes de restriction de sommeil. Ainsi, Sekine et al. (2010) ont montré après une seule nuit de restriction de sommeil (moins de 4 heures de sommeil versus plus de 7 heures) une diminution de la réserve de débit coronaire (*coronary flow velocity reserve*, CFVR) qui traduit une atteinte de la fonction endothéliale coronaire. Une diminution de la FMD a également été mesurée, après 3 nuits de travail chez des infirmières (Kim et al. 2011). La diminution de la FMD était corrélée au nombre d'années passées en travail posté (Kim et al. 2011). Elle était également associée à une diminution de la production de nitrites et de nitrates ( $\text{NO}_2^-$  et  $\text{NO}_3^-$ ) qui traduit une diminution de la production de NO. Ces résultats confirment les travaux de Takase et al. (2004) qui ont montré une diminution de la FMD chez des étudiants après 4 semaines de révisions associant restriction de sommeil et stress. D'autres travaux réalisés chez le rongeur ont rapporté une augmentation de la concentration plasmatique d'endothéline-1 après 96 heures de privation de sommeil paradoxal (Palma et al. 2002).

La restriction de sommeil, même aiguë, pourrait être également une voie d'activation de processus inflammatoires qui modifient la vasomotricité et favorisent l'activation endothéliale. Plusieurs études, de durée et d'intensité différentes, ont montré une augmentation de la concentration plasmatique de CRP ultrasensible au cours de restrictions aiguës de sommeil (Haack et al. 2007; Meier-Ewert et al. 2004; van Leeuwen et al. 2009; Vgontzas et al. 2004). Ces modifications persistent parfois après plusieurs nuits de récupération (van Leeuwen et al. 2009).

La restriction de sommeil, modeste (Vgontzas et al. 2004) ou prolongée (Haack et al. 2007), est également associée à une augmentation de la concentration plasmatique de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ) qui persiste après 2 nuits de récupération (van Leeuwen et al. 2009). Cependant, plusieurs études n'ont pas mis en évidence d'effet de la restriction de sommeil sur la concentration plasmatique du TNF- $\alpha$  ou de son récepteur (Haack et al. 2007; Ruiz et al. 2010; Shearer et al. 2001) pour des durées équivalentes de restriction. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats discordants comme le sexe (les variations semblent plus importantes chez les hommes), l'horaire du prélèvement ou la technique de prélèvement (Haack et al. 2002; Irwin et al. 2010; Vgontzas et al. 2004).

Les modifications immuno-inflammatoires observées pourraient être liées à une augmentation de la production par les monocytes d'IL-6 et de TNF- $\alpha$ . Cette modification a été observée après seulement une nuit de restriction de sommeil (Irwin et al. 2010; Irwin et al. 2006). Elles sont peut-être également la conséquence de l'augmentation de la PA et de l'activité du système nerveux autonome (Gangwisch et al. 2006; Meier-Ewert et al. 2004). Certains auteurs ont suggéré que la diminution de la mélatonine, observée au cours de restrictions de sommeil (Rogers et Dinges 2008) induit une augmentation des cytokines pro-inflammatoires. En effet, la mélatonine est un régulateur important du rythme circadien. Elle intervient dans la régulation de la production diurne de cytokines et de médiateurs de l'immunité. Elle a également une action antioxydante et elle intervient dans la régulation circadienne de l'activité du système nerveux sympathique (Rogers et Dinges 2008).

Il semble donc que la restriction de sommeil, même modeste, soit une contrainte suffisante pour entraîner chez le sujet sain une augmentation de la pression artérielle, de l'activité du système nerveux sympathique et des modifications immuno-inflammatoires responsables d'une inflammation vasculaire chronique (Mullington et al. 2009). Ces modifications favorisent l'apparition de pathologies cardiovasculaires. Cependant, la cinétique et les mécanismes qui lient la restriction chronique de sommeil aux modifications immunitaires, inflammatoires et vasculaires ne sont pas encore bien précisés (Mullington et al. 2009). Dans une revue de la littérature récente, Farrault et al. (2011) ont proposé le schéma théorique présenté dans la Figure 12).



**Figure 12. Voies potentielles par lesquelles la restriction chronique de sommeil favorise l'apparition de pathologies cardiovasculaires.** La restriction augmente l'activité du système nerveux sympathique et de l'axe corticotrope du stress. Le *shear stress* exacerbé par l'augmentation de la pression artérielle, induit une inflammation de la paroi vasculaire qui favorise la production endothéliale de médiateurs de l'inflammation. Les médiateurs hormonaux du stress (catécholamines, cortisol) peuvent mobiliser les leucocytes dans la circulation sanguine. La dégranulation des leucocytes entraîne la production de stress oxydatif. Les catécholamines augmentent l'expression du facteur nucléaire Kappa B (NF- $\kappa$ B), un activateur de l'expression des gènes des cytokines pro-inflammatoires. L'activation de toutes ces voies métaboliques entraîne le maintien d'un statut pro-inflammatoire chronique qui favorise le développement de pathologies cardiovasculaires. Modifié d'après Faraut et al. 2011.

## IV.2. Réponses à la privation aiguë et totale de sommeil

Ce type de privation est moins fréquent que la restriction de sommeil. Cependant, la privation aiguë et totale de sommeil est habituelle dans les milieux professionnels caractérisés par des activités continues (armées, police, secours, hôpitaux...). Nous n'évoquerons ici que les effets de la privation aiguë et totale de sommeil (1 à 3 jours d'éveil continu). Les résultats d'expérimentations extrêmes réalisées chez l'homme (11 jours de privation de sommeil) (Ross 1965) ou l'animal (10 à 22 jours) (Zenko et al. 2000) ne seront pas abordés.

### IV.2.1. La pression artérielle

La privation totale de sommeil perturbe le rythme circadien de la pression artérielle en inhibant la diminution nocturne de la pression artérielle (*dip*) (Kamperis et al. 2010) (Figure 13). Cependant, les effets de cette privation observés au cours de la journée qui suit la nuit de privation sont très disparates et contradictoires. La privation totale de sommeil entraîne d'après certains auteurs une augmentation de la pression artérielle (Kato et al. 2000; Lo et al. 2010; Meier-Ewert et al. 2004; Ogawa et al. 2003) alors que pour d'autres elle ne semble pas avoir d'effet persistant au-delà de la nuit (Pagani et al. 2009; Vaara et al. 2009). Ces différences sont principalement liées à l'activité des sujets et aux conditions de mesure de la pression artérielle (Zhong et al. 2005).

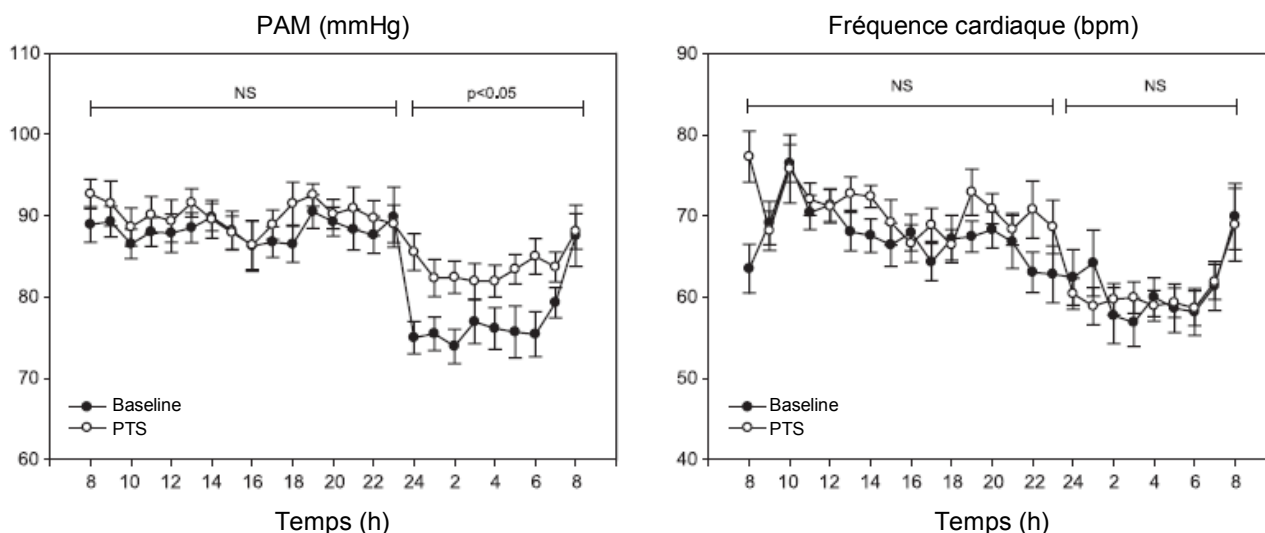
Il semble cependant que 24 heures de privation aiguë de sommeil, dans des conditions bien contrôlées et au repos, n'entraîne pas de variation de la pression artérielle et de l'activité du système nerveux sympathique par rapport à la journée de référence (Pagani et al. 2009). Cette privation induit cependant une diminution de la sensibilité du baroréflexe spontané (Pagani et al. 2009; Zhong et al. 2005). En revanche, lorsque la privation de sommeil est associée à un stress physique ou mental ou à une journée de travail, une augmentation de la pression artérielle systolique est observée (Lo et al. 2010; Su et al. 2008). Celle-ci persiste dans certaines études après une nuit de 8 heures sommeil (Lo et al. 2010; Su et al. 2008). Une augmentation de la pression artérielle est également observée lorsque la durée de la privation est plus longue (plus de 32 heures) (Miro et al. 2002).

Lorsqu'une augmentation de la pression artérielle est observée, elle est souvent associée à une augmentation de la fréquence cardiaque, de l'activité du système nerveux sympathique, de la concentration plasmatique de catécholamines et à une modification de la sensibilité du baroréflexe (Akerstedt et al. 1980; Miro et al. 2002; Su et al. 2008; Zhong et al. 2005). Cependant, des résultats contradictoires suggèrent l'implication de mécanismes plus complexes. En effet, l'activation du système nerveux sympathique ne semble pas toujours entraîner d'augmentation de la pression artérielle (Zhong et al. 2005). D'autre part, la privation de sommeil ne semble pas modifier les résistances vasculaires (Kato et al. 2000). De plus, il a été observé, en association avec une augmentation de la pression artérielle, une diminution paradoxale de l'activité nerveuse sympathique musculaire (Kato et al. 2000; Ogawa et al. 2003). Il semble donc que les variations de la pression artérielle, lorsqu'elles sont observées, soient plutôt



la conséquence d'une augmentation de la fréquence et du débit cardiaque que des résistances vasculaires périphériques. Ce résultat suggère que la privation de sommeil a des effets différents sur le cœur et sur les vaisseaux (Wolk et al. 2005). Quoiqu'il en soit, l'augmentation de l'activité du système nerveux sympathique ne permet pas d'expliquer l'ensemble des réactions observées (Kato et al. 2000).

Chez l'animal, la privation aiguë et totale de sommeil entraîne rapidement une augmentation de la pression artérielle (Chang et al. 2006; Sgoifo et al. 2006), associée à une augmentation de la fréquence cardiaque et de l'ACTH (Sgoifo et al. 2006). Dans une autre étude, une augmentation de la pression artérielle a été observée après 5 jours de privation de sommeil. Elle était associée à une diminution de l'activité des NOS et des COXs présentes dans des structures cérébrales impliquées dans la régulation de l'activité du système nerveux autonome (Chang et al. 2006). Le NO est en particulier, un inhibiteur de l'activité du système nerveux sympathique dans ces structures (Chang et al. 2006).



**Figure 13. Variations circadiennes de la pression artérielle moyenne (PAM) et de la fréquence cardiaque avant (Baseline) et pendant 24 heures de privation totale de sommeil (PTS), chez l'homme sain (Kamperis et al. 2010).**

#### IV.2.2. La vasomotricité

Amir et al. (2004) ont observé une diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium (mesuré par FMD) après 24 heures de privation de sommeil. Cette étude a pour la première fois mis en évidence que la privation aiguë et totale de sommeil altère la fonction endothéliale et la vasomotricité. Cependant, cette étude a été réalisée chez des jeunes médecins et des internes travaillant dans un service d'urgence. Cette situation combine les effets de la privation de sommeil à ceux de la station debout prolongée et du stress. Ce dernier est un facteur bien connu d'altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium (Hijmering et al. 2002). De plus, la diminution de la FMD était plus importante chez les sujets faisant des gardes de nuit depuis plus de 3 ans. Dans ce travail, il n'a pas été observé d'effet sur la

réactivité vasculaire indépendante de l'endothélium (trinitrine sublinguale). Néanmoins, il semble que la privation totale de sommeil puisse, comme la restriction aiguë, induire une altération de la fonction endothéliale (Sekine et al. 2010; Takase et al. 2004).

### **IV.2.3. Les marqueurs biologiques**

#### *a Marqueurs de la dysfonction endothéliale*

Frey et al. (2007) ont récemment montré, chez des sujets sains, qu'une privation aiguë et totale de sommeil de 40 heures induit une élévation de la concentration plasmatique de protéines d'adhésion (ICAM-1 et sélectine-E) qui sont considérées comme des marqueurs biologiques de l'activation endothéliale. L'augmentation de la concentration plasmatique de ces marqueurs peut être induite par une augmentation de la pression artérielle et par l'augmentation de la concentration plasmatique de cytokines pro-inflammatoires (Irwin et al. 1996) qui ont aussi des effets importants sur la vasomotricité (Iversen et al. 1999). Ainsi, une augmentation d'IL-1 $\beta$  et IL-6 a été observée après 40 heures de privation de sommeil (Frey et al. 2007; Vgontzas et al. 2007) et une augmentation de TNF- $\alpha$  après 42 heures de privation de sommeil chez des femmes (Altemus et al. 2001). IL-6 et le récepteur soluble du TNF- $\alpha$  (TNF-RI) augmentent également après 88 heures de privation totale de sommeil (Meier-Ewert et al. 2004; Shearer et al. 2001). Cependant, des résultats contradictoires ont aussi été rapportés par Frey et al. (2007). Ces auteurs ont montré qu'une nuit de privation totale de sommeil, dans des conditions contrôlées de posture, de lumière et de nutrition, entraîne une diminution d'IL-6. Ruiz et al. (2010) n'ont observé aucune augmentation de TNF- $\alpha$  après deux nuits de privation totale de sommeil.

Par ailleurs, Meier-Ewert et al. (2004) ont mis en évidence, après une privation de sommeil particulièrement longue (88 heures), l'apparition d'un syndrome inflammatoire, caractérisé par une augmentation de CRP, un marqueur stable de l'inflammation et un facteur pronostique indépendant d'évènements cardiovasculaires. Cependant, lors de situations expérimentales plus courtes (moins de 48 heures de privation de sommeil), la concentration plasmatique de CRP diminue (Frey et al. 2007) ou n'est pas modifiée (Dimitrov et al. 2004).

En somme, les effets de la privation de sommeil sur les cytokines restent incertains. Les différences observées entre les études sont probablement liées aux durées différentes des protocoles et aux techniques de prélèvement. L'utilisation continue de cathéters intraveineux implantés pendant 24 heures est associée à une augmentation de la concentration en IL-6 après une période de sommeil ou de privation de sommeil (Haack et al. 2002). En effet, l'augmentation de la concentration plasmatique en IL-6, TNF- $\alpha$  et le récepteur soluble du TNF- $\alpha$  peut être liée à une inflammation locale au niveau du site de prélèvement (Haack et al. 2000). Néanmoins, nous pouvons retenir qu'une privation de sommeil semble induire des modifications immuno-inflammatoires.

### ***b Autres marqueurs biologiques d'intérêt***

L'augmentation de la pression artérielle au cours de la privation totale de sommeil ne semble pas être liée à des modifications d'autres déterminants de la pression artérielle et en particulier de la volémie et des hormones du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA). Le rythme circadien des hormones du système rénine-angiotensine-aldostérone est altéré pendant la privation de sommeil. (Charloux et al. 2001; Kamperis et al. 2010). Ainsi, la privation de sommeil induit une diminution nocturne des taux plasmatiques d'aldostérone, d'angiotensine II et de l'activité rénine-plasmatique (Charloux et al. 2001; Kamperis et al. 2010) entraînant une diminution de la réabsorption du sodium. L'activité moins importante du SRAA chez les sujets privés de sommeil peut être une conséquence de l'augmentation de l'activité du système nerveux sympathique ou de l'absence de diminution de la pression artérielle. Par ailleurs, la privation totale de sommeil n'a également aucun effet sur les taux plasmatiques d'arginine vasopressine et de peptide atrial natriurétique (ANP) (Kamperis et al. 2010). Au final, la privation totale de sommeil entraîne une augmentation de l'excrétion rénale de sodium et de la diurèse mais ne modifie pas la volémie (Charloux et al. 2001; Kamperis et al. 2010).

Contrairement à la restriction aiguë de sommeil, qui semble activer l'axe corticotrope et induire une élévation du cortisol, les effets de la privation totale de sommeil sur le cortisol ne sont pas clairs et les résultats publiés sont contradictoires. Des études ont rapporté une augmentation (Charloux et al. 2001; Leproult et al. 1997; Schussler et al. 2006; Weitzman et al. 1983), une diminution (Akerstedt et al. 1980; Dinges et al. 1994; Frey et al. 2007; Vgontzas et al. 1999) ou une absence de modification (Dzaja et al. 2004; Follenius et al. 1992; Gary et al. 1996; Gonzalez-Ortiz et al. 2000; Haack et al. 2002; Heiser et al. 2000; Ozturk et al. 1999). Les différences observées sont probablement liées aux conditions expérimentales. Le cortisol est en effet sensible à l'horaire du prélèvement (rythme circadien du cortisol), à la nature du prélèvement (salive, sang...), à l'activité des sujets ou à la prise alimentaire (Heiser et al. 2000). La position debout avant le prélèvement (Hennig et al. 2000) ou une augmentation de la luminosité matinale (Leproult et al. 2001) sont également des stimuli qui induisent une augmentation du cortisol. En revanche, la privation de sommeil, dans des conditions bien contrôlées de posture et de lumière, ne modifie pas significativement les rythmes circadiens du cortisol et de l'ACTH (Bryant et al. 2004).

De même, contrairement à la restriction aiguë de sommeil, plusieurs auteurs n'ont pas observé d'effet de la privation totale de sommeil sur la mélatonine dans des conditions contrôlées de posture et de luminosité (Goichot et al. 1998; Kamperis et al. 2010). Une augmentation de la concentration plasmatique de mélatonine a été observée après 36 et 50 heures de privation totale de sommeil dans des conditions moins contrôlées (Salin-Pascual et al. 1988).

D'autre part, la privation totale de sommeil semble avoir un effet significatif sur les marqueurs du stress oxydatif. Chez le rongeur, la privation totale de sommeil entraîne une augmentation de la production de marqueurs du stress oxydatif (glutathion, activité de la catalase, malondialdéhyde...) dans divers structures cérébrales (hippocampe, thalamus et hypothalamus) (Silva et al. 2004; Singh et al. 2008), dans le foie (Chang et al. 2008; Everson et al. 2005) et dans le myocarde (Everson et al. 2005).

### **IV.3. Synthèse**

La restriction chronique de sommeil entraîne une augmentation basale de l'activité du système nerveux sympathique et de la PA, associée à des modifications immuno-inflammatoires et à une altération de la fonction endothéliale. Ces modifications favorisent l'apparition de pathologies cardiovasculaires. Une diminution de la quantité de sommeil pendant quelques jours est un stress suffisant pour induire des modifications cardiovasculaires. Ces modifications sont de faibles amplitudes et infra-cliniques, mais elles sont concordantes avec celles observées au cours de la restriction chronique de sommeil.

Les effets de la privation aiguë et totale de sommeil sont plus discutés. Chez les sujets sains, la privation aiguë et totale de sommeil peut entraîner une augmentation de la pression artérielle. Celle-ci pourrait être liée à une augmentation de l'activité du système nerveux sympathique. Certains auteurs ont également décrit des modifications immuno-inflammatoires associées. Cependant, la privation totale de sommeil induit également, chez le sujet sain, une augmentation de la production de protéines d'adhésion liée à une activation endothéliale. De plus, des travaux récents montrent que la privation totale de sommeil pourrait elle aussi altérer de façon précoce la vasomotricité et donc la fonction endothéliale.

# Problématique et objectifs scientifiques

Les militaires sont soumis, lors d'opérations soutenues, à des privations totales de sommeil, souvent prolongées et répétées (Lieberman et al. 2002). Ces privations interviennent dans des conditions environnementales parfois contraignantes nécessitant une fonction vasculaire intacte (Johnson et Kellogg 2010). Or, la privation de sommeil altère la réponse physiologique à la chaleur (Armstrong et al. 2007; Coris et al. 2004) et à l'exercice d'intensité modérée (Sawka et al. 1984) ou intense (Armstrong et Maresh 1991; Martin et Gaddis 1981). Plusieurs auteurs ont également souligné qu'elle modifie la réponse thermique lors d'une exposition au froid (Landis et al. 1998; Savourey et Bittel 1994). La privation de sommeil pourrait également favoriser la survenue d'une pathologie induite par la chaleur (Day et Grimshaw 2005) ou par le froid (Marsh 1983; Rintamaki 2000). Cependant, les mécanismes qui lient la privation de sommeil à ces pathologies ne sont actuellement pas clairement identifiés.

La revue de la littérature a mis en évidence que la privation totale de sommeil induit des modifications de la pression artérielle, de l'activité du système nerveux autonome et de la vasomotricité. Les modifications de la vasomotricité pourraient être la conséquence d'altérations de la fonction endothéliale. A long terme, ces altérations pourraient favoriser l'apparition de pathologies cardiovasculaires. A court terme, les atteintes de la vasomotricité sont des mécanismes potentiels d'intolérance au chaud (Cui et al. 2005) et au froid (Sawada 1996).

Notre hypothèse de travail est qu'une privation totale de sommeil est un stress suffisant pour entraîner, chez l'homme sain, une dysfonction endothéliale responsable d'une altération de la vasomotricité. Cette dysfonction pourrait être liée à des modifications de la pression artérielle et/ou à des modifications immuno-inflammatoires. L'objectif principal de ce travail est donc d'étudier les effets de la privation totale de sommeil sur la fonction vasculaire.

Dans un premier temps, chez l'homme sain, l'objectif spécifique est d'évaluer, en l'absence de stress physique ou mental surajouté et dans des conditions contrôlées, si cette privation peut altérer la vasodilatation induite par l'acétylcholine et la vasoconstriction induite par le froid. Nous déterminerons également la durée d'éveil continu nécessaire à l'apparition d'une éventuelle dysfonction et ses liens avec une augmentation de la pression artérielle, de l'activité du système nerveux sympathique et les modifications immuno-inflammatoires.

Dans une seconde partie du travail réalisé chez le rat, les objectifs spécifiques sont de comprendre les mécanismes impliqués dans la dysfonction vasculaire en étudiant en particulier l'impact des modifications de la pression artérielle sur la réactivité vasculaire. Nous étudierons également l'influence de la privation de sommeil sur l'activité des voies de synthèses du NO et de PGI<sub>2</sub>.

# Travail de thèse

## I. Première partie : effet de la privation de sommeil sur la réactivité vasculaire.

Trois études ont été réalisées chez l'homme sain :

- L'objectif principal de **la 1<sup>ère</sup> étude**, a été d'évaluer si une privation totale de sommeil chez l'homme sain pouvait altérer la **vasodilatation dépendante et indépendante de l'endothélium** et de déterminer le délai d'apparition de cette éventuelle dysfonction. L'objectif secondaire a été d'identifier les liens de cette dysfonction avec des modifications de la pression artérielle, de l'activité du système nerveux autonome et des marqueurs de l'activation endothéliale et de l'inflammation.
- **La 2<sup>ème</sup> étude** a eu comme objectif d'étudier des effets de la privation aiguë de sommeil sur la vascularisation cutanés lors d'un test d'immersion locale au froid, puissant **vasoconstricteur** ;
- **la 3<sup>ème</sup> étude**, plus méthodologique, a eu pour objectif principal d'évaluer la variabilité et la reproductibilité de la mesure de la vasodilatation dépendante et indépendante de l'endothélium (méthode couplée laser-Doppler – iontophorèse d'acétylcholine et de nitroprussiate de sodium). L'objectif secondaire était de comparer l'utilisation de l'acétylcholine (ACh) et de la méthacholine (MCh), un ester synthétique de l'ACh.

Les articles relatifs à des études sont présentés en annexe (page 143).

## **I.1.1<sup>ère</sup> étude : « Effet de la privation aiguë de sommeil sur la fonction endothéliale de sujets sains »**

### *Articles publiés :*

Sauvet F, Leftheriotis G, Gomez-Merino D, Langrume C, Drogou V, Van Beers P, Bourrilhon C, Florence G, Chennaoui M. Effect of acute sleep deprivation on vascular function in healthy subjects. *J Appl Physiol.* 2010 ; 108:68-75.

Chennaoui M, Sauvet F, Drogou C, Van Beers P, Langrume C, Guillard M, Gourby B, Bourrilhon C, Florence G, and Gomez-Merino D. Effect of one night of sleep loss on changes in tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), sleepiness and performance in healthy men. *Cytokine.* 2011 ; 56:318-24.

### **I.1.1. Objectifs de l'étude**

L'objectif de ce travail a été d'évaluer, chez des sujets sains de moins de 35 ans, les effets de 40 heures de privation totale de sommeil sur la **vasodilatation dépendante et indépendante de l'endothélium** et de déterminer le délai d'apparition de cette éventuelle dysfonction. L'objectif secondaire était d'identifier les liens de cette dysfonction avec des modifications de la pression artérielle, de l'activité du système nerveux autonome et des marqueurs de l'activation endothéliale et de l'inflammation.

### **I.1.2. Matériels et méthodes**

#### *a Les sujets*

Douze hommes de moins de 35 ans ( $29,1 \pm 3,3$  ans) ont été inclus dans l'étude. Tous les sujets ont été interrogés et examinés avant l'étude et un prélèvement sanguin a été réalisé pour le dosage du glucose, du cholestérol total, des triglycérides, du  $\gamma$ GT et des transaminases. Les critères d'exclusion étaient :

- un facteur de risque cardiovasculaire, un antécédent de pathologie cardiovasculaire ou cutanée, un traitement médical, une pathologie infectieuse en cours ;
- la consommation de tabac, d'alcool ( $\geq 1$  verre/jour) ou de caféine ( $> 400$  mg/jour) ;
- un index de masse corporelle (BMI) supérieur à  $30 \text{ kg.m}^{-2}$  ;
- le travail posté, des antécédents de troubles ou pathologie du sommeil (*Pittsburg sleep quality index*, *PSQI*  $< 31$ , ou  $> 69$ ) (Buysse et al. 1989), une somnolence diurne excessive (*Epworth Sleepiness Scales*  $\geq 9$ ) (Johns 1991) et un chronotype non intermédiaire (*Horne and Orstberg questionnaire*) (Horne et Ostberg 1976).

### ***b Protocole expérimental***

Les sujets ont été logés pendant les 5 jours de l'étude dans des chambres individuelles climatisées ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Le premier jour (J1), ils ont été familiarisés avec le laboratoire et équipés pour l'enregistrement ambulatoire de l'électroencéphalogramme, de l'électrooculogramme et de l'électromyogramme nécessaire à l'étude de la polysomnographie. Pendant J1 et J2, les sujets allaient au lit à 23:00 et étaient réveillés à 07:00. La privation totale de sommeil a débuté le 3<sup>ème</sup> jour (J3) à 07:00 et se terminait le 4<sup>ème</sup> jour (J4) à 23:00 (soit après 40 heures d'éveil continu, définis comme la durée de privation totale de sommeil, PTS). Les sujets ont quitté le laboratoire le 5<sup>ème</sup> jour (J5) après une nuit de sommeil (23:00-07:00), dite de récupération (Figure 14).

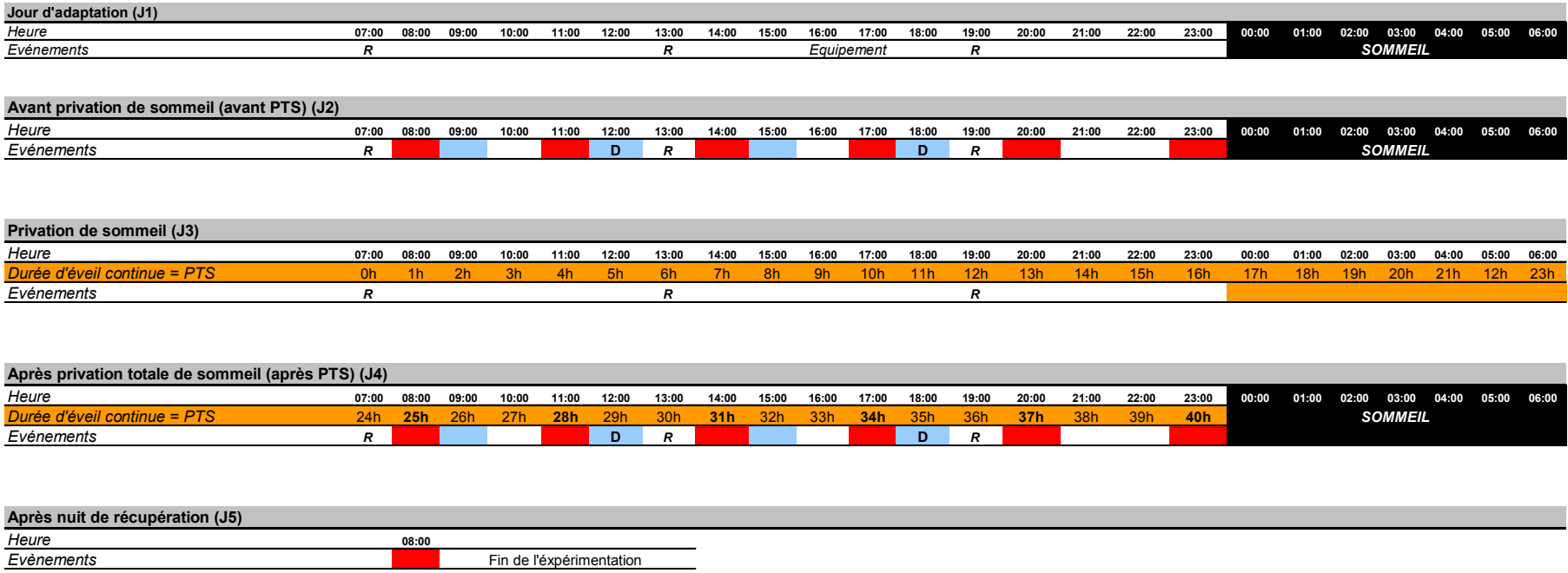
Pendant l'expérimentation, excepté pendant la douche (22:00 à 23:00), les sujets ont été continuellement enregistrés pour l'étude de la polysomnographie (lecture visuelle a posteriori avec Embla Somnologica Software) afin de s'assurer qu'ils restaient éveillés pendant les 40 heures d'éveil continu. La température centrale était enregistrée par télémétrie au moyen de capsules ingérées (VitalSense, Mini Mitter Company).

L'intensité lumineuse dans le laboratoire a été maintenue entre 150 et 200 lux pendant toute la période d'expérimentation. Quand ils n'étaient pas occupés par une session de tests ou un repas, les sujets pouvaient lire, regarder la télévision, jouer à des jeux de société ou converser avec les expérimentateurs. La pratique d'un exercice physique, la consommation du tabac, d'alcool et de substance psychoactive étaient interdites pendant les 24 heures précédant l'étude et les 5 jours d'expérimentation. L'apport énergétique a été fixé à 2600 kcal/jour.

Toutes les mesures ont été réalisées dans la chambre du sujet. Les prélèvements sanguins étaient réalisés toutes les 3 heures (08:00, 11:00, 14:00, 17:00, 20:00 et 23:00) pendant J2 et J4 à l'aide d'un cathéter veineux implanté dans une veine de l'avant-bras. Un dernier prélèvement était réalisé à J5 après une nuit de récupération. Des précautions ont été prises afin d'éliminer une possible inflammation locale due au cathéter : i) le cathéter était inséré dans le bras gauche à J2 et dans le bras controlatéral à J4 avant le premier prélèvement ; ii) entre les prélèvements, le cathéter était rempli avec une faible quantité de sérum physiologique hépariné et obturé (la dose totale d'héparine utilisée par sujet était inférieure à 100 UI/24 heures) ; iii) le cathéter était enlevé immédiatement après le dernier prélèvement (23:00). Après chaque prélèvement, les échantillons de sang étaient centrifugés à 1 100 G et les aliquotes de plasma stockés à  $-80^\circ\text{C}$ .

Les variables cardiovasculaires (ECG, pression artérielle) ont été enregistrées avant la privation totale de sommeil (J2) et pendant la privation (J4) après 10 minutes de repos en position couchée à 09:00, 12:00, 15:00 et 18:00. Une mesure de la réactivité vasculaire était également réalisée à 12:00 et 18:00.





Evènements :

- Evaluation de la réactivité vasculaire D
- Repas standardisé R
- Evaluation de la PA et FC
- Eveil continu
- Prise de sang

Figure 14. Représentation schématique du protocole expérimental. La privation totale de sommeil (PTS) a été définie comme la durée d'éveil continu. Début le la PTS à J3 (07:00) et fin à J4 (23:00) soit 40 h de PTS.

### c Mesures physiologiques cardiovasculaires

Le débit sanguin cutané (SkBF) a été mesuré à l'aide de deux sondes laser-Doppler (481-1, Perimed AB) adaptées pour l'iontophorèse, fixées sur l'avant-bras avec un patch adhésif double face et connecté à un moniteur laser-Doppler (PF5000, Perimed AB). Avant l'expérimentation, les éponges contenues dans les sondes laser-Doppler étaient imbibées, pour l'une avec 0,2 ml d'une solution de chlorure d'acétylcholine (ACh, 1%, 5,5 mM, Sigma-Aldrich), et pour l'autre avec 0,2 ml d'une solution de nitroprussiate de sodium (SNP, 2%, 67 mM, Nitriate, Serb Laboratoires). Chaque électrode d'iontophorèse et une électrode passive de référence (Ag-AgCl, PF 384, Perimed AB), fixées à 5 cm l'une de l'autre, étaient connectées à un générateur de courant (PeriIont 382, Perimed AB) pour l'iontophorèse. Pour toutes les solutions, le solvant était de l'eau désionisée (pH = 6,5). Après 5 minutes d'enregistrement, le SNP (courant de cathode) et l'ACh (courant d'anode) étaient simultanément administrés par trois stimulations électriques (0,1 mA) de 10 secondes (I1, I2 et I3) avec un intervalle entre deux stimulations de 120 secondes. La température cutanée de l'avant-bras, maintenue entre 33 et 34°C (Cracowski et al. 2006), était enregistrée grâce à deux thermocouples fixés sur la peau, 3 cm de part et d'autre des sondes laser-Doppler.

La pression artérielle a été enregistrée en continu au 3<sup>ème</sup> doigt à l'aide d'un photopléthysmographe (Portapres, Finapres Medical Systems) (Imholz 1996).

L'électrocardiogramme (ECG 100 amplifiers, Biopac Systems Inc.) et les mouvements de la cage thoracique a été également enregistrés en continu au moyen d'une ceinture thoracique avec capteurs piézoélectrique (SS5LB, Biopac Systems Inc).

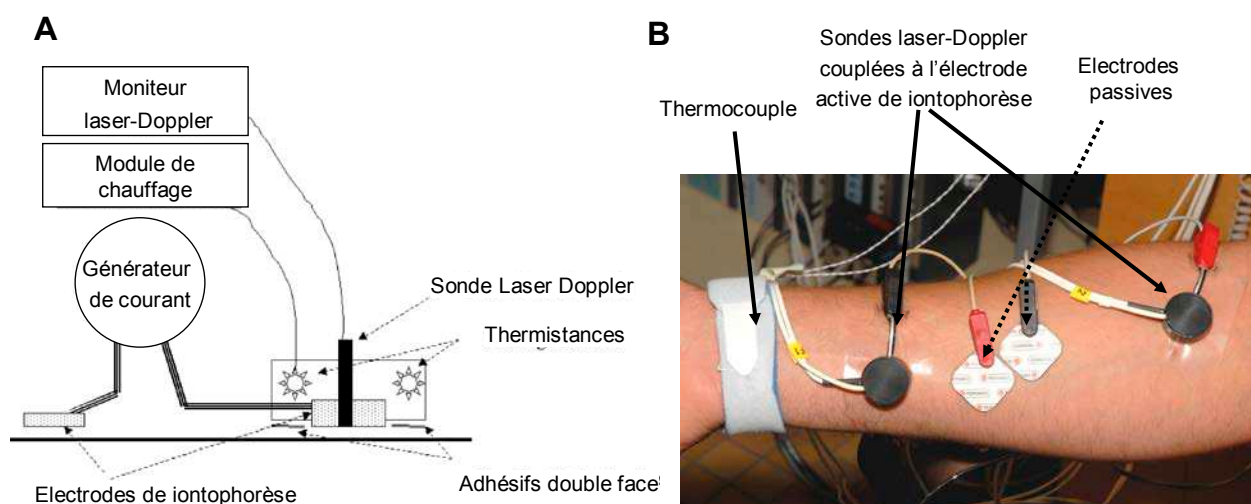


Figure 15. A. Coupe d'une sonde Laser-Doppler couplée à l'iontophorèse utilisée dans l'expérimentation (Tartas et al. 2005a). B. Exemple d'équipement de l'avant-bras d'un sujet.

#### d Analyse des données cardiovasculaires

Tous les signaux ont été numérisés et enregistrés avec une fréquence d'échantillonnage de 1000 Hz (MP150, Biopac Systems Inc.).

**Réactivité microvasculaire.** Le débit sanguin cutané (**SkBF**, en unité de perfusion arbitraire - PU) obtenu à partir de chaque sonde laser-Doppler a été moyenné toutes les 10 secondes pour réduire la variabilité temporelle liée à la vasomotion. Les paramètres suivants ont été calculés :

- la conductance vasculaire cutanée (**CVC**, en PU/mmHg), égale au rapport de SkBF sur PAM ;
- la valeur de base (**Baseline**), valeur moyenne des 2 minutes d'enregistrement avant I1 ;
- la valeur maximale de CVC (**CVC<sub>peak</sub>**) observée après I3, exprimée en % de la *Baseline* ;
- les pentes des courbes de CVC pendant les 60 secondes précédant et suivant I3, calculées par régression linéaire (corrélation linéaire de Pearson) ;
- l'air sous la courbe de CVC (**AUC**) de I1 jusqu'à 5 minutes après I3, exprimée en %..s.

**Variabilité de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle systolique.** Les 5 dernières minutes de signal, sans artefact ni extrasystole (lecture visuelle), enregistrées en position couchée, ont été sélectionnées et analysées à l'aide d'une routine informatique (Matlab V7.3, The MathWorks Inc.). Les ondes-R de l'ECG (Manriquez et Zhang 2007) et les pics de pression artérielle ont été automatiquement détectés. Les périodes RR, la FC, la PAS, la PAD et la PAM ont été calculées, ainsi que leur écart type (*standard deviation*, SD).

La puissance des bandes de basse fréquence (*low frequency*, LF; 0,04–0,15 Hz) et de haute fréquence (*high frequency*, HF; 0,15–0,40 Hz) des périodes RR (*heart rate variability*, HRV) et de la PAS (*Systolic blood pressure variability*, BPV) a été calculée par transformée rapide de Fourier (FFT) et exprimée en valeur absolue (HRV : ms<sup>2</sup> et BPV : mmHg<sup>2</sup>) et en valeur normalisée (*normalized units*, nu ; en % de [LF + HF]). La sensibilité du baroreflexe spontané (BRS) a été calculée pour les bandes LF et HF en calculant, lorsque la cohérence était supérieure à 0,5, le gain spectral entre BPV et HRV (Laude et al. 2004).

**Estimation du débit cardiaque et des résistances périphériques totales.** De nombreuses méthodes ont été décrites pour estimer le volume d'éjection systolique (VES) à partir de l'analyse de l'onde de pression artérielle. Nous avons choisi d'utiliser la méthode de la compliance non linéaire de Liljestrand qui est la plus reproductible (Sun et al. 2009). Le débit cardiaque (Q<sub>c</sub>) et les résistances périphériques totales (RPT) ont alors été calculés en utilisant les relations suivantes : Q<sub>c</sub> = VES x FC et RPT = PAM / Q<sub>c</sub>. Cette méthode indirecte a montré sa pertinence pour évaluer les variations de Q<sub>c</sub> et RPT chez un sujet lorsque celui ci est son propre témoin (Halliwill et al. 1996; Sun et al. 2009).

**Formule de Liljestrand (1928) avec k constante de compliance égale à k=422,9 ml (Sun et al. 2009).**

$$VES = k \frac{PAS - PAD}{PAS + PAD}$$

## e Variables biologiques

## Dosages des protéines dans le sang (plasma et sérum) (Tableau 1)

Un soin tout particulier a été apporté à la réalisation des prélèvements sanguins afin de diminuer le risque d'inflammation au niveau du site de prélèvement. En effet, des études récentes suggèrent que la privation aiguë de sommeil pourrait induire une augmentation de la concentration de marqueurs circulants de l'inflammation tels que IL-6, TNF- $\alpha$  et la CRP (Irwin et al. 1996; Meier-Ewert et al. 2004; Ruiz et al. 2010; Shearer et al. 2001). Cependant, des résultats contradictoires ont été rapportés. En effet, Frey et al. (Frey et al. 2007) ont observé qu'une nuit de privation totale de sommeil (PTS), dans des conditions contrôlées de posture, de lumière et de nutrition, entraînait une diminution d'IL-6 et de CRP. Les résultats contradictoires observés dans la littérature peuvent s'expliquer par le faible niveau de variation des variables mesurés, des durées différentes de privation de sommeil et la variabilité individuelle dans la tolérance à la privation de sommeil. Cependant, l'augmentation de la concentration plasmatique en IL-6 pourrait être également la conséquence d'une inflammation locale induite par l'utilisation de cathéters intraveineux implantés pendant 24 heures. Cette inflammation est d'autant plus importante que le prélèvement est difficile à réaliser, notamment pendant le sommeil (Haack et al. 2002).

Tableau 1. Dosages des protéines réalisés dans le sang.

Variables	Heures de prélèvement	Milieu	Techniques	Marques du test utilise	Limites de détection
ICAM-1	8 h	Sérum	ELISA	R&D Systems, USA	0,096 ng/ml
Sélectine-E	8 h	Sérum	ELISA	R&D Systems, USA	0,009 ng/ml
VCAM-1	8 h	Sérum	ELISA	R&D Systems, USA	0,6 ng/ml
MCP-1	8 h	Sérum	ELISA	R&D Systems, USA	5 pg/ml
Sélectine-P	8 h	Sérum	ELISA	R&D Systems, USA	0,5 ng/ml
PAI-1/SerpinE	8 h	Plasma	ELISA	R&D Systems, USA	0,059 ng/ml
Endothéline (ET-1)	8 h	Sérum	ELISA	Biomédica, Autriche	0,02 fmol/ml
Prostaglandine E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> )	Cinétique	Sérum	ELISA	Assay Design, USA	13,4 pg/ml
CRP (hs)	Cinétique	Plasma	ELISA	R&D Systems, USA	0,01 mg/l
IL-6 (hs)	Cinétique	Plasma	ELISA	R&D Systems, USA	0,11 pg/ml
IL-1 ( $\beta$ ) (hs)	Cinétique	Plasma	ELISA	R&D Systems, USA	0,057 pg/ml
TNF- $\alpha$ (hs)	Cinétique	Plasma	ELISA	R&D Systems, USA	0,038 pg/ml
TNF-RI	Cinétique	Plasma	ELISA	R&D Systems, USA	0,77 pg/ml
Cortisol	Cinétique	Plasma	RIA	Diasorin, USA	5,9 nmol/l
ACTH	8 h	Plasma	RIA	Diasorin, USA	15 pg/ml
Insuline	8 h	Sérum	RIA	Diasorin, USA	3 $\mu$ U/ml
Leptine	8 h	Plasma	RIA	LINCO research, USA	0,05 ng/ml
Noradrenaline	8 h	Plasma	ELISA	LDN, Allemagne	5.4 ng/ml
Adrenaline	8 h	Plasma	ELISA	LDN, Allemagne	8 pg/ml

Abréviations : hs : haute sensibilité, , TNF-RI: récepteur soluble du TNF- $\alpha$ , 8h : prélèvement à 8 h pendant J2, J4 et J5 ; cinétique : prélèvement à 8h, 11h, 14h, 17h, 20h et 23h pendant J2 et J4.

### *Analyse de la numération formule sanguine*

Le nombre de globules blancs, de polynucléaires neutrophiles, de monocytes et de lymphocytes a été mesuré à partir du sang total par un automate du Centre de Transfusion Sanguine des Armées (CTSA – Clamart).

### *Dosages des ARN messagers des cellules de la lignée blanche*

**Prélèvement et conservation des ARNm totaux.** Afin de stabiliser les ARNm dès le prélèvement, le sang a été collecté en tube PAXgene Blood RNA (PreAnalytiX™, Franklin Lakes, USA). Ces tubes contiennent des réactifs spécifiques protégeant les molécules d'ARN de la dégradation par les ARNases et minimisant l'expression de gènes parasites. Les tubes sont conservés à -80°C.

**Extraction des ARNm totaux.** Cette étape est réalisée avec l'automate QIAcube (Qiagen) en utilisant le kit PAXene Blood RNA kit (PreAnalytiX). Après décongélation, 40 µl de solution ont été centrifugées et lavées à deux reprises (10 minutes à 4000g, 20°C) puis concentrées et purifiées en utilisant le kit PAXene Blood RNA kit. Une étape de centrifugation additionnelle à travers les colonnes PAXgene Shedder est réalisée pour homogénéiser le lysa cellulaire. Le surnageant a été ensuite mélangé à de l'éthanol et déposé sur une colonne PAXgene RNA. Au cours d'une courte étape de centrifugation, l'ARN a été absorbé par une membrane à base de gel de silice et les contaminants résiduels sont éliminés par lavage. La membrane a été ensuite traitée avec une ADNase (DNAase I) afin de supprimer toute trace d'ADN. Enfin, les ARNm sont élués avec de l'eau. La quantité et la qualité de l'ARN ainsi extrait sont évaluées par spectrophotométrie (UV-visible) sur 1,5 µl, (Nonodrop ND-1000, NanoDrop Technologies, Rockland, USA). Le contrôle de l'intégrité des échantillons a été ensuite réalisé (Bioanalyzer, Agilent Technologies, Belgique).

**Transcription inverse des ARN totaux en ADN.** Cette étape a été réalisée grâce au kit Reverse Transcriptase Core Kit (Eurogentec, USA). 4 µl d'ARN (200 ng) sont mis en présence d'un mix qui contenait : 1 µl de tampon, 25 µl d'enzyme (Euroscript *reverse transcriptase*), 0,5 µl d'oligo(dT), des nucléotides (2,5 mM), 2 µl de MgCl<sub>2</sub> et un inhibiteur des RNase. Le mélange était incubé 10 min à 25°C puis 30 minutes à 48°C et enfin 5 minutes à 95°C pour dénaturer l'enzyme.

**Polymerase chain reaction (PCR) semi-quantitative en temps réel.** Les amorces ont été dessinées à l'aide du logiciel MC Vector (Tableau 2) et synthétisées par le laboratoire Eurogentec (Saraing, Belgique). 2 µl de solution sont placés dans le lightCycler (Biorad) en présence d'une solution (Kit Light Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I ; Roche) comprenant notamment du MgCl<sub>2</sub>, les amorces spécifiques (sens et anti sens) et du Taq-SYBR Green qui contenait l'enzyme et un marqueur fluorescent.

**Analyse des résultats.** La synthèse d'ADN réalisée à chaque cycle a été estimée par la mesure de la fluorescence à la fin de chaque étape. Cette mesure permettait de tracer la courbe de fluorescence en fonction du nombre de cycle. La quantification relative de l'ADN complémentaire (ADNc) présent dans chaque échantillon a été réalisée par rapport à une calibration interne (pool de la totalité des échantillons de chaque structure) par la méthode dite de « comparaison des cycles de sortie ». Le cycle de sortie est le cycle d'amplification pour lequel la fluorescence induite par les ADNc est supérieure au bruit de fond. La valeur du cycle de sortie est proportionnelle à la quantité d'ADNc cible présente initialement dans la solution.

**Les résultats ont été exprimés** en % de la quantité moyenne d'ARNm obtenus avec des gènes domestiques de référence (*housekeeping*). Ces gènes ont été traités de la même façon que les extraits. Les gènes de références utilisés ont été : RPLP0 (*acidic ribosomal phosphoprotein P0*), HPRT (*hypoxanthine hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*) et la CycA (cyclophiline A).

Gène cible	Amorce	Séquence
TNF- $\alpha$	Sens	5'-TCTTCTGTCTGCTGCACTTTGGAG-3'
	Anti sens	5'-GCTTGAGGGTTTGCTACAACATGG
TNF-RI	Sens	5'-TCTTCTGTCTGCTGCACTTTGGAG-3'
	Anti sens	5'-GCTTGAGGGTTTGCTACAACATGG
IL-6	Sens	5'-CCACTCACCTCTTCAGAACGAATTG-3'
	Anti sens	5'-TGCCTCTTTGCTGCTTTCACAC-3'
RPLP0	Sens	5'-TGAGGTCAGGAGTTCGAGACCAG-3'
	Anti sens	5'- CCTCCCGAGTAGCTGGGATTAC-3'
CycA	Sens	5'-TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG-3'
	Anti sens	5'- CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC-3'
HPRT	Sens	5'-GCATCTACAACCCTGAAGTGCTTG-3'
	Anti sens	5'-GCAGACAGACACTGGCAACATTG-3'

**Tableau 2.** Séquences et sens des amorces dessinées pour les gènes d'intérêt (TNF- $\alpha$ , TNF-RI, IL-6) et les gènes de référence pou la PCR en temps réelle.

### *f* **Analyses statistiques**

Les résultats sont présentés sous la forme moyenne  $\pm$  SEM. La significativité a été fixée à  $p < 0,05$ . Pour les variables cardiovasculaires et biologiques nous avons utilisé une analyse de variance (ANOVA) à mesures répétées non-paramétriques de Friedman, suivie éventuellement appariée en utilisant le test de Wilcoxon.

#### **I.1.3. Résultats**

Tous les sujets ont terminé le protocole expérimental. L'étude a posteriori des enregistrements polysomnographiques a permis de vérifier que tous les sujets étaient restés éveillés pendant les 40 heures d'éveil continu. Les durées moyennes de sommeil pendant la 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> nuit étaient respectivement :  $7,3 \pm 0,1$  h,  $7,5 \pm 0,1$  h et  $7,7 \pm 0,1$  h.

##### *a* **Réactivité microvasculaire**

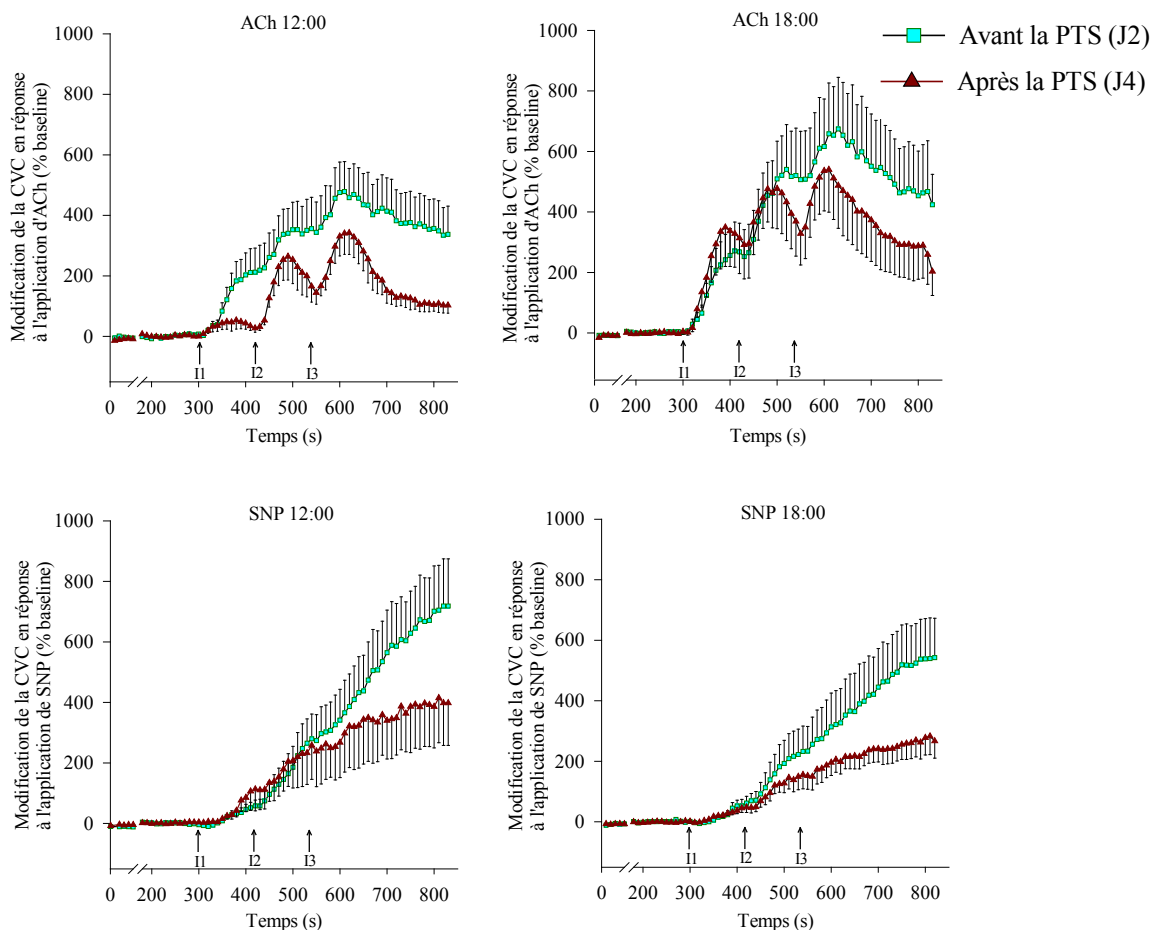
Aucune différence significative n'a été observée dans les valeurs basales de débit sanguin cutané (SkBF) ou de conductance vasculaire cutanée (CVC) entre J2 et J4 ou entre 12:00 et 18:00.

**Réponse à l'iontophorèse d'ACh (Figure 16, haut, Tableau 3).** Après la privation de sommeil (J4), par rapport à J2, nous avons observé des valeurs de  $CVC_{peak}$  inférieures à 12:00 ( $p = 0,03$ ) et à 18:00 ( $p = 0,04$ ) et des valeurs d'AUC inférieures à 12:00 ( $p = 0,02$ ) uniquement.

A J2 et J4, AUC et  $CVC_{peak}$  étaient supérieures à 18:00 par rapport à 12:00 ( $p = 0,03$ ).

Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre les pentes de la partie ascendante de la courbe de CVC avant  $CVC_{peak}$  entre J2 et J4 et entre les pentes observées à 12:00 et à 18:00. Cependant, les pentes de la courbe descendante, après  $CVC_{peak}$ , étaient plus importantes après privation de sommeil (J4) par rapport à avant (J2,  $p = 0,03$ ).

**Réponse à l'iontophorèse de SNP (Figure 16, bas, Tableau 3).**  $CVC_{peak}$  et l'aire sous la courbe de CVC ( $CVC_{AUC}$ ) étaient plus faible après la privation de sommeil par rapport à avant (J2), que ce soit à 12:00 ( $p = 0,02$ ) ou à 18:00 ( $p = 0,02$ ). Nous n'avons pas observé de différence significative entre les valeurs calculées à 12:00 et à 18:00.



**Figure 16. Modification de la conductance vasculaire (CVC) après délivrance par iontophorèse d'ACh et de SNP à 12:00 et 18:00 avant et après la privation totale de sommeil (PTS).** ACh et SNP ont été délivrées par 3 (I1, I2, I3) stimulations électriques (0,1 mA, 0,1 mC/min, intervalle entre les stimulations de 120 secondes). La Baseline est la CVC observée au cours des 120 secondes avant I1. Résultats présentés : moyennes  $\pm$  SEM.

**Tableau 3. Modifications des variables de la réactivité vasculaire observées avant (J2) et après PTS (J4)**

	Avant PTS (J2)		Après PTS (J4)		Friedman p
	12:00	18:00	12:00	18:00	
<i>CVC avant et après application d'ACh</i>					
Baseline CVC, $10^{-2}$ PU/mmHg	8,2 $\pm$ 1,3	6,91 $\pm$ 0,7	8,6 $\pm$ 1,39	8,47 $\pm$ 1,6	ns
CVC <sub>peak</sub> , % Baseline	454 $\pm$ 158	774 $\pm$ 183	283 $\pm$ 163*	608 $\pm$ 139*	<0,01
AUC, $10^3$ .%.s	16,7 $\pm$ 6,5	22,2 $\pm$ 6,4	8,1 $\pm$ 2,2*	18,2 $\pm$ 4,7	0,01
<i>CVC avant et après application de SNP</i>					
Baseline CVC, $10^{-2}$ PU/mmHg	7,6 $\pm$ 0,7	8,7 $\pm$ 0,8	7,7 $\pm$ 1,5	8,1 $\pm$ 1,2	ns
CVC <sub>peak</sub> , % Baseline	778 $\pm$ 158	584 $\pm$ 126	476 $\pm$ 138*	316 $\pm$ 52*	<0,01
AUC, $10^3$ .%.s	17,3 $\pm$ 2,9	14,7 $\pm$ 1,9	9,1 $\pm$ 2,9*	7,5 $\pm$ 1,4*	<0,01

Les valeurs présentées sont les moyennes  $\pm$  SEM. La Baseline (CVC) est la CVC moyenne au cours des 120 secondes avant I1. CVC<sub>peak</sub> est la valeur maximale de CVC après I3. L'aire sous la courbe (*Area Under the Curve*, AUC) a été calculée en intégrant le signal de CVC de I1 jusqu'à 5 minutes après I3. \*p < 0,05 vs. avant PTS (J2).



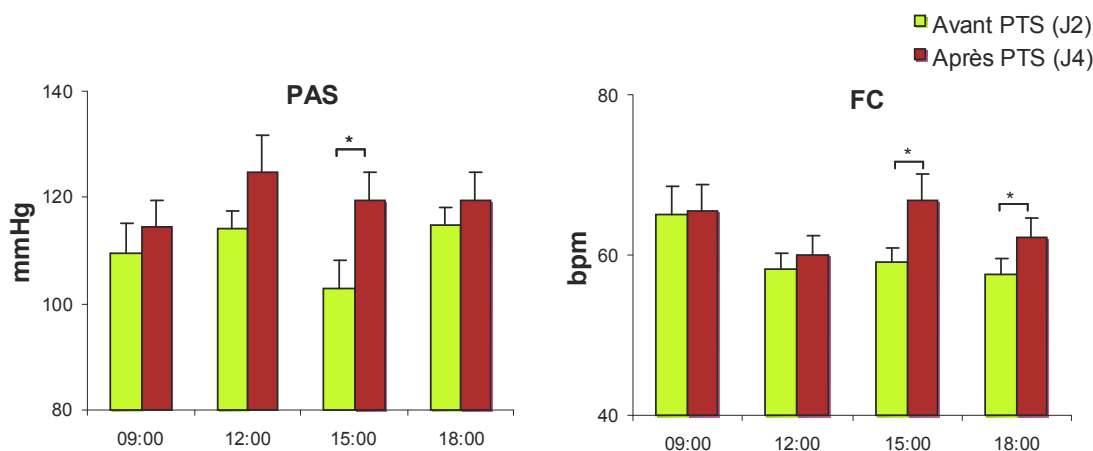
### *b Pression artérielle*

A J4 à 15:00, nous avons mis en évidence une PAS supérieure par rapport à J2 ( $p = 0,03$ ) (Figure 17). Avant la privation de sommeil (J2), nous avons mesuré une diminution significative de la PAS à 15:00, par rapport à 08:00, 12:00 et 18:00. Cette différence n'a pas été retrouvée après PTS (J4). Nous n'avons pas observé d'effet de la privation de sommeil sur la PAM et la PAD.

Nous avons également montré un effet de la privation de sommeil sur le gain HF du baroreflexe. Le gain diminue à 15:00 et 18:00 par rapport à la journée avant privation de sommeil. ( $p = 0,02$  et  $p = 0,03$ ). Nous n'avons pas observé de modification significative du gain LF.

### *c Fréquence cardiaque*

Après privation de sommeil (PTS), la fréquence cardiaque (FC) était supérieure à 15:00 et à 18:00 ( $p = 0,02$  pour tous) aux valeurs mesurées avant PTS (Figure 17). Aucune différence n'a été mise en évidence pour LF+HF<sub>RR</sub>, mais la puissance de la bande de basse fréquence (LF<sub>RR</sub>nu) était également supérieure à 15:00 et 18:00, après PTS ( $p < 0,01$ ) alors que HF<sub>RR</sub> nu était inférieure ( $p < 0,01$ ).



**Figure 17. Pression artérielle systolique (PAS) et fréquence cardiaque (FC) mesurées avant et après privation totale de sommeil (PTS). \*différence entre avant et après PTS,  $p < 0,05$ .**

### *d Débit cardiaque et résistances périphériques totales*

Nous n'avons pas observé de modification significative du volume d'éjection systolique (VES) au cours de la privation de sommeil. En revanche, nous avons mis en évidence une augmentation modérée du débit cardiaque à 15 :00 et 18 :00 ( $p = 0,03$  et  $p = 0,04$ ) liée à l'augmentation de la fréquence cardiaque. Nous n'avons pas mis en évidence de modification significative des résistances périphériques totales au cours de la privation de sommeil.

e Variables biologiques

(i) Protéines du sang

Variables évaluées à 08:00 à J2, J4 et J5 (Figure 19, Tableau 4)

Les concentrations plasmatiques de sélectine-E ( $p = 0,04$ ) et de  $PGE_2$  ( $p = 0,02$ ) étaient plus élevées à J4 par rapport à J2. Après une nuit de sommeil (J5), nous avons observé par rapport à J2, une augmentation de la concentration plasmatique d'ICAM-1 ( $p = 0,03$ ), d'IL-6 ( $p = 0,02$ ) et de noradrénaline ( $p = 0,02$ ). Aucune modification significative n'a été observée pour les autres variables mesurés à 08:00 (endothéline-1, cortisol, glycémie et CRP). Il est à noter que plus de 50 % des échantillons d'IL-1 $\beta$  étaient sous la limite de détection du kit ELISA utilisé. Les résultats n'ont donc pas été analysés et ne sont pas présentés.

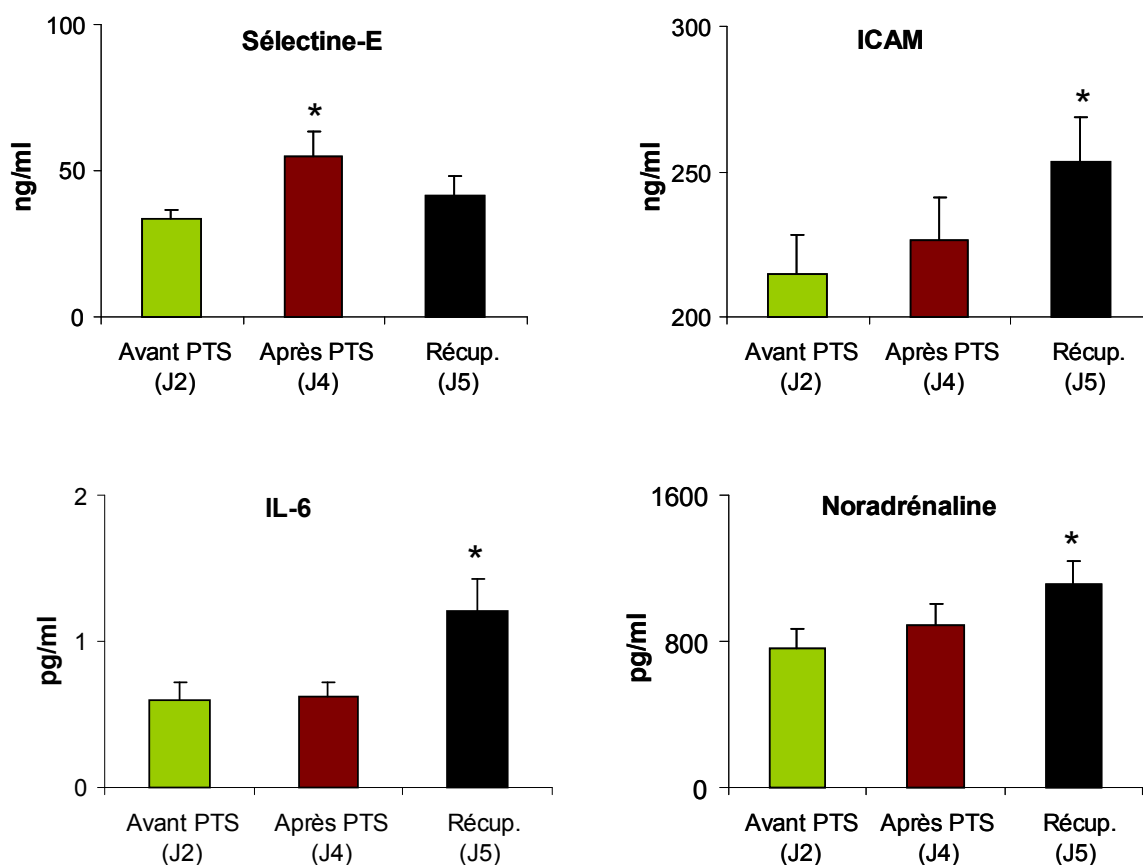


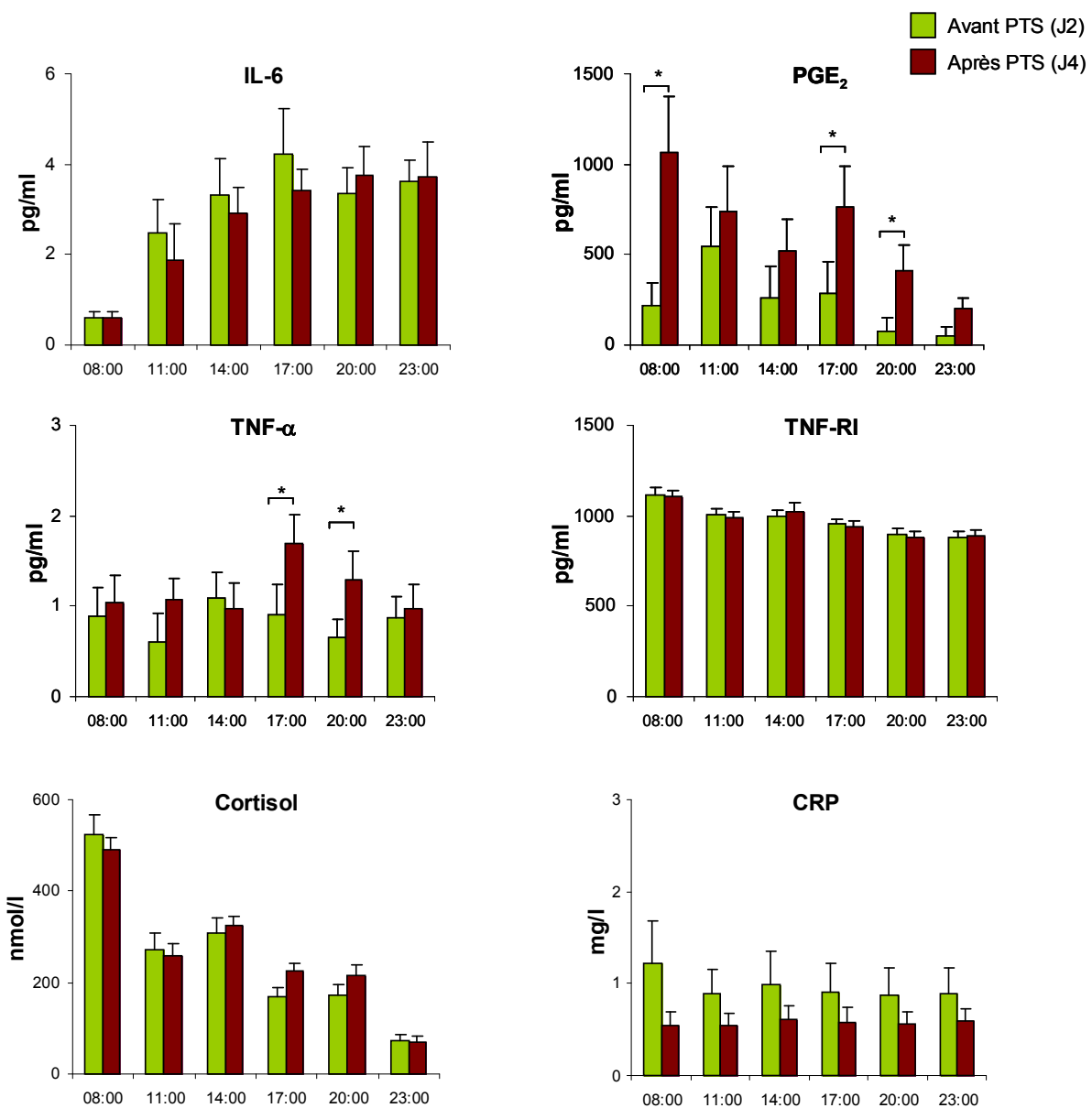
Figure 18. Concentrations plasmatiques de sélectine-E, d'ICAM, d'IL-6 et de noradrénaline à 8h avant privation totale de sommeil (PTS), après PTS et après une nuit de récupération. \* différence avec avant PTS,  $p < 0,05$ .

**Variables évaluées en cinétique (08:00, 11:00, 14:00, 17:00 et 23:00) au cours de J2 et J4**

Avant privation de sommeil (J2), nous avons observé une augmentation d'IL-6 et une diminution du cortisol au cours de la journée, qui traduisent l'existence d'un rythme circadien bien connu pour ces variables. En revanche, l'heure de la journée n'induit pas de variation des concentrations plasmatiques de TNF- $\alpha$  et de son récepteur soluble (TNF-RI).

Après privation de sommeil (J4), nous avons observé, par rapport à J2, une augmentation transitoire de la concentration plasmatique de TNF- $\alpha$  à 17:00 et 20:00, soit après 34 et 37 heures d'éveil continu. De plus, PGE<sub>2</sub> était augmentée à 08:00, 17:00 et 20:00.

Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre J4 et J2 pour les concentrations plasmatiques de TNF-RI, d'IL-6, de cortisol et de CRP.



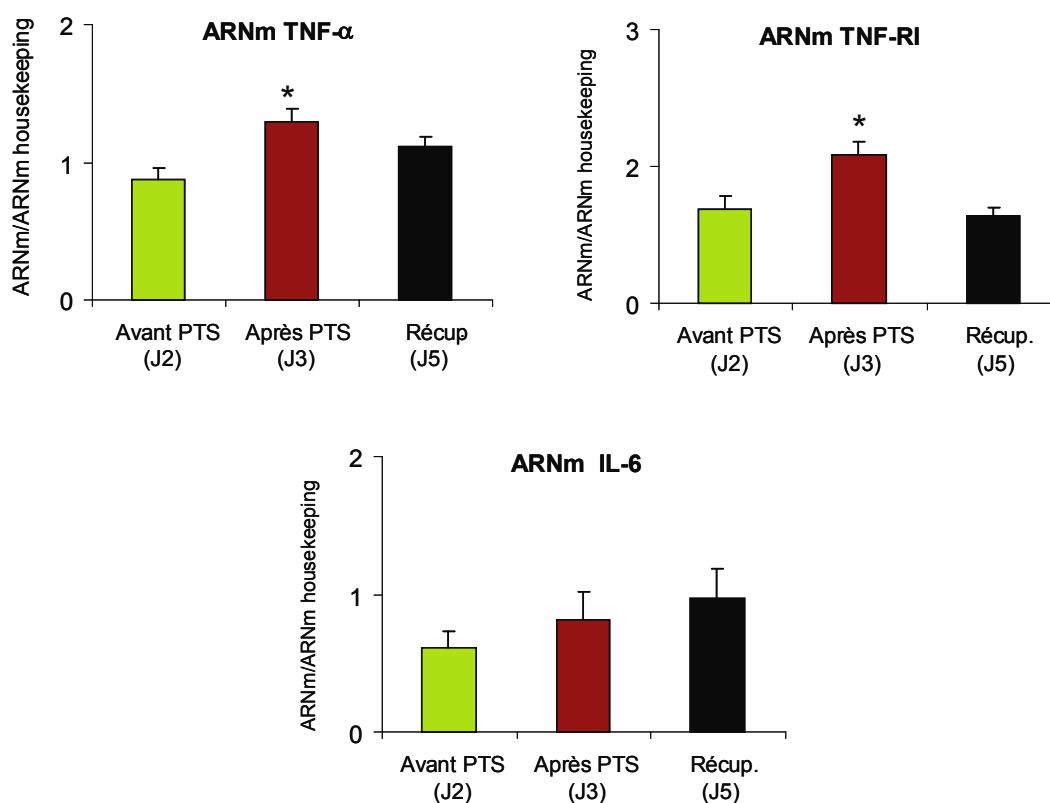
**Figure 19. Evolution des concentrations plasmatiques d'IL-6, de PGE<sub>2</sub> de TNF- $\alpha$ , de TNF-RI, de cortisol et de CRP au cours des journées de tests avant et après la privation totale de sommeil (PTS). \*différence entre avant et après PTS, p < 0,05.**

**(ii) Numération et formule sanguine**

A J4 et J5, le nombre de polynucléaires neutrophiles et de lymphocytes ne varie par rapport à J2. Cependant, nous avons mis en évidence une augmentation du nombre monocytes en J5 par rapport à J2 ( $p = 0,02$ ).

**(iii) ARNm des cellules de la lignée blanche sanguine**

Nous avons observé après PTS (J4), par rapport à J2, une augmentation de la quantité d'ARNm codant pour le TNF- $\alpha$  et son récepteur soluble (TNF-RI) produits par les cellules de la lignée blanche sanguine. En revanche, la privation de sommeil, n'a pas induit de variation significative de la quantité d'ARNm codant pour IL-6.



**Figure 20. Evolution de la quantité d'ARNm codant pour TNF- $\alpha$ , TNF-RI et IL-6 provenant des cellules de la lignée blanche sanguine.** Prélèvements effectués à 8 heures avant privation totale de sommeil (PTS), après PTS et après une nuit de récupération. Les résultats sont exprimés par rapport aux ARN totaux des gènes domestiques (*housekeeping*). \*différence entre avant et après PTS,  $p < 0,05$ .

## I.1.4. Tableaux de résultats

Tableau 4. Evolution des concentrations plasmatiques des protéines dosées à 08:00 pendant J2, J4 et J5

	Avant PTS (J2)	Après PTS (J4)	Récupération (J5)	Friedman P
<b>Sélectine-E, ng/ml</b>	<b>35 ± 6</b>	<b>54 ± 8*</b>	<b>42 ± 6</b>	<b>0,02</b>
P-sélectine, ng/ml	96,7 ± 8,9	99,4 ± 10,1	97,2 ± 10,1	ns
<b>ICAM-1, ng/ml</b>	<b>215 ± 13</b>	<b>227 ± 15</b>	<b>253 ± 16*</b>	<b>0,02</b>
VCAM, ng/ml	491 ± 27	489 ± 24	513 ± 34	ns
MCP-1, pg/ml	399 ± 37	164 ± 26	391 ± 32	ns
PAI-1 /Serpine, ng/ml	4,01 ± 0,87	3,98 ± 0,72	4,31 ± 1,34	ns
<b>PGE<sub>2</sub>, pg/ml</b>	<b>215 ± 131</b>	<b>1065 ± 307*</b>	<b>55 ± 43</b>	<b>0,02</b>
Endothéline-1, fmol/ml	0,63 ± 0,20	0,55 ± 0,18	0,61 ± 0,23	ns
CRP, µg/ml	1,22 ± 0,46	0,55 ± 0,13	0,61 ± 0,14	ns
<b>IL-6, pg/ml</b>	<b>0,60 ± 0,13</b>	<b>0,62 ± 0,10</b>	<b>1,20 ± 0,23*</b>	<b>0,03</b>
TNF-α, pg/ml	0,88 ± 0,32	1,05 ± 0,30	0,88 ± 0,24	ns
TNF-RI, pg/ml	1110 ± 42	1103 ± 40	1055 ± 48	ns
Insuline, µU/ml	33,1 ± 9,6	53,0 ± 15,3	41,9 ± 12,1	ns
Glycémie, mmol/l	6,96 ± 0,38	5,71 ± 0,48	6,54 ± 1,34	ns
Cortisol, mmol/l	524 ± 42	491 ± 27	503 ± 16	ns
ACTH, pg/ml	54 ± 9	59 ± 22	54 ± 26	ns
Adrénaline, pg/ml	81 ± 16	68 ± 10	57 ± 13	ns
<b>Noradrénaline, pg/ml</b>	<b>757 ± 110</b>	<b>885 ± 121</b>	<b>1113 ± 125*</b>	<b>0,04</b>

Valeurs présentées : moyennes ± SEM. \* différence par rapport à J2, p < 0,05.

Tableau 5. Numération et formule sanguine à 08:00 pendant J2, J4 et J5

	Avant PTS (J2)	Après PTS (J4)	Récupération (J5)	Friedman p:
Globules blancs, 10 <sup>3</sup> /µl	5,88 ± 0,44	6,24 ± 0,32	6,21 ± 0,38	ns
Poly. neutrophyles, 10 <sup>3</sup> /µl	3,54 ± 0,41	3,83 ± 0,26	3,76 ± 0,30	ns
Lymphocytes, 10 <sup>3</sup> /µl	1,76 ± 0,06	1,77 ± 0,08	1,72 ± 0,07	ns
<b>Monocytes, 10<sup>3</sup>/µl</b>	<b>0,23 ± 0,02</b>	<b>0,29 ± 0,03</b>	<b>0,31 ± 0,03*</b>	<b>0,02</b>

Valeurs présentées : moyennes ± SEM. \* différence par rapport à J2, p < 0,05.

**Tableau 1. Evolution des variables cardiovasculaires évaluées à 09:00, 12:00, 15:00 et 18:00 avant et après privation totale de sommeil (PTS)**

	Avant PTS (J2)				Après PTS (J4)				Friedman
	09:00	12:00	15:00	18:00	09:00	12:00	15:00	18:00	p
C, bpm	65 ± 4	58 ± 2	59 ± 2	58 ± 2	66 ± 3	60 ± 2	67 ± 3*	62 ± 2*	0,001
F+HF <sub>RR</sub> , 10 <sup>2</sup> .ms <sup>2</sup>	22 ± 5	19 ± 5	16 ± 4	20 ± 5	20 ± 7	18 ± 3	12 ± 2	23 ± 4	ns
F <sub>RR</sub> nu,%	52 ± 6	60 ± 5	58 ± 5	52 ± 6	67 ± 5	70 ± 5	74 ± 3*	76 ± 4*	0,005
lf <sub>RR</sub> nu,%	48 ± 6	40 ± 5	42 ± 5	48 ± 6	33 ± 5	30 ± 5	26 ± 3*	25 ± 4*	0,003
AS, mmHg	109 ± 6	114 ± 4	105 ± 5	117 ± 3	114 ± 5	125 ± 7	120 ± 5*	119 ± 5	0,008
AD, mmHg	64 ± 4	71 ± 2	61 ± 4	72 ± 4	65 ± 3	80 ± 5	72 ± 4	75 ± 4	ns
AM, mmHg	79 ± 4	85 ± 2	75 ± 4	87 ± 4	82 ± 4	95 ± 5	88 ± 4	90 ± 4	0,012
ΔRS gain LF	7,6 ± 1,8	9,1 ± 1,3	8,16 ± 1,3	9,0 ± 1,4	9,8 ± 2,4	11,5 ± 1,8	7,4 ± 2,6	9,3 ± 2,5	ns
ΔRS gain HF	15,2 ± 2,4	11,4 ± 1,7	15,0 ± 2,6	14,8 ± 2,5	12,4 ± 2,2	11,5 ± 2,4	9,9 ± 1,5*	10,1 ± 2,4*	0,02
VES, ml	93,8 ± 3,4	98,3 ± 2,9	97,2 ± 2,0	96,3 ± 1,7	94,1 ± 2,5	96,1 ± 1,7	99,8 ± 2,9	98,3 ± 1,8	ns
Qc, l/min	6,2 ± 0,6	5,8 ± 0,7	6,0 ± 0,5	5,8 ± 0,5	6,1 ± 0,6	5,9 ± 0,7	6,9 ± 0,4*	7,2 ± 0,6*	0,004
RPT, mmHg.min/l	12,2 ± 2,3	14,8 ± 2,7	12,1 ± 3,3	14,9 ± 2,5	13,1 ± 2,1	15,9 ± 3,1	12,7 ± 2,6	12,5 ± 2,5	ns

Les valeurs sont les moyennes ± SE. Abréviations : privation totale de sommeil (PTS), fréquence cardiaque (FC), pression artérielle systolique (PAS), diastolique (PAD) et moyenne (PAM), puissance dans les bandes de basse fréquence de l'HRV (LF<sub>RR</sub>), de hautes fréquences (HF<sub>RR</sub>), valeurs normalisées (nu), BRS (baroreflexe spontané), volume d'éjection systolique (VES), Qc (débit cardiaque), RPT (résistances périphériques totales). \*p < 0,05 différence entre J4 et J2.

### I.1.5. Synthèse et discussion

L'intérêt de ce travail a été de mettre en évidence une chronologie des effets de la privation totale de sommeil qui est résumée dans le tableau ci-dessous :

Durée d'éveil continu	Variables modifiées par la privation de sommeil par rapport à la journée de référence (J2, avant PTS)
25 heures	<ul style="list-style-type: none"> <li>↗ sélectine-E (sérum)</li> <li>↗ PGE<sub>2</sub> (sérum)</li> <li>↗ ARNm TNF-<math>\alpha</math> (cellules de la lignée blanche sanguine)</li> <li>↗ ARNm TNF-RI (cellules de la lignée blanche sanguine)</li> </ul>
29 heures	<ul style="list-style-type: none"> <li>↘ Vasodilatation induite par l'ACh et par le SNP</li> </ul>
32 heures	<ul style="list-style-type: none"> <li>↗ PA, FC, Qc, activité système nerveux sympathique</li> <li>↘ sensibilité du baroreflexe</li> </ul>
34 heures	<ul style="list-style-type: none"> <li>↗ TNF-<math>\alpha</math> (plasma)</li> </ul>
Après une nuit de récupération	<ul style="list-style-type: none"> <li>↗ IL-6 (plasma)</li> <li>↗ ICAM-1 (sérum)</li> <li>↗ noradrénaline (plasma)</li> <li>↗ quantité de monocytes (NFS)</li> </ul>

Nous n'avons pas mis en évidence d'effet de la PTS sur les résistances périphériques totales, le cortisol, la CRP ou encore l'endothéline-1. Dans notre travail nous avons été limités par la quantité de sang prélevé et par le nombre de protéines qu'il a été possible de doser en cinétique. De même les tests d'évaluation de la réactivité vasculaire ont été réalisés uniquement à 12:00 et 18:00, soit 5 heures après chaque repas. Néanmoins, ces résultats nous permettent de formuler quelques conclusions et hypothèses.

#### *Effet de la PTS sur la fonction vasculaire*

A notre connaissance, ce travail décrit pour la première fois une altération de la fonction endothéliale après une privation totale de sommeil, réalisée chez l'homme sain et dans des conditions contrôlées (apports alimentaires, lumière, absence de stress, absence d'activité physique, qualité des prélèvements sanguins...). Cette altération a été caractérisée par une diminution de la vasodilatation vasculaire dépendante de l'endothélium et par une augmentation de la concentration plasmatique de marqueurs de l'activation endothéliale qui demeurent augmentés pour certains, après une nuit de récupération.

La dysfonction endothéliale est apparue avant les modifications de la PA et de l'activité du système nerveux sympathique. Ces dernières n'ont été observées qu'après 32 heures de privation de sommeil,

conformément à ce qui a déjà été décrit dans la littérature (Kato et al. 2000; Pagani et al. 2009; Zhong et al. 2005). La PTS ne semble pas être un stress suffisant pour entraîner une augmentation importante et durable de la PA. Cependant, elle perturbe le rythme circadien et annule sa diminution nocturne (appelée *dipping profile*) (Kamperis et al. 2010). Le *non-dipping profile* est associé à une augmentation de la concentration circulante de marqueurs de l'activation endothéliale (Vita et Keaney 2002) tel que la sélectine-E (Desideri et al. 2004). L'absence de diminution nocturne de la pression artérielle pourrait donc être un facteur favorisant l'activation endothéliale observée dans notre étude. De plus, le *non-dipping* favorise la production d'espèces radicalaires de l'oxygène qui altèrent la biodisponibilité du NO (Pierdomenico et al. 1999). Ces espèces pourraient contribuer à la diminution de la réactivité vasculaire observée dans notre travail.

Bien que la vasodilatation induite par l'ACh soit principalement liée à la production de NO dans les vaisseaux de gros diamètre, la voie NO/cGMP n'est pas toujours prédominante pour la vasodilatation dépendante de l'endothélium dans les artères de résistance (Koeppen et al. 2004). Nous avons observé dans notre travail que la PTS diminue la vasodilatation induite par l'ACh mais influence également la cinétique de la réponse à l'ACh. La PTS entraîne une diminution plus rapide de la CVC après le pic de réponse maximale. Ce résultat suggère une altération de l'efficacité de la vasodilatation dépendante des prostacyclines (PGI<sub>2</sub>). En effet, il a été mis en évidence que l'altération de la biodisponibilité de PGI<sub>2</sub> est caractérisée, chez l'homme, par une diminution de la durée de la vasodilatation induite par l'ACh (Durand et al. 2003). De plus, des études in-vivo ont mis en évidence que les EDHFs peuvent servir de mécanismes compensateurs dans des situations où la biodisponibilité du NO est altérée (Gaubert et al. 2007). Il conviendra donc d'étudier spécifiquement l'impact de la privation de sommeil sur chacune des voies métaboliques responsables de la vasodilatation dépendante de l'endothélium.

L'interprétation de la diminution de la vasodilatation induite par le SNP est plus difficile. Elle peut être la conséquence d'une diminution de la réactivité vasculaire indépendante de l'endothélium puisque le SNP est un donneur de NO qui agit directement sur les cellules musculaires lisses. Cette diminution traduit alors une altération de la sensibilité des cellules musculaires lisses au NO, comme cela a notamment été observé, *in vitro*, sous l'effet de cytokines pro-inflammatoires (Papapetropoulos et al. 1996). La diminution de la vasodilatation induite par le SNP peut également être liée à une diminution de l'activité des COX-1. En effet, le SNP est appliqué par un courant de cathode qui provoque une vasodilatation via l'activation des COX-1 (Gohin et al. 2011).

#### *Effet de la PTS sur le TNF- $\alpha$ et TNF-R1*

Nous avons observé dans ce travail une augmentation de la concentration plasmatique de TNF- $\alpha$  après 32 à 35 heures d'éveil continu. Aucune étude n'avait auparavant mis en évidence chez l'homme une augmentation de la concentration plasmatique de TNF- $\alpha$  au cours de la PTS. En revanche, Shearer et al. (2001) ont montré une augmentation de la concentration plasmatique des récepteurs solubles de type I que nous n'avons pas observée. Néanmoins, l'augmentation du nombre de monocytes, de PGE<sub>2</sub>, et de TNF- $\alpha$



traduit l'installation d'un état pro-inflammatoire (Caughey et al. 2001; Dinges et al. 1994). L'augmentation de l'expression d'ARNm du TNF- $\alpha$  et de son récepteur, ainsi que de la concentration plasmatique de PGE<sub>2</sub>, observée après 25 heures de PTS, est la conséquence de probables modifications immuno-inflammatoires survenues au cours des 24 premières heures de PTS (Irwin et al. 2006; Lange et al. 2003). Même si PGE<sub>2</sub> peut être synthétisée par les cellules endothéliales, la principale source de production demeure les monocytes, notamment sous l'effet de cytokines pro-inflammatoires (Irwin et al. 2006).

#### *Absence d'effet de la PTS sur IL-6*

Les résultats de cette étude ne mettent pas en évidence de modification de la concentration en IL-6 au cours de la privation de sommeil, ce qui est en accord avec les travaux de Born et Dinges. (Born et al. 1997; Dinges et al. 1995). Une augmentation d'IL-6 a cependant été observée dans plusieurs études (Frey et al. 2007; Haack et al. 2002; Shearer et al. 2001; Vgontzas et al. 1999; Vgontzas et al. 2007; Vgontzas et al. 2004). Notre résultat peut être liée aux précautions prises pour réaliser les prélèvements sanguins au cours de l'expérimentation (Haack et al. 2002; Haack et al. 2000). En particulier, contrairement à de nombreuses études, les cathéters veineux étaient enlevés à 23 heures et n'étaient donc pas conservés pendant la nuit de privation, afin de limiter l'inflammation locale et la production d'IL-6. En revanche, nous avons observé après une nuit de récupération une augmentation d'IL-6 qui peut être la conséquence soit de l'activation endothéliale, soit de l'augmentation de l'activité du système nerveux autonome et de la pression artérielle (Mullington et al. 2009).

#### *Absence d'effet de la PTS sur la CRP*

Nous n'avons observé aucune modification de la concentration plasmatique en CRP. Il semble que 40 heures de privation de sommeil n'induit pas d'augmentation de la CRP (Dimitrov et al. 2004; Frey et al. 2007). Néanmoins, d'autres auteurs ont montré une augmentation au cours d'une privation beaucoup plus longue (88 heures) (Meier-Ewert et al. 2004).

**En conclusion**, dans notre environnement expérimental contrôlé, nos résultats montrent que la privation de sommeil est un stress suffisant pour induire, au niveau de vaisseaux résistifs cutanés, une altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium. Cette réponse est probablement liée à des modifications de la fonction endothéliale qui apparaissent avant les modifications de la pression artérielle. L'altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium peut être la conséquence d'une altération du rythme circadien de la pression artérielle et/ou à des modifications immuno-inflammatoires. Dans la prochaine étude, nous nous intéresserons aux effets de la privation de sommeil sur la vasoconstriction induite par le froid.

## **I.2. 2<sup>ème</sup> étude: « Effet de la privation totale de sommeil sur la tolérance locale au froid »**

*Articles soumis :*

Sauvet F, Bourrilhon C, Alonso A, Cottet-Emard JM, Besnard Y, Savourey G, Launay JC. Effects of 29 hours sleep deprivation on local cold tolerance in humans.

### **I.2.1. Objectifs de l'étude**

Les blessures et maladies induites par les environnements froids, notamment les gelures des extrémités, sont toujours un problème de santé publique pour les militaires (Grieve et al. 2011; Moran et al. 2003), les secouristes (Kupper et al. 2003), les alpinistes et les personnes travaillant en ambiance froide (Makinen et al. 2009; Piedrahita et al. 2008). La fatigue physique et la privation de sommeil ont été empiriquement identifiées comme des facteurs de risque de survenue de pathologies induites par le froid (Rintamaki 2000). A ce jour, les conséquences physiologiques de la privation de sommeil sur la tolérance des extrémités au froid n'ont jamais été étudiées.

L'objectif de cette étude est d'évaluer, chez des sujets sains, les effets de 29 heures d'éveil continu sur la température cutanée et la conductance vasculaire cutanée au cours d'une exposition locale au froid (immersion de la main dans une eau à 5°C). Après avoir étudié les mécanismes vasodilatateurs nous avons souhaité porter notre intérêt sur les mécanismes vasoconstricteurs afin de caractériser les effets de la privation de sommeil sur la vasomotricité. En effet, l'exposition au froid entraîne une vasoconstriction qui limite la perte de chaleur et un frisson qui produit de la chaleur. La vasoconstriction cutanée réduit les débits sanguins cutanés (SkBF), en particulier des membres et des extrémités qui sont le plus exposés au froid. Les débits sanguins cutanés peuvent alors devenir négligeables (Daanen 2003; Kellogg 2006) et la température cutanée peut atteindre des valeurs très basses qui favorisent la survenue d'une gelure (Daanen 2009). Cependant, l'exposition des extrémités au froid (< 15 °C) entraîne aussi une vasodilatation, induite par le froid (CIVD, *cold induced vasodilation*) (Lewis 1930). Cette vasodilatation, paradoxale, survient après 10 à 15 minutes lors d'une immersion de la main dans l'eau froide. Elle est caractérisée par plusieurs cycles de reperfusion, liés à l'augmentation du débit sanguin cutané, qui réchauffent les extrémités, préviennent la survenue des gelures et améliorent la dextérité (Daanen 2003). Les sujets qui ont une CIVD altérée pendant un test d'immersion de la main, ou des doigts, dans l'eau froide ont un risque accru de gelures (Daanen 2009).

Actuellement, le test de 30 minutes d'immersion de la main en eau froide est considéré, chez l'homme, comme un test reproductible et simple (O'Brien 2005) d'évaluation de la fonction microvasculaire cutanée (Sendowski et al. 1997; Sendowski et al. 2000; Van der Struijs et al. 2008). La réponse

physiologique de la peau humaine exposée au froid met en jeu des mécanismes neurologiques réflexes et des facteurs locaux (Kellogg 2006). Le rôle de l'innervation orthosympathique dans la vasoconstriction initiale lors de l'exposition au froid est bien caractérisée (Kellogg 2006; Pergola et al. 1993). Elle est induite par une augmentation rapide et sélective de l'activité de récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques ( $\alpha_2$ -AR) après la mise en jeu des voies métaboliques associées aux protéines Rho-kinases (Bailey et al. 2004). Cependant, les mécanismes indépendants de l'innervation qui interviennent dans la réponse secondaire (tardive) au froid, en particulier ceux qui induisent la CIVD, sont toujours mal connus (Kellogg 2006). Plusieurs facteurs peuvent être impliqués : une production endothéliale d'agents vasodilatateurs, une relaxation des cellules musculaires lisses et des modifications de l'affinité des récepteurs (Kellogg 2006; Racchi et al. 1997).

Comme nous l'avons vu dans la 1<sup>ère</sup> étude (Sauvet et al. 2010), 29 heures de privation totale de sommeil (PTS) entraînent une diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium associée à une augmentation de la concentration plasmatique de marqueurs de l'activation endothéliale qui traduisent une probable dysfonction. De plus, il a été montré que la PTS, bien qu'elle n'entraîne pas d'augmentation de la pression artérielle et de l'activité du système nerveux sympathique au repos (Pagani et al. 2009; Sauvet et al. 2010), pouvait affecter la réponse autonome et hémodynamique en réponse à d'un stimuli stressant (Zhong et al. 2005). En considérant ces résultats, **nous avons fait l'hypothèse** que 29 heures de PTS pouvaient altérer la réponse physiologique des extrémités au froid et en particulier la CIVD.

## I.2.2. Matériels et méthodes

### a Les sujets

Dix hommes de moins de 35 ans ( $30,6 \pm 2,1$  ans) ont été inclus dans cette étude. Tous les sujets ont été préalablement interrogés, examinés et une prise de sang a été réalisée. Les critères d'exclusion étaient :

- au moins un facteur de risque cardiovasculaire, antécédent de pathologie cardiovasculaire, de pathologie cutanée ou neurologique (aiguë ou séquellaire) ;
- consommateurs de tabac, d'alcool ( $\geq 1$  verre/jour), de caféine ( $> 400$  mg/jour) ;
- index de masse corporelle  $> 30$  kg/m<sup>2</sup> ;
- traitement médical.
- travail posté, antécédent de trouble ou pathologie du sommeil (*Pittsburg sleep quality index*, *PSQI*  $< 31$ , or  $> 69$ ) (Buysse et al. 1989), somnolence diurne excessive (*Epworth Sleepiness Scales*  $\geq 9$ ) ((Johns 1991) ou un chronotype non intermédiaire (*Horne et Orstberg questionnaire*) (Horne et Ostberg 1976) ;

Les caractéristiques biométriques suivantes ont été mesurées ou calculées :

- le poids (W, en Kg) et la taille (H, en m) ;
- les plis cutanés tricipital (Pct) et sous scapulaire (Pcs) avec une pince de Holtain (moyenne de deux mesures), réalisées par 2 médecins ;
- la surface corporelle (AD, en m<sup>2</sup>) en utilisant l'équation de Dubois et Dubois (1916) ;
- la masse maigre (lean body mass, LBM) avec la formule de Lohman's (Lohman et al. 1975) et la masse grasse (body fat mass, BFM) comme suit :  $BFM = (1-LBM/W) \times 100$ .

### ***b Privation de sommeil***

Les sujets ont été admis dans le laboratoire de l'Institut de recherche biomédicale des armées – antenne CRSSA (La Tronche, France) pendant 2 jours. Après une nuit de sommeil, la PTS débutait à 07:00 et finissait à 12:00 le jour suivant après la réalisation du test d'immersion de la main dans l'eau froide soit après 29 heures d'éveil continu. Pendant l'expérimentation les sujets étaient continuellement monitorés (EEG, EMG, ECG) pour l'étude de la polysomnographie (Actiwave, CamNtech Ltd., Cambridge, UK). Les enregistrements ont été analysés après l'étude (Somnologica TM, Medcare, Reykjavik, Iceland) pour s'assurer que les sujets étaient restés éveillés pendant la PTS. Le laboratoire était éclairé (200 Lux) pendant toute la période de PTS. Lorsqu'ils n'étaient pas occupés par une expérimentation ou un repas, les sujets pouvaient lire, regarder un film, jouer à des jeux de société ou des jeux vidéo ou discuter avec les expérimentateurs. L'exercice physique et la consommation de café ou de tabac étaient interdits. Les repas et l'apport calorique ont été standardisés pour tous les sujets (2600 kcal/jour). La consommation hydrique était permise *ad libitum*.

### ***c Test d'immersion de la main dans l'eau froide***

Chaque sujet a réalisé deux tests, un après une nuit normale de sommeil (NN) et un après 29 heures de PTS. L'ordre de passage des deux tests, séparés d'au moins 1 mois, a été randomisé. Chaque test était réalisé à 10 heures du matin dans une chambre climatique [Tdb (chaleur sèche) =  $23 \pm 2$  °C ; RH (humidité relative) = 30 - 50 %]. Il se composait de 3 périodes successives : une période de 30 minutes de **contrôle** en température ambiante, une période d'**immersion** de la main droite dans une eau à 5°C puis, une période de 30 minutes de **réchauffement passif** en température ambiante, hors de l'eau.

*d Variables physiologiques mesurées lors des tests d'immersion*

Dès leur arrivée dans le laboratoire, les sujets (vêtus d'un tee-shirt et d'un short) étaient installés, au calme et en position assise, dans la chambre climatique. Ils étaient ensuite équipés pour le recueil :

- **de la température rectale (Tre)**, mesurée à l'aide d'un thermomètre inséré au moins 12 cm au-delà de la marge anale (thermocouple de type T en cuivre-constant [Cu-Ct] noyé dans une olive en laiton et inséré dans un tube en silicone, précision  $\pm 0,05$  °C) ;

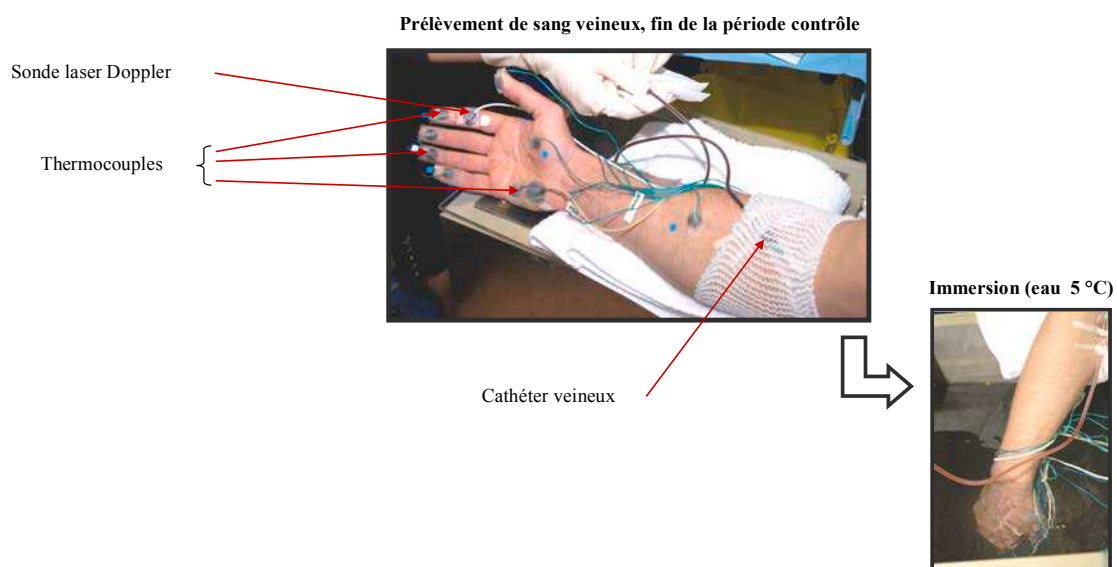
- **des températures cutanées sur la région immergée** (main droite), à l'aide de thermocouples (Cu-Ct, précision  $\pm 0,05$  °C) fixés avec des patches en Néoprène et un adhésif sur la pulpe des doigts (doigts 2 à 4 soit **Tfi2** et **Tfi4**), l'éminence thénar (**Tte**), l'éminence hypothénar (**Thte**) et l'avant-bras droit (**Tarm**).

- **des températures cutanées des régions non immergées** : 10 mesures sur l'hémicorps gauche pour le calcul de la température cutanée moyenne ( $\bar{T}_{sk}$ ), selon l'équation de Colin et Houdas (1965), avec des thermocouples (Cu-Ct) soudés sur des disques d'argent (précision  $\pm 0,05$  °C), fixés avec de l'adhésif sur le front (ligne médiane), la face dorsale de la main, la face externe de l'avant-bras, le dos (pointe de l'omoplate), la poitrine (région sous-mamellonnaire), le ventre (région peri-ombilicale), la face externe de la cuisse (mi hauteur), la face externe du mollet et la face supérieure du pied ;

- **du débit sanguin cutané (SkBF)** à l'aide d'un laser-Doppler (Periflux PF4001, Perimed, Järfälla, Sweden). Une sonde laser-Doppler submersible (PF 405, Perimed, Järfälla, Suède) était fixée sur la pulpe du deuxième doigt de la même façon que les thermocouples.

- **de la pression artérielle systolique (PAS)** et diastolique (**PAD**), mesurées toutes les minutes avec un sphygmomanomètre automatique et de la **fréquence cardiaque (FC)** mesurée en continu (Dinamap PLUS, Model 8723, Critikon, USA).

Les signaux étaient enregistrés toutes les 10 secondes à l'aide d'un enregistreur numérique (LADO3C, Icône Group, Eybens, France).



**Figure 21. Instrumentation de la main droite du sujet.**

### e Variables calculées

La pression artérielle moyenne (**PAM**, mmHg) selon la formule :  $MAP = PAS/3 + (2/3) PAD$ .

Le signal de débit sanguin (**SkBF**, en unité arbitraire de perfusion, PU) obtenu par la sonde de laser-Doppler a été moyenné toutes les 10 secondes pour réduire la variabilité instantanée liée à la vasomotion (Cracowski et al. 2006).

La conductance vasculaire cutanée (**CVC** en PU/mmHg), reflet de la perfusion vasculaire, a été calculée comme le ratio SkBF sur PAM (Cracowski et al. 2006; Sendowski et al. 1997). La CVC a été exprimée en % de la ligne de base (Baseline) obtenue en moyennant les 5 dernières minutes de la période de contrôle.

Les valeurs moyennes de températures cutanées, de fréquence cardiaque, de pression artérielle et de CVC ont été calculées et présentées pour les 5 dernières minutes de la période contrôle (**Baseline**), pour les 30 minutes d'**immersion** et pour les 5 dernières minutes de la période de récupération (**Récupération**).

La CIVD (*cold induced vasodilation*) a été identifiée comme une augmentation de la température cutanée digitale d'au moins 0,5 °C pendant l'immersion (Daanen 2009). La CIVD a été caractérisée selon les variables suivantes (Figure 22) : nadir initial (**Tfi<sub>min</sub>**, **CVC<sub>min</sub>**), temps à la valeur initiale de température (**Onset time**), valeur maximale atteinte par la première CIVD (**Tfi<sub>max</sub>**, **CVC<sub>max</sub>**),  $\Delta Tfi = Tfi_{max} - Tfi_{min}$ , temps au pic (**Peak time**), valeur minimale observée pendant toute l'immersion (**Tfi<sub>min</sub> CWI**), valeur maximale observée pendant toute l'immersion (**Tfi<sub>max</sub> CWI**) et aire sous la courbe pendant l'immersion (**Tfi<sub>AUC</sub>** et **CVC<sub>AUC</sub>**).

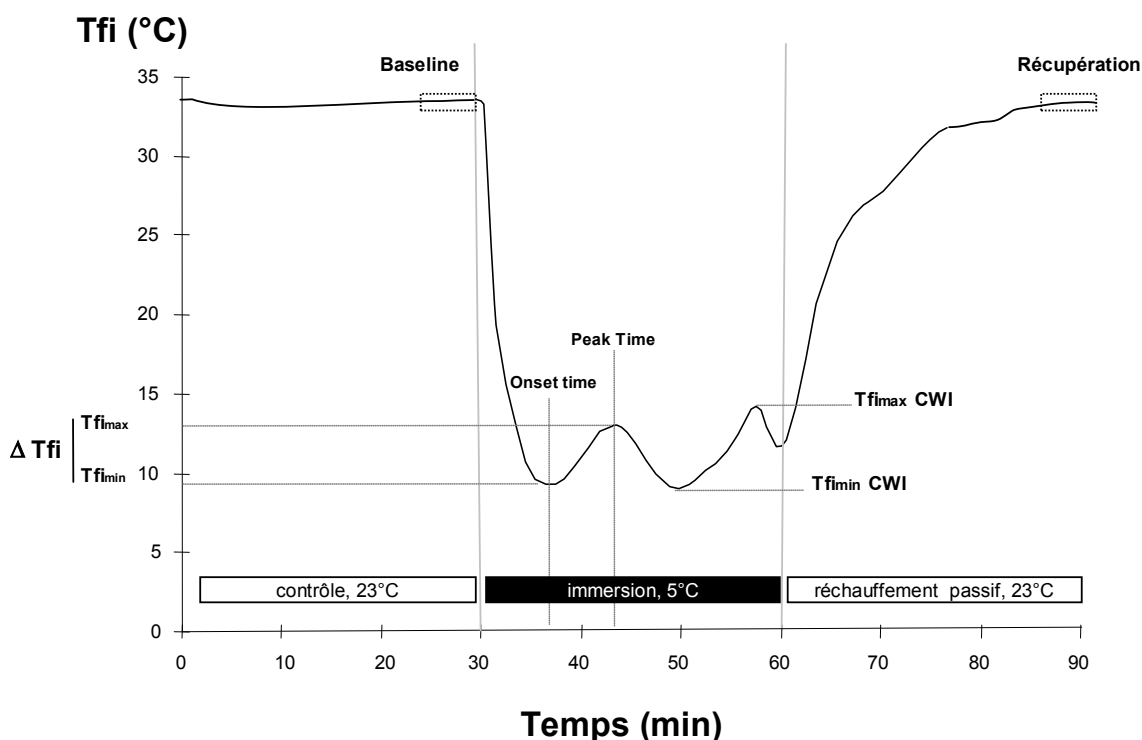


Figure 22. Variables calculées à partir de la température cutanée digitale (Tfi) pendant le test d'immersion de la main dans l'eau froide. Courbe théorique d'évolution de Tfi au cours du test.

### *f Variables biologiques*

Un cathéter veineux a été inséré dans la veine antécubitale droite (BD Insyte-W, 18 G, 1 ¾ in, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) 30 minutes avant le début de l'expérimentation. Des prélèvements sanguins ont été réalisés à la fin de la période contrôle (**Baseline**), pendant l'immersion dans l'eau froide (pendant **Onset time** et **Peak time**) et 10 minutes après le début du réchauffement passif (**10' récup**). Chaque prélèvement sanguin était réparti dans deux tubes héparinés (5 ml) pour le dosage des catécholamines, des nitrites et des nitrates (métabolites stables du NO) (Wang et al. 1994) et deux tubes EDTA avec aprotinine (5 ml) pour le dosage de la rénine et de l'endothéline-1.

**Tableau 6. Dosages biochimiques et hormonaux**

<i>Variables</i>	<i>Techniques</i>	<i>Milieux</i>	<i>Marques</i>	<i>Limites de détection</i>
Noradrénaline (NA)	HPLC-ED	Plasma	Centre de Biologie Nord, Lyon, France	32 ng/l
Adrénaline (A)	HPLC-ED	Plasma	Centre de Biologie Nord, Lyon, France	16 ng/l
Dopamine (DA)	HPLC-ED	Plasma	Centre de Biologie Nord, Lyon, France	2 ng/l
Rénine	RIA	Plasma	CisBio Int., France	2.5 pg/ml
Endothéline-1 (ET-1)	ELISA	Plasma	R & D Systems, USA	0,1 pg/ml
Nitrites (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	ELISA	Plasma	R & D Systems, USA	3.1 µmol/l
Nitrates (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	ELISA	Plasma	R & D Systems, USA	3.1 µmol/l

HPLC-ED : chromatographie liquide haute performance avec détection électronique .

### *g Evaluation de la douleur subjective*

Pendant le test, la douleur ressentie était évaluée avant chaque prélèvement sanguin en utilisant une échelle numérique : 0 (« aucune douleur ») à 10 (« douleur intolérable »).

### *h Analyses statistiques*

Les résultats sont présentés sous la forme moyenne  $\pm$  SEM. Les variables ont été analysées par une analyse de variance (ANOVA) avec mesures répétées à deux facteurs : privation de sommeil (2 niveaux : NN et PTS) et moment du test (3 niveaux : Baseline, Immersion et Récupération). Lorsqu'un effet global ou une interaction significative étaient observés, les valeurs mesurées au cours du test étaient comparées avec la Baseline et les valeurs observées après PTS étaient comparées avec les valeurs observées après une nuit de sommeil (au même moment du test d'immersion) en utilisant un test post-hoc de Tukey. Les valeurs caractérisant la CIVD ont été comparées en utilisant une ANOVA à mesures répétées à 1 facteur (privation de sommeil, 2 niveaux : après NN et après PTS). Les relations entre les variables étaient étudiées en utilisant une corrélation linéaire de Pearson. Le niveau de significativité statistique (risque  $\alpha$ ) a été fixé à  $p < 0,05$ .

### I.2.3. Résultats

#### a Températures cutanées des zones immergées

A la fin de la période contrôle (Baseline), nous n'avons pas observé de différence entre les températures cutanées mesurées après une nuit de sommeil (NN) et après 29 heures d'éveil continu (Figure 23).

Pendant l'immersion, par rapport à la Baseline, toutes les températures cutanées immergées ont diminué ( $p < 0,01$ ) aussi bien après NN qu'après PTS. Cependant après PTS, les températures cutanées Tfi2 et Tfi4 étaient inférieures à celles observées après NN (Tableau 8,  $p < 0,05$ ). Les valeurs maximales et minimales de Tfi2 and Tfi4 n'étaient pas modifiées après PTS, alors que  $Tfi2_{AUC}$  et  $Tfi4_{AUC}$  étaient inférieures après PTS ( $p < 0,05$ ). Concernant les variables caractérisant la CIVD pour Tfi2 et Tfi4, ni le nombre de CIVD, ni les caractéristiques de la première CIVD ( $Tfi_{min}$ ,  $Tfi_{max}$ ,  $\Delta Tfi$ , Onset et Peak times, Tableau 8) n'ont été modifiés après PTS par rapport à NN.

A la fin de la période de récupération, les températures cutanées locales étaient revenues à des valeurs identiques à celles de la Baseline. En revanche après PTS, Tfi2 et Tfi4 demeurent inférieures aux valeurs de la baseline (Tableau 8,  $p < 0,05$ ). Par ailleurs, les températures cutanées digitales observées après PTS étaient inférieures en fin de récupération à celles observées après NN ( $p < 0,05$ ).

#### b Température des zones non immergées

Nous n'avons pas mis en évidence d'effet de la PTS sur la  $Tre$ , la  $\bar{T}sk$  et  $Tarm$  au cours de la Baseline, de l'Immersion et de la Récupération.

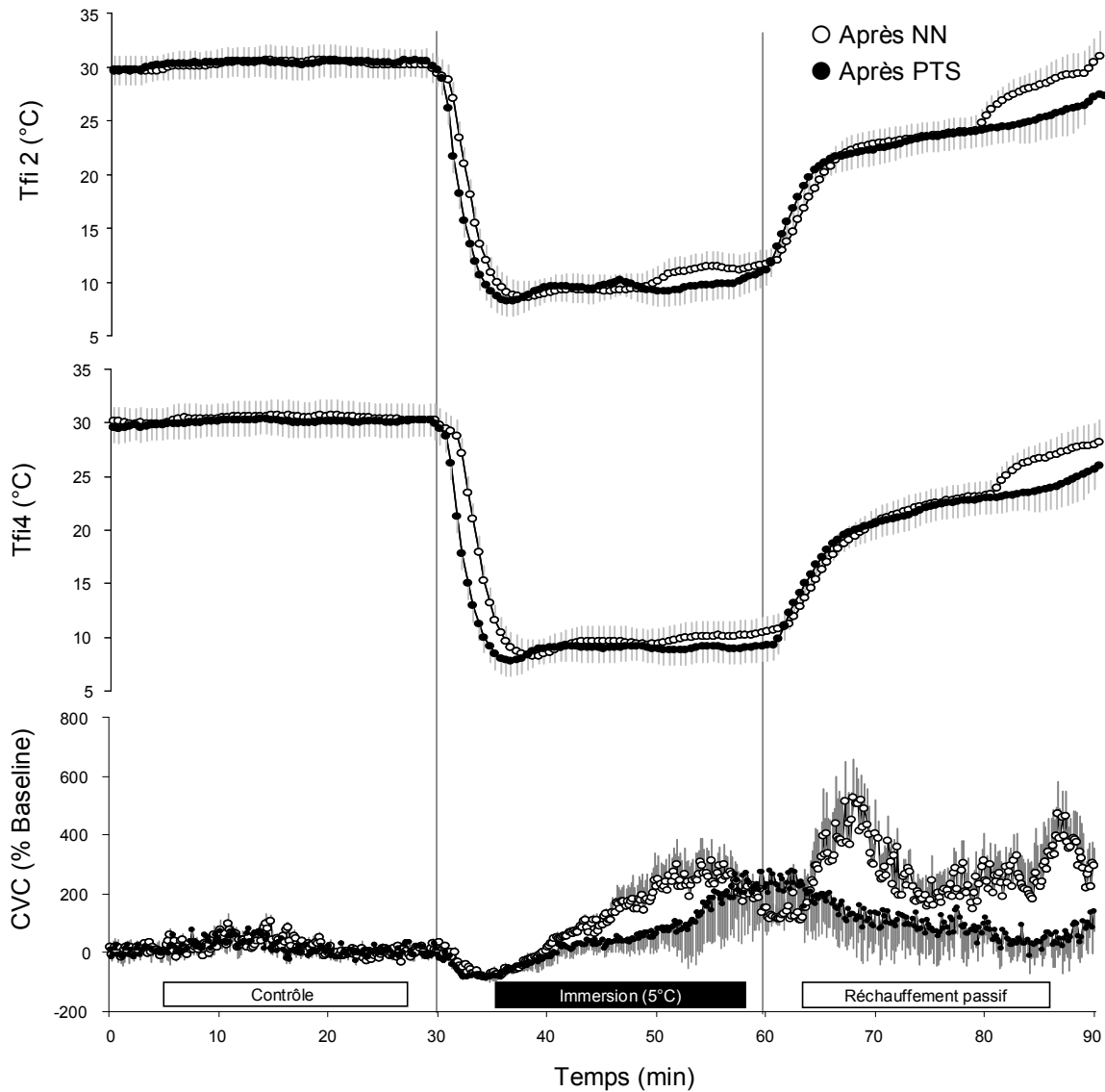
#### c Conductances vasculaires cutanées

Pendant la période contrôle, nous n'avons pas montré de différence significative entre les valeurs observées après NN et après PTS (Tableau 10).

Pendant l'immersion,  $CVC_{max}$ ,  $CVC$  et  $CVC_{AUC}$  ont diminuées par rapport à la Baseline ( $p < 0,05$ ). Après PTS, ces valeurs étaient inférieures à celles observées après NN. De plus, les valeurs inférieures de  $CVC$  (Onset time) apparaissent plus précocement ( $p < 0,05$ ). Dans cette étude, nous avons observé pendant l'immersion, une relation significative: d'une part entre Tfi2 et  $CVC$  ( $R^2 = -0,41$ ;  $p = 0,02$ ) et d'autre part entre Tfi4 et  $CVC$  ( $R^2 = -0,52$ ;  $P = 0,02$ ). De plus, nous avons mis en évidence une relation linéaire significative pendant l'immersion entre Tfi2 et  $CVC_{AUC}$  ( $R^2 = -0,63$ ;  $p < 0,01$ ) et entre Tfi4 et  $CVC_{AUC}$  ( $R^2 = -0,57$ ;  $p = 0,01$ ).

Pendant la récupération,  $CVC$  était également moins importante après PTS qu'après NN ( $p = 0,03$ ).





**Figure 23.** Evolution de la température cutanée des doigts 2 (Tfi2) et 4 (Tfi4) et de la conductance vasculaire cutanée (CVC) au cours des 30 minutes de contrôle (air ambiant, 25°C), 30 minutes d'immersion de la main dans l'eau froide (5°C) et des 30 minutes de récupération passive (air ambiant, 25 °C) après une nuit normale de sommeil (NN) et après privation totale de sommeil (PTS). La CVC est exprimée en % de la *Baseline* (moyenne des 5 dernières minutes de la période contrôle).

#### *d Pression artérielle et fréquence cardiaque*

Nous n'avons pas observé de différence significative entre les valeurs de FC, de PAS, de PAM et de PAD après NN et après PTS, que ce soit au cours de la baseline, au cours de l'immersion ou en récupération (Tableau 11). Comme attendu, la FC diminue pendant l'immersion et la récupération ( $p < 0,05$ ) alors que PAS, PAD et PAM augmentent pendant l'immersion ( $p < 0,05$ ).

### *e Variables biologiques*

Nous avons observé un effet significatif « moment du test » et PTS sur les concentrations plasmatiques d'endothéline-1 ( $p < 0,05$ ) (Tableau 12, Figure 24). Après NN, les concentrations plasmatiques d'endothéline-1 étaient plus importantes pendant la récupération ( $p < 0,05$ ) par rapport à la baseline. En revanche, après PTS, les concentrations plasmatiques d'endothéline-1 ont augmenté pendant l'immersion par rapport à la Baseline. Après PTS, les concentrations plasmatiques d'endothéline pendant l'immersion étaient négativement corrélées (Figure 25) avec Tfi2 et Tfi4 ( $R^2 = 0,54$ ,  $p < 0,01$ ;  $R^2 = 0,47$ ,  $p < 0,01$ , respectivement) et avec CVC ( $R^2 = 0,35$ ,  $p = 0,01$ ).

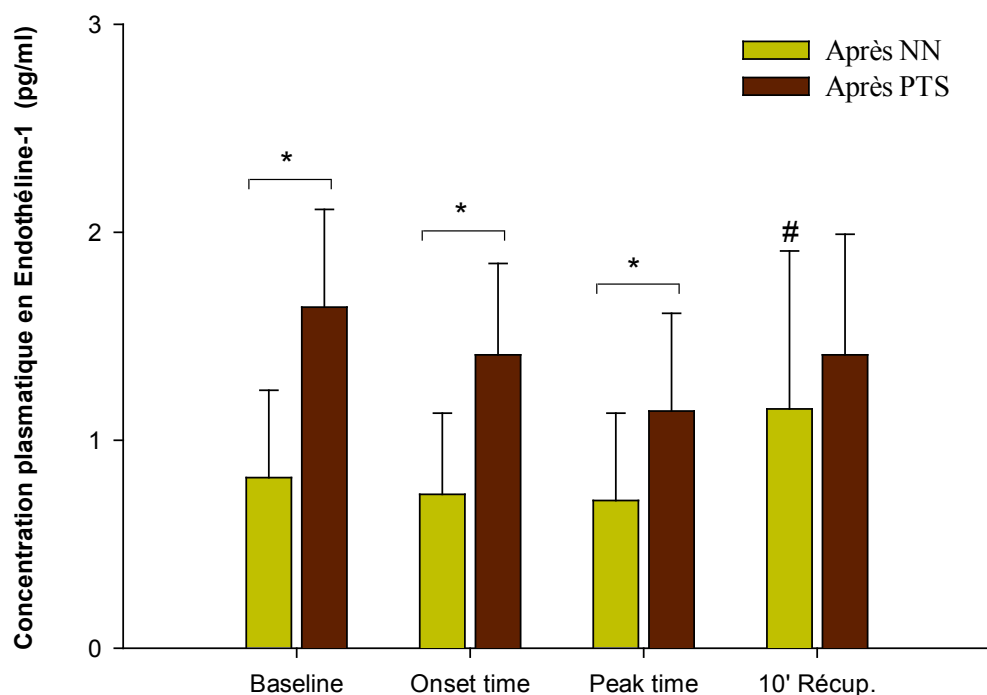
Nous n'avons pas mis en évidence d'effet de la PTS sur les concentrations plasmatiques de catécholamines et de rénine. En revanche, les résultats montrent un effet « moment du test » pour l'adrénaline ( $p < 0,001$ ), la noradrénaline ( $P < 0,001$ ), la dopamine ( $p < 0,01$ ) et la rénine ( $p < 0,01$ ) avec une augmentation des concentrations plasmatiques après 10 minutes de récupération par rapport à la Baseline ( $p < 0,05$ ) (Tableau 12).

Aucun effet « moment du test » ou PTS n'a été constaté pour les concentrations plasmatiques en nitrites et en nitrates. Cependant, les concentrations plasmatiques observées pour les nitrites sont inférieures à la limite de détection du kit ELISA utilisé ce qui a pu masquer un éventuel effet de la privation de sommeil sur leur production

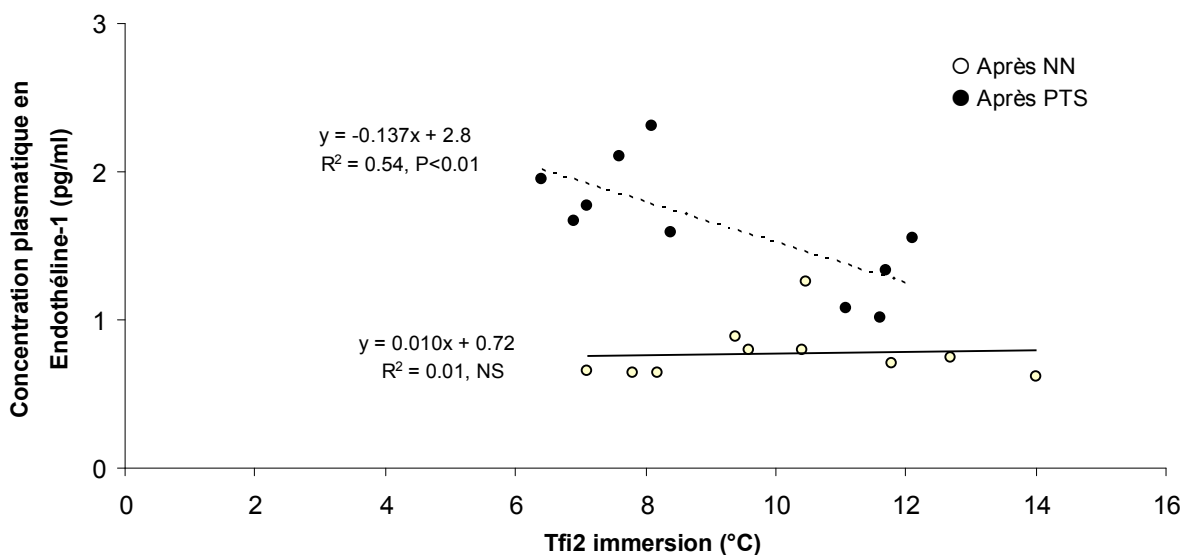
### *f Douleur ressentie*

Les valeurs de douleur ressentie étaient égales à zéro pendant la Baseline. Au cours du test, nous avons observé une augmentation de la douleur ressentie pendant l'immersion ( $F_{2,9} = 25.1$ ,  $p < 0,01$ ) sans effet de la PTS.

Pendant l'immersion, la douleur moyenne était respectivement pour Onset time, Peak time et 10 minutes de récupération, après NN égale à  $4,1 \pm 0,7$ ,  $4,3 \pm 0,7$  et  $2,7 \pm 0,8$  et après PTS égale à  $4,6 \pm 0,8$ ,  $5,4 \pm 0,9$  et  $3,8 \pm 1,0$ .



**Figure 24. Concentrations plasmatiques en endothéline-1 après une nuit normale de sommeil (NN) et après 29 heures de privation totale de sommeil (PTS), à la fin de la période contrôle (Baseline), au cours de l’immersion dans l’eau froide au moment de l’Onset et du Pic (Onset time, Peak time) de température cutanée digitale et après 10 minutes de récupération (10’ Récup).** \* différence significative entre après NN et après PTS,  $p < 0,05$  ; # différence avec la Baseline,  $p < 0,05$ .



**Figure 25. Correlations entre les concentrations plasmatiques en endothéline-1 et la température cutanée digitale pendant l’immersion (Tfi2), après une nuit normale de sommeil (○) et après privation totale de sommeil (PTS) (●).**

## I.2.4. Tableaux de résultats

**Tableau 7. Températures rectale et cutanées pendant la baseline, l'immersion et la récupération, après une nuit normale de sommeil (NN) et après privation totale de sommeil (PTS).**

		Moment du test			ANOVA		
		Baseline	Immersion	Récupération	Moment du test (F <sub>2,18</sub> )	PTS (F <sub>1,9</sub> )	Inter (F <sub>2,18</sub> )
Tre, °C	Après NN	37,3 ± 0,1	37,2 ± 0,1	37,1 ± 0,1	6,8	3,7	0,6
	Après PTS	37,1 ± 0,1	37,0 ± 0,1	37,0 ± 0,1	p < 0,01	ns	ns
T <sub>sk</sub> , °C	Après NN	32,8 ± 0,2	32,6 ± 0,2	32,1 ± 0,2	17,8	3,2	2,0
	Après PTS	33,1 ± 0,2	33,2 ± 0,2	32,7 ± 0,2	p = 0,01	ns	ns
Tarm, °C	Après NN	32,3 ± 0,3	24,8 ± 0,9*	27,7 ± 1,2*	83,6	1,1	0,2
	Après PTS	33,0 ± 0,5	25,8 ± 0,5*	27,9 ± 1,5*	p < 0,001	ns	ns
Tte, °C	Après NN	30,7 ± 1,0	12,0 ± 0,9*	27,9 ± 2,1	159,4	1,7	1,8
	Après PTS	29,4 ± 1,3	12,0 ± 0,9*	25,7 ± 1,8*	p < 0,001	ns	ns
Thte, °C	Après NN	30,3 ± 1,1	12,6 ± 0,9*	27,7 ± 2,1	108,2	0,8	0,5
	Après PTS	30,3 ± 1,3	12,9 ± 0,5*	25,4 ± 1,9*	p < 0,001	ns	ns
Tfi2, °C	Après NN	29,9 ± 1,5	12,2 ± 0,7*	30,9 ± 1,8	131,2	5,2	1,2
	Après PTS	29,7 ± 1,5	9,6 ± 0,7* \$	26,0 ± 1,9* \$	p < 0,001	p = 0,04	ns
Tfi4, °C	Après NN	30,0 ± 1,7	11,1 ± 0,8*	29,3 ± 2,0	104,2	5,7	2,1
	Après PTS	29,0 ± 1,7	9,0 ± 0,6* \$	26,7 ± 1,8* \$	p < 0,001	p = 0,04	ns

Valeurs présentées : moyenne ± SEM. Abréviations (cf. p68) : Baseline représente la valeur moyenne des 5 dernières minutes de contrôle en air ambiant. CWI est les 30 minutes d'immersion dans l'eau froide (5 °C). Récupération est les 5 dernières minutes des 30 minutes de récupération en air ambiant. \*: différence avec la baseline p < 0,05 \$: différence entre après NN et après PTS p < 0,05.

**Tableau 8. Caractéristiques de la vasodilatation induite par le froid (Cold Induced Vasodilation, CIVD) pour les températures cutanées des doigts 2 et 4 (Tfi2 ; Tfi4) après une nuit normale de sommeil (NN) et après privation totale de sommeil (PTS).**

Situations	Doigt 2		ANOVA		Doigt 4		ANOVA	
	Après NN	Après PTS	PTS (F <sub>1,9</sub> )	p	Après NN	Après PTS	PTS (F <sub>1,9</sub> )	p
Nombre de CIVD, n	1,5 ± 0,3	1,3 ± 0,2	0,3	ns	1,2 ± 0,2	1,5 ± 0,3	0,7	ns
1 <sup>ère</sup> CIVD								
Tfi <sub>min</sub> , °C	8,1 ± 0,8	7,4 ± 0,3	1,3	ns	7,8 ± 0,7	7,2 ± 0,4	0,9	ns
Tfi <sub>max</sub> , °C	12,0 ± 0,9	11,7 ± 1,0	4,0	ns	10,9 ± 1,0	10,3 ± 0,9	0,4	ns
Δ Tfi, °C	3,7 ± 0,9	4,3 ± 0,8	0,0	ns	3,0 ± 0,7	3,1 ± 0,7	0,1	ns
Onset time, s	455 ± 80	530 ± 81	0,1	ns	441 ± 31	386 ± 43	0,9	ns
Peak time, s	442 ± 77	642 ± 99	3,0	ns	462 ± 119	532 ± 111	0,8	ns
Tfi <sub>max</sub> CWI, °C	13,4 ± 0,9	11,8 ± 1,2	4,0	ns	12,1 ± 1,0	10,7 ± 0,9	2,0	ns
Tfi <sub>min</sub> CWI, °C	,6 ± 0,6	7,4 ± 0,3	0,1	ns	7,6 ± 0,7	7,1 ± 0,3	0,2	ns
Tfi <sub>AUC</sub> , °C.s	20162 ± 1475	16995 ± 971	9,5	0,01	19846 ± 1553	16818 ± 1034	7,3	0,02

Valeurs présentées : moyennes ± SEM. Abréviations cf. page 69.

**Tableau 9. Conductances vasculaires cutanées (CVC) mesurées à la pulpe du 2<sup>ème</sup> doigt, pendant les périodes : baseline, immersion et récupération, après une nuit normale de sommeil (NN) et après 29 heures de privation totale de sommeil (PTS).**

Situations	Après NN	Après PTS	ANOVA	
			PTS (F <sub>1-9</sub> )	P
Baseline, PU/mmHg	0,6 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,9	ns
Immersion				
CVC <sub>min</sub> , % Baseline	-91,8 ± 1,6	-83,9 ± 8,3	1,6	ns
CVC <sub>max</sub> , % Baseline	385,9 ± 169,7	240,0 ± 133,7	5,6	0,04
Onset time, s	146,0 ± 19,6	87,0 ± 10,2	16,5	0,01
Peak time, s	1046,6 ± 125,8	1163,5 ± 143,4	0,3	ns
CVC, % Baseline	143,6 ± 78,0	30,0 ± 40,2	5,2	0,04
CVC <sub>AUC</sub> , %s	995,0 ± 181,6	745,3 ± 86,9	5,2	0,04
Récupération, % Baseline	738,1 ± 333,6	225,3 ± 123,9	6,1	0,03

Valeurs présentées : moyennes ± SEM. Abréviations cf. page 69.

**Tableau 10. Variables cardiovasculaires observées pendant les périodes baseline, immersion dans l'eau froide et récupération après une nuit normale de sommeil (NN) et après 29 heures de privation totale de sommeil (PTS).**

		Moment du test			ANOVA		
		Baseline	Immersion	Récupération	Moment du test (F <sub>3-27</sub> )	PTS (F <sub>2-9</sub> )	Inter. (F <sub>3-27</sub> )
FC, bpm	Après NN	67,8 ± 2,1	65,8 ± 1,9*	63,8 ± 1,9*	18,9	2,3	0,6
	Après PTS	71,5 ± 2,6	69,5 ± 3,0*	65,0 ± 2,7*	p < 0,001	ns	Ns
PAS, mmHg	Après NN	120,3 ± 4,0	131,7 ± 6,1*	112,7 ± 3,1	12,2	0,1	0,9
	Après PTS	118,4 ± 3,3	129,5 ± 3,7*	113,1 ± 3,7	p < 0,001	ns	Ns
PAD, mmHg	Après NN	69,0 ± 2,8	75,3 ± 3,9*	64,9 ± 2,8	18,7	1,5	0,3
	Après PTS	66,0 ± 2,2	72,4 ± 2,6*	62,2 ± 2,4	p < 0,001	ns	Ns
PAM, mmHg	Après NN	87,6 ± 2,5	97,5 ± 4,4*	84,3 ± 2,8	18,8	1,0	0,1
	Après PTS	85,4 ± 2,5	94,0 ± 3,0*	80,7 ± 2,7	p < 0,001	ns	Ns

Valeurs présentées : moyennes ± SEM. \* différence par rapport à la baseline, p<0,05.

**Tableau 1. Variables biochimiques et métaboliques observées au cours du test d'immersion dans l'eau froide (5°C) après une nuit normale de sommeil (NN) et après privation totale de sommeil (PTS).**

Valeurs		Moment du test				ANOVA		
		Baseline	Onset time	Peak time	10' Recup.	Moment du test (F <sub>3-27</sub> )	PTS (F <sub>2-9</sub> )	Inter. (F <sub>3-27</sub> )
Endothéline-1, pg/ml	Après NN	0,82 ± 0,1	0,75 ± 0,1	0,69 ± 0,1	0,77 ± 0,1*	6,0	28,4	1,9
	Après PTS	1,64 ± 0,1 <sup>s</sup>	1,41 ± 0,1 <sup>s</sup>	1,18 ± 0,1 <sup>s</sup>	1,44 ± 0,1*	p < 0,05	p < 0,01	ns
Adrénaline, ng/l	Après NN	41,2 ± 6,6	58,0 ± 8,0	94,8 ± 17,9	59,1 ± 15,2*	7,0	3,1	1,0
	Après PTS	60,0 ± 8,1	77,1 ± 9,1	109,0 ± 13,2	168,0 ± 31,7*	p < 0,01	Ns	ns
Noradrénaline, ng/l	Après NN	388 ± 33	479 ± 36	527 ± 34	467 ± 78*	26,4	3,5	1,9
	Après PTS	480 ± 30	518 ± 36	550 ± 28	802 ± 91*	p < 0,01	Ns	ns
Dopamine, ng/l	Après NN	16,1 ± 1,3	15,3 ± 1,5	14,0 ± 2,3	18,0 ± 3,9*	5,5	4,5	2,3
	Après PTS	20,1 ± 4,2	20,7 ± 3,7	26,7 ± 6,9	26,9 ± 11,9*	p < 0,01	Ns	ns
Rénine, pg/ml	Après NN	16,0 ± 2,3	17,1 ± 2,9	18,1 ± 2,6	22,0 ± 2,6*	6,0	4	0,9
	Après PTS	28,6 ± 6,2	26,5 ± 5,6	26,7 ± 6,9	31,3 ± 5,9*	p < 0,01	Ns	ns
Nitrites, µmol/L	Après NN	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,2	0,9 ± 0,2	1,8	1,6	0,6
	Après PTS	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1,4 ± 0,2	Ns	Ns	ns
Nitrates, µmol/L	Après NN	21,8 ± 4,2	22,2 ± 3,7	19,2 ± 4,2	21,9 ± 4,1	0,3	1,4	2,1
	Après PTS	25,2 ± 4,2	24,8 ± 3,8	25,0 ± 3,9	24,4 ± 4,2	ns	ns	ns

Valeurs présentées : moyennes ± SEM. Abréviations: privation totale de sommeil (PTS), nuit normale (NN), *Cold Water Immersion* (CWI), interaction (Inter.). Les prélèvements sanguins ont été réalisés à la fin de la période contrôle, pendant l'immersion (Onset time, Peak time) et après 10 minutes de récupération en air ambiant (10' Récup.). \*: différence par rapport à la Baseline p<0,05, <sup>s</sup>: différence entre après NN et après PTS p < 0,05.

**Tableau 11. Numération formule sanguine après une nuit normale de sommeil (NN) et après privation totale de sommeil (PTS).**

Valeurs		Moment du test	ANOVA
		Baseline	PTS (F <sub>2-9</sub> )
Globules blancs, 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>	Après NN	5,36 ± 0,38	0,14
	Après PTS	5,26 ± 0,29	ns
Neutrophiles, 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>	Après NN	3,11 ± 0,13	8,1
	Après PTS	3,27 ± 0,23	ns
Lymphocytes, 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>	Après NN	1,61 ± 0,09	8,1
	Après PTS	1,43 ± 0,12	ns
Monocytes, 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>	Après NN	0,35 ± 0,03	3,4
	Après PTS	0,41 ± 0,03	ns
Eosinophiles, 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>	Après NN	0,06 ± 0,03	0,2
	Après PTS	0,06 ± 0,03	ns

Valeurs présentées : moyennes ± SEM. Abréviations: privation totale de sommeil (PTS), nuit normale (NN), non significatif (ns).

### I.2.5. Synthèse et discussion

Ce travail a permis d'observer que la PTS altère la tolérance locale au froid de sujets sains. **Trois résultats principaux émergent :**

- **29 heures d'éveil continu** entraînent une **diminution de la température cutanée**, mesurée sur 2 doigts différents, et de la CVC pendant 30 minutes d'immersion de la main dans l'eau froide et la période de récupération ;
- ces variations apparaissent **sans modification de l'état physiologique basal**, attesté par l'absence d'effet de la PTS sur la température rectale, la température cutanée moyenne ( $\bar{T}_{sk}$ ), la fréquence cardiaque, la pression artérielle et les concentrations plasmatiques en catécholamines ;
- les modifications observées sont associées à une augmentation de la concentration plasmatique en **endothéline-1**, inversement corrélée à la température cutanée et à la CVC pendant l'immersion.

Dans cette étude, nous avons observé que la PTS entraînait une diminution des températures cutanées digitales et la CVC pendant l'immersion et la récupération. Ces phénomènes traduisent une diminution de la tolérance locale au froid (Daanen 2003; Sawada 1996). Contrairement à notre hypothèse initiale, nous n'avons pas observé d'effet significatif de la PTS sur les paramètres caractérisant la CIVD. Toutefois, il semble que l'augmentation du délai de récupération soit un signe plus sensible que la modification de la CIVD. En effet, Sawada et al. (Sawada et al. 2000) ont observé, après des périodes successives d'immersion de la main dans l'eau froide, que la diminution de la température cutanée au cours de la récupération précède l'altération de la CIVD. En conséquence, nous proposons d'étudier lors des tests d'immersion locale au froid, la température cutanée pendant l'immersion mais aussi pendant les 30 minutes de récupération afin d'augmenter la sensibilité du test. D'un point de vue plus pratique, nos résultats ont des implications pour la prévention des gelures. Il semble en effet que la privation de sommeil diminue la tolérance locale au froid et doit être considérée comme un facteur de risque de gelure.

Les mécanismes physiologiques qui sous-tendent les effets de la privation de sommeil sur la tolérance locale au froid demeurent méconnus. La diminution de la température cutanée observée pendant l'immersion et la récupération peut être liée à une augmentation de la vasoconstriction et/ou à une atteinte des mécanismes vasodilatateurs. Ces deux hypothèses sont discutées ci-dessous.

**Hypothèse n°1 : augmentation du tonus vasoconstricteur.** En l'absence d'effet de la PTS sur les concentrations plasmatiques de catécholamines et de rénine, cette hypothèse est supportée par l'augmentation, après PTS, de la concentration plasmatique d'endothéline-1 (ET-1). Celle-ci est alors inversement corrélée pendant l'immersion aux températures cutanées digitales ( $T_{fi2}$  et  $T_{fi4}$ ) et à la CVC. ET-1 a une action vasoconstrictrice par une action directe sur le muscle lisse et une action indirecte en potentialisant l'effet vasoconstricteur des catécholamines. Chez l'homme, peu de travaux ont étudié les effets de la PTS sur l'endothéline-1. Cependant, il a été rapporté une augmentation de concentrations



plasmatiques d'ET-1 chez des rongeurs, après 96 heures de privation de sommeil paradoxal (Palma et al. 2002) et chez l'homme, dans une population de petits dormeurs (moins de 7 heures par nuit de sommeil par rapport à plus de 8 heures ) (Weil et al. 2010).

**Hypothèse n°2 : altération des mécanismes vasodilatateurs impliqués dans la réponse prolongée au froid et la récupération.** Cette hypothèse pourrait expliquer la diminution de la  $CVC_{max}$  observée pendant l'immersion et la disparition des pics de CVC visuellement observés pendant la récupération qui traduisent une altération des mécanismes de reperfusion. Ces phénomènes de reperfusion sont la conséquence d'une diminution de la libération synaptique de noradrénaline (Johnson et al. 2005b; Pergola et al. 1993; Yamasaki et al. 2006) et la production par l'endothélium de métabolites vasodilatateurs (Hodges et al. 2006; Yamasaki et al. 2006). Or, nous avons observé dans nos travaux précédents que 29 heures d'éveil continu représentaient un stress suffisant pour altérer la vasodilatation dépendante de l'endothélium (Sauvet et al. 2010). Ce résultat pourrait expliquer la diminution de la tolérance au froid observée et être rapproché des travaux de Sawada (Sawada 1996) qui ont montré une diminution de la température cutanée et une altération de la CIVD chez des sujets ayant une fonction endothéliale altérée.

Nos résultats contribuent à renforcer l'hypothèse que la tolérance locale au froid est un mécanisme d'origine plutôt périphérique (Daanen 2003) et non un mécanisme d'origine centrale, liée à une diminution de l'activité sympathique (Flouris et Cheung 2009a, b). En effet, dans notre travail, les modifications de la réaction locale au froid observées après la PTS impliquent plutôt des mécanismes vasculaires périphériques que des mécanismes centraux. Notamment, nous n'avons pas observé d'effet de la PTS sur la pression artérielle au repos et au cours d'un stress lié à l'immersion ce qui confirme des résultats précédemment observés (Kato et al. 2000; Pagani et al. 2009; Sauvet et al. 2010). De même nous n'avons pas observé d'effet de la PTS sur la température centrale et la température cutanée moyenne. L'absence d'effet de la PTS sur  $T_{re}$ ,  $\bar{T}_{sk}$  et la production métabolique de chaleur a été précédemment décrite en air ambiant (Caine-Bish et al. 2004; Meney et al. 1998; Savourey et Bittel 1994). Cependant plusieurs auteurs ont montré que la privation de sommeil modifie la réponse thermique lors d'une exposition générale (corps entier) au froid. (Savourey et Bittel 1994; Young et al. 1998). Notre étude a mis en évidence, pour la première fois, un effet de la PTS sur la réponse locale au froid.

### **I.3.3<sup>ème</sup> étude : « Evaluation de la variabilité de la mesure de la vasodilatation dépendante de l'endothélium »**

*Article publié :*

Sauvet F, Mahé G, Chennaoui M, Langrume C, Vasseur M, Abraham P, Leftheriotis G. Acetylcholine chloride as a potential source of variability in the study of cutaneous vascular function in man. *Microvascular research*. 2011 ; 82:190-7.

#### **I.3.1. Objectifs de l'étude**

Comme nous l'avons décrit précédemment, la mesure du débit sanguin cutané par laser-Doppler couplée à l'iontophorèse de chlorure d'acétylcholine (ACh) est reconnue comme une technique non invasive et fiable pour évaluer la vasodilatation dépendante de l'endothélium. Cette mesure de la réactivité vasculaire est considérée par de nombreux auteurs comme un index de la fonction endothéliale. Une des limites de cette technique est la grande variabilité de la mesure observée dans certaines études qui impose de respecter des règles méthodologiques précises (Cracowski et al. 2006; Joannides et al. 2006) et d'évaluer la reproductibilité de la technique utilisée.

L'ACh est aujourd'hui la substance vasoactive la plus utilisée pour évaluer la réactivité vasculaire. Cependant, l'ACh est hydrolysée rapidement par les acétylcholinestérases (AChE) (Shibasaki et Crandall 2001) et elle est instable en solution (Sletten et al. 2005). Ces facteurs sont une source non négligeable de variabilité de la mesure et imposent une préparation extemporanée des solutions. Le chlorure de methacholine (MCh), ester synthétique ( $\beta$ -methyl) de l'ACh, agit comme un agoniste non sélectif des récepteurs muscariniques. MCh est un agent pharmacologique largement utilisé dans les tests de provocation bronchique non spécifiques (Hayes et al., 1998). Il pourrait être utilisé à la place de l'ACh pour l'évaluation de la réactivité vasculaire car il est plus stable en solution (Acar et al. 2001; Hayes et al. 1998) et également plus résistant aux acétylcholinestérases (AChE) (Bruning et al., 1996; Kimura et al., 2007). La variabilité et la reproductibilité de l'évaluation de la réactivité vasculaire par iontophorèse d'ACh et de MCh n'ont jamais été comparées.

Cette première étude avait pour objectif principal de mesurer la variabilité de l'étude de la réactivité vasculaire (vasodilatation cutanée induite par iontophorèse d'ACh et de nitroprussiate de sodium) et de déterminer sa reproductibilité. Nous avons étudié plus particulièrement la variabilité induite par le site de mesure (*inter-site*), le jour (*inter-day*) et par l'heure de la journée (*intra-day*). Le second objectif de cette étude était de comparer les effets vasculaires de l'ACh et de la MCh. L'âge ayant une influence sur l'activité des cholinestérases (Srivatsan et Peretz 1996), nous nous sommes également intéressés à l'effet de l'âge sur la réponse à l'ACh et à la MCh.

### I.3.2. Matériels et méthodes

#### *g Les sujets*

40 sujets en bonne santé (36 hommes et 4 femmes) ont été inclus dans cette étude réalisée sur deux sites : l'Institut de recherche biomédicale des armées (IRBA) de Brétigny sur Orge et le service d'explorations fonctionnelles cardiovasculaires du centre hospitalier universitaire d'Angers.

Les critères d'exclusion étaient :

- un antécédent de pathologie cardiovasculaire ou cutanée ;
- un traitement médical ;
- une pathologie infectieuse ;
- un trouble du sommeil ou un travail posté ;
- une consommation journalière de tabac, d'alcool, de caféine (> 400 mg/j) ;
- un indice de masse corporelle (BMI) supérieur à 30 kg.m<sup>2</sup>.

#### *h Etude de la réactivité vasculaire cutanée*

**Les débits sanguins cutanés** (*skin blood flow*, SkBF) ont été mesurés par deux sondes laser-Doppler (*laser-Doppler flowmetrys*, LDF) fixées sur la face interne de l'avant-bras gauche avec un adhésif double-face. Les sondes laser-Doppler (481-1, Perimed AB, Suède) étaient couplées avec une électrode et une éponge (1,2 cm<sup>2</sup>) conçues pour la délivrance de substances par iontophorèse et percée en leur centre pour laisser passer l'extrémité de la sonde laser-Doppler.

Avant chaque expérimentation, l'éponge a été imbibée avec 0,2 ml d'une solution préparée *extemporanée* contenant du chlorure d'acétylcholine (ACh, 1 %, 11 mM), ou du chlorure de méthacholine (MCh, 1 %, 10 mM), ou du nitroprussiate de sodium (SNP, 2 %, 67mM) ou de l'eau désionisée. L'eau désionisée était le solvant des solutions. A 5 cm de la sonde laser-Doppler, une électrode passive était également collée sur la peau. Chaque sonde Laser-Doppler et son électrode passive étaient connectées à un générateur (PeriIont 382, Perimed AB) permettant de délivrer un courant d'intensité contrôlée (0,1 mA). ACh et MCh (chargées négativement) étaient délivrées avec un courant d'anode (négatif) alors que SNP (chargé positivement) était délivré avec un courant de cathode (positif).

**La température cutanée** (*skin temperature*, Tsk) a été enregistrée à l'aide de 2 thermocouples placés sur la peau à 3 cm des sondes laser-Doppler.

**La pression artérielle** a été mesurée en continue (3<sup>ème</sup> doigt de la main droite) à l'aide d'un photoplethysmographe (Portapres, Finapres Medical Systems) (Imholz 1996).

### *i Protocoles expérimentaux*

Toutes les mesures ont été réalisées en position semi-assise, après une période de 10 minutes de repos. Après 5 minutes d'enregistrement, les substances vasoactives étaient administrées par iontophorèse selon le protocole suivant : 4 stimulations électriques successives (0,1 mA) de 10 secondes chacune (I1, I2, I3, et I4) avec un intervalle de 120 secondes entre deux stimulations (Debbabi et al. 2009). Pour chaque sonde la charge électrique administrée était de 4 mC (2.5 mC/cm<sup>2</sup>). Le travail a été divisé en 4 protocoles distincts :

**Protocole 1 – Etude de la vasodilatation induite par les courants à la cathode et à l'anode.** L'effet du courant sur la conductance vasculaire cutanée induite par notre protocole d'iontophorèse à l'anode et à la cathode a été étudié (8 sujets) selon le protocole d'iontophorèse décrit précédemment. Les éponges ont été imbibées uniquement avec de l'eau désionisée (solvant).

**Protocole 2 – Comparaison des vasodilatations induites par ACh et MCh.** Les éponges couplées aux sondes laser-Doppler ont été imbibées, pour l'une par une solution d'ACh et pour l'autre par une solution de MCh (16 sujets).

**Protocole 3 – Etude des variabilités induites par le site de mesure (*inter-site*) et par jour de la mesure (*inter-day*).** La réactivité vasculaire a été mesurée à 11:00 au cours de 2 journées de test différentes (médiane de la durée entre deux mesures : 5 jours, étendue : 3-12 jours). Une solution d'ACh (n=6), de MCh (n=5) ou de SNP (n=5) était déposée sur les deux sondes laser-Doppler.

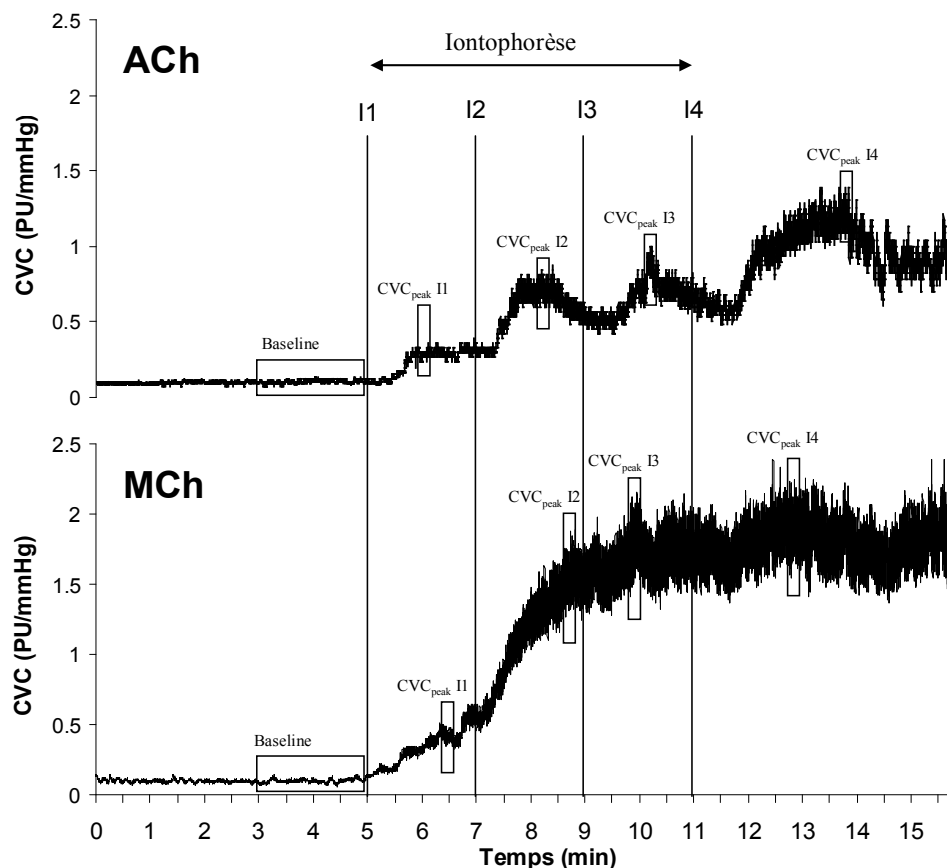
**Protocole 4 – Etude des variabilités induites par l'heure de la mesure (*intra-day*).** La réactivité vasculaire a été mesurée chez 16 sujets à 11:00 et à 16:00 pendant deux journées différentes (médiane 8 jours, étendue : 1-21 jours). Au cours de ces journées de test nous avons mesuré selon un ordre aléatoire : i) la réactivité vasculaire à ACh (sonde 1) et au SNP (sonde 2) ou ii) la réactivité vasculaire à MCh (sonde 1) et au SNP (sonde 2).

### *j Analyse des données*

La conductance vasculaire cutanée (CVC, PU/mmHg) a été calculée par le rapport du débit sanguin cutané (SkBF) en unité arbitraire de perfusion (PU), à la pression artérielle moyenne (PAM, mmHg).

Les variables suivantes ont été calculées (Figure 26) :

- **Baseline** (PU/mmHg) : valeur basale, valeur moyenne au cours des 2 minutes précédant la première stimulation d'iontophorèse (I1) ;
- **CVC<sub>peak</sub>** (%) : valeur maximale de CVC (sur 10 secondes) après chaque stimulation électrique. Comme 4 stimulations électriques ont été réalisées (I1 à I4), 4 CVC<sub>peak</sub> ont été calculées (CVC<sub>peak</sub>I1 à CVC<sub>peak</sub>I4). Les CVC<sub>peak</sub> ont été exprimées en % de variation par rapport à la valeur basale (% Baseline) (Cracowski et al. 2006) ;
- **CVC<sub>increase</sub>** (PU/mmHg) : différence en valeur absolue entre la valeur maximale de CVC observée au cours du test et la Baseline ;
- **CVC<sub>AUC</sub>** (%.s) : aire sous la courbe de la 1<sup>ère</sup> stimulation électrique (I1) jusqu'à 5 minutes après la 4<sup>ème</sup> stimulation (I4).



**Figure 26. Exemple de modifications de la conductance vasculaire cutanée (CVC) induites par iontophorèse d'acétylcholine (ACh) et de méthacholine (MCh).** ACh et MCh ont été délivrées par 4 stimulations électriques de 10 secondes (I1 à I4) de 0,1 mA avec un intervalle de 120 secondes entre deux stimulations. La ligne de base (*Baseline*) a été calculée en moyennant les 120 secondes avant I1. CVC<sub>peak</sub> (I1 à I4) sont les valeurs maximales (10 secondes) de CVC observées après chaque stimulation électrique.

### *k* Analyses statistiques

Les résultats ont été présentés sous la forme moyenne  $\pm$  ESM (erreur standard à la moyenne). Le risque alpha ( $p$ ) a été fixé à 0,05. Les analyses statistiques suivantes ont été conduites :

**Protocole 1** – analyse de variance non-paramétrique de Friedman à mesure répétée (2 facteurs : « stimulation électrique » et « nature du courant » : anode vs. cathode) puis comparaison multiple (test de Wilcoxon) entre les valeurs de  $CVC_{peak}$  et leur Baseline.

**Protocole 2** – ANOVA à mesure répétée à 1 ou 2 facteurs (« substance utilisée » et « stimulation électrique »). Le lien entre ACh et MCh a été déterminé par régression linéaire. La pente et l'intersection de la relation entre ACh et MCh ont été comparées à la droite théorique [ $f(x) = y$ ] par une analyse de covariance (ANCOVA). Le pente de la droite est le reflet du gain entre la vasodilatation induite par MCh et par ACh et l'ordonnée à l'origine est le reflet de la sensibilité. La droite théorique [ $f(x) = y$ ] représente une relation entre deux variables de gain et de sensibilité identique.

Une analyse de Bland et Altman (Bland et Altman 1986) a été utilisée pour comparer la reproductibilité des mesures. Le coefficient de reproductibilité était égale à  $1,96 \times$  l'écart type (SD) des différences entre les paires de mesures. La reproductibilité est bonne lorsque 95% des valeurs sont comprises entre les limites d'agrément. Celles-ci ont été calculées par la formule : moyenne des différences  $\pm 1,96$  l'écart type de différences entre les mesures.

**Protocole 3** – La variabilité des mesures a été déterminée en calculant le coefficient de variation (CV). Un CV  $< 20\%$  est considéré comme bon (Roustit et al. 2010a). Le coefficient de reproductibilité (CR) a été calculé selon la méthode de Bland et Altman (Bland et Altman 1986).

**Protocole 4** – Après avoir vérifié la normalité de la distribution des valeurs (test de Shapiro-Wilk), la réponse vasculaire a été déterminée par une ANOVA à deux facteurs (« heure de la journée » et « stimulation électrique ») suivie par un test post-hoc de Tukey.

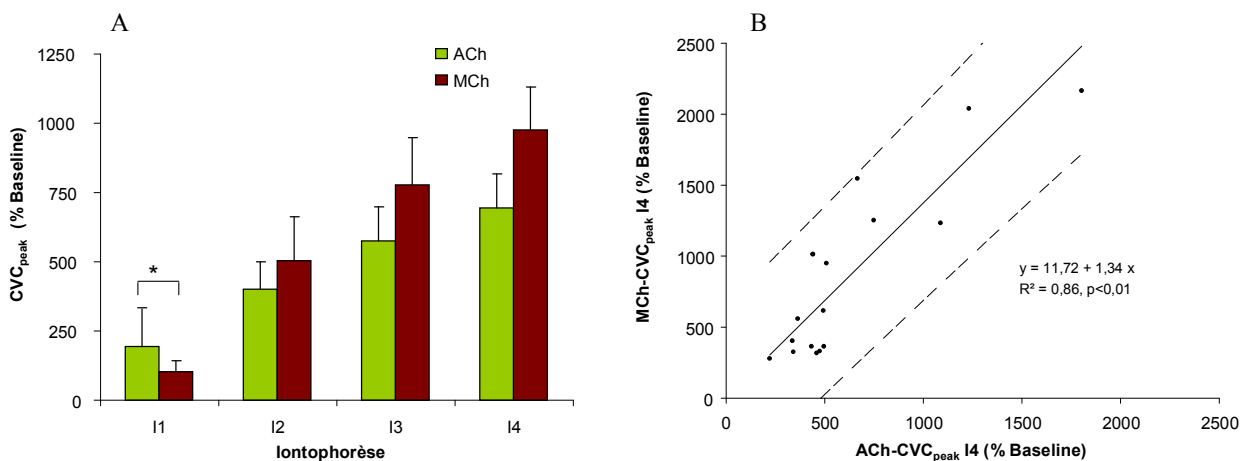
**Effet de l'âge** – Une régression linéaire (corrélation linéaire de Pearson) a été réalisée sur l'ensemble des valeurs des protocoles 2, 3 et 4 pour déterminer l'influence de l'âge sur les vasodilatations induites par ACh et MCh. Les pentes et les intersections des courbes avec l'ordonnée à l'origine des relations entre ACh et MCh avec l'âge ont été comparées par une analyse de covariance (ANCOVA).

### I.3.3. Résultats

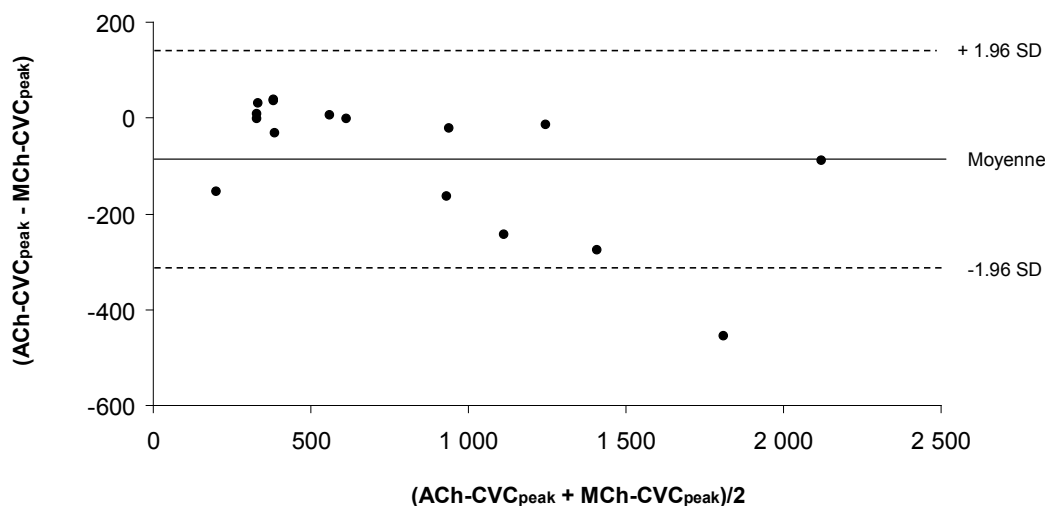
Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre les protocoles pour les variables biométriques, la pression artérielle ou de la température cutanée (Tableau 15).

**Protocole 1 – Etude de la vasodilatation induite par les courants à la cathode et à l'anode.** A l'anode, nous n'avons pas observé d'augmentation significative de CVC induite par le courant. En revanche, à la cathode, nous avons observé une augmentation significative de la CVC après la quatrième stimulation électrique (I4,  $p < 0,05$ ).

**Protocole 2 – Comparaison des vasodilatations induites par ACh et MCh (Figure 27).** L'iontophorèse d'ACh et de MCh a entraîné une augmentation de la CVC, significative dès la 1<sup>ère</sup> stimulation pour ACh et à partir de la 2<sup>ème</sup> stimulation pour MCh. Les valeurs maximales de CVC observées après iontophorèse d'ACh et de MCh sont corrélées ( $R^2 = 0,86$ ,  $p < 0,001$ ), avec une pente significativement différente de la droite théorique [ $f(x) = y$ ] ( $p < 0,01$ ) qui traduit un gain significatif de la réponse vasculaire à MCh par rapport à ACh. La reproductibilité entre les deux mesures (ACh et MCh) est de 95 % et peut être considérée comme bonne (Figure 28).



**Figure 27. Comparaison des effets de l'acétylcholine (ACh) et de la methacholine (MCh) sur la conductance vasculaire cutanée (CVC).** A. ACh et MCh ont été délivrées par 4 périodes de 10 secondes de courant (I1 à I4) de 0,1 mA avec un intervalle de 120 secondes entre deux stimulations. CVC<sub>peak</sub> (% Baseline) est la valeur maximale (sur 10 secondes) observée après chaque dose de courant. La Baseline a été calculée en moyennant les valeurs de CVC obtenues au cours des 120 secondes avant I1. Les valeurs présentées sont les moyennes  $\pm$  SE.\* différence significative entre ACh- et MCh-CVC<sub>peak</sub>,  $p < 0,05$ . B. Corrélation entre ACh-CVC<sub>peak</sub> I4 et MCh-CVC<sub>peak</sub> I4 (CVC<sub>peak</sub> après la 4<sup>ème</sup> dose de courant).



**Figure 28. Diagramme de Bland et Altman utilisé pour l'étude de la reproductibilité entre ACh-CVC<sub>peak</sub> I4 et MCh-CVC<sub>peak</sub> I4.** La ligne continue représente la moyenne des différences entre ACh-CVC<sub>peak</sub> et MCh-CVC<sub>peak</sub> ( $-83.5 \pm 35.1\%$ ). Les lignes pointillées sont les limites d'agrément pour le calcul de la reproductibilité : moyenne  $\pm 1.96 SD$ . SD est l'écart type (*standard deviation, SD*) des différences entre les mesures.

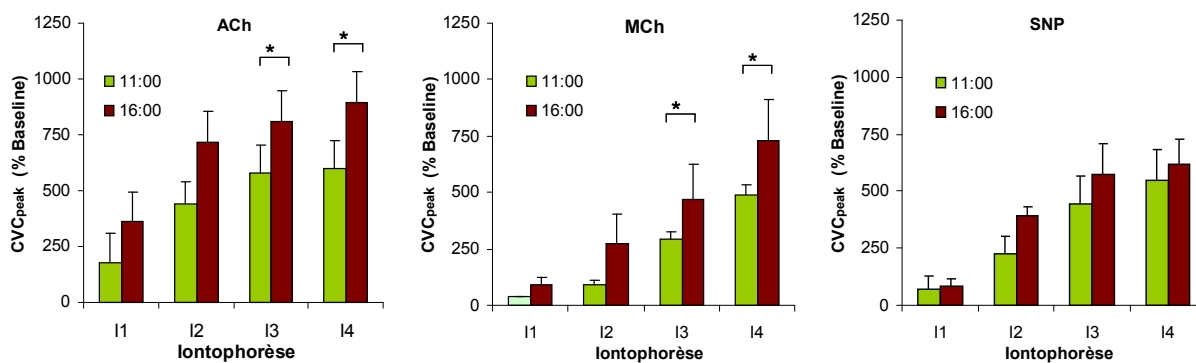
**Protocole 3 – Etude de la variabilité induite par le site de mesure (*inter-site*) et par le jour de la mesure (*inter-day*).** Des coefficients de variations inférieurs à 20 % ont été observés (Tableau 15, page Erreur ! Signet non défini.):

- après iontophorèse d'ACh pour CVC<sub>peak</sub> I3 et I4 (après la 3<sup>ème</sup> et la 4<sup>ème</sup> stimulation) et CVC<sub>AUC</sub> ;
- après iontophorèse de MCh pour CVC<sub>peak</sub> I4 (après la 4<sup>ème</sup> stimulation) et CVC<sub>AUC</sub> ;
- après iontophorèse de SNP pour CVC<sub>AUC</sub>.

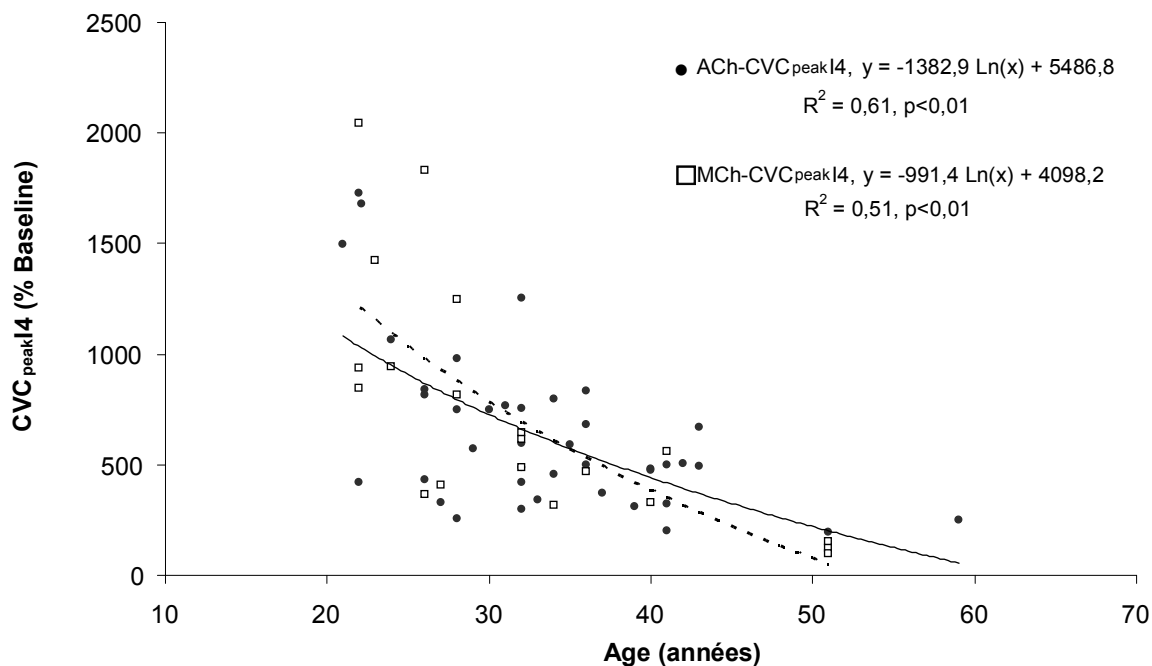
**Protocole 4 – Etude de la variabilité induite par l'heure de la mesure (*intra-day*) (Figure 29).** Après iontophorèse d'ACh et de MCh nous avons observé des valeurs de CVC<sub>peak</sub> et de CVC<sub>AUC</sub> significativement plus importantes à 16:00 qu'à 11:00 après I3 et I4. Après iontophorèse de SNP, nous n'avons pas observé d'effet significatif du facteur « heure de la journée ».

**Effet de l'âge sur la réactivité vasculaire.** Pour ACh et MCh, nous avons mis en évidence une diminution significative de la CVC<sub>peak</sub>I4, de la CVC<sub>AUC</sub> et de la CVC<sub>peak</sub>I3 (pour ACh uniquement) d'allure logarithmique avec l'âge (Figure 30). Les pentes et les ordonnées à l'origine des courbes obtenues pour MCh et ACh ne sont pas significativement différentes. Nous n'avons pas observé d'effet « âge » après iontophorèse de SNP.





**Figure 29. Effets de l'acétylcholine (ACh), de la méthacholine (MCh) et du nitroprussiate de sodium (SNP) sur la conductance vasculaire cutanée (CVC).** ACh, MCh et SNP ont été délivrés par 4 périodes de 10 secondes de courant (I1 à I4) de 0,1 mA avec un intervalle de 120 secondes entre deux stimulations.  $CVC_{peak}$  (% Baseline) est la valeur maximale de CVC observée après chaque iontophorèse. La Baseline a été calculée en moyennant les valeurs de CVC obtenues au cours des 120 secondes avant I1. Les valeurs présentées sont les moyennes  $\pm$  SEM. \* vs. 11:00  $p < 0,05$ .



**Figure 30. Effet de l'âge sur l'augmentation relative de la conductance vasculaire cutanée ( $CVC_{peakI4}$ ) induite par l'application par iontophorèse d'ACh (ACh- $CVC_{peak}$ ) et de MCh (MCh- $CVC_{peak}$ ).** ACh- $CVC_{peak}$  et MCh- $CVC_{peak}$  sont exprimés en % de la Baseline (CVC).

**Tableau 1. Caractéristiques biométriques, pression artérielle et température cutanée des sujets en fonction des protocoles**

	Protocole 1		Protocoles 2 et 4		Protocole 3	
	Moyenne $\pm$ SEM	Etendue	Moyenne $\pm$ SEM	Etendue	Moyenne $\pm$ SEM	Etendue
Age, années	29,1 $\pm$ 2,4	[22 – 51]	30,0 $\pm$ 2,0	[22 – 51]	29,4 $\pm$ 2,5	[21 – 59]
Taille, m	1,77 $\pm$ 0,05	[1,67 – 1,84]	1,76 $\pm$ 0,07	[1,67 – 1,84]	1,75 $\pm$ 0,6	[1,61 – 1,88]
Poids, kg	74,2 $\pm$ 2,9	[55,1 – 82,4]	76,1 $\pm$ 2,2	[55,0 – 82,0]	70,9 $\pm$ 2,0	[62,0 – 91,6]
IMC, kg/m <sup>2</sup>	24,2 $\pm$ 0,6	[19,7 – 26,1]	22,9 $\pm$ 0,9	[19,7 – 26,1]	23,4 $\pm$ 0,3	[20,3 – 28,4]
PAS, mmHg	124,9 $\pm$ 3,1	[108 – 144]	132,4 $\pm$ 4,3	[110 – 141]	126,8 $\pm$ 2,7	[110 – 148]
PAM, mmHg	90,4 $\pm$ 3,5	[74 – 100]	93,5 $\pm$ 2,4	[82 – 93]	89,0 $\pm$ 3,1	[85 – 99]
PAD, mmHg	73,2 $\pm$ 2,9	[57 – 85]	79,0 $\pm$ 2,1	[63 – 79]	66,8 $\pm$ 2,5	[73 – 85]
Tsk, °C	33,6 $\pm$ 0,4	[32,7 – 34,9]	33,3 $\pm$ 0,3	[32,3 – 34,9]	33,1 $\pm$ 0,4	[32,5 – 36,1]

Protocole 1, n = 8 ; Protocole 2, 3 et 4, n = 16. IMC : indice de masse corporelle ; PAS : pression artérielle systolique ; PAD : pression artérielle diastolique, PAM : pression artérielle moyenne ; Tsk : température cutanée.

**Tableau 1. Variabilité et reproductibilité de la réponse vasculaire cutanée à l'application par iontophorèse d'ACh, de MCh et de SNP**

	ACh		MCh		SNP	
	Inter-site CV (CR)	Inter-day CV (CR)	Inter-site CV (CR)	Inter-day CV (CR)	Inter-site CV (CR)	Inter-day CV (CR)
Baseline SkBF, PU	16,6 (5,4)*	57,2 (8,9)	15,5 (3,1*)	38,0 (15,3)	19,4 (9,1*)	39,3 (4,4)
Baseline CVC, PU/mmHg	13,5 (0,14*)	57,2 (0,15)	10,5 (0,12*)	38,0 (1,15)	10,3 (1,8*)	37,8 (1,2)
CVC <sub>peakI1</sub> , % Baseline	32,1 (289,1)	65,6 (312,1)	11,8 (189,5*)	41,4 (285,3)	5,1 (152,5*)	27,6 (513,1)
CVC <sub>peakI2</sub> , % Baseline	36,6 (343,1)	31,9 (334,6)	36,8 (300,2)	39,4 (241,6)	50,5 (553,2)	41,8 (412,2)
CVC <sub>peakI3</sub> , % Baseline	14,4 (217,2*)	19,7 (189,6*)	24,8 (224,7)	28,9 (143,9)	22,2 (488,2)	27,5 (495,2)
CVC <sub>peakI4</sub> , % Baseline	15,5 (156,5*)	18,6 (165,2*)	12,2 (212,5*)	17,2 (132,1*)	23,1 (552,2)	24,7 (508,2)
CVC <sub>increase</sub> , PU/mmHg	28,2 (1,4)	50,9 (1,6)	35,4 (1,6)	47,4 (1,7)	23,1 (0,5)	60,6 (0,6)
AUC, %s.10 <sup>3</sup>	15,3 (3,1*)	21,2 (2,9*)	13,8 (1,3*)	14,6 (3,3*)	19,2 (2,9*)	35,2 (3,2)

Acétylcholine (ACh), Methacholine (MCh) et Nitroprussiate de sodium (SNP) ont été délivrés par 4 stimulations électriques (I1, I2, I3, I4) de 10 secondes (0,1 mA avec un intervalle entre 2 stimulations de 120 secondes). Baseline SkBF et CVC ont été calculées en moyennant les 120 secondes de signal de débit sanguin cutané (SkBF) et de conductance vasculaire cutanée (CVC) avant I1. CV est le coefficient de variation (en %), CR est le coefficient de reproductibilité. \* Bonne reproductibilité (95 % des différences < 1.96 x l'écart type des différences).

### I.3.5. Synthèse et discussion

Le protocole d'iontophorèse utilisé dans notre travail ne provoque pas de vasodilatation induite par le courant à l'anode. En revanche, nous avons observé une vasodilatation induite par le courant à la cathode qui est un biais pour l'étude de la réactivité vasculaire induite par le SNP.

ACh et MCh, appliquées à l'anode entraînent une augmentation significative de la CVC avec un gain supérieur pour MCh par rapport à ACh. La reproductibilité est bonne (> 95 %) et les coefficients de variation sont inférieurs à 20 % à partir de la troisième stimulation électrique pour ACh et à partir de la quatrième stimulation électrique pour MCh. Pour ACh et MCh nous avons observé une réactivité vasculaire plus faible le matin (11:00) que l'après-midi (16:00) et une diminution significative de la réactivité vasculaire en fonction de l'âge (allure logarithmique). Après iontophorèse de SNP la variabilité est importante et la reproductibilité n'est correcte que pour l'aire sous la courbe de la CVC.

La variabilité des mesures réalisées dans cette étude avec ACh et MCh peut être considérée comme meilleure que celles observées dans la littérature utilisant l'hyperhémie réactive, la chaleur ou une stimulation électrique d'iontophorèse plus importante (Brocx et Drummond 2009; Cracowski et al. 2006; Jadhav et al. 2007; Joannides et al. 2006). Le nombre de stimulations électriques semble notamment jouer un rôle significatif sur la variabilité de la mesure. En effet, après une seule stimulation électrique l'augmentation de la CVC induite par l'ACh a une variabilité importante (> 20 %) (Brocx et Drummond 2009; Henricson et al. 2007). D'autres auteurs ont observé que le fractionnement de la stimulation électrique en stimulations répétées et de faible intensité, améliorerait la reproductibilité de la vasodilatation induite par l'ACh (Jadhav et al. 2007).

Les résultats de cette étude nous imposent également de prendre en compte, dans nos futurs travaux, la variabilité circadienne de la réactivité vasculaire et de comparer uniquement les résultats de tests réalisés à la même heure. En effet, notre travail confirme les résultats obtenus par Elherik et al. (2002) mettant en évidence une atténuation de la FMD (*flow mediated dilation*) de l'artère brachiale mesurée le matin par rapport à l'après-midi. Cette diminution de la réactivité vasculaire pourrait être liée à des variations circadiennes de la production de substances vasoactives telles que le NO et l'endothéline-1 (Elherik et al. 2002). L'âge est également un facteur important de diminution de la vasodilatation induite par ACh et MCh qui doit être pris en compte pour diminuer la variabilité inter-sujet.

L'utilisation de MCh semble intéressante pour l'évaluation de la réactivité vasculaire du fait notamment de sa stabilité en solution et d'une faible variabilité de la vasodilatation induite par iontophorèse de MCh. Néanmoins, la corrélation entre les résultats obtenus avec la méthode laser-Doppler couplée à l'iontophorèse et ceux observés avec des méthodes de référence (FMD) a été décrite avec l'ACh (Debbabi et al. 2009) mais pas avec MCh. L'intérêt de MCh pour l'évaluation de la réactivité vasculaire mérite d'être confirmé.

## I.4. Synthèse des résultats obtenus chez l'homme

L'ensemble des travaux réalisés chez l'homme sain a mis en évidence que la PTS était, en l'absence de contrainte psychologique, physique ou environnementale surajoutée, un stress suffisant pour induire une dysfonction vasculaire. Cette dysfonction a été objectivée par des modifications de la vasomotricité (diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium et modification de la réponse physiologique locale au froid) mais aussi par une augmentation de la concentration plasmatique de marqueurs de l'activation endothéliale et de l'endothéline-1. La diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium et la dégradation de la vasodilatation protectrice lors de l'exposition locale au froid suggèrent que la privation totale le sommeil altère les voies endothéliales de production de substances vasodilatatrices. Nous vérifierons cette hypothèse dans nos prochains travaux chez l'animal en nous intéressant plus particulièrement aux effets de la PTS sur la vasodilatation dépendante des voies du NO et de la prostacycline (PGI<sub>2</sub>).

Un autre mécanisme potentiel de la diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium est l'augmentation de la production de métabolites vasoconstricteurs comme ET-1. Cependant, nous n'avons observé une augmentation d'ET-1 que dans une seule étude, après 29 heures d'éveil continu. ET-1 ayant une action paracrine, il est difficile de mettre en évidence des variations de sa concentration plasmatique.

Des modifications de la pression artérielle et de l'activité du système nerveux autonome ont également été observées mais de façon plus tardive par rapport aux modifications de la fonction vasculaire. Il semble donc que les modifications de la pression artérielle ne soient pas la cause de la diminution de la réactivité vasculaire observée. Cette hypothèse sera également vérifiée dans la seconde partie de nos travaux.

En revanche, les modifications de la vasomotricité sont associées à des modifications immuno-inflammatoires, en particulier une production accrue de PGE<sub>2</sub> et d'ARNm codant pour le TNF- $\alpha$  et son récepteur soluble, et de façon plus tardive par l'augmentation des concentrations plasmatiques de TNF- $\alpha$ . L'augmentation de la concentration plasmatique de cytokines pro-inflammatoires, observée dans nos travaux, est une source potentielle de diminution de la biodisponibilité du NO et d'augmentation d'ET-1.

## **II. Deuxième partie : rôle du système nerveux autonome et de l'activité des eNOS et des COX-1 dans la diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium induite par la privation totale de sommeil.**

### **II.1. Objectifs de l'étude**

La seconde partie des travaux expérimentaux a été réalisée chez le rat et complète les études réalisées chez l'homme sain en ayant comme objectif d'identifier certaines voies et supports biochimiques impliqués dans la dysfonction vasculaire observée après la PTS. Les objectifs spécifiques étaient d'évaluer :

- l'impact du protocole de privation de sommeil utilisé sur la pression artérielle, la fréquence cardiaque et l'activité du système nerveux autonome (SNA) ;
- l'impact des modifications de la pression artérielle induite par la privation de sommeil sur la réactivité vasculaire ;
- l'impact de la privation de sommeil sur l'activité des eNOS et des COX-1 ;
- la réponse endocrinienne et inflammatoire à la privation totale de sommeil.

### **II.2. Eléments de choix méthodologique**

**Le recours au modèle animal** permet deux types d'études non autorisées chez l'homme telles que la réalisation de blocages pharmacologiques, notamment la sympathectomie chimique et le blocage de l'activité des NOS et des COXs. De plus, l'utilisation d'un modèle animal permet de réaliser des enregistrements de la pression artérielle aortique et de la fréquence cardiaque par télémétrie. Les effets de la privation de sommeil sur la réactivité vasculaire étant modérés et peut-être liés à des modulations immuno-inflammatoires, nous avons divisé notre travail en plusieurs protocoles distincts et fait le choix de ne pas évaluer la réactivité vasculaire chez des animaux équipés de capteurs de télémétrie chroniquement implantés (source potentielle d'inflammation) (Weiergraber et al. 2005). Nous avons également préféré ne pas réaliser de prélèvement biologique chez des animaux préalablement anesthésiés pour l'étude de la réactivité vasculaire.

**Critères du modèle de privation de sommeil.** Nous avons privilégié un modèle adapté à des privations de sommeil de plus de 24 heures et qui permette à l'animal de se nourrir et de s'abreuver *ad libitum*. Nous

avons également rejeté tous les modèles de privation de sommeil utilisant un choc électrique ou un contact avec de l'eau car ces méthodes constituent un facteur de stress (Bergmann et al. 1989; Rechtschaffen et al. 1999).

**La méthode d'évaluation in-vivo de la réactivité vasculaire utilisée a été volontairement non invasive**, afin de soumettre l'animal à une sédation la plus faible possible. L'anesthésie est en effet un facteur de diminution de la réactivité vasculaire du fait de l'hypotension artérielle qu'elle entraîne mais également du fait d'effets propres des produits anesthésiants sur l'endothélium et les cellules musculaires lisses (Fizanne et al. 2003; Loeb et al. 1997). La kétamine notamment inhibe l'activité des NOS, la vasodilatation induite par l'ACh (Loeb et al. 1997) et l'hyperhémie réactive (Rastaldo et al. 2001). L'isoflurane modifie également la vasodilatation dépendante de la voie du NO (Fizanne et al. 2003; Loeb et al. 1997). Le thiopental et le pentobarbital inhibent la vasodilatation induite par la voie des EDHFs (Loeb et al. 1997). Cependant, le faible niveau d'anesthésie n'a pas permis la pose de cathéters en raison de la douleur induite par les incisions qui entraîne une augmentation de la pression artérielle, de la fréquence cardiaque et réveille l'animal.

Dans notre travail, nous avons cependant choisi d'utiliser de faibles doses de thiopental sodique afin de préserver au maximum les voies du NO et des prostaglandines qui sont les voies prépondérantes de la vasodilatation induite par l'ACh chez des animaux jeunes (Gaubert et al. 2007).

## **II.3. Matériels et méthodes**

### **II.3.1. Animaux**

Les expérimentations ont été réalisées avec des rats Wistar mâles, âgés de 7 à 9 semaines, pesant entre 250 et 350 g (Laboratoire Janvier, le Genest-St-Isle, France). Les rats étaient hébergés dans des conditions environnementales contrôlées ( $22 \pm 2$  °C; humidité  $50 \pm 15$  %) avec un cycle de lumière jour/nuit (12/12, éclairage de la pièce [300 Lux] entre 07:00 et 19:00). Les animaux avaient un accès libre à la nourriture (aliments standards A03, Safe, France) et à l'eau. Tous les animaux étaient accueillis dans l'animalerie au moins 1 semaine avant le début de l'expérimentation. Les procédures expérimentales ont été conduites en accord la législation française (décret 2005-264 du 22 mars 2005) et ont été approuvées par le comité d'éthique de l'Institut de recherche biomédicale des armées (Brétigny-sur-Orge, France).

### II.3.2. Privation de sommeil

La privation de sommeil a été réalisée en utilisant le modèle de la « roue lente » décrit par (Christie et al. 2008). Les rats destinés à être privés de sommeil (PTS) étaient placés à partir de 9 heures du matin, dans une roue d'activité (Lafayette Instruments, IN, USA) active pendant 24 heures selon le rythme suivant : 3 secondes d'activité (ON) et 12 secondes de repos (OFF) à une vitesse de 3 m/min. La distance parcourue était donc inférieure à 1600 m par 24 heures. La roue d'activité est une roue motorisée de 35,56 cm de diamètre et de 10,9 cm de largeur interne pilotée par un logiciel informatique qui permet de contrôler parfaitement la distance parcourue. La roue contient un biberon et une mangeoire facilement accessibles. Dans des travaux précédents, Christie et al. (2008) ont observé que ce modèle produit plus de 93 % d'éveil. Au cours de travaux préliminaires (résultats non présentés) nous avons vérifié ce résultat et observé une durée relative de la période d'éveil égale à  $97,5 \pm 1,4$  % de la période de tests. Les rats étaient préalablement habitués à la roue d'activité pendant 8 jours à raison de 2 périodes de 30 minutes dans la roue inactive pendant les 2 premiers jours puis active pendant les 6 autres jours (rythme : 3 secondes ON-12 secondes OFF).

Dans la seconde condition expérimentale, appelée contrôle cage (CC), les rats étaient hébergés dans des cages standards pendant toute l'expérimentation. Ils étaient cependant manipulés et pesés tous les 2 jours.



Figure 31. Roue d'activité (face + profil).



### **II.3.3. Télémétrie**

#### ***a Procédure chirurgicale***

Les émetteurs de télémétrie permettant l'enregistrement de la pression artérielle (PA), de la fréquence cardiaque (FC) et de la température centrale (Tc) (TA11CTA-F40, Data Sciences Int., St Paul, MN, USA) ont été implantés chirurgicalement 15 jours avant l'expérimentation en respectant une procédure chirurgicale qui garantit une qualité d'enregistrement pendant les périodes d'activité (Sgoifo et al. 1996). Rapidement, les rats (âgés de 5 semaines) étaient analgésiés avec de la buprénorphine (Temgesic, Merck & Co, USA, 0,05mg/kg SC) 20 minutes avant l'incision et anesthésiés avec de l'isoflurane [5 % (induction) et 1-1,5 % (entretien) dans un mélange 80% d'O<sub>2</sub> et 20% de protoxyde d'azote]. Après l'ouverture de l'abdomen, le cathéter pour la mesure de la pression artérielle a été inséré dans l'aorte abdominale, 0,5 cm environ au dessus de la bifurcation aortique, puis collé avec de la colle biologique (Vetbond, 3M, USA). Les deux électrodes permettant d'enregistrer l'ECG étaient fixées pour l'une dans le muscle pectoral droit et pour l'autre dans un muscle peaucier, 1 cm à gauche de l'apophyse xyphoïde. Le corps du transmetteur était inséré dans la cavité abdominale et fixé à la paroi. Après la fermeture de l'incision, les animaux recevaient un traitement antibiotique prophylactique (benzathine benzylpenicilline, Extencilline, Sanofi-adventis, France, 60000 UI, im, 1 dose unique) et une analgésie post opératoire (carprofen, Rimadyl, Pfizer Animal Health, 4 mg/kg/j pendant 3 jours, sc). Après l'opération, les rats étaient placés dans une cage individuelle.

#### ***b Recueil et analyse des données***

Les données ont été enregistrées pendant la situation expérimentale (PTS ou CC), mais aussi pendant les 24 heures avant et après en utilisant le logiciel Dataquest ART Acquisition program (Data Science), avec une fréquence d'échantillonnage de 500 Hz. Les plaques réceptrices pour la télémétrie étaient placées en avant de la roue afin d'obtenir un signal de qualité, non perturbé par l'activité électrique du moteur de la roue. Cependant ce positionnement des plaques réceptrices a rendu inopérant la mesure de l'activité des animaux, basée sur leur déplacement au dessus de la plaque. Les fichiers de données au format ASCII ont été exportés pour être analysés avec le logiciel Labchart (Adinstruments, Oxford, UK). Les signaux recueillis étant souvent brouillés lors des 3 secondes d'activité de la roue. Nous avons isolé pour analyse des périodes de 10 secondes sur les 12 secondes d'inactivité de la roue. Sur ces périodes, les pics R des complexes QRS de l'ECG et les pics de pression artérielle ont été détectés afin de calculer, à partir des complexes sans artéfacts : les périodes RR, la fréquence cardiaque, la pression artérielle systolique (PAS), diastolique (PAD) et moyenne (PAM) et l'écart type des périodes RR ( $SD_{NN}$ ) et de la PAS ( $SD_{PAS}$ ). Le nombre de points de mesure obtenu par période de 10 secondes (60 environ) n'était pas suffisant pour conduire une analyse spectrale de la FC ou de PAS. Pour chacune de ces variables nous avons ensuite calculé la valeur moyenne

obtenue au cours de la période lumière allumée (07:00-19:00) et au cours de la période lumière éteinte (19:00-07:00). Les données obtenues avec les animaux CC ont été traitées de la même façon.

### II.3.4. Evaluation de la réactivité vasculaire

#### *a Instrumentation*

Le dos des animaux était préalablement dépilé une crème dépilatoire (Gel-crème Veet, Reckitt Benckisser, USA) afin de créer une zone glabre pour la mesure des débits sanguins cutanés et l'application locale de courant. Cette dépilation a été réalisée deux jours avant l'expérimentation afin d'éviter des biais liés à une irritation ou une inflammation locale de la peau. Pour la mesure de la réactivité vasculaire, les animaux ont été légèrement anesthésiés avec du phénobarbital sodique (Nesdonal, Rhône Mérieux, France, 45 mg/kg, ip) et placés en décubitus ventral dans un vivarium chauffé ( $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ) afin de maintenir la température rectale (MLT1403, AdInstrument, Royaume uni) stable ( $37,7 \pm 0,5$ ) tout au long de l'expérimentation. Les débits sanguins cutanés étaient mesurés avec un moniteur laser-Doppler (PF 5001 Master, Periflux, Perimed, Suède) relié à deux sondes laser-Doppler, couplées à des électrodes d'iontophorèse (PF 481-1, Perimed), fixées avec un adhésif double face sur la peau du rat préalablement dégraissée (alcool modifié, 70%). Les sondes étaient chauffées à  $33^\circ\text{C}$ .

Toutes les substances vasoactives utilisées étaient préparées *extemporanées*, dissoutes dans de l'eau désionisée et appliquées (0,2ml) sur l'éponge ( $1,2 \text{ cm}^2$ ) de la sonde d'iontophorèse. La seconde électrode, passive était placée sur les membres postérieurs du rat (Garry et al. 2005; Gohin et al. 2011). Un générateur permettait d'appliquer un courant électrique d'intensité contrôlée à la cathode ou à l'anode selon la polarité de la solution à appliquer. Toutes les drogues et le solvant étaient administrés par une stimulation électrique unique (30 secondes, 0,1 mA). Contrairement à l'homme, nous n'utilisons pas de stimulations multiples car elles entraînent chez le rat des contractions musculaires qui perturbent la mesure. La réactivité vasculaire dépendante de l'endothélium était évaluée en appliquant une solution de chlorure d'acétylcholine (ACh, 2%, 5.5 mM, Sigma-Aldrich) et la réactivité vasculaire indépendante de l'endothélium par l'application de nitroprussiate de sodium (SNP, 1%, 67mM, SERB laboratory, Paris, France). L'effet des courants de cathode et d'anode sur les débits sanguins cutanés, appelé CIV (*Current Induced Vasodilation*) a été ensuite évalué sur les mêmes animaux par iontophorèse d'eau désionisée uniquement (Gohin et al. 2011).

Le signal de **débit sanguin cutané (SkBF, Skin Blood Flow)**, exprimé en unité arbitraire de perfusion (PU), a été numérisé avec une fréquence d'échantillonnage de 200 Hz (PowerLab, Adinstruments, Oxford, UK). L'enregistrement débutait par une période de 5 minutes de période basale et se poursuivait 15 minutes après l'application du courant électrique. L'enregistrement ne débutait que lorsque le débit sanguin cutané était stable pendant la période basale et compris entre 50 et 100 PU.

La pression artérielle systolique (PAS) était enregistrée de façon non invasive à la queue des rats analgésiés (Kurtz et al. 2005) à la fin de l'expérimentation (ML125 NIBP/R, Adinstruments, Oxford, UK).

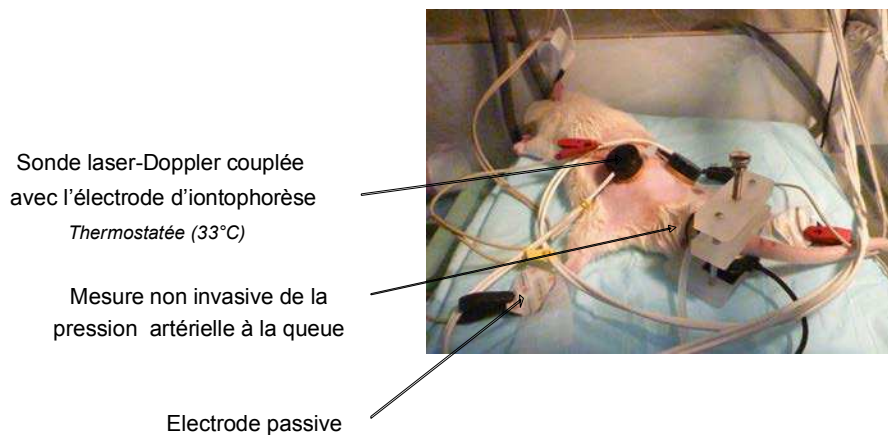


Figure 32. Instrumentation des rats pour l'étude de la réactivité vasculaire

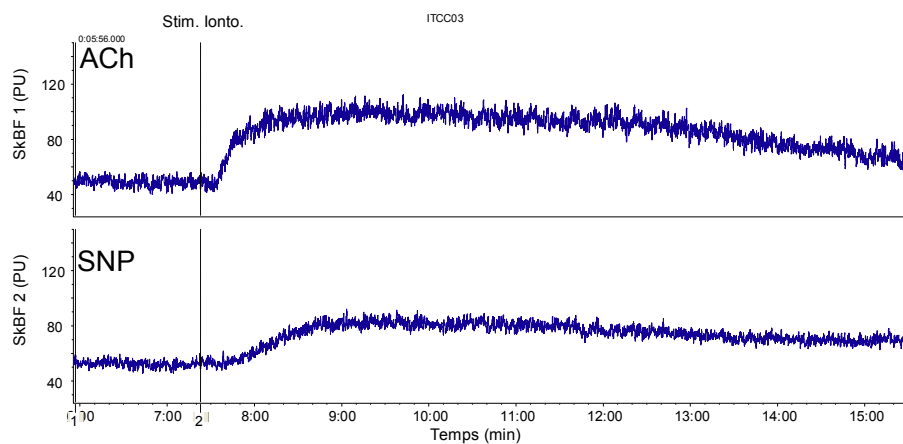


Figure 33. Exemple de modification du débit sanguin cutané (SkBF) après application par iontophorèse (Stim. Ionto.) d'acétylcholine (ACh) et de nitroprussiate de sodium (SNP). 1. début d'enregistrement ; 2. Stim. Ionto.

### *b Analyse des données*

Le signal de débit sanguin cutané (SkBF) a été moyenné toutes les 10 secondes afin de réduire les effets de la variabilité instantanée du signal appelé vasomotion. La ligne de base (*Baseline*) a été calculée en moyennant les 2 minutes de signal avant l'application du courant électrique. La vasodilatation induite par le courant (CIV) a été calculée comme l'augmentation maximale de débit sanguin cutané en réponse à l'application de courant d'anode ou le courant de cathode. La vasodilatation induite par l'ACh (dépendante de l'endothélium) et par le SNP (indépendante de l'endothélium) a été calculée comme l'augmentation maximale de débit sanguin cutané en réponse à l'application d'ACh et de SNP. Afin d'individualiser les

effets propres à l'ACh et au SNP nous avons soustrait, à la vasodilatation observée, la vasodilatation induite par le courant (CIV) d'anode pour l'ACh et de cathode pour le SNP. Les résultats ont été exprimés en % de la Baseline (Roustit et al. 2009).

### II.3.5. Protocoles expérimentaux

Nous avons réalisé 4 protocoles expérimentaux en utilisant des groupes d'animaux différents.

#### a Protocole 1 : Rôle du SNA dans les effets de la PTS sur la PA

Dans ce premier protocole, nous avons évalué par télémétrie, l'effet de la privation totale de sommeil (PTS) sur la pression artérielle, la fréquence cardiaque et la température centrale. Les rats privés de sommeil (PTS) ou contrôle cage (CC) ont été enregistrés pendant les 24 heures de situation expérimentale mais aussi pendant les 24 heures avant et après. Pour évaluer l'effet des modifications de l'activité du SNA, un premier groupe de rats a été préalablement sympathectomisés par injection de réserpine (5 mg/kg, ip, Sigma-Aldrich), 24 heures avant puis tous les jours pendant la situation expérimentale (PTS ou CC). La demi-vie de la réserpine est d'environ 20 heures (Sander et al. 1997; Slovut et al. 2004). La réserpine (5mg) a été préalablement dissoute dans une solution de 20 µl d'acide ascorbique et diluée dans 1 ml de sérum physiologique (0,9%). Le second groupe de rats (Contrôle) a été injecté selon le même protocole avec une solution contenant uniquement le solvant. L'efficacité de la sympathectomie a été contrôlée à la fin de l'expérimentation par l'injection de tyramine (250 µg/kg, iv, Sigma-Aldrich) qui entraîne une libération de noradrénaline par l'innervation sympathique terminale (Fromy et al. 2007; Rice et al. 1987; Sander et al. 1997). La tyramine entraîne 15 minutes après l'injection, une augmentation de la PAS de  $19 \pm 4$  mmHg chez des rats traités par réserpine et de  $56 \pm 5$  mmHg chez des rats contrôle ( $p < 0,01$ ). L'administration de réserpine permet donc de vérifier l'efficacité de la sympathectomie (figure 35).

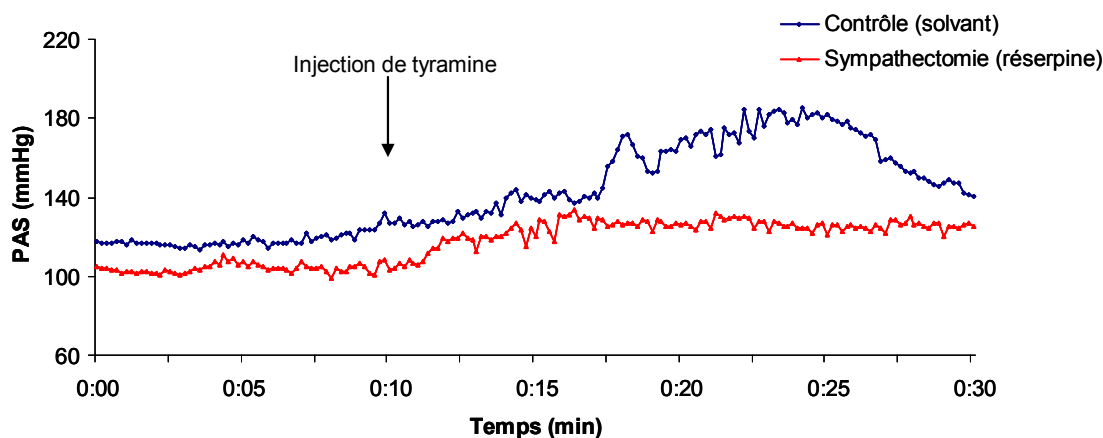


Figure 34. Exemple de modification de la pression artérielle systolique (PAS) après injection de tyramine chez des rats traités par réserpine (sympathectomie) ou par le solvant (contrôle).

### ***b Protocole 2 : rôle du SNA et de la PA dans les effets de la PTS sur la réactivité vasculaire***

Nous avons évalué l'effet de 24 heures de PTS sur la vasodilatation induite par l'ACh, le SNP, le courant d'anode et le courant de cathode chez des rats sympathectomisés selon le protocole précédent et chez des rats contrôle ayant reçu le solvant. Comme dans le protocole précédent, l'efficacité de la sympathectomie a été vérifiée par injection de tyramine.

### ***c Protocole 3 : effet de la PTS sur l'activité des voies de synthèse du NO et de PGI<sub>2</sub>***

Nous avons utilisé une approche pharmacologique afin d'évaluer l'effet de la privation de sommeil sur la réactivité vasculaire après inhibition de la synthèse du NO et de la prostacycline (PGI<sub>2</sub>). La vasodilatation induite par l'ACh, le SNP, le courant d'anode et le courant de cathode a été évaluée chez des rats préalablement traités (30 minutes avant l'évaluation de la réactivité vasculaire) avec un inhibiteur non-spécifique des cyclooxygénases (indométhacine, **Indo.**, 5mg/kg, ip, Sigma-aldrich), ou un inhibiteur non-spécifique des NO synthases (N<sup>G</sup>-Nitro-L-arginine, **L-NNA**, 20 mg/kg, ip, Sigma-Aldrich) ou une combinaison des deux (**Indo. + L-NNA**) ou l'injection de sérum physiologique (**Sérum Phy.**, 0,3 ml, ip) (Garry et al. 2005; Gaubert et al. 2007; Irikura et al. 1994).

### ***d Protocole 4 : réponse endocrinienne et inflammatoire***

Dans ce dernier protocole, les animaux ont été euthanasiés immédiatement après la fin de la situation expérimentale (PTS ou CC) et les protéinesci-dessous ont été dosées dans le sang. Contrairement à l'homme, il n'existe pas de kit ultra sensible pour IL-6 et TNF- $\alpha$  chez le rat. La 8-isoprostane (8-iso Prostaglandine F<sub>2 $\alpha$</sub> ) est un marqueur indirect du stress oxydatif (Yi et al. 2006).

**Tableau 12. Dosages sanguin des protéines.**

<b>Variables</b>	<b>Techniques</b>	<b>Milieus</b>	<b>Marques</b>	<b>Limites de detection</b>
MCP-1	ELISA	plasma	Ray Biotech, USA	15 pg/ml
Endothéline (ET-1)	ELISA/RIA	plasma	Cusabio, Chine	1,6 pg/ml
IL-6	ELISA	plasma	R&D Systems, USA	21 pg/ml
IL-1 $\beta$	ELISA	plasma	R&D Systems, USA	5 pg/ml
TNF- $\alpha$	ELISA	plasma	R&D Systems, USA	5 pg/ml
Corticostérone	RIA	plasma	IDS, UK	5,5 ng/ml
8 isoprostane	ELISA	plasma	Cayman, USA	2,7 pg/ml
Noradrénaline	ELISA	plasma	LDN, UK	40 pg/ml
Adrénaline	ELISA	plasma	LND, UK	10 pg/ml

Abréviations : ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*; RIA : *radioimmunoassay*, sTNF-RI : *soluble TNF receptor 1*, 8h : prélèvement à 8 h pendant J2, J4 et J5 ; cinétique : prélèvement à 8h, 11h, 14h, 17h, 20h et 23h pendant J2 et J4.

### II.3.6. Analyses statistiques

Les résultats ont été présentés sous la forme moyenne  $\pm$  SEM. Le seuil de significativité a été fixé à  $p < 0,05$ . Dans le **protocole 1**, nous avons comparé les résultats au cours de la situation expérimentale (PTS ou CC) et dès 24 heures après, avec les résultats obtenus au cours de la journée “avant”, par une analyse de variance à mesures répétées sur les rangs (ANOVA de Friedman non paramétrique), chaque animal étant son propre témoin. En cas d’effet significatif, les valeurs obtenues aux mêmes heures ont été comparées avec un test de Wilcoxon. **Protocoles 2 et 3**. Nous avons comparé les résultats entre les groupes en réalisant une analyse de variance sur les rangs (ANOVA de Kruskal-Wallis). En cas d’effet significatif nous avons comparé les résultats des situations expérimentales (PTS vs. CC) et l’effet des traitements (L-NNA, Indo. réserpine... vs. contrôle ou Sérum phy.) en utilisant un test de Mann-Whitney sur les rangs. **Protocole 4**, les résultats des deux groupes (PTS et CC) ont été comparés avec un test de Mann-Whitney.

## II.4. Résultats

### II.4.1. Effet de la PTS sur le PA et le système nerveux autonome

Chez les animaux contrôles, nous avons observé au cours de la nuit, correspondant à la période d’activité du rat, une augmentation de la PAS, de la PAM et de la fréquence cardiaque ( $p < 0,05$ ). Chez les animaux privés de sommeil, la pression artérielle (PAM et PAS) augmente pendant la privation par rapport à la journée avant (cf. Figure 35 et Figure 36). Aucune différence n’a été observée entre les journées avant et après ( $p < 0,05$ ). Chez les animaux sympathectomisés par réserpine, nous n’avons pas mis en évidence de différence entre les valeurs observées le jour et la nuit, ni d’effet de la privation de sommeil. Concernant la température centrale nous avons observé chez les rats traités avec le solvant (contrôle) et sympathectomisés une augmentation de la température centrale la nuit par rapport à la journée et au cours de la journée de privation de sommeil par rapport à la journée avant ( $p < 0,05$  pour tous).

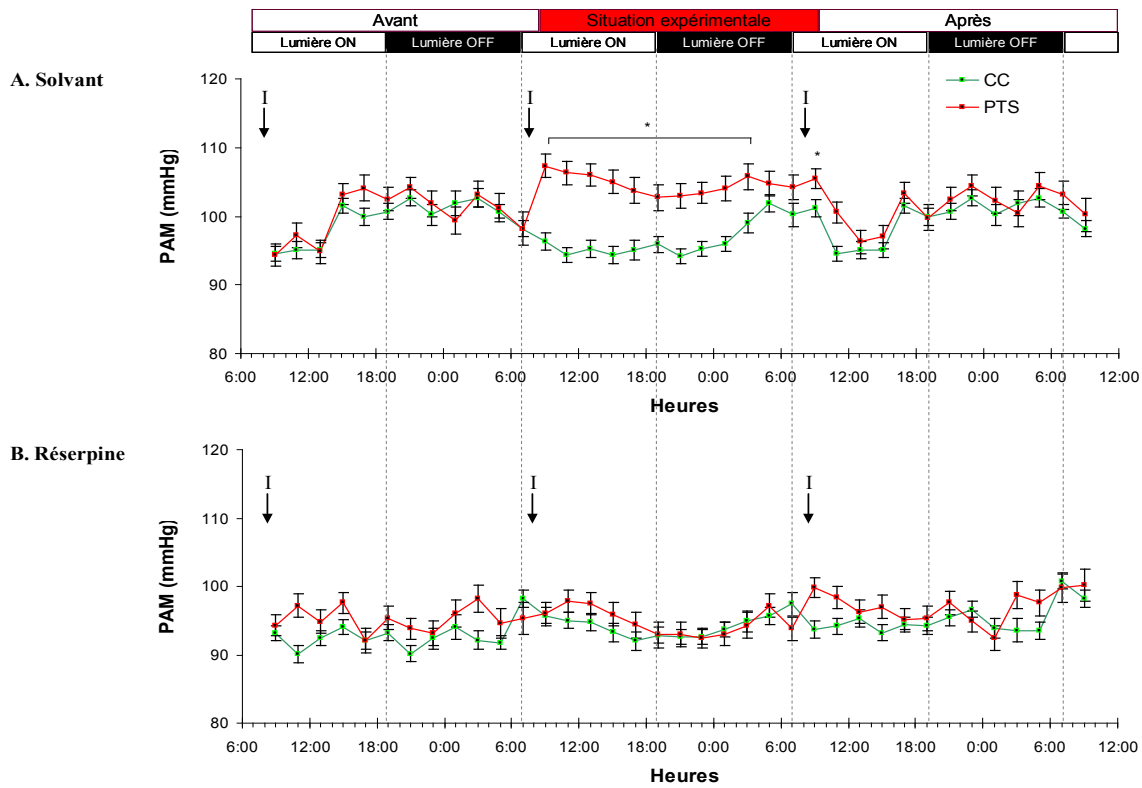


Figure 35. Effet de la privation de sommeil sur la pression artérielle moyenne (PAM) chez des rats traités (A) par le solvant ou (B) par la réserpine (sympathectomie). I : injection. \* différence par rapport à avant (même heure),  $p < 0,05$ .

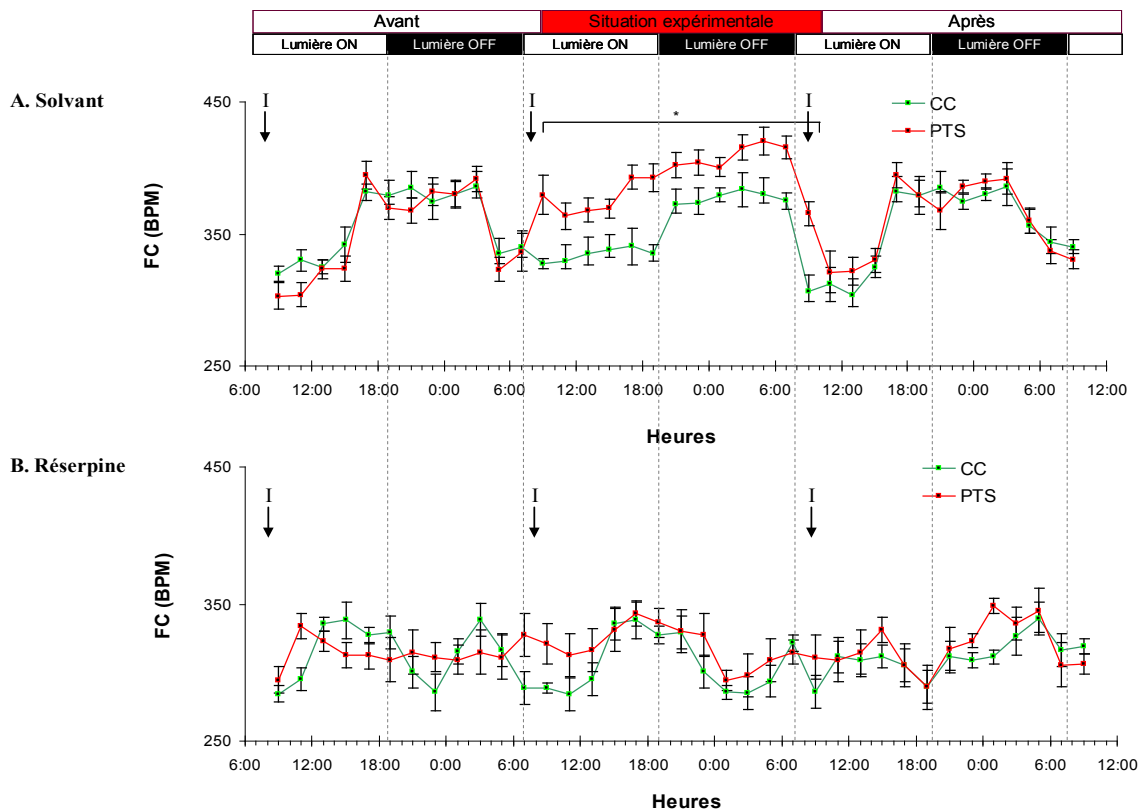


Figure 36. Effet de la privation de sommeil sur la fréquence cardiaque (FC) chez des rats traités (A) par le solvant ou (B) par la réserpine (sympathectomie). I : injection. \* différence par rapport à avant (même heure),  $p < 0,05$ .

**Tableau 1. Evolution des variables cardiovasculaires et de la température centrale au cours de la journée avant privation totale de sommeil (PTS), pendant et après, chez des animaux (A) traités par le solvant et (B) sympathectomisés (traités par la réserpine).**

**A. Solvant**

	Avant		Privation de sommeil		Après		Friedman P
	Jour 07:00 – 19:00	Nuit 19:00 – 07:00	Jour 07:00 – 19:00	Nuit 19:00 – 07:00	Jour 07:00 – 19:00	Nuit 19:00 – 07:00	
PAS	112,6 ± 2,9	120,5 ± 2,9	125,9 ± 6,4*	131,5 ± 7,9*	114,8 ± 4,45	122,8 ± 3,9	0,02
SD <sub>PAS</sub>	9,9 ± 0,7	6,9 ± 0,6	5,4 ± 1,7*	5,4 ± 3,1*	9,6 ± 0,5	7,1 ± 0,6	0,02
PAM	90,8 ± 2,6	95,1 ± 2,4\$	100,1 ± 2,9*	104,4 ± 2,7*	93,9 ± 4,2	96,2 ± 4,0	0,03
PAD	76,8 ± 3,1	80,2 ± 3,6	82,5 ± 2,4	86,9 ± 5,3	79,3 ± 2,9	80,8 ± 3,4	ns
FC	337 ± 21	388 ± 20	372 ± 92*	394 ± 21	337 ± 32	372 ± 33	0,03
SD <sub>NN</sub>	10,5 ± 2,0	8,1 ± 1,2	4,8 ± 1,8*	6,3 ± 2,3	9,2 ± 1,8	7,9 ± 1,5	0,02
Température centrale	37,5 ± 0,5	38,6 ± 0,4	38,4 ± 0,4*	38,7 ± 0,2	37,5 ± 0,3	38,3 ± 0,2	0,02

**B. Réserpine**

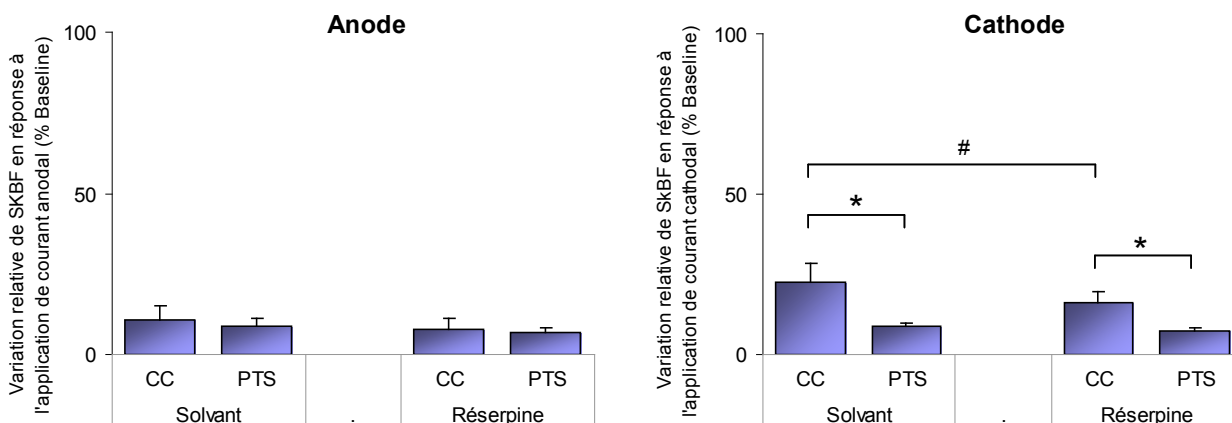
	Avant		Privation de sommeil		Après		Friedman P
	Jour 07:00 – 19:00	Nuit 19:00 – 07:00	Jour 07:00 – 19:00	Nuit 19:00 – 07:00	Jour 07:00 – 19:00	Nuit 19:00 – 07:00	
PAS	108,5 ± 1,7	108,3 ± 0,9	110,5 ± 1,5	109,7 ± 1,7	110,9 ± 0,8	108,8 ± 1,1	ns
SD <sub>PAS</sub>	10,1 ± 1,7	15,4 ± 2,4	12,8 ± 2,3	11,3 ± 2,1	16,7 ± 0,5	9,9 ± 0,6	ns
PAM	84,8 ± 1,4	88,3 ± 1,0	89,4 ± 2,1	91,2 ± 0,9	89,9 ± 2,2	88,5 ± 1,2	ns
PAD	72,4 ± 1,2	78,2 ± 2,1	79,2 ± 1,2	82,1 ± 1,1	79,0 ± 1,3	78,5 ± 1,9	ns
FC	310 ± 20	347 ± 19	340 ± 26	352 ± 24	318 ± 16	363 ± 25	ns
SD <sub>NN</sub>	12,2 ± 0,1	11,9 ± 0,1	15,7 ± 0,1	15,8 ± 0,1	15,9 ± 0,1	16,1 ± 0,1	ns
Température Centrale	37,4 ± 0,4	38,7 ± 0,4	38,2 ± 0,2	38,0 ± 0,3	37,3 ± 0,4	38,1 ± 0,2	0,02

Résultats présentés : moyenne ± SEM. Abréviations : pression artérielle systolique (PAS), pression artérielle diastolique (PAD), pression artérielle moyenne (PAM) , écart type (SD), fréquence cardiaque (FC). \* différence par rapport à avant, p<0,05 (pour la même période de la journée).



### II.4.2. Effet de la PTS sur la vasodilatation induite par le courant

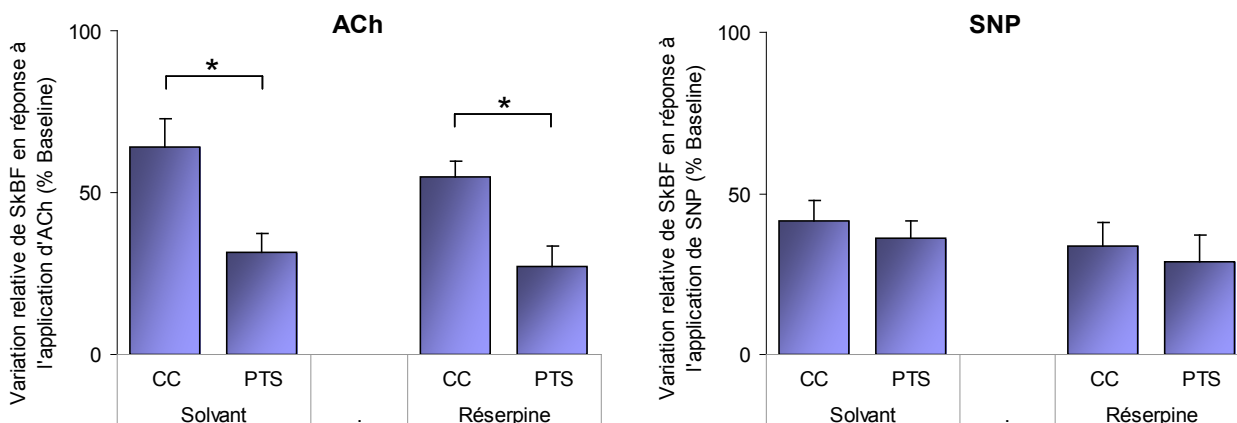
La variation relative de SkBF induite par le courant d'anode était égale à  $10,8 \pm 4,1$  % pour les animaux CC. Nous n'avons pas observé d'effet de la privation de sommeil ou de la sympathectomie sur la vasodilatation induite par le courant d'anode. Par contre, nous avons observé une vasodilatation induite par le courant de cathode plus importante ( $22,6 \pm 5,9$  % pour les animaux CC) avec un effet significatif de la privation de sommeil ( $p < 0,01$ ) et de la sympathectomie ( $p < 0,01$ ).



**Figure 37.** Effet de la privation de sommeil sur la variation relative de SkBF induite par l'ACh et le SNP sur des animaux sympathectomisés (Réserpine) et des animaux traités avec le Solvant.\* différence par rapport à contrôle cage (CC),  $p < 0,05$  ; # différence par rapport au solvant,  $p < 0,05$ .  $n=8$ .

### II.4.3. Effet de la PTS sur la vasodilatation induite par ACh et SNP

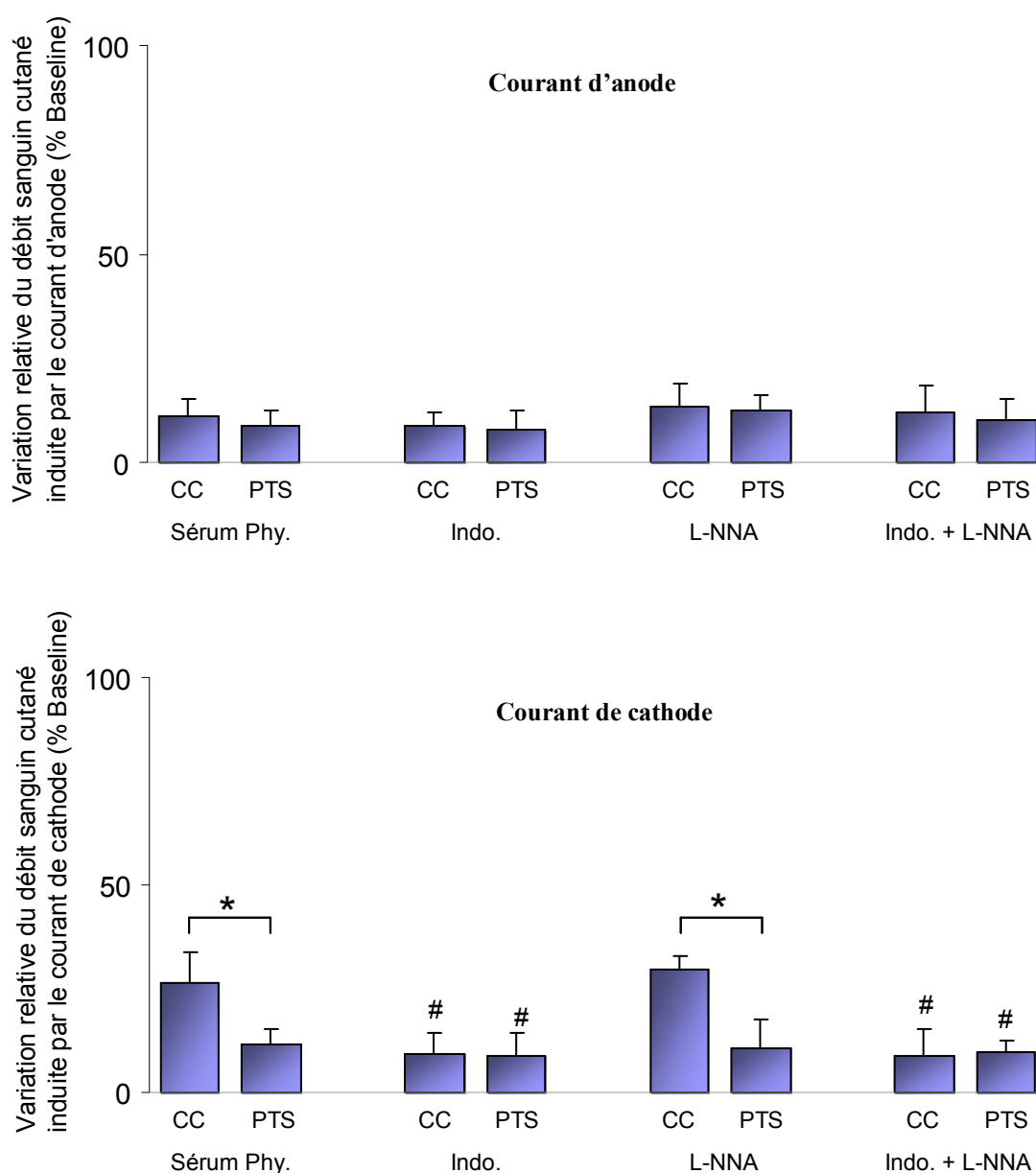
La privation de sommeil entraîne une diminution de la vasodilatation induite par l'ACh ( $P < 0,05$ ) chez les animaux traités par le solvant et les animaux traités par réserpine (Sympathectomie). Ce phénomène n'a pas été observé pour la vasodilatation induite par le SNP (Figure 39).



**Figure 38.** Effet de la privation de sommeil sur la variation relative de SkBf induite par l'ACh et le SNP sur des animaux sympathectomisés (réserpine) et des animaux traités avec le solvant. \* différence par rapport à contrôle cage (CC),  $p < 0,05$  ; # différence par rapport au solvant,  $p < 0,05$ .  $n=8$ .

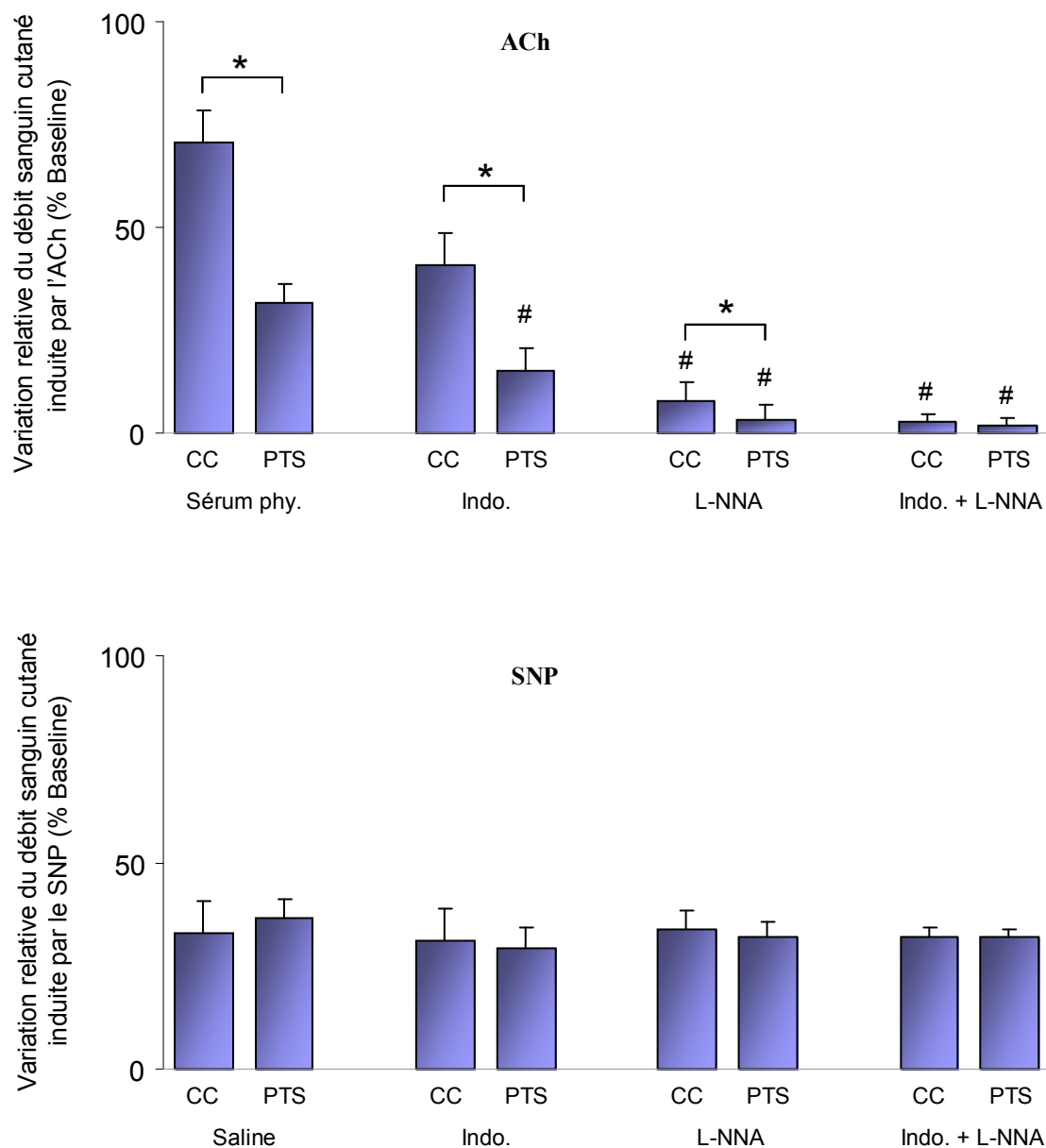
#### II.4.4. Effet de l'inhibition des voies du NO et PGI<sub>2</sub>

Nous n'avons pas observé d'effet de la PTS ou d'injection de bloquer pharmacologique (indométhacine ou L-NNA) sur la vasodilatation induite par le courant d'anode. La vasodilatation induite par le courant de cathode étant significativement atténuée après privation de sommeil et après traitement par indométacine. L'injection de L-NNA n'a pas eu d'effet sur la vasodilatation induite par le courant de cathode (Figure 40).



**Figure 39. Effet de la privation de sommeil sur la variation relative de SkBF induite par le courant (cathode et anode) chez des animaux préalablement traités avec du sérum physiologique, de l'indométhacine (Indo.), du N<sup>G</sup>-Nitro-L-arginine (L-NNA) ou une combinaison L-NNA + Indo. \* différence par rapport à contrôle cage (CC), p<0,05 ; # différence par rapport au solvant, p<0,05. n=8.**

La vasodilatation induite par ACh était faiblement ( $-42,7 \pm 7,6 \%$ ) diminuée après traitement par indométhacine et fortement diminuée ( $-89,1 \pm 2,5 \%$ ) après traitement par L-NNA (Figure 40). Nous avons observé un effet significatif de la privation de sommeil chez les rats traités par sérum physiologique, par indométhacine ou par L-NNA. Nous n'avons pas observé d'effet de la privation de sommeil, de l'injection d'indométhacine ou de L-NNA sur la vasodilatation induite par le SNP.



**Figure 40.** Effet de la privation de sommeil sur la variation relative de SkBF induite par l'ACh et le SNP sur des animaux préalablement traités avec du sérum physiologique, de l'indométacine (Indo.), du N<sup>G</sup>-Nitro-L-arginine (L-NNA) ou une combinaison Indo. + L-NNA. \* différence par rapport à contrôle cage (CC),  $p < 0,05$  ; # différence par rapport au solvant,  $p < 0,05$ .  $n=8$ .

#### II.4.5. Réponse endocrinienne et inflammatoire

Nous avons observé chez les animaux privés de sommeil, une augmentation significative des concentrations plasmatiques d'IL-6 ( $p < 0,01$ ), de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,01$ ) et de noradrénaline ( $p < 0,05$ ). Nous n'avons pas mis en évidence d'effet significatif de la PTS sur les concentrations plasmatiques de MCP-1, l'endothéline-1, l'adrénaline, la corticostérone et la 8-isoprostane. Pour IL-1 $\beta$ , 75 % des valeurs observées étaient en dessous du seuil de sensibilité du test.

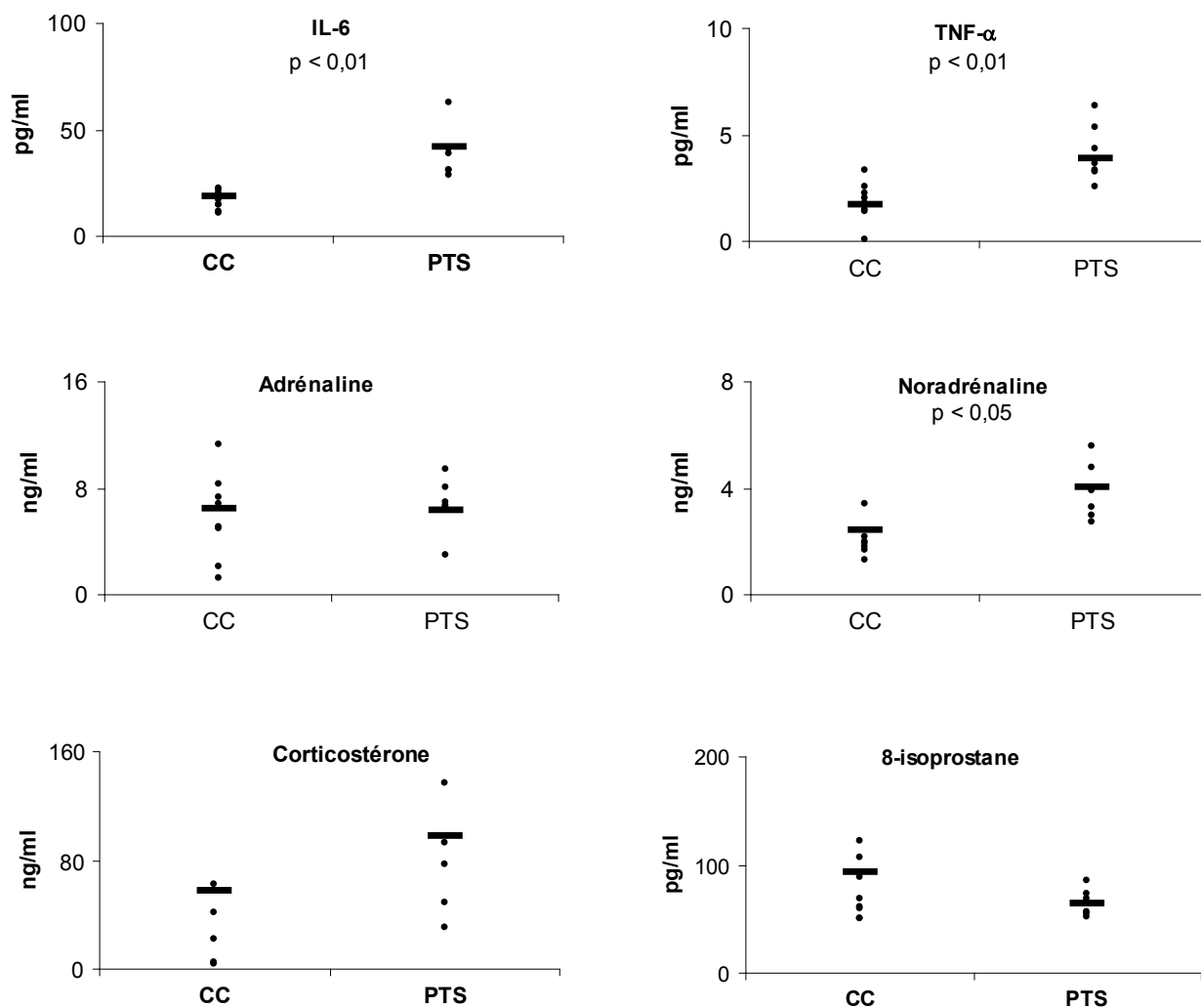


Figure 41. Effet de la privation totale de sommeil (PTS) sur les concentrations plasmatiques d'IL-6, de TNF- $\alpha$ , d'adrénaline, de noradrénaline, de corticostérone et de 8-isoprostane.  $n=8$ .

## II.5. Synthèse et discussion

Nos travaux chez l'animal ont mis en évidence après 24 heures d'éveil continu :

- une augmentation de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque liée à une augmentation de l'activité du système nerveux sympathique et de la noradrénaline ;
- une diminution de la réactivité vasculaire dépendante de l'endothélium (ACh) et de la vasodilatation induite par le courant de cathode qui persistent après sympathectomie et qui ne sont donc pas la conséquence de l'augmentation de la PA et de l'activité sympathique ;
- une diminution de la vasodilatation dépendante de la voie du NO et de PGI<sub>2</sub> ;
- des modifications immuno-inflammatoires dominées par une augmentation de la concentration plasmatique de d'I<sub>l</sub>-6 et de TNF- $\alpha$ .

Dans nos conditions expérimentales, la privation totale de sommeil (PTS) n'a pas entraîné d'augmentation de la corticostérone, contrairement à ce qui avait été préalablement observé (Sgoifo et al. 2006). Ce résultat, qui traduit l'absence de stress surajouté à la privation de sommeil, n'a été possible qu'en modifiant le protocole d'habituation à la roue d'activité décrit par Christie et al. (2008) qui fut porté de 2 à 8 jours.

Peu d'études des effets vasculaires de la PTS ont été réalisées chez le rat. Dans les études précédentes, la durée de privation de sommeil était plus longue (2 à 4 jours) (Sgoifo et al. 2006; Zenko et al. 2000). Nos travaux ont montré qu'une durée courte (24 heures) d'éveil continu chez le rat est un stress suffisant pour entraîner une modification de la fonction vasculaire. Ce travail chez l'animal a également permis de valider l'une de nos hypothèses émise après nos travaux chez l'homme. En effet, nous avons observé une diminution de la vasodilatation induite par l'ACh chez des animaux sympathectomisés. Ce résultat démontre que l'augmentation de la PA et de l'activité du système nerveux sympathique n'est pas responsable de l'altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium.

D'autre part, nos résultats confirment la voie prépondérante du NO dans la vasodilatation induite par l'ACh chez le rat jeune avec une participation significative des prostacyclines (Garry et al. 2005). Nos travaux confirment également l'implication de la voie des COX-1 dans la vasodilatation par le courant de cathode (Durand et al. 2002a; Gohin et al. 2011; Tartas et al. 2005b). L'étude de la vasodilatation induite par le courant de cathode semble être une méthode pertinente d'étude de la vasodilatation induite par la voies de production du PGI<sub>2</sub> chez l'animal (Gohin et al. 2011).

L'originalité de nos résultats est d'avoir montré que l'altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium observée après une PTS est liée à la diminution de l'activité des voies de synthèse du NO, mais aussi de PGI<sub>2</sub>. Les causes d'altération de la voie du NO sont multiples. Théoriquement, il peut s'agir d'une réduction de la quantité d'eNOS (diminution de l'expression ou altération des ARNm), d'une diminution de l'activité d'eNOS, d'une altération de la biodisponibilité du NO (liaison à des radicaux

libres qui le rendent inefficace) ou d'une diminution de la sensibilité des cellules musculaires lisses au NO (Kawashima et Yokoyama 2004; Takaya et al. 2007). Actuellement, nos travaux ne permettent pas d'identifier les mécanismes impliqués dans l'altération des voies métaboliques du NO et de PGI<sub>2</sub>.

Sur un plan plus méthodologique, la prise en compte de la vasodilatation induite par le courant a permis de mettre en évidence l'absence d'effet de la privation totale de sommeil sur la vasodilatation induite par le SNP. Il semble donc que la PTS n'induit pas de modification de la vasodilatation dépendante de l'endothélium et donc la sensibilité du muscle lisse au NO. Cela n'avait pas été fait chez l'homme et cette hypothèse ne peut pas être actuellement complètement écartée.



## Discussion générale

Nos résultats expérimentaux, obtenus chez l'homme et chez l'animal, ont mis en évidence un effet de la privation aiguë et totale de sommeil (PTS) sur la vasomotricité, la pression artérielle et une réponse inflammatoire. Chez l'homme, nous avons décrit une cinétique d'apparition de ces réponses à la PTS. Dès 25 heures de PTS, nous avons mis en évidence une augmentation des concentrations plasmatiques de sélectine-E et de PGE<sub>2</sub>, associée à l'augmentation de la quantité d'ARNm codant pour le TNF- $\alpha$  et son récepteur (TNF-RI) dans les cellules de la lignée blanche. Dès 29 heures de PTS, nous avons montré une diminution de la vasodilatation cutanée induite par l'iontophorèse d'acétylcholine (ACh) et une altération de la tolérance locale au froid. Ces modifications sont associées à l'augmentation de la concentration plasmatique d'endothéline-1 (ET-1). Après 32 heures de PTS, nous avons observé une augmentation de la PA et de l'activité du système nerveux autonome. Entre 34 et 37 heures de PTS nous avons montré une augmentation de la concentration plasmatique de TNF- $\alpha$ . Enfin après une nuit de sommeil, nous observons des concentrations plasmatiques plus élevées en noradrénaline, IL-6, ICAM-1 et en nombre de monocytes, par rapport à la journée avant PTS. Par contre, nous n'avons pas observé de modification des résistances vasculaires périphériques et des concentrations plasmatiques de CRP et de cortisol.

Chez le rat, nous avons observé une augmentation de la PA tout au long de la PTS. Après 25 heures de PTS, nous observons une diminution de la vasodilatation induite par ACh et le courant de cathode associée à une augmentation des concentrations plasmatiques d'IL-6, de TNF- $\alpha$  et de noradrénaline. Cette diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium a été également mise en évidence chez des animaux préalablement sympathectomisés. Chez ces animaux, la PTS n'a aucun effet sur la PA. Nos travaux chez le rat ont également montré que l'altération de la vasodilatation induite par l'ACh était liée à une altération de la voie de synthèse du NO, principal agent vasodilatateur produit par l'endothélium, mais aussi de la PGI<sub>2</sub>.

L'ensemble de ces éléments suggère que la PTS induit une dysfonction endothéliale associée à des modifications de l'activité du système nerveux autonome et à un état inflammatoire de bas grade. Certaines variations biologiques ont été observées dès 25 heures d'éveil continu, ce qui suggère l'existence de modifications physiologiques au cours de la nuit de privation de sommeil (soit entre 23 et 7 heures). Ces modifications n'ont pas été étudiées dans notre travail pour ne pas perturber la qualité de la nuit de référence et ne pas imposer la présence prolongée d'un cathéter veineux. Quoiqu'il en soit, les réponses vasculaires observées pourraient être la conséquence de modifications de l'activité du système nerveux autonome et/ou de réponses immuno-inflammatoires induites par la PTS (Faraut et al. 2011).



## I. Hypothèses

### I.1. Hypothèse « sympathique »

Chez l'homme, notre travail confirme que dans des conditions expérimentales bien contrôlées, sans contraintes psychologique ou environnementale surajoutées, 25 heures d'éveil continu n'entraînent pas de modification de la PA (Pagani et al. 2009). Néanmoins, nous avons mis en évidence après 32 heures, une augmentation de la PA associée à une augmentation de l'activité du système nerveux sympathique, préalablement décrite (Kato et al. 2000; Ogawa et al. 2003; Zhong et al. 2005). Chez le rat, une augmentation de la PA et de la fréquence cardiaque est observée tout au long de la période de privation de sommeil, ce qui confirme les travaux de Sgoifo et al. (2006). En l'absence de stress, objectivé par l'absence de variation significative de la corticostérone plasmatique, l'augmentation de la PA se normalise très rapidement (4 heures) après l'arrêt de la privation, contrairement à ce qui a été préalablement décrit (Sgoifo et al. 2009).

L'augmentation de l'activité du système nerveux sympathique pourrait participer aux altérations de la vasomotricité en entraînant une augmentation du tonus vasoconstricteur mais aussi en diminuant la vasodilatation dépendante de l'endothélium (Hijmering et al. 2002). En effet, l'activation sympathique est un facteur de diminution de la production de NO et de la FMD (Hijmering et al. 2002). De plus, il a été montré que l'augmentation des catécholamines plasmatiques induit, *in vivo* et *in vitro*, une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- $\alpha$ ) et une activation endothéliale (Friedman et Irwin 1997; Johnson et al. 2005a; Papanicolaou et al. 1996). Dans nos travaux chez l'homme et l'animal, l'augmentation de l'activité du système nerveux sympathique coïncide avec l'augmentation de la concentration plasmatique de TNF- $\alpha$  qui stimule l'activation endothéliale et réduit la biodisponibilité du NO (Chia et al. 2003; Nakamura et al. 2000). L'augmentation de la PA, induite par l'activation sympathique, pourrait également participer à cette réponse en augmentant le *shear stress* qui est un facteur de modification de la vasomotricité. A court terme, il augmente la synthèse et l'activité d'eNOS, ce qui est un mécanisme protecteur contre l'augmentation de pression (Corson et al. 1996). A moyen et long termes, son augmentation chronique est un facteur de production d'espèces radicalaires de l'oxygène qui diminuent la biodisponibilité du NO et induisent l'activation endothéliale (Chae et al. 2001; Khazaei et al. 2008). Le TNF- $\alpha$ , peut être sécrété, comme IL-6, par les cellules endothéliales sous l'effet du *shear stress* (Gornikiewicz et al. 2000).

D'autre part, plusieurs auteurs ont également émis l'hypothèse que l'activation endothéliale et la dysfonction endothéliale, qui apparaissent au cours de troubles du sommeil, étaient la conséquence d'altérations du rythme circadien, de la PA et de l'activité du système nerveux sympathique (Faraut et al. 2011; Frey et al. 2007; Mullington et al. 2010). En effet, l'absence de diminution nocturne de la PA et de l'activité sympathique, observée au cours de la privation totale de sommeil (Kamperis et al. 2010; Sayk et al. 2010) est responsable du maintien d'un *shear stress* élevé au cours de la nuit, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de la sélectine-E observée dans notre travail et par Frey et al. (2007) après respectivement

25 et 28 heures d'éveil continu. L'activation endothéliale ainsi créée est un facteur favorisant la dysfonction endothéliale et la diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium (Khazaei et al. 2008).

Cependant, dans notre travail, les réponses inflammatoires et la diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium sont apparues chez l'homme avant l'augmentation de la PA. Par conséquent, l'augmentation de la PA et de l'activité sympathique ne semble pas être initialement responsable des altérations de la vasomotricité. Dans nos travaux chez le rat, nous avons pu confirmer cette hypothèse et prouver que l'altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium était indépendante des variations de la PA et de l'activité du système nerveux sympathique. En effet, chez des rats sympathectomisés, nous avons toujours observé une diminution de la vasodilatation dépendante de l'ACh malgré l'absence de modification de la PA. Nous pouvons donc conclure que l'augmentation de l'activité du système nerveux sympathique et/ou de la PA induite par la PTS n'explique pas l'altération précoce de la vasodilatation dépendante de l'endothélium induite par la PTS observée chez le rat et chez l'homme après 29 heures d'éveil continu.

Néanmoins, chez l'homme, après 32 heures d'éveil continu, nous ne pouvons pas exclure que l'augmentation de la PA observée participe à l'altération de vasomotricité. De même, la PTS dans des conditions expérimentales différentes, associée par exemple au maintien de la position debout prolongée ou à une contrainte psychologique, peut entraîner une augmentation plus précoce et plus importante de la PA et de l'activité du système nerveux sympathique (Nam et al. 2011; Lo et al. 2010; Su et al. 2008). Cette augmentation de la PA pourrait altérer de façon plus importante la vasomotricité. De plus, à moyen et long termes, l'altération chronique du rythme circadien de la PA et de l'activité du système nerveux sympathique est probablement un facteur favorisant la dysfonction endothéliale observée dans les restrictions chroniques de sommeil (Desideri et al. 2004; Mullington et al. 2009).

## **I.2. Hypothèse immuno-inflammatoire**

### **I.2.1. La privation de sommeil entraîne une inflammation de bas grade**

Nos travaux ont montré que la PTS induit une réponse inflammatoire très aiguë, observée chez l'homme et chez l'animal dès 25 heures d'éveil continu pour certaines variables. L'originalité de notre travail est d'avoir également mis en évidence, chez l'homme, une augmentation significative, après 34 et 37 heures d'éveil continu, des taux plasmatiques de TNF- $\alpha$  sans modification de la concentration plasmatique de son récepteur soluble TNF-RI. Cette augmentation a été préalablement décrite dans la restriction chronique de sommeil ou dans différentes pathologies du sommeil (Patel et al. 2009; Vgontzas et al. 2004). Les modifications de la concentration plasmatique de TNF- $\alpha$  et l'augmentation de la concentration sérique de PGE<sub>2</sub> et de la sélectine-E sont des arguments en faveur d'un état inflammatoire,

qui peut être qualifié de bas grade en l'absence de modification de la CRP et d'hyperthermie (Taddei et al. 2006).

L'effet de la PTS sur PGE<sub>2</sub> et la sélectine-E a été préalablement mis en évidence au cours de privations aiguës et totales de sommeil (moins de 40 heures d'éveil continu) (Frey et al. 2007; Haack et al. 2009). La production de PGE<sub>2</sub> est activée principalement par les COX-2, dont la transcription est notamment augmentée par des cytokines pro-inflammatoires, telles que TNF- $\alpha$ , dans les monocytes, les plaquettes mais aussi les cellules endothéliales... (Haack et al. 2009). L'observation d'une augmentation de PGE<sub>2</sub> et de la sélectine-E après seulement 25 heures d'éveil continu est donc le signe de modifications immuno-inflammatoires survenues auparavant, au cours de la nuit de PTS (Caughey et al. 2001).

D'autre part, contrairement à plusieurs études, nous n'avons pas observé de modification d'IL-6 au cours des 40 heures d'éveil continu (Shearer et al. 2001; Vgontzas et al. 1999; Vgontzas et al. 2007; Vgontzas et al. 2004). Toutefois, nos résultats confirment les travaux de Born et Dinges (Born et al. 1997; Dinges et al. 1995). La qualité du prélèvement sanguin, en particulier l'absence de cathéter pendant la nuit, peut expliquer ce résultat. En effet, IL-6 est rapidement sécrétée, contrairement au TNF- $\alpha$ , lors d'une inflammation locale induite par la présence pendant 24 heures d'un cathéter veineux (Haack et al. 2000). Quoi qu'il en soit, une privation aiguë et totale de sommeil, en l'absence de contraintes psychologique, physique ou environnementale surajoutées, semble donc suffisante pour induire l'installation d'une inflammation de bas grade, caractérisée notamment par la sécrétion de PGE<sub>2</sub> et de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ .

### **I.2.2. L'augmentation du TNF- $\alpha$ , conséquence de l'activation des monocytes ?**

L'augmentation des concentrations plasmatiques de TNF- $\alpha$  observée dans nos travaux pourrait être la conséquence d'une modification immunitaire, dominée par l'activation des monocytes. En effet, nous avons mis en évidence une augmentation, dans les cellules de la lignée blanche, de la production d'ARNm codant pour le TNF- $\alpha$  après seulement 25 heures d'éveil continu. Ces résultats sont concordants avec des travaux récents qui ont montré une telle augmentation après une seule nuit de restriction aiguë de sommeil (4 heures) (Irwin et al. 2010). Cette augmentation traduit une probable activation des monocytes, principales sources de production du TNF- $\alpha$  (Bierhaus et al. 2003).

De plus, quelques auteurs ont précédemment décrit des modifications immunitaires, innées et acquises, survenant au décours de la PTS. Ces modifications ont été notamment mises en évidence par une augmentation plus importante, chez des sujets privés de sommeil, du nombre de neutrophiles et de cellules T activées en réponse à une vaccination (hépatite A) (Lange et al. 2003) et de la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 par des monocytes stimulés avec des lipopolysaccharides (LPS) (Irwin et al. 2010). La production de TNF- $\alpha$  est notamment stimulée, dans les cellules de la lignée blanche sanguine, par

l'activation du facteur NF- $\kappa$ B dont l'augmentation a été notamment observée dans ces cellules après une seule nuit de privation de sommeil (Irwin et al. 2008).

Ces réponses immuno-inflammatoires pourraient être liées à une modification du rythme circadien de l'activité des cellules immunitaires ou de l'activité du système nerveux parasympathique au cours de la nuit de privation de sommeil (entre 16 heures et 24 heures d'éveil continu). En effet, le sommeil induit une diminution physiologique du nombre de monocytes, de cellules *Natural Killer* et de lymphocytes présents dans le sang (Born et al. 1997). Ces cellules produisent notamment du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  qui jouent un rôle physiologique important dans l'induction du sommeil et qui ont un rythme circadien dans de nombreuses structures cérébrales (Obal et Krueger 2003). La PTS inhibe également l'activité parasympathique nocturne qui a une action anti-inflammatoire (Faraut et al. 2011) et favorise l'activation sympathique qui a un effet inverse en stimulant la production de cytokines pro-inflammatoires (Irwin et al. 1999). De même, une diminution nocturne de la mélatonine induite par la PTS pourrait favoriser la production de cytokines pro-inflammatoires et favoriser les altérations de la vasomotricité (Goichot et al. 1998; Kamperis et al. 2010). En effet, l'augmentation nocturne de la mélatonine au cours du sommeil diminue la réponse immuno-inflammatoire, inhibe le système nerveux sympathique et a un effet antioxydant (Faraut et al. 2011).

Au-delà de ces données expérimentales, il existe des exemples cliniques de retentissement d'une seule nuit de privation de sommeil sur l'immunité. Par exemple, chez l'homme, la vaccination contre la grippe H1N1 ou l'hépatite A induit une production moindre d'anticorps lorsqu'elle est réalisée chez des sujets privés de sommeil (Lange et al. 2003; Spiegel et al. 2002).

### **I.2.3. Relation entre l'inflammation de bas grade et les altérations de la vasomotricité**

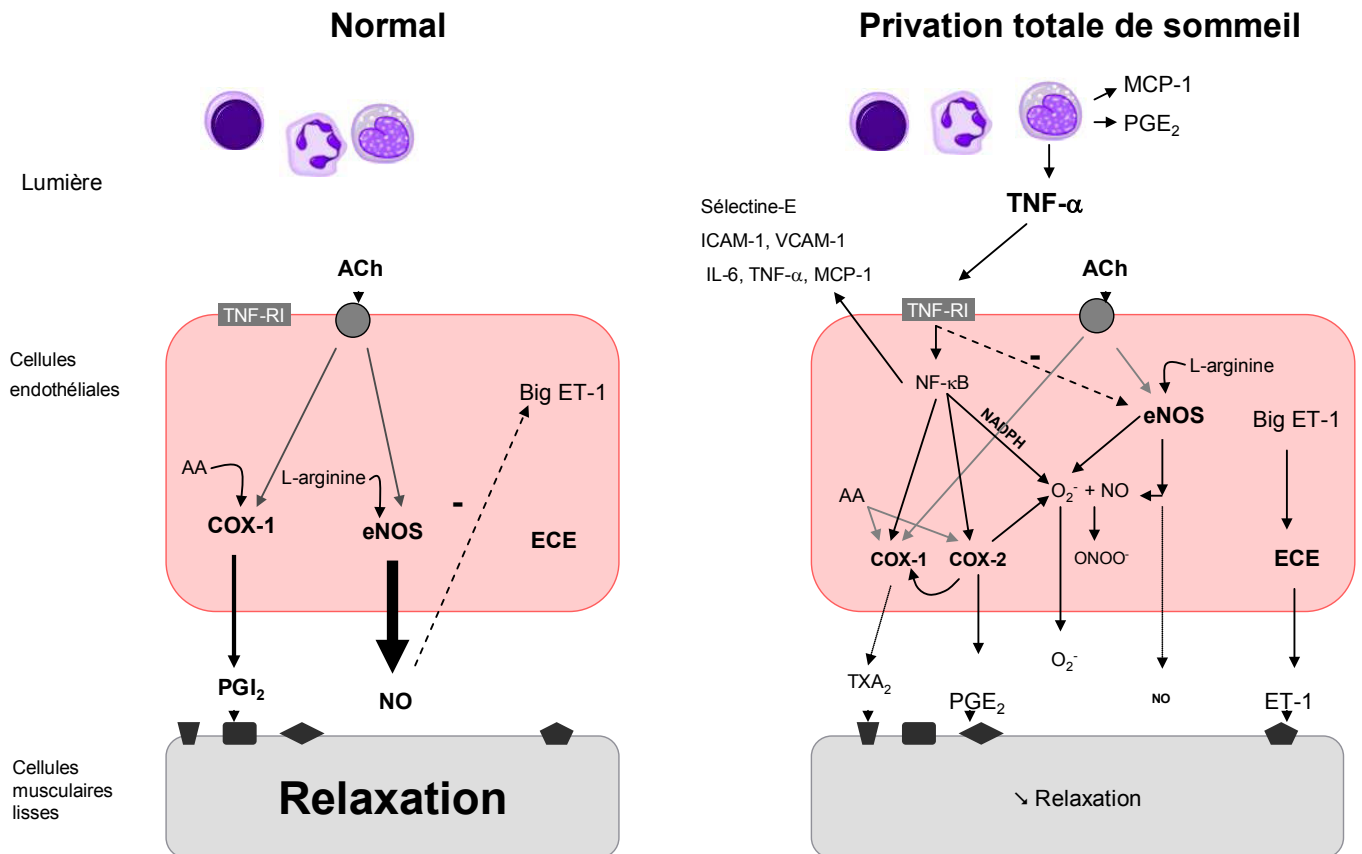
L'apparition d'une inflammation de bas grade, même transitoire, caractérisée par l'augmentation des concentrations plasmatiques du TNF- $\alpha$  et de PGE<sub>2</sub> pourrait être responsable de la diminution de la réactivité vasculaire observée dans nos études. Nous n'avons pas assez d'éléments pour prouver le lien de cause à effet de cette relation. Néanmoins, plusieurs études nous permettent de suggérer un lien entre l'inflammation aiguë de bas grade et les modifications de la vasomotricité (Libby et al. 1997; Meier et al. 1998; Ross 1999). En effet, plusieurs cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) altèrent la vasodilatation dépendante de l'endothélium en agissant sur les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (Losonczy et al. 2000). Cependant, les cinétiques d'action de ces cytokines sont différentes. *In vivo*, sur la vascularisation cutanée de sujets humains en bonne santé, une brève injection intra-artérielle de TNF- $\alpha$  est suffisante pour augmenter la production de prostanoïdes vasoconstricteurs, diminuer la biodisponibilité du NO et altérer la vasodilatation induite par l'injection intra-artérielle d'ACh en une heure seulement (Chia et al. 2003; Nakamura et al. 2000). Cette injection entraîne également une augmentation retardée (4 heures après l'injection) de la concentration plasmatique d'IL-6 (Chia et al.

2003). L'injection d'IL-6 dans les mêmes conditions n'a par contre aucun effet sur la vasodilatation dépendante de l'endothélium (Bhagat et Vallance 1997). Dans des travaux réalisés sur des artères méésentériques isolées de rats, 3 jours d'exposition à IL-6 sont nécessaires pour observer une diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium (De Salvatore et al. 2003), alors que 14 heures suffisent pour IL-1 $\beta$  (Jimenez-Altayo et al. 2006) et seulement 30 minutes pour le TNF- $\alpha$  (Wimalasundera et al. 2003).

Le TNF- $\alpha$  semble donc avoir un rôle pivot dans l'apparition d'une altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium au cours d'une inflammation aiguë (Taddei et al. 2006), ce qui est concordant avec nos résultats. Nous avons en effet observé une augmentation de la production de TNF- $\alpha$  avant les modifications de la vasomotricité. Le TNF- $\alpha$  peut altérer la vasodilatation dépendante de l'endothélium par plusieurs mécanismes. Il induit notamment la production de radicaux libres de l'oxygène et l'activation du facteur NF- $\kappa$ B endothélial qui diminuent la synthèse et l'activité d'eNOS et altèrent la biodisponibilité du NO. Le TNF- $\alpha$  diminue également la production de facteurs dépolarisants dérivés de l'endothélium (EDHFs), stimule l'expression endothéliale d'IL-6 et de protéine d'adhésion et enfin favorise la synthèse de COX-2. L'activation des COX-2 induit également la production d'espèces radicalaires et en particulier O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Milstien et Katusic 1999). Même si nous n'avons pas observé dans notre travail d'augmentation de production de marqueurs indirects du stress oxydatif plasmatique, la production d'espèces radicalaires dans la cellule endothéliale pourrait en partie expliquer la diminution de la vasodilatation observée chez l'homme après une PTS. Les traitements antioxydants ont notamment démontré leur effet protecteur au cours d'altérations aiguës de la vasodilatation dépendante de l'endothélium induite par une inflammation (Clapp et al. 2004). Enfin, la diminution de la biodisponibilité du NO lève l'action inhibitrice du NO sur la production de précurseur d'ET-1 (Zhang et al. 2009).

Nous pouvons ainsi proposer, à partir de nos travaux chez l'homme et chez l'animal, un schéma de synthèse (Figure 42) décrivant les effets de la privation aiguë et totale de sommeil sur la cellule endothéliale et la vasodilatation induite par l'ACh.

A titre d'exemple, plusieurs études ont montré que l'inflammation aiguë et de bas grade provoqué par une vaccination (*Salmonella typhi*, BCG, influenza A/H1N1) entraîne une diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium (Clapp et al. 2004; Hingorani et al. 2000; Lamb et al. 2004). Cette diminution a été observée quelques heures (6 à 8 heures) seulement après la vaccination (Clapp et al. 2004; Hingorani et al. 2000). Dans tous ces travaux la vasodilatation indépendante de l'endothélium n'a pas été altérée ce qui indique que l'inflammation aiguë ne modifie pas la sensibilité des cellules musculaires lisses au NO.



**Figure 42. Effet de la privation totale de sommeil sur la vasodilatation induite par l'acétylcholine (ACh)**

La privation totale de sommeil diminue la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO) et de la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) via de multiples mécanismes ce qui induit une diminution de la vasodilatation induite par l'ACh. Les cellules de la lignée blanche activées produisent des cytokines pro-inflammatoires et notamment du TNF-α qui se lie sur son récepteur (TNF-RI). Celui-ci est co-localisé avec la cavéoline-1 qui inhibe l'activation de eNOS. TNF-α via l'activation du facteur nucléaire-κB (NF-κB) induit la production de cytokines pro-inflammatoires et de protéines d'adhésion (MCP-1, ICAM-1, VCAM-1, sélectine-E). TNF-α active également la NADPH qui produit des anions superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Ces derniers se lient avec le NO pour produire des ions peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) et diminuer la biodisponibilité du NO. AA : acide arachidonique, TXA<sub>2</sub> : thromboxane A2,

## II. Conséquences de la dysfonction endothéliale

Nos résultats sont concordants avec les travaux récents qui ont mis en évidence que la restriction aiguë de sommeil (Sekine et al. 2010; Takase et al. 2004) ou la privation totale de sommeil au cours d'une nuit de travail (Amir et al. 2004) peuvent entraîner une altération de la fonction endothéliale. Les modifications observées dans ces travaux sont modérées et infra-cliniques. Néanmoins, ces modifications sont concordantes avec ce qui est observé dans des profils physiopathologiques prédictifs de pathologies cardiovasculaires. En effet, la diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium (30 à 40 %) est du même ordre de grandeur que celle induite par le tabagisme, l'hypertension artérielle ou l'hypercholestérolémie qui sont des facteurs de risque cardiovasculaire (Grover-Paez et Zavalza-Gomez 2009). Certaines modifications que nous observons persistent après une nuit de récupération (8 heures), notamment l'augmentation des catécholamines, d'IL-6, du nombre de monocytes et de certaines protéines d'adhésion. A l'issue d'une privation totale de sommeil, une nuit de récupération n'est donc pas suffisante. Il est alors raisonnable de faire l'hypothèse, qu'en l'absence de récupération et de sommeil suffisant, les privations répétées de sommeil contribuent à l'établissement d'une élévation basale des médiateurs de l'inflammation ce qui pourrait favoriser l'apparition de pathologies chroniques (Taddei et al. 2006).

Les modifications aiguës et transitoires de la fonction endothéliale, apparemment bénignes (stress psychologique, infection virale aiguës, repas trop riche en graisse...) associées à une activation endothéliale peuvent être suffisantes pour favoriser la survenue d'un événement coronarien aigu (Nieuwdorp et al. 2008; Otto et al. 2004; Strike et Steptoe 2003). La privation totale de sommeil pourrait donc être un facteur de risque d'événements cardiovasculaires aigus, notamment chez des sujets présentant des facteurs de risque cardiovasculaire (Mullington et al. 2009).

L'altération des capacités vasodilatatrices dépendantes de l'endothélium observées, dans notre travail après PTS, permettrait en partie d'expliquer le lien entre la privation de sommeil et la diminution de la tolérance aux contraintes thermiques. Sawada et al. (2000) ont en effet montré que la dysfonction endothéliale diminuait les mécanismes vasodilatateurs de protection contre les gelures. Nous n'avons pas évalué l'effet de la privation de sommeil sur la tolérance au chaud mais plusieurs études ont établi un lien entre la dysfonction endothéliale et la survenue de pathologies liées à la chaleur (voir la revue de Charkoudian, 2003).

### **III. Intérêt de la méthode d'évaluation de la vasodilatation dépendante de l'endothélium**

L'évaluation de la vasodilatation dépendante de l'endothélium, en utilisant la technique couplée laser-Doppler et iontophorèse d'ACh, a donc permis d'identifier des altérations de la vasodilatation dépendante de l'endothélium chez l'homme et chez l'animal après une PTS. L'utilisation de stimulations électriques multiples et de faible intensité permet de diminuer la variabilité de la méthode et de ne pas induire de vasodilatation induite par le courant d'anode. Cependant, ce protocole n'est pas utilisable chez l'animal en raison des mouvements liés aux contractions musculaires qu'il induit. L'utilisation de MCh, à la place de l'ACh, semble intéressante pour l'avenir du fait de sa stabilité en solution qui simplifie la préparation des solutions. La réponse à la MCh est cependant légèrement différente de celle observée avec ACh (cinétique plus lente et gain plus important). La vasodilatation induite par MCh devra être comparée à d'autres méthodes de référence (FMD, échographie...).

Les résultats de nos travaux ont également confirmé la variabilité circadienne de la réactivité vasculaire. Cela impose pour nos futurs travaux de comparer uniquement les résultats de tests réalisés à la même heure. La diminution matinale de la réactivité vasculaire pourrait être liée à des variations circadiennes de la production de substances vasoactives telles que le NO et l'ET-1 (Elherik et al. 2002). L'âge est également un facteur important de diminution de la vasodilatation induite par ACh et MCh. Il doit donc être pris en compte pour diminuer la variabilité inter-sujets.

Les principales difficultés que nous avons rencontrées ont été dominées par les effets vasculaires induits par le courant de cathode qui ont perturbé l'évaluation de la vasodilatation indépendante de l'endothélium. La soustraction de la vasodilatation induite par le courant à la valeur observée avec le SNP est indispensable pour évaluer la vasodilatation indépendante de l'endothélium. Cette méthode a permis de démontrer, chez le rat, l'absence d'effet de la PTS sur la vasodilatation indépendante de l'endothélium. Nous avons essayé d'appliquer d'autres donneurs du NO (PAPA NONOate, DETA NONOate...). Leur très grande labilité en solution rend les mesures peu reproductibles.





## Conclusion

La privation aiguë et totale de sommeil est fréquente dans les métiers de la sécurité, des transports et de la santé. Nos résultats suggèrent que 40 heures d'éveil continu sont un stimulus suffisant pour induire, chez des sujets sains, des altérations de la vasomotricité caractérisées par une diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium et de la tolérance locale au froid. Ces modifications sont associées chez l'homme à une inflammation de bas grade, à une activation endothéliale puis à l'augmentation de la pression artérielle et de l'activité du système nerveux sympathique.

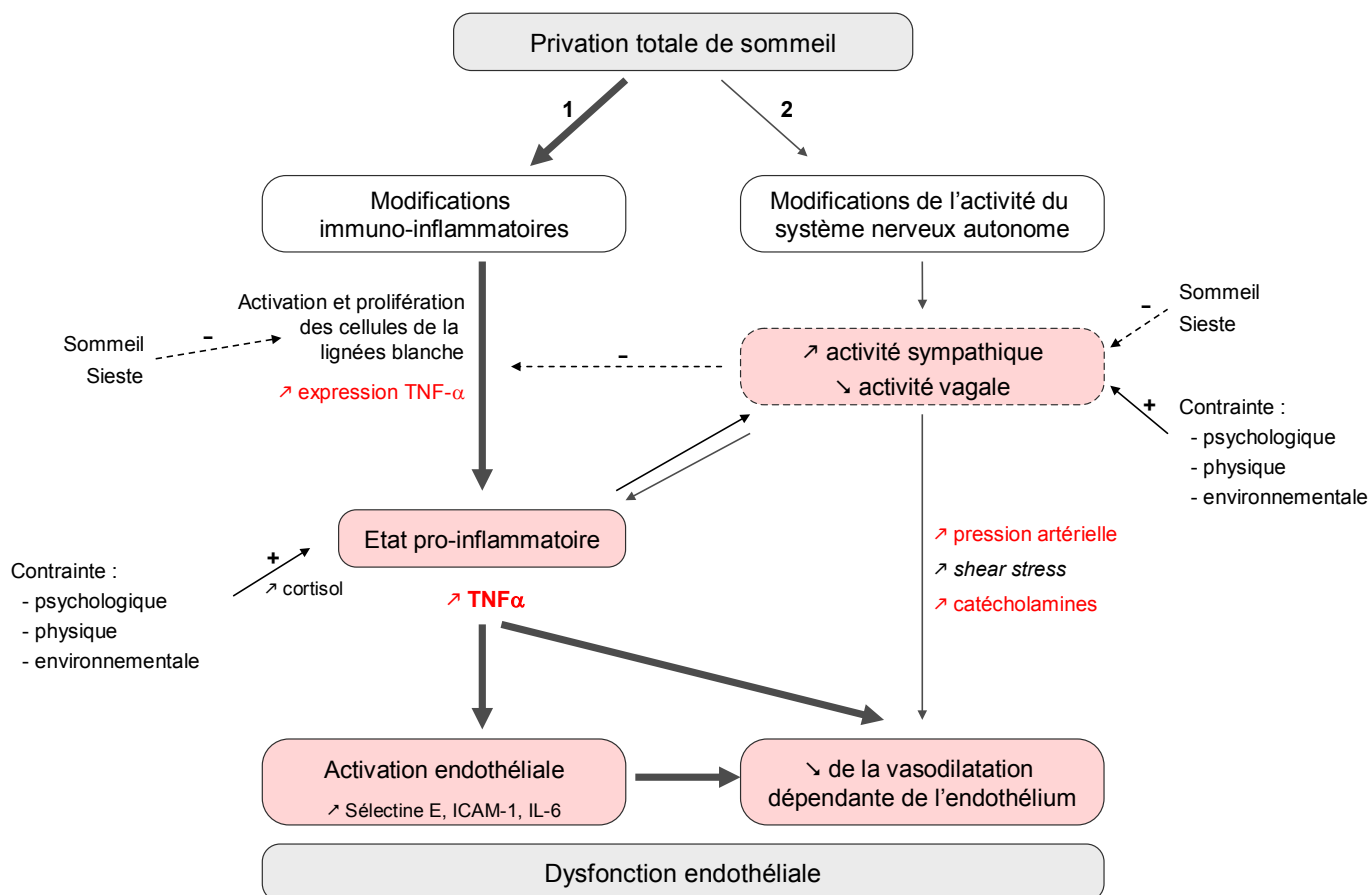
Contrairement à ce qui avait été préalablement suggéré, les modifications de la vasomotricité apparaissent, chez l'homme, avant l'augmentation de la PA et de l'activité du système nerveux sympathique. Elles sont même indépendantes de celles-ci chez le rat. L'originalité de notre travail est donc d'avoir décrit une cinétique de réponses vasculaires et immuno-inflammatoires à la privation totale de sommeil. Chez l'homme une réponse immuno-inflammatoire est observée dès 26 heures de privation de sommeil. Les altérations de la vasomotricité ont été mises en évidence après 29 heures d'éveil continu et l'augmentation de la pression artérielle et de l'activité du système nerveux sympathique après 32 heures d'éveil continu. Dans nos conditions expérimentales, sans contrainte psychologique ou environnementale surajoutées, l'augmentation de la production de TNF- $\alpha$  semble être un élément clef et aigu des altérations observées. Nous avons pu démontrer chez le rat que la voie de production du NO, mais aussi des prostaglandines, étaient altérées par la privation totale de sommeil.

Bien que modérées et infra-cliniques, ces réponses sont cohérentes avec les altérations cardiovasculaires et inflammatoires induites par la privation chronique de sommeil, dont les conséquences pathologiques sont bien connues. Les modifications de la vasomotricité observées sont un facteur de d'apparition de pathologies vasculaires chez des patients à risque. Elles seraient également une source de diminution des capacités d'adaptation aux contraintes environnementales qui induisent une vasodilatation comme le chaud ou les mécanismes de protection contre les gelures.

L'évaluation de la vasodilatation dépendante de l'endothélium, en utilisant la technique couplée laser-Doppler et iontophorèse d'ACh, a donc permis d'identifier des altérations aiguës de la vasodilatation dépendante de l'endothélium chez l'homme et chez l'animal. La reproductibilité de cette mesure indépendante de l'opérateur est bonne. L'utilisation de MCh, à la place de l'ACh, semble intéressante pour l'avenir du fait de sa stabilité en solution qui simplifie la préparation des solutions.

Nous pouvons ainsi proposer un schéma théorique (Figure 43) des effets de la privation totale de sommeil. De nombreuses contraintes environnementales (luminosité, température...), physiques (posture, activité...) ou psychologiques peuvent potentiellement modifier les réponses physiologiques observées.

L'absence de sommeil récupérateur suffisant entre des périodes de privation de sommeil peut être un facteur d'augmentation chronique de l'inflammation qui peut favoriser le développement de pathologies cardiovasculaires et métaboliques (Faraut et al. 2011).



**Figure 43. Schéma de synthèse des effets de la privation totale de sommeil**

**Axe 1. Modifications initiales.** La privation totale de sommeil induit des modifications immuno-inflammatoires qui favorisent l'apparition d'un état pro-inflammatoire caractérisé par une augmentation de la production de TNF-α. Celle-ci induit une activation endothéliale et la diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium.

**Axe 2. Modifications secondaires.** La privation totale de sommeil induit également une inhibition de l'activité parasympathique nocturne et une augmentation de l'activité sympathique. Ces modifications induisent une augmentation de la pression artérielle, du *shear stress* et de la concentration sanguine de catécholamines qui altère la vasomotricité et favorise l'état pro-inflammatoire.

**Contraintes associées.** Les axes corticotropes et végétatifs du stress sont activés par les contraintes psychologiques, physiques et environnementales. Ces modifications favorisent l'augmentation de l'activité sympathique et l'inflammation. En revanche, le sommeil, et dans une moindre mesure la sieste, ont une activité inverse en stimulant l'activité du système nerveux parasympathique qui a une action anti-inflammatoire.

En rouge, ce que nous avons observé dans nos études.

# Perspectives

Des travaux complémentaires sont nécessaires pour élucider les mécanismes précis qui lient la privation totale de sommeil (PTS) à la dysfonction endothéliale et à l'inflammation. Il conviendra également d'essayer de comprendre les relations entre la privation de sommeil et les systèmes immunitaires et végétatifs, notamment au cours de privations répétées. L'existence d'une inflammation, même transitoire, pendant une période d'éveil continu, renforce l'intérêt d'utiliser des stratégies qui diminuent les réponses immuno-inflammatoires à la privation de sommeil, mais également de déterminer la durée de la période nécessaire à la récupération.

## I. Compréhension des mécanismes

**Rôle de l'inflammation.** Nous avons fortement suggéré que les altérations de la vasomotricité induites par la PTS étaient, en l'absence de contraintes psychologiques ou environnementales, liées à des modifications immuno-inflammatoires et en particulier à la production de TNF- $\alpha$ . Il nous appartient donc d'apporter la preuve de ce concept. Cependant, l'utilisation d'antagonistes (anticorps, récepteurs solubles ou cytokines inhibitrices) du TNF- $\alpha$  inhibe le sommeil paradoxal chez l'homme et le sommeil à onde lente chez le rat (Obal et Krueger 2003 ; Vgontzas et al. 2004). Cela impose de discuter de la nature de l'«anti-TNF» utilisé et d'évaluer par télémétrie son effet sur le sommeil avant de s'intéresser à la fonction endothéliale.

**Etude de la régulation de l'activité d'eNOS.** Nos travaux ont mis en évidence une altération de la voie de production du NO. Celle-ci peut être modulée au niveau de l'expression (ARNm) et de l'activité de eNOS ou de la biodisponibilité du NO (Khazaei et al. 2008). Le TNF- $\alpha$ , qui semble impliqué dans les effets vasculaires de la PTS, peut diminuer la quantité d'eNOS produite, en déstabilisant les ARNm, mais il peut également agir sur l'activité d'eNOS (Wu 2002). En effet, le récepteur endothélial du TNF- $\alpha$  est co-localisé avec la cavéoline-1 qui a pour fonction de fixer eNOS dans les *cavéolae* et empêcher son activation (Wu 2002 et Wang et al. 2008). L'activité d'eNOS est aussi régulée par des mécanismes de phosphorylation via l'activation de la voie des sérine/thréonine kinases (Akt/PKB) (Dimmeler et al. 1999). Afin de comprendre les mécanismes qui lient la privation de sommeil à la diminution de l'activité de la voie du NO, nous envisageons de mesurer, par la technique du *western blot*, les variations relatives de la quantité de formes actives d'eNOS (phosphorylées sur le site Ser<sup>1179</sup>), de formes inactives (phosphorylées sur le site thréonine<sup>495</sup>) et les protéines tissulaires intervenant dans sa régulation comme la cavéoline-1, AKT et sa forme phosphorylée (phospho-AKT). La mise au point de la technique de dosage

est difficile en raison de la labilité des formes phosphorylées. Cette mise au point est actuellement conduite dans notre laboratoire en partenariat avec le laboratoire de biologie neurovasculaire et mitochondriale intégrée d'Angers.

**Etude des effets de la privation de sommeil sur les EDHFs.** Dans nos travaux chez le rat, la vasodilatation dépendante de la voie des EDHF était très faible du fait de l'âge des animaux (7 à 9 semaines) (Gaubert et al. 2007) et de l'utilisation de thiopental sodique comme anesthésiant (de Wit et al. 1999). Nous n'avons donc pas évalué l'effet de la PTS sur les EDHFs. Or, cette voie métabolique est importante chez des sujets plus âgés puisqu'elle corrige en partie la diminution de la biodisponibilité du NO liée à l'âge (Gaubert et al. 2007). De plus, le TNF- $\alpha$  a un effet inhibiteur du cytochrome P450 et inhibe ainsi les EETs. Nous envisageons donc d'évaluer l'effet de la PTS sur les EDHFs en utilisant des animaux plus âgés, préalablement traités avec des inhibiteurs pharmacologiques des canaux potassiques (apamine, charybdotoxine, glibenclamide...) qui participent à la vasodilatation dépendante des EDHFs (Gaubert et al. 2007 ; Garry et al. 2005). Le protocole d'anesthésie devra être également adapté pour préserver au maximum ces voies métaboliques.

**Rôle de l'endothéline-1.** L'une de nos études a suggéré un possible effet de la PTS sur les concentrations plasmatiques d'ET-1. Le dosage plasmatique est difficile en raison de la faible quantité d'endothéline présente dans le plasma du fait de ses mécanismes d'action paracrine et autocrine. La régulation de la production d'ET-1 est principalement transcriptionnelle ou liée à la stabilité des ARNm codant pour les précurseurs d'ET-1 (Khasei et al. 2008). Afin d'évaluer le rôle d'ET-1 dans les altérations vasculaires induites par la privation de sommeil, nous envisageons tout d'abord de mesurer les variations de quantité tissulaire de la Big-ET-1, un précurseur d'ET-1 chez des animaux privés ou non de sommeil. Une approche pharmacologique permettra également d'évaluer l'effet de la PTS sur la vasodilatation dépendante de l'endothélium après traitement par des antagonistes mixtes ETA/ETB (Bosentan) ou spécifiques des récepteurs ETA (Ambrisentan ou Sitaxentan) ou ETB (BQ-788) (Bourque et al. 2011 ; Khazazi et al. 2008).

## II. Contre-mesures

Plusieurs méthodes (sieste, luminothérapie...) ont montré leur efficacité pour réduire les altérations cognitives induites par la privation de sommeil (Faraut et al. 2007; Vgontzas et al. 2007). Vgontzas et al. (2007) ont également mis en évidence que les siestes avaient un effet protecteur contre les modifications inflammatoires et entraînaient une augmentation moins importante de cytokines pro-inflammatoires au cours de la restriction de sommeil. L'effet de ces siestes sur l'altération de la vasomotricité n'a jamais été évalué.

Plusieurs travaux ont montré que 7 semaines d'entraînement physique chez le rat induisent une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires (L-1b and IL-6). (Bruunsgaard 2005 ; Chennaoui et al. 2008). Nous pouvons donc faire l'hypothèse que l'entraînement physique chez le rat est un facteur de protection contre l'installation d'un syndrome inflammatoire. Des travaux préliminaires ont été réalisés dans le laboratoire dans le cadre d'un projet de recherche financé par la Direction Générale de l'Armement (CDT Chennaoui). Des résultats encourageants ont déjà été obtenus puisque nous avons observé après 24 heures de PTS une augmentation moindre d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  chez les animaux entraînés par rapport aux animaux sédentaires. Nous évaluerons donc dans un premier temps les effets de la PTS et de l'entraînement physique sur les variations de protéines tissulaires intervenant dans la régulation de l'activité d'eNOS (Western blot). Dans un deuxième temps, il conviendra d'évaluer l'effet de l'entraînement physique associé à la PTS sur la vasodilatation dépendante de l'endothélium.

### **III. Restriction de sommeil**

Les militaires sont également souvent confrontés à des restrictions aiguës de sommeil, pendant lesquelles ils ne peuvent dormir que 3 à 5 heures par nuit. Ces situations peuvent durer pendant plusieurs jours. Il est alors important de pouvoir déterminer, chez des sujets sains, la durée de restriction de sommeil à partir de laquelle la fonction endothéliale sera altérée, mais aussi la durée nécessaire à la récupération. Nous souhaitons au cours des années 2012 à 2014 mettre en place un projet, chez l'homme, s'inscrivant dans la continuité des résultats obtenus dans notre thèse, qui s'intéressera aux effets de la restriction de sommeil sur les réponses immuno-inflammatoires et vasculaires.

Dans un premier temps, ce projet aura pour objectif de déterminer, dans une situation de restriction chronique sévère de sommeil (5 heures par nuit pendant 7 jours), chez des sujets jeunes (< 35 ans), la cinétique des modifications des paramètres cardiovasculaires et inflammatoires et la durée nécessaire à la récupération. Dans un deuxième temps, nous évaluerons l'efficacité d'une contre-mesure (sieste ou luminothérapie) visant à limiter, voire inhiber, les effets délétères d'une situation de restriction chronique de sommeil. Ce projet sera réalisé en collaboration avec le Centre du sommeil, de l'Hôtel Dieu à Paris (Pr Damien Léger). Ce projet a été proposé pour un financement auprès de la Direction Générale de l'Armement.



## Références bibliographiques

- Acar V, Hourri JJ, Le Hoang MD, Pradeau D, Guyon F (2001) Stability of stored methacholine solutions: study of hydrolysis kinetic by IP-LC. *J Pharm Biom Anal* 25: 861-869
- Akerstedt T, Palmblad J, de la Torre B, Marana R, Gillberg M (1980) Adrenocortical and gonadal steroids during sleep deprivation. *Sleep* 3: 23-30
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357: 593-615
- Algotsson A, Nordberg A, Winblad B (1995) Influence of age and gender on skin vessel reactivity to endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilators tested with iontophoresis and a laser Doppler perfusion imager. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 50: M121-127
- Altemus M, Rao B, Dhabhar FS, Ding W, Granstein RD (2001) Stress-induced changes in skin barrier function in healthy women. *J Invest Dermatol* 117: 309-317
- Amir O, Alroy S, Schliamser JE, Asmir I, Shiran A, Flugelman MY, Halon DA, Lewis BS (2004) Brachial artery endothelial function in residents and fellows working night shifts. *Am J Cardiol* 93: 947-949
- Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangé D, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA, Yeung AC, et al. (1995) Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* 26: 1235-1241
- Andreassen AK, Gullestad L, Holm T, Simonsen S, Kvernebo K (1998) Endothelium-dependent vasodilation of the skin microcirculation in heart transplant recipients. *Clin transplant* 12: 324-332
- Andreotti F, Davies GJ, Hackett DR, Khan MI, De Bart AC, Aber VR, Maseri A, Kluft C (1988) Major circadian fluctuations in fibrinolytic factors and possible relevance to time of onset of myocardial infarction, sudden cardiac death and stroke. *Am J Cardiol* 62: 635-637
- Anea CB, Ali MI, Osmond JM, Sullivan JC, Stepp DW, Merloiu AM, Rudic RD (2010) Matrix metalloproteinase 2 and 9 dysfunction underlie vascular stiffness in circadian clock mutant mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30: 2535-2543
- Angelot F, Seilles E, Biichle S, Berda Y, Gaugler B, Plumas J, Chaperot L, Dignat-George F, Tiberghien P, Saas P, Garnache-Ottou F (2009) Endothelial cell-derived microparticles induce plasmacytoid dendritic cell maturation: potential implications in inflammatory diseases. *Haematologica* 94: 1502-1512
- Angus JA, Wright CE (2000) Techniques to study the pharmacodynamics of isolated large and small blood vessels. *J Pharmacol Toxicol Methods* 44: 395-407
- Arlidsson M, Nilsson GE, Stromberg T (2000) Effects on skin blood flow by provocation during local analgesia. *Microvasc Res* 59: 122-130
- Armstrong LE, Casa DJ, Millard-Stafford M, Moran DS, Pyne SW, Roberts WO (2007) American College of Sports Medicine position stand. Exertional heat illness during training and competition. *Med Sci Sports Exerc* 39: 556-572
- Armstrong LE, Maresh CM (1991) The induction and decay of heat acclimatisation in trained athletes. *Sports Med* 12: 302-312
- Ayas NT, White DP, Manson JE, Stampfer MJ, Speizer FE, Malhotra A, Hu FB (2003) A prospective study of sleep duration and coronary heart disease in women. *Arch Int Med* 163: 205-209
- Bailey SR, Eid AH, Mitra S, Flavahan S, Flavahan NA (2004) Rho kinase mediates cold-induced constriction of cutaneous arteries: role of alpha2C-adrenoceptor translocation. *Circ Res* 94: 1367-1374
- Beny JL (1999) Information Networks in the Arterial Wall. *News Physiol Sci* 14: 68-73
- Berdeaux A, Ghaleh B, Dubois-Randé JL, Vigue B, Drieu La Rochelle C, Hittinger L, Giudicelli JF (1994) Role of vascular endothelium in exercise-induced dilation of large epicardial coronary arteries in conscious dogs. *Circulation* 89: 2799-2808
- Bergmann BM, Kushida CA, Everson CA, Gilliland MA, Obermeyer W, Rechtschaffen A (1989) Sleep deprivation in the rat: II. Methodology. *Sleep* 12: 5-12



- Bhagat K, Vallance P (1997) Inflammatory cytokines impair endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. *Circulation* 96: 3042-3047
- Bierhaus A, Wolf J, Andrassy M, Rohleder N, Humpert PM, Petrov D, Ferstl R, von Eynatten M, Wendt T, Rudofsky G, Joswig M, Morcos M, Schwaninger M, McEwen B, Kirschbaum C, Nawroth PP (2003) A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 1920-1925
- Binggeli C, Spieker LE, Corti R, Sudano I, Stojanovic V, Hayoz D, Luscher TF, Noll G (2003) Statins enhance postischemic hyperemia in the skin circulation of hypercholesterolemic patients: a monitoring test of endothelial dysfunction for clinical practice? *J Am Coll Cardiol* 42: 71-77
- Bland JM, Altman DJ (1986) Regression analysis. *Lancet* 1: 908-909
- Boer R, Ulrich WR, Klein T, Mirau B, Haas S, Baur I (2000) The inhibitory potency and selectivity of arginine substrate site nitric-oxide synthase inhibitors is solely determined by their affinity toward the different isoenzymes. *Mol Pharmacol* 58: 1026-1034
- Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A (2003) Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 168-175
- Bonnet MH, Arand DL (2007) EEG arousal norms by age. *J Clin Sleep Med* 3: 271-274
- Born J, Lange T, Hansen K, Molle M, Fehm HL (1997) Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells. *J Immunol* 158: 4454-4464
- Bourque SL, Davidge ST, Adams MA (2011) The interaction between endothelin-1 and nitric oxide in the vasculature: new perspectives. *Am J Physiol* 300: R1288-1295
- Bratz IN, Kanagy NL (2004) Nitric oxide synthase-inhibition hypertension is associated with altered endothelial cyclooxygenase function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H2394-2401
- Brocx KA, Drummond PD (2009) Reproducibility of cutaneous microvascular function assessment using laser Doppler flowmetry and acetylcholine iontophoresis. *S Pharmacol Physiol* 22: 313-321
- Brodsky SV, Gealekman O, Chen J, Zhang F, Togashi N, Crabtree M, Gross SS, Nasjletti A, Goligorsky MS (2004) Prevention and reversal of premature endothelial cell senescence and vasculopathy in obesity-induced diabetes by ebselen. *Circ Res* 94: 377-384
- Bruunsgaard H (2005) Physical activity and modulation of systemic low-level inflammation. *J Leukoc Biol* 78: 819-835
- Bryant PA, Trinder J, Curtis N (2004) Sick and tired: Does sleep have a vital role in the immune system? *Nat Rev Immunol* 4: 457-467
- Buysse DJ, Reynolds CF, 3rd, Monk TH, Berman SR, Kupfer DJ (1989) The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Res* 28: 193-213
- Caine-Bish NL, Potkanowicz ES, Otterstetter R, Glickman EL (2004) Thermal and metabolic responses of sleep deprivation of humans during acute cold exposure. *Aviat Space Environ Med* 75: 964-968
- Calabro P, Willerson JT, Yeh ET (2003) Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells. *Circulation* 108: 1930-1932
- Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR (1996) Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res* 78: 415-423
- Caughey GE, Cleland LG, Penglis PS, Gamble JR, James MJ (2001) Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2. *J Immunol* 167: 2831-2838
- Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE (1992) Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 340: 1111-1115
- Chae CU, Lee RT, Rifai N, Ridker PM (2001) Blood pressure and inflammation in apparently healthy men. *Hypertension* 38: 399-403
- Chang HM, Mai FD, Chen BJ, Wu UI, Huang YL, Lan CT, Ling YC (2008) Sleep deprivation predisposes liver to oxidative stress and phospholipid damage: a quantitative molecular imaging study. *J Anat* 212: 295-305
- Chang HM, Wu UI, Lin TB, Lan CT, Chien WC, Huang WL, Shieh JY (2006) Total sleep deprivation inhibits the neuronal nitric oxide synthase and cytochrome oxidase reactivities in the nodose ganglion of adult rats. *J Anat* 209: 239-250

- Charkoudian N (2003) Skin blood flow in adult human thermoregulation: how it works, when it does not, and why. *Mayo Clin Proc* 78: 603-612
- Charloux A, Gronfier C, Chapotot F, Ehrhart J, Piquard F, Brandenberger G (2001) Sleep deprivation blunts the night time increase in aldosterone release in humans. *J Sleep Res* 10: 27-33
- Chen GF, Suzuki H (1990) Calcium dependency of the endothelium-dependent hyperpolarization in smooth muscle cells of the rabbit carotid artery. *J Physiol* 421: 521-534
- Chen JR, Wang TJ, Huang HY, Chen LJ, Huang YS, Wang YJ, Tseng GF (2009) Fatigue reversibly reduced cortical and hippocampal dendritic spines concurrent with compromise of motor endurance and spatial memory. *Neuroscience* 161: 1104-1113
- Chennaoui M, Drogou C, Gomez-Merino D (2008) Effects of physical training on IL-1beta, IL-6 and IL-1ra concentrations in various brain areas of the rat. *Eur Cytokine Netw* 19: 8-14
- Chia S, Qadan M, Newton R, Ludlam CA, Fox KA, Newby DE (2003) Intra-arterial tumor necrosis factor-alpha impairs endothelium-dependent vasodilatation and stimulates local tissue plasminogen activator release in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 695-701
- Chowienzyk PJ, Cockcroft JR, Ritter JM (1994) Blood flow responses to intra-arterial acetylcholine in man: effects of basal flow and conduit vessel length. *Clin Sci (Lond)* 87: 45-51
- Christie MA, McKenna JT, Connolly NP, McCarley RW, Strecker RE (2008) 24 hours of sleep deprivation in the rat increases sleepiness and decreases vigilance: introduction of the rat-psychomotor vigilance task. *J Sleep Res* 17:376-384.
- Clapp BR, Hingorani AD, Kharbanda RK, Mohamed-Ali V, Stephens JW, Vallance P, MacAllister RJ (2004) Inflammation-induced endothelial dysfunction involves reduced nitric oxide bioavailability and increased oxidant stress. *Cardiovasc Res* 64: 172-178
- Clapp BR, Hirschfield GM, Storry C, Gallimore JR, Stidwill RP, Singer M, Deanfield JE, MacAllister RJ, Pepys MB, Vallance P, Hingorani AD (2005) Inflammation and endothelial function: direct vascular effects of human C-reactive protein on nitric oxide bioavailability. *Circulation* 111: 1530-1536
- Cockcroft JR, Chowienzyk PJ, Benjamin N, Ritter JM (1994) Preserved endothelium-dependent vasodilatation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 330: 1036-1040
- Constans J, Conri C (2006) Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease. *Clin Chim Acta* 368: 33-47
- Cooke JP, Rossitch E, Jr., Andon NA, Loscalzo J, Dzau VJ (1991) Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *J Clin Invest* 88: 1663-1671
- Coris EE, Ramirez AM, Van Durme DJ (2004) Heat illness in athletes: the dangerous combination of heat, humidity and exercise. *Sports Med* 34: 9-16
- Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R (2002) Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 39: 257-265
- Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG (1996) Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res* 79: 984-991
- Cox DA, Vita JA, Treasure CB, Fish RD, Alexander RW, Ganz P, Selwyn AP (1989a) Atherosclerosis impairs flow-mediated dilation of coronary arteries in humans. *Circulation* 80: 458-465
- Cox RH, Haas KS, Moisey DM, Tulenko TN (1989b) Effects of endothelium regeneration on canine coronary artery function. *Am J Physiol* 257: H1681-1692
- Cracowski JL, Minson CT, Salvat-Melis M, Halliwill JR (2006) Methodological issues in the assessment of skin microvascular endothelial function in humans. *Trends in pharmacological sciences* 27: 503-508
- Cracowski JL, Roustit M (2010) Pharmacology of the human skin microcirculation. *Microvasc Res* 80: 1
- Crea F, Biasucci LM, Buffon A, Liuzzo G, Monaco C, Caligiuri G, Kol A, Sperti G, Cianflone D, Maseri A (1997) Role of inflammation in the pathogenesis of unstable coronary artery disease. *Am J Cardiol* 80: 10E-16E
- Cui J, Arbab-Zadeh A, Prasad A, Durand S, Levine BD, Crandall CG (2005) Effects of heat stress on thermoregulatory responses in congestive heart failure patients. *Circulation* 112: 2286-2292
- Daanen H (2009) Cold-induced vasodilation. *Eur J Appl Physiol* 105: 663-664

- Daanen HA (2003) Finger cold-induced vasodilation: a review. *Eur J Appl Physiol* 89: 411-426
- Day TK, Grimshaw D (2005) An observational study on the spectrum of heat-related illness, with a proposal on classification. *J R Army Med Corps* 151: 11-18
- De Salvatore G, De Salvia MA, Piepoli AL, Natale L, Porro C, Nacci C, Mitolo CI, Mitolo-Chieppa D (2003) Effects of in vivo treatment with interleukins 1beta and 6 on rat mesenteric vascular bed reactivity. *Auton Autacoid Pharmacol* 23: 125-131
- de Wit C, Esser N, Lehr HA, Bolz SS, Pohl U (1999) Pentobarbital-sensitive EDHF mediates ACh-induced arteriolar dilation in the hamster microcirculation. *Am J Physiol* 276: H1527-1534
- Deanfield J, Donald A, Ferri C, Giannattasio C, Halcox J, Halligan S, Lerman A, Mancina G, Oliver JJ, Pessina AC, Rizzoni D, Rossi GP, Salvetti A, Schiffrin EL, Taddei S, Webb DJ (2005) Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds. *J Hypertens* 23: 7-17
- Debbabi H, Bonnin P, Ducluzeau PH, Leftheriotis G, Levy BI (2009) Noninvasive assessment of endothelial function in the skin microcirculation. *Am J Hypertens* 23: 541-546
- Desideri G, Croce G, Ferri C (2004) Does nondipping blood pressure profile contribute to vascular inflammation during sleep deprivation? *J Am Coll Cardiol* 44: 1529-1530; author reply 1530-1521
- Dimitrov S, Lange T, Tieken S, Fehm HL, Born J (2004) Sleep associated regulation of T helper 1/T helper 2 cytokine balance in humans. *Brain, behavior, and immunity* 18: 341-348
- Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399: 601-605
- Dinges DF, Douglas SD, Hamarman S, Zaugg L, Kapoor S (1995) Sleep deprivation and human immune function. *Adv Neuroimmunol* 5: 97-110
- Dinges DF, Douglas SD, Zaugg L, Campbell DE, McMann JM, Whitehouse WG, Orne EC, Kapoor SC, Icaza E, Orne MT (1994) Leukocytosis and natural killer cell function parallel neurobehavioral fatigue induced by 64 hours of sleep deprivation. *J Clin Invest* 93: 1930-1939
- Dohi Y, Takase H, Sato K, Ueda R (2007) Association among C-reactive protein, oxidative stress, and traditional risk factors in healthy Japanese subjects. *Int J Cardiol* 115: 63-66
- Durand S, Fromy B, Bouye P, Saumet JL, Abraham P (2002a) Current-induced vasodilation during water iontophoresis (5 min, 0.10 mA) is delayed from current onset and involves aspirin sensitive mechanisms. *J Vasc Research* 39: 59-71
- Durand S, Fromy B, Bouye P, Saumet JL, Abraham P (2002b) Vasodilatation in response to repeated anodal current application in the human skin relies on aspirin-sensitive mechanisms. *J physiol* 540: 261-269
- Durand S, Fromy B, Tartas M, Jardel A, Saumet JL, Abraham P (2003) Prolonged aspirin inhibition of anodal vasodilation is not due to the trafficking delay of neural mediators. *Am j physiol* 285: R155-161
- Durand S, Tartas M, Bouye P, Koitka A, Saumet JL, Abraham P (2004) Prostaglandins participate in the late phase of the vascular response to acetylcholine iontophoresis in humans. *J physiol* 561: 811-819
- Dzaja A, Dalal MA, Himmerich H, Uhr M, Pollmacher T, Schuld A (2004) Sleep enhances nocturnal plasma ghrelin levels in healthy subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E963-967
- Elherik K, Khan F, McLaren M, Kennedy G, Belch JJ (2002) Circadian variation in vascular tone and endothelial cell function in normal males. *Clin Sci (Lond)* 102: 547-552
- Ellingstad VS, Heimstra NW (1970) Performance changes during the sustained operation of a complex psychomotor task. *Ergonomics* 13: 693-705
- Epstein Y, Roberts WO (2011) The pathophysiology of heat stroke: an integrative view of the final common pathway. *Scand J Med Sci Sports In press*
- Everson CA, Laatsch CD, Hogg N (2005) Antioxidant defense responses to sleep loss and sleep recovery. *Am J Physiol* 288: R374-383
- Faraut B, Boudjeltia KZ, Vanhamme L, Kerkhofs M (2011) Immune, inflammatory and cardiovascular consequences of sleep restriction and recovery. *Sleep Med Rev In press*
- Fathi R, Haluska B, Isbel N, Short L, Marwick TH (2004) The relative importance of vascular structure and function in predicting cardiovascular events. *J Am Coll Cardiol* 43: 616-623
- Ferrell WR, Ramsay JE, Brooks N, Lockhart JC, Dickson S, McNeece GM, Greer IA, Sattar N (2002) Elimination of electrically induced iontophoretic artefacts: implications for non-invasive assessment of peripheral microvascular function. *J Vasc Research* 39: 447-455

- Fichtlscherer S, Rosenberger G, Walter DH, Breuer S, Dimmeler S, Zeiher AM (2000) Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *Circulation* 102: 1000-1006
- Fitzgerald GA (2004) Prostaglandins: modulators of inflammation and cardiovascular risk. *J Clin Rheumatol* 10: S12-17
- Fizanne L, Fromy B, Preckel MP, Sigauco-Roussel D, Saumet JL (2003) Effect of isoflurane on skin-pressure-induced vasodilation. *J Vasc Research* 40: 416-422
- Flouris AD, Cheung SS (2009a) Authors' response to H. Daanen's 'Cold-induced vasodilation' letter. *Eur J Appl Physiol* 106: 317-319
- Flouris AD, Cheung SS (2009b) Influence of thermal balance on cold-induced vasodilation. *J Appl Physiol* 106: 1264-1271
- Follenius M, Brandenberger G, Bandesapt JJ, Libert JP, Ehrhart J (1992) Nocturnal cortisol release in relation to sleep structure. *Sleep* 15: 21-27
- Frey DJ, Fleshner M, Wright KP, Jr. (2007) The effects of 40 hours of total sleep deprivation on inflammatory markers in healthy young adults. *Brain Beh Imm* 21: 1050-1057
- Frick M, Suessenbacher A, Alber HF, Dichtl W, Ulmer H, Pachinger O, Weidinger F (2005) Prognostic value of brachial artery endothelial function and wall thickness. *J Am Coll Cardiol* 46: 1006-1010
- Friedman EM, Irwin MR (1997) Modulation of immune cell function by the autonomic nervous system. *Pharmacol Ther* 74: 27-38
- Fromy B, Abraham P, Saumet JL (2000) Progressive calibrated pressure device to measure cutaneous blood flow changes to external pressure strain. *Brain Res Brain Res Protoc* 5: 198-203
- Fromy B, Sigauco-Roussel D, Baron C, Roquelaure Y, Leftheriotis G, Saumet JL (2007) Neuroendocrine pathway involvement in the loss of the cutaneous pressure-induced vasodilatation during acute pain in rats. *J Physiol* 579: 247-254
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376
- Furlan R, Guzzetti S, Crivellaro W, Dassi S, Tinelli M, Baselli G, Cerutti S, Lombardi F, Pagani M, Malliani A (1990) Continuous 24-hour assessment of the neural regulation of systemic arterial pressure and RR variabilities in ambulant subjects. *Circulation* 81: 537-547
- Gangwisch JE, Heymsfield SB, Boden-Albala B, Buijs RM, Kreier F, Pickering TG, Rundle AG, Zammit GK, Malaspina D (2006) Short sleep duration as a risk factor for hypertension: analyses of the first National Health and Nutrition Examination Survey. *Hypertension* 47: 833-839
- Garry A, Sigauco-Roussel D, Merzeau S, Dumont O, Saumet JL, Fromy B (2005) Cellular mechanisms underlying cutaneous pressure-induced vasodilation: in vivo involvement of potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H174-180
- Gary KA, Winokur A, Douglas SD, Kapoor S, Zaugg L, Dinges DF (1996) Total sleep deprivation and the thyroid axis: effects of sleep and waking activity. *Aviat Space Environ Med* 67: 513-519
- Gaubert ML, Sigauco-Roussel D, Tartas M, Berrut G, Saumet JL, Fromy B (2007) Endothelium-derived hyperpolarizing factor as an in vivo back-up mechanism in the cutaneous microcirculation in old mice. *J Physiol* 585: 617-626
- Ghiadoni L, Donald AE, Cropley M, Mullen MJ, Oakley G, Taylor M, O'Connor G, Betteridge J, Klein N, Steptoe A, Deanfield JE (2000) Mental stress induces transient endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 102: 2473-2478
- Gigante B, Piras O, De Paolis P, Porcellini A, Natale A, Volpe M (1998) Role of the angiotensin II AT2-subtype receptors in the blood pressure-lowering effect of losartan in salt-restricted rats. *J Hypertens* 16: 2039-2043
- Gohin S, Sigauco-Roussel D, Conjard-Duplany A, Dubourg L, Saumet JL, Fromy B (2011) What can current stimulation tell us about the vascular function of endogenous prostacyclin in healthy rat skin in vivo? *J Invest Dermatol* 131: 237-244
- Goichot B, Weibel L, Chapotot F, Gronfier C, Piquard F, Brandenberger G (1998) Effect of the shift of the sleep-wake cycle on three robust endocrine markers of the circadian clock. *Am J Physiol* 275: E243-248
- Gokce M, Erdol C, Orem C, Tekelioglu Y, Durmus I, Kasap H (2002a) Inflammation and immune system response against unstable angina and its relationship with coronary angiographic findings. *Jpn Heart J* 43: 593-605

- Gokce N, Keaney JF, Jr., Hunter LM, Watkins MT, Menzoian JO, Vita JA (2002b) Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation* 105: 1567-1572
- Gomez-Merino D, Drogou C, Chennaoui M, Tiollier E, Mathieu J, Guezennec CY (2005) Effects of combined stress during intense training on cellular immunity, hormones and respiratory infections. *Neuroimmunomod* 12: 164-172
- Gonzalez-Ortiz M, Martinez-Abundis E, Balcazar-Munoz BR, Pascoe-Gonzalez S (2000) Effect of sleep deprivation on insulin sensitivity and cortisol concentration in healthy subjects. *Diabetes Nutr Metab* 13: 80-83
- Gornikiewicz A, Sautner T, Brostjan C, Schmierer B, Fugger R, Roth E, Muhlbacher F, Bergmann M (2000) Catecholamines up-regulate lipopolysaccharide-induced IL-6 production in human microvascular endothelial cells. *FASEB J* 14: 1093-1100
- Graier WF, Posch K, Fleischhacker E, Wascher TC, Kostner GM (1999) Increased superoxide anion formation in endothelial cells during hyperglycemia: an adaptive response or initial step of vascular dysfunction? *Diabetes Res Clin Pract* 45: 153-160
- Grenon SM, Hurwitz S, Sheynberg N, Xiao X, Judson B, Ramsdell CD, Kim C, Cohen RJ, Williams GH (2004) Sleep restriction does not affect orthostatic tolerance in the simulated microgravity environment. *J Appl Physiol* 97: 1660-1666
- Grieve AW, Davis P, Dhillon S, Richards P, Hillebrandt D, Imray CH (2011) A clinical review of the management of frostbite. *J R Army Med Corps* 157: 73-78
- Grossmann M, Jamieson MJ, Kellogg DL, Jr., Kosiba WA, Pergola PE, Crandall CG, Shepherd AM (1995) The effect of iontophoresis on the cutaneous vasculature: evidence for current-induced hyperemia. *Microvasc Res* 50: 444-452
- Grover-Paez F, Zavalza-Gomez AB (2009) Endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors. *Diabetes Res Clin Pract* 84: 1-10
- Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM (2000) Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res* 86: E85-90
- Ha M, Park J (2005) Shiftwork and metabolic risk factors of cardiovascular disease. *J Occup Health* 47: 89-95
- Haack M, Kraus T, Schuld A, Dalal M, Koethe D, Pollmacher T (2002) Diurnal variations of interleukin-6 plasma levels are confounded by blood drawing procedures. *Psychoneuroendocrinology* 27: 921-931
- Haack M, Lee E, Cohen DA, Mullington JM (2009) Activation of the prostaglandin system in response to sleep loss in healthy humans: potential mediator of increased spontaneous pain. *Pain* 145: 136-141
- Haack M, Reichenberg A, Kraus T, Schuld A, Yirmiya R, Pollmacher T (2000) Effects of an intravenous catheter on the local production of cytokines and soluble cytokine receptors in healthy men. *Cytokine* 12: 694-698
- Haack M, Sanchez E, Mullington JM (2007) Elevated inflammatory markers in response to prolonged sleep restriction are associated with increased pain experience in healthy volunteers. *Sleep* 30: 1145-1152
- Hall MH, Muldoon MF, Jennings JR, Buysse DJ, Flory JD, Manuck SB (2008) Self-reported sleep duration is associated with the metabolic syndrome in midlife adults. *Sleep* 31: 635-643
- Halliwill JR, Taylor JA, Hartwig TD, Eckberg DL (1996) Augmented baroreflex heart rate gain after moderate-intensity, dynamic exercise. *Am J Physiol* 270: R420-426
- Hamilton CA, McPhaden AR, Berg G, Pathi V, Dominiczak AF (2001) Is hydrogen peroxide an EDHF in human radial arteries? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H2451-2455
- Hansell J, Henareh L, Agewall S, Norman M (2004) Non-invasive assessment of endothelial function - relation between vasodilatory responses in skin microcirculation and brachial artery. *Clin Physiol Funct Im* 24: 317-322
- Hayes RD, Beach JR, Rutherford DM, Sim MR (1998) Stability of methacholine chloride solutions under different storage conditions over a 9 month period. *Eur Respir J* 11: 946-948
- Hecker M, Ullrich V (1989) On the mechanism of prostacyclin and thromboxane A2 biosynthesis. *J Bio Chem* 264: 141-150
- Heiser P, Dickhaus B, Schreiber W, Clement HW, Hasse C, Hennig J, Remschmidt H, Krieg JC, Wesemann W, Opper C (2000) White blood cells and cortisol after sleep deprivation and recovery sleep in humans. *E Arch Psy Clin Neuro* 250: 16-23
- Hennig J, Friebe J, Ryl I, Kramer B, Bottcher J, Netter P (2000) Upright posture influences salivary cortisol. *Psychoneuroendocrinology* 25: 69-83

- Henricson J, Tesselaar E, Persson K, Nilsson G, Sjöberg F (2007) Assessment of microvascular function by study of the dose-response effects of iontophoretically applied drugs (acetylcholine and sodium nitroprusside)--methods and comparison with in vitro studies. *Microvasc Res* 73: 143-149
- Higuchi S, Ohtsu H, Suzuki H, Shirai H, Frank GD, Eguchi S (2007) Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clin Sci (Lond)* 112: 417-428
- Hijmering ML, Stroes ES, Olijhoek J, Hutten BA, Blankestijn PJ, Rabelink TJ (2002) Sympathetic activation markedly reduces endothelium-dependent, flow-mediated vasodilation. *J Am Coll Cardiol* 39: 683-688
- Hingorani AD, Cross J, Kharbanda RK, Mullen MJ, Bhagat K, Taylor M, Donald AE, Palacios M, Griffin GE, Deanfield JE, MacAllister RJ, Vallance P (2000) Acute systemic inflammation impairs endothelium-dependent dilatation in humans. *Circulation* 102: 994-999
- Hodges GJ, Zhao K, Kosiba WA, Johnson JM (2006) The involvement of nitric oxide in the cutaneous vasoconstrictor response to local cooling in humans. *J Physiol* 574: 849-857
- Holowatz LA, Thompson CS, Minson CT, Kenney WL (2005) Mechanisms of acetylcholine-mediated vasodilatation in young and aged human skin. *J Physiol* 563: 965-973
- Horne BD, Anderson JL, John JM, Weaver A, Bair TL, Jensen KR, Renlund DG, Muhlestein JB (2005) Which white blood cell subtypes predict increased cardiovascular risk? *J Am Coll Cardiol* 45: 1638-1643
- Horne JA, Ostberg O (1976) A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *Int J Chronobiol* 4: 97-110
- Hubbard RW (1990) Heatstroke pathophysiology: the energy depletion model. *Med Sci Sports Exerc* 22: 19-28
- Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM, Jr., Boerwinkle E (1997) Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation* 96: 4219-4225
- Imholz BP (1996) Automated blood pressure measurement during ergometric stress testing: possibilities of Finapres. *Z Kardiol* 85 S3: 76-80
- Irikura K, Maynard KI, Lee WS, Moskowitz MA (1994) L-NNA decreases cortical hyperemia and brain cGMP levels following CO<sub>2</sub> inhalation in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol* 267: H837-843
- Irwin M, McClintick J, Costlow C, Fortner M, White J, Gillin JC (1996) Partial night sleep deprivation reduces natural killer and cellular immune responses in humans. *FASEB J* 10: 643-653
- Irwin M, Thompson J, Miller C, Gillin JC, Ziegler M (1999) Effects of sleep and sleep deprivation on catecholamine and interleukin-2 levels in humans: clinical implications. *F Clin Andoc Met* 84: 1979-1985
- Irwin MR, Carrillo C, Olmstead R (2010) Sleep loss activates cellular markers of inflammation: sex differences. *Brauh Bihav Immun* 24: 54-57
- Irwin MR, Wang M, Campomayor CO, Collado-Hidalgo A, Cole S (2006) Sleep deprivation and activation of morning levels of cellular and genomic markers of inflammation. *Arch Int Med* 166: 1756-1762
- Irwin MR, Wang M, Ribeiro D, Cho HJ, Olmstead R, Breen EC, Martinez-Maza O, Cole S (2008) Sleep loss activates cellular inflammatory signaling. *Biol Psychiatry* 64: 538-540
- Iversen PO, Nicolaysen A, Kvernebo K, Benestad HB, Nicolaysen G (1999) Human cytokines modulate arterial vascular tone via endothelial receptors. *Pflugers Arch* 439: 93-100
- Jadhav S, Sattar N, Petrie JR, Cobbe SM, Ferrell WR (2007) Reproducibility and repeatability of peripheral microvascular assessment using iontophoresis in conjunction with laser Doppler imaging. *J Cardiol Pharmacol* 50: 343-349
- Jansson JH, Olofsson BO, Nilsson TK (1993) Predictive value of tissue plasminogen activator mass concentration on long-term mortality in patients with coronary artery disease. A 7-year follow-up. *Circulation* 88: 2030-2034
- Jimenez-Altayo F, Briones AM, Giraldo J, Planas AM, Salices M, Vila E (2006) Increased superoxide anion production by interleukin-1beta impairs nitric oxide-mediated relaxation in resistance arteries. *J Pharmacol Experim Ther* 316: 42-52
- Joannides R, Bellien J, Thuillez C (2006) Clinical methods for the evaluation of endothelial function-- a focus on resistance arteries. *Fundam Clin Pharmacol* 20: 311-320
- Johns MW (1991) A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. *Sleep* 14: 540-545

- Johnson JD, Campisi J, Sharkey CM, Kennedy SL, Nickerson M, Greenwood BN, Fleshner M (2005a) Catecholamines mediate stress-induced increases in peripheral and central inflammatory cytokines. *Neuroscience* 135: 1295-1307
- Johnson JM, Kellogg DL, Jr. (2010) Thermoregulatory and thermal control in the human cutaneous circulation. *Front Biosci (Schol Ed)* 2: 825-853
- Johnson JM, Yen TC, Zhao K, Kosiba WA (2005b) Sympathetic, sensory, and nonneuronal contributions to the cutaneous vasoconstrictor response to local cooling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H1573-1579
- Johnson RP (1984) Laser Doppler microscopy. *Biochem Soc Trans* 12: 635-637
- Kalia YN, Naik A, Garrison J, Guy RH (2004) Iontophoretic drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 56: 619-658
- Kamperis K, Hagstroem S, Radvanska E, Rittig S, Djurhuus JC (2010) Excess diuresis and natriuresis during acute sleep deprivation in healthy adults. *Am J Physiol Renal Physiol* 299: F404-411
- Kato M, Phillips BG, Sigurdsson G, Narkiewicz K, Pesek CA, Somers VK (2000) Effects of sleep deprivation on neural circulatory control. *Hypertension* 35: 1173-1175
- Kawano H, Motoyama T, Yasue H, Hirai N, Waly HM, Kugiyama K, Ogawa H (2002) Endothelial function fluctuates with diurnal variation in the frequency of ischemic episodes in patients with variant angina. *J Am Coll Cardiol* 40: 266-270
- Kawashima S, Yokoyama M (2004) Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 998-1005
- Kellogg DL, Jr. (2006) In vivo mechanisms of cutaneous vasodilation and vasoconstriction in humans during thermoregulatory challenges. *J Appl Physiol* 100: 1709-1718
- Kellogg DL, Jr., Hodges GJ, Orozco CR, Phillips TM, Zhao JL, Johnson JM (2007) Cholinergic mechanisms of cutaneous active vasodilation during heat stress in cystic fibrosis. *J Appl Physiol* 103: 963-968
- Kellogg DL, Jr., Zhao JL, Coey U, Green JV (2005) Acetylcholine-induced vasodilation is mediated by nitric oxide and prostaglandins in human skin. *J Appl Physiol* 98: 629-632
- Kellogg DL, Jr., Zhao JL, Wu Y (2009) Roles of nitric oxide synthase isoforms in cutaneous vasodilation induced by local warming of the skin and whole body heat stress in humans. *J Appl Physiol* 107: 1438-1444
- Khan F, Newton DJ, Smyth EC, Belch JJ (2004) Influence of vehicle resistance on transdermal iontophoretic delivery of acetylcholine and sodium nitroprusside in humans. *J Appl Physiol* 97: 883-887
- Khan F, Patterson D, Belch JJ, Hirata K, Lang CC (2008) Relationship between peripheral and coronary function using laser Doppler imaging and transthoracic echocardiography. *Clin Sci (Lond)* 115: 295-300
- Khazaei M, Moien-Afshari F, Laher I (2008) Vascular endothelial function in health and diseases. *Pathophysiology* 15: 49-67
- Kim W, Park HH, Park CS, Cho EK, Kang WY, Lee ES (2011) Impaired endothelial function in medical personnel working sequential night shifts. *Int J Cardiol* 151: 377-378
- Kindler V, Sappino AP (1991) The beneficial effects of localized tumor necrosis factor production in BCG infection. *Behring Inst Mitt*: 120-124
- King CR, Knutson KL, Rathouz PJ, Sidney S, Liu K, Lauderdale DS (2008) Short sleep duration and incident coronary artery calcification. *Jama* 300: 2859-2866
- Kiviniemi TO, Snapir A, Saraste M, Toikka JO, Raitakari OT, Ahotupa M, Hartiala JJ, Scheinin M, Koskenvuo JW (2006) Determinants of coronary flow velocity reserve in healthy young men. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H564-569
- Koeppen M, Feil R, Siegl D, Feil S, Hofmann F, Pohl U, de Wit C (2004) cGMP-dependent protein kinase mediates NO- but not acetylcholine-induced dilations in resistance vessels in vivo. *Hypertension* 44: 952-955
- Korthuis R (2011) Chapitre 3, Régulation of vascular tone. In: Sciences MCL (ed) Skeletal Muscle circulation. San Rafael (CA)
- Kripke DF, Garfinkel L, Wingard DL, Klauber MR, Marler MR (2002) Mortality associated with sleep duration and insomnia. *Arch Gen Psychiatry* 59: 131-136
- Kripke DF, Simons RN, Garfinkel L, Hammond EC (1979) Short and long sleep and sleeping pills. Is increased mortality associated? *Arch Gen Psychiatry* 36: 103-116
- Krueger JM, Majde JA (2003) Humoral links between sleep and the immune system: research issues. *Ann N Y Acad Sci* 992: 9-20

- Kubes P, Suzuki M, Granger DN (1991) Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 4651-4655
- Kupper T, Steffgen J, Jansing P (2003) Cold exposure during helicopter rescue operations in the Western Alps. *Ann Occup Hyg* 47: 7-16
- Kurtz TW, Griffin KA, Bidani AK, Davisson RL, Hall JE (2005) Recommendations for blood pressure measurement in animals: summary of an AHA scientific statement from the Council on High Blood Pressure Research, Professional and Public Education Subcommittee. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 478-479
- Lamb DJ, Tickner ML, Dreux AC, El-Sankary W, Hourani SM, Eales-Reynolds LJ, Ferns GA (2004) Impairment of vascular function following BCG immunisation is associated with immune responses to HSP-60 in the cholesterol-fed rabbit. *Atherosclerosis* 172: 13-20
- Lamontagne D, König A, Bassenge E, Busse R (1992) Prostacyclin and nitric oxide contribute to the vasodilator action of acetylcholine and bradykinin in the intact rabbit coronary bed. *J Cardiol Pharmacol* 20: 652-657
- Landis CA, Savage MV, Lentz MJ, Brengelmann GL (1998) Sleep deprivation alters body temperature dynamics to mild cooling and heating not sweating threshold in women. *Sleep* 21: 101-108
- Lange T, Perras B, Fehm HL, Born J (2003) Sleep enhances the human antibody response to hepatitis A vaccination. *Psycho Med* 65: 831-835
- Larkin SW, Williams TJ (1993) Evidence for sensory nerve involvement in cutaneous reactive hyperemia in humans. *Circ Res* 73: 147-154
- Laude D, Elghozi JL, Girard A, Bellard E, Bouhaddi M, Castiglioni P, Cerutti C, Cividjian A, Di Rienzo M, Fortrat JO, Janssen B, Karemaker JM, Leftheriotis G, Parati G, Persson PB, Porta A, Quintin L, Regnard J, Rudiger H, Stauss HM (2004) Comparison of various techniques used to estimate spontaneous baroreflex sensitivity (the EuroBaVar study). *Am J Physiol* 286: R226-231
- Le Brocq M, Leslie SJ, Milliken P, Megson IL (2008) Endothelial dysfunction: from molecular mechanisms to measurement, clinical implications, and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 10: 1631-1674
- Leproult R, Colecchia EF, L'Hermite-Baleriaux M, Van Cauter E (2001) Transition from dim to bright light in the morning induces an immediate elevation of cortisol levels. *F Clin Andoc Met* 86: 151-157
- Leproult R, Copinschi G, Buxton O, Van Cauter E (1997) Sleep loss results in an elevation of cortisol levels the next evening. *Sleep* 20: 865-870
- Lerman A, Holmes DR, Jr., Bell MR, Garratt KN, Nishimura RA, Burnett JC, Jr. (1995) Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans. *Circulation* 92: 2426-2431
- Leung WH, Lau CP, Wong CK (1993) Beneficial effect of cholesterol-lowering therapy on coronary endothelium-dependent relaxation in hypercholesterolaemic patients. *Lancet* 341: 1496-1500
- Lewis T (1930) Observations upon the reactions of the vessels of the human skin to cold. *Heart* 15: 177-208
- Liao D, Wong TY, Klein R, Jones D, Hubbard L, Sharrett AR (2004) Relationship between carotid artery stiffness and retinal arteriolar narrowing in healthy middle-aged persons. *Stroke* 35: 837-842
- Libby P, Aikawa M, Jain MK (2006) Vascular endothelium and atherosclerosis. *Handb Exp Pharmacol*: 285-306
- Libby P, Egan D, Skarlatos S (1997) Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. *Circulation* 96: 4095-4103
- Lieberman HR, Tharion WJ, Shukitt-Hale B, Speckman KL, Tulley R (2002) Effects of caffeine, sleep loss, and stress on cognitive performance and mood during U.S. Navy SEAL training. *Sea-Air-Land. Psychopharmacology (Berl)* 164: 250-261
- Lind L (2003) Circulating markers of inflammation and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 169: 203-214
- Liu Y, Tanaka H (2002) Overtime work, insufficient sleep, and risk of non-fatal acute myocardial infarction in Japanese men. *Occup Environ Med* 59: 447-451
- Lo SH, Lin LY, Hwang JS, Chang YY, Liao CS, Wang JD (2010) Working the night shift causes increased vascular stress and delayed recovery in young women. *Chronobiol Int* 27: 1454-1468
- Loeb AL, Godeny I, Longnecker DE (1997) Anesthetics alter relative contributions of NO and EDHF in rat cremaster muscle microcirculation. *Am J Physiol* 273: H618-627
- Lohman TG, Boileau RA, Massey BH (1975) Prediction of lean body mass in young boys from skinfold thickness and body weight. *Hum Biol* 47: 245-262



- Lorenzo S, Minson CT (2007) Human cutaneous reactive hyperaemia: role of BKCa channels and sensory nerves. *J Physiol* 585: 295-303
- Losonczy G, Kriston T, Szabo A, Muller V, Harvey J, Hamar P, Heemann U, Baylis C (2000) Male gender predisposes to development of endotoxic shock in the rat. *Cardiovasc Res* 47: 183-191
- Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P (1986) Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 315: 1046-1051
- Lusardi P, Mugellini A, Preti P, Zoppi A, Derosa G, Fogari R (1996) Effects of a restricted sleep regimen on ambulatory blood pressure monitoring in normotensive subjects. *Am J Hypertens* 9: 503-505
- Makinen TM, Jokelainen J, Nayha S, Laatikainen T, Jousilahti P, Hassi J (2009) Occurrence of frostbite in the general population--work-related and individual factors. *Scand J Work Environ Health* 35: 384-393
- Mallat Z, Tedgui A (2000) Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. *Brit J Pharmacol* 130: 947-962
- Manriquez AI, Zhang Q (2007) An algorithm for QRS onset and offset detection in single lead electrocardiogram records. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2007: 541-544
- Marcelin-Jimenez G, Escalante B (2001) Functional and cellular interactions between nitric oxide and prostacyclin. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 129: 349-359
- Marsh AR (1983) A short but distant war - the Falklands campaign. *J R Soc Med* 76: 972-982
- Martin BJ, Gaddis GM (1981) Exercise after sleep deprivation. *Med Sci Sports Exerc* 13: 220-223
- Mascareno E, El-Shafei M, Maulik N, Sato M, Guo Y, Das DK, Siddiqui MA (2001) JAK/STAT signaling is associated with cardiac dysfunction during ischemia and reperfusion. *Circulation* 104: 325-329
- Maver J, Struel M (2000) Microvascular reactivity in normotensive subjects with a familial predisposition to hypertension. *Microvasc Res* 60: 241-248
- Medow MS, Taneja I, Stewart JM (2007) Cyclooxygenase and nitric oxide synthase dependence of cutaneous reactive hyperemia in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H425-432
- Meier-Ewert HK, Ridker PM, Rifai N, Price N, Dinges DF, Mullington JM (2001) Absence of diurnal variation of C-reactive protein concentrations in healthy human subjects. *Clinical chemistry* 47: 426-430
- Meier-Ewert HK, Ridker PM, Rifai N, Regan MM, Price NJ, Dinges DF, Mullington JM (2004) Effect of sleep loss on C-reactive protein, an inflammatory marker of cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol* 43: 678-683
- Meier CR, Jick SS, Derby LE, Vasilakis C, Jick H (1998) Acute respiratory-tract infections and risk of first-time acute myocardial infarction. *Lancet* 351: 1467-1471
- Meney I, Waterhouse J, Atkinson G, Reilly T, Davenne D (1998) The effect of one night's sleep deprivation on temperature, mood, and physical performance in subjects with different amounts of habitual physical activity. *Chronobiol Int* 15: 349-363
- Miller VM, Vanhoutte PM (1985) Endothelium-dependent contractions to arachidonic acid are mediated by products of cyclooxygenase. *Am J Physiol* 248: H432-437
- Mills PJ, von Kanel R, Norman D, Natarajan L, Ziegler MG, Dimsdale JE (2007) Inflammation and sleep in healthy individuals. *Sleep* 30: 729-735
- Milstien S, Katusic Z (1999) Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun* 263: 681-684
- Minson CT, Berry LT, Joyner MJ (2001) Nitric oxide and neurally mediated regulation of skin blood flow during local heating. *J Appl Physiol* 91: 1619-1626
- Miro E, Cano-Lozano MC, Buéla-Casal G (2002) Effects of total sleep deprivation on cardiovascular parameters: An absence of biologically significant findings? *J Psychophysiol* 16: 119-126
- Moe GW, Rouleau JL, Nguyen QT, Cernacek P, Stewart DJ (2003) Role of endothelins in congestive heart failure. *Can J Physiol Pharmacol* 81: 588-597
- Moor-Instruments (2007) Principe de la mesure du débit sanguin cutané par laser-Doppler. <http://gb.moor.co.uk/product/moorvms-ldf-laser-doppler-monitor/1>. Dernier accès le 29 sept 2011
- Moran DS, Heled Y, Shani Y, Epstein Y (2003) Hypothermia and local cold injuries in combat and non-combat situations--the Israeli experience. *Aviat Space Environ Med* 74: 281-284
- Morel O, Toti F, Bakouboula B, Grunebaum L, Freyssinet JM (2006) Procoagulant microparticles: 'criminal partners' in atherothrombosis and deleterious cellular exchanges. *Pathophysiol Haemost Thromb* 35: 15-22

- Muenter NK, Watenpaugh DE, Wasmund WL, Wasmund SL, Maxwell SA, Smith ML (2000) Effect of sleep restriction on orthostatic cardiovascular control in humans. *J Appl Physiol* 88: 966-972
- Mullington JM, Haack M, Toth M, Serrador JM, Meier-Ewert HK (2009) Cardiovascular, inflammatory, and metabolic consequences of sleep deprivation. *Prog Cardiovasc Dis* 51: 294-302
- Mullington JM, Simpson NS, Meier-Ewert HK, Haack M (2010) Sleep loss and inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 24: 775-784
- Murtha YM, Allen BM, Orr JA (1999) The role of protein kinase C in thromboxane A<sub>2</sub>-induced pulmonary artery vasoconstriction. *J Biomed Sci* 6: 293-295
- Nakamura M, Yoshida H, Arakawa N, Saitoh S, Satoh M, Hiramori K (2000) Effects of tumor necrosis factor-alpha on basal and stimulated endothelium-dependent vasomotion in human resistance vessel. *J Cardiol Pharmacol* 36: 487-492
- Nam KC, Kwon MK, Kim DW (2011) Effects of posture and acute sleep deprivation on heart rate variability. *Yonsei Med J* 52: 569-573
- Nieuwdorp M, Meuwese MC, Mooij HL, Ince C, Broekhuizen LN, Kastelein JJ, Stroes ES, Vink H (2008) Measuring endothelial glycocalyx dimensions in humans: a potential novel tool to monitor vascular vulnerability. *J Appl Physiol* 104: 845-852
- O'Brien C (2005) Reproducibility of the cold-induced vasodilation response in the human finger. *J Appl Physiol* 98: 1334-1340
- Obal F, Jr., Krueger JM (2003) Biochemical regulation of non-rapid-eye-movement sleep. *Front Biosci* 8: d520-550
- Ogawa Y, Kanbayashi T, Saito Y, Takahashi Y, Kitajima T, Takahashi K, Hishikawa Y, Shimizu T (2003) Total sleep deprivation elevates blood pressure through arterial baroreflex resetting: a study with microneurographic technique. *Sleep* 26: 986-989
- Olivares R, Ducimetiere P, Claude JR (1993) Monocyte count: a risk factor for coronary heart disease? *Am J Epidemiol* 137: 49-53
- Opazo Saez AM, Mosel F, Nurnberger J, Rushentsova U, Gossl M, Mitchell A, Schafers RF, Philipp T, Wenzel RR (2005) Laser Doppler imager (LDI) scanner and intradermal injection for in vivo pharmacology in human skin microcirculation: responses to acetylcholine, endothelin-1 and their repeatability. *Br J Clin Pharmacol* 59: 511-519
- Orshal JM, Khalil RA (2004) Interleukin-6 impairs endothelium-dependent NO-cGMP-mediated relaxation and enhances contraction in systemic vessels of pregnant rats. *Am J Physiol* 286: R1013-1023
- Otto ME, Svatikova A, Barretto RB, Santos S, Hoffmann M, Khandheria B, Somers V (2004) Early morning attenuation of endothelial function in healthy humans. *Circulation* 109: 2507-2510
- Ozturk L, Pelin Z, Karadeniz D, Kaynak H, Cakar L, Gozukirmizi E (1999) Effects of 48 hours sleep deprivation on human immune profile. *Sleep Res Online* 2: 107-111
- Pagani M, Pizzinelli P, Traon AP, Ferreri C, Beltrami S, Bareille MP, Costes-Salon MC, Beroud S, Blin O, Lucini D, Philip P (2009) Hemodynamic, autonomic and baroreflex changes after one night sleep deprivation in healthy volunteers. *Auton Neurosci* 145: 76-80
- Palma BD, Gabriel A, Jr., Bignotto M, Tufik S (2002) Paradoxical sleep deprivation increases plasma endothelin levels. *Braz J Med Biol Res* 35: 75-79
- Palmer J, Love S (2011) Endothelin receptor antagonists: potential in Alzheimer's disease. *Pharmacol Res* 63: 525-531
- Palmer MJ (2009) Endothelin receptor antagonists: status and learning 20 years on. *Prog Med Chem* 47: 203-237
- Panza JA, Epstein SE, Quyyumi AA (1991) Circadian variation in vascular tone and its relation to alpha-sympathetic vasoconstrictor activity. *N Engl J Med* 325: 986-990
- Papanicolaou DA, Petrides JS, Tsigos C, Bina S, Kalogeras KT, Wilder R, Gold PW, Deuster PA, Chrousos GP (1996) Exercise stimulates interleukin-6 secretion: inhibition by glucocorticoids and correlation with catecholamines. *Am J Physiol* 271: E601-605
- Papapetropoulos A, Abou-Mohamed G, Marczin N, Murad F, Caldwell RW, Catravas JD (1996) Downregulation of nitrovasodilator-induced cyclic GMP accumulation in cells exposed to endotoxin or interleukin-1 beta. *Brit J Pharmacol* 118: 1359-1366
- Parthimos D, Edwards DH, Griffith TM (1996) Comparison of chaotic and sinusoidal vasomotion in the regulation of microvascular flow. *Cardiovasc Res* 31: 388-399

- Patel SR, Zhu X, Storfer-Isser A, Mehra R, Jenny NS, Tracy R, Redline S (2009) Sleep duration and biomarkers of inflammation. *Sleep* 32: 200-204
- Pergola PE, Kellogg DL, Jr., Johnson JM, Kosiba WA, Solomon DE (1993) Role of sympathetic nerves in the vascular effects of local temperature in human forearm skin. *Am J Physiol* 265: H785-792
- Perry JC, Bergamaschi CT, Campos RR, Andersen ML, Casarini DE, Tufik S (2011a) Differential sympathetic activation induced by intermittent hypoxia and sleep loss in rats: Action of angiotensin (1-7). *Auton Neurosci* 160: 32-36
- Perry JC, Bergamaschi CT, Campos RR, Andersen ML, Montano N, Casarini DE, Tufik S (2011b) Sympathetic and angiotensinergic responses mediated by paradoxical sleep loss in rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 12: 146-152
- Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroberto P, Verdecchia P, Schillaci G (2001) Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation* 104: 191-196
- Piedrahita H, Oksa J, Malm C, Rintamaki H (2008) Health problems related to working in extreme cold conditions indoors. *Int J Circumpolar Health* 67: 279-287
- Pierdomenico SD, Costantini F, Bucci A, De Cesare D, Bucciarelli T, Cuccurullo F, Mezzetti A (1999) Blunted nocturnal fall in blood pressure and oxidative stress in men and women with essential hypertension. *Am J Hypertens* 12: 356-363
- Pries AR, Habazettl H, Ambrosio G, Hansen PR, Kaski JC, Schachinger V, Tillmanns H, Vassalli G, Tritto I, Weis M, de Wit C, Bugiardini R (2008) A review of methods for assessment of coronary microvascular disease in both clinical and experimental settings. *Cardiovasc Res* 80: 165-174
- Pyke K, Green DJ, Weisbrod C, Best M, Dembo L, O'Driscoll G, Tschakovsky M (2010) Nitric oxide is not obligatory for radial artery flow-mediated dilation following release of 5 or 10 min distal occlusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H119-126
- Pyke KE, Tschakovsky ME (2005) The relationship between shear stress and flow-mediated dilatation: implications for the assessment of endothelial function. *J Physiol* 568: 357-369
- Racchi H, Schliem AJ, Donoso MV, Rahmer A, Zuniga A, Guzman S, Rudolf K, Huidobro-Toro JP (1997) Neuropeptide Y Y1 receptors are involved in the vasoconstriction caused by human sympathetic nerve stimulation. *Eur J Pharmacol* 329: 79-83
- Rastaldo R, Penna C, Pagliaro P (2001) Comparison between the effects of pentobarbital or ketamine/nitrous oxide anesthesia on metabolic and endothelial components of coronary reactive hyperemia. *Life Sci* 69: 729-738
- Rechtschaffen A, Bergmann BM, Gilliland MA, Bauer K (1999) Effects of method, duration, and sleep stage on rebounds from sleep deprivation in the rat. *Sleep* 22: 11-31
- Rice PJ, Taylor DA, Valinski WA, Head RJ, Fleming WW (1987) Norepinephrine depletion and sensitivity changes in rat heart induced by pretreatment with reserpine. *J Pharmacol Exp Therap* 240: 764-771
- Rinaldi GJ (2001) Influence of several methodological procedures utilized to obtain in vitro vascular preparations on endothelial activity. *Endothelium* 8: 235-242
- Rintamaki H (2000) Predisposing factors and prevention of frostbite. *Int J Circumpolar Health* 59: 114-121
- Robson MC, DelBeccaro EJ, Heggors JP, Loy GL (1980) Increasing dermal perfusion after burning by decreasing thromboxane production. *J Trauma* 20: 722-725
- Rogers NL, Dinges DF (2008) Interaction of chronic sleep restriction and circadian system in humans. *J Sleep Res* 17: 406-411
- Rohde LE, Lee RT, Rivero J, Jamacochian M, Arroyo LH, Briggs W, Rifai N, Libby P, Creager MA, Ridker PM (1998) Circulating cell adhesion molecules are correlated with ultrasound-based assessment of carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 1765-1770
- Ross JJ (1965) Neurological Findings after Prolonged Sleep Deprivation. *Arch Neurol* 12: 399-403
- Ross R (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115-126
- Roustit M, Blaise S, Cracowski JL (2009) Sodium nitroprusside iontophoresis on the finger pad does not consistently increase skin blood flow in healthy controls and patients with systemic sclerosis. *Microvasc Res* 77: 260-264
- Roustit M, Blaise S, Millet C, Cracowski JL (2010a) Reproducibility and methodological issues of skin post-occlusive and thermal hyperemia assessed by single-point laser Doppler flowmetry. *Microvasc Res* 79: 102-108

- Roustit M, Maggi F, Isnard S, Hellmann M, Bakken B, Cracowski JL (2010b) Reproducibility of a local cooling test to assess microvascular function in human skin. *Microvasc Res* 79: 34-39
- Ruiz FS, Andersen ML, Martins RC, Zager A, Lopes JD, Tufik S (2010) Immune alterations after selective rapid eye movement or total sleep deprivation in healthy male volunteers. *Innate Immun*
- Sabanayagam C, Shankar A (2010) Sleep duration and cardiovascular disease: results from the National Health Interview Survey. *Sleep* 33: 1037-1042
- Sakurai T, Yanagisawa M, Masaki T (1992) Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends in pharmacological sciences* 13: 103-108
- Salin-Pascual RJ, Ortega-Soto H, Huerto-Delgado L, Camacho-Arroyo I, Roldan-Roldan G, Tamarkin L (1988) The effect of total sleep deprivation on plasma melatonin and cortisol in healthy human volunteers. *Sleep* 11: 362-369
- Sander M, Hansen J, Victor RG (1997) The sympathetic nervous system is involved in the maintenance but not initiation of the hypertension induced by N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester. *Hypertension* 30: 64-70
- Saumet JL, Kellogg DL, Jr., Taylor WF, Johnson JM (1988) Cutaneous laser-Doppler flowmetry: influence of underlying muscle blood flow. *J Appl Physiol* 65: 478-481
- Sauvet F, Leftheriotis G, Gomez-Merino D, Langrume C, Drogou C, Van Beers P, Bourrilhon C, Florence G, Chennaoui M (2010) Effect of acute sleep deprivation on vascular function in healthy subjects. *J Appl Physiol* 108: 68-75
- Savourey G, Bittel J (1994) Cold thermoregulatory changes induced by sleep deprivation in men. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 69: 216-220
- Sawada S (1996) Cold-induced vasodilatation response of finger skin blood vessels in older men observed by using a modified local cold tolerance test. *Ind Health* 34: 51-56
- Sawada S, Araki S, Yokoyama K (2000) Changes in cold-induced vasodilatation, pain and cold sensation in fingers caused by repeated finger cooling in a cool environment. *Ind Health* 38: 79-86
- Sawka MN, Gonzalez RR, Pandolf KB (1984) Effects of sleep deprivation on thermoregulation during exercise. *Am J Physiol* 246: R72-77
- Sayk F, Teckentrup C, Becker C, Heutling D, Wellhoner P, Lehnert H, Dodt C (2010) Effects of selective slow-wave sleep deprivation on nocturnal blood pressure dipping and daytime blood pressure regulation. *Am J Physiol* 298: R191-197
- Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM (2000) Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 101: 1899-1906
- Schindler TH, Nitzsche EU, Olschewski M, Magozaki N, Mix M, Prior JO, Facta AD, Solzbach U, Just H, Schelbert HR (2004) Chronic inflammation and impaired coronary vasoreactivity in patients with coronary risk factors. *Circulation* 110: 1069-1075
- Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van der Poll T (2008) Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol* 83: 536-545
- Schussler P, Uhr M, Ising M, Weikel JC, Schmid DA, Held K, Mathias S, Steiger A (2006) Nocturnal ghrelin, ACTH, GH and cortisol secretion after sleep deprivation in humans. *Psychoneuroendocrinology* 31: 915-923
- Sekine T, Daimon M, Hasegawa R, Toyoda T, Kawata T, Funabashi N, Komuro I (2010) The impact of sleep deprivation on the coronary circulation. *Int J Cardiol* 144 : 266-267
- Sendowski I, Savourey G, Besnard Y, Bittel J (1997) Cold induced vasodilatation and cardiovascular responses in humans during cold water immersion of various upper limb areas. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 75: 471-477
- Sendowski I, Savourey G, Launay JC, Besnard Y, Cottet-Emard JM, Pequignot JM, Bittel J (2000) Sympathetic stimulation induced by hand cooling alters cold-induced vasodilatation in humans. *Eur J Appl Physiol* 81: 303-309
- Sgoifo A, Buwalda B, Roos M, Costoli T, Merati G, Meerlo P (2006) Effects of sleep deprivation on cardiac autonomic and pituitary-adrenocortical stress reactivity in rats. *Psychoneuroendocrinology* 31: 197-208
- Sgoifo A, de Boer SF, Haller J, Koolhaas JM (1996) Individual differences in plasma catecholamine and corticosterone stress responses of wild-type rats: relationship with aggression. *Physiol Behav* 60: 1403-1407
- Shearer WT, Reuben JM, Mullington JM, Price NJ, Lee BN, Smith EO, Szuba MP, Van Dongen HP, Dinges DF (2001) Soluble TNF-alpha receptor 1 and IL-6 plasma levels in humans subjected to the sleep deprivation model of spaceflight. *J Allerg Clin Immunol* 107: 165-170

- Shibasaki M, Crandall CG (2001) Effect of local acetylcholinesterase inhibition on sweat rate in humans. *J Appl Physiol* 90: 757-762
- Silva RH, Abilio VC, Takatsu AL, Kameda SR, Grassl C, Chehin AB, Medrano WA, Calzavara MB, Registro S, Andersen ML, Machado RB, Carvalho RC, Ribeiro Rde A, Tufik S, Frussa-Filho R (2004) Role of hippocampal oxidative stress in memory deficits induced by sleep deprivation in mice. *Neuropharmacology* 46: 895-903
- Singh R, Kiloung J, Singh S, Sharma D (2008) Effect of paradoxical sleep deprivation on oxidative stress parameters in brain regions of adult and old rats. *Biogerontology* 9: 153-162
- Sletten DM, Nickander KK, Low PA (2005) Stability of acetylcholine chloride solution in autonomic testing. *J Neurol Sci* 234: 1-3
- Slovut DP, Mehta SH, Dorrance AM, Brosius FC, Watts SW, Webb RC (2004) Increased vascular sensitivity and connexin43 expression after sympathetic denervation. *Cardiovasc Res* 62: 388-396
- Spiegel K, Leproult R, Van Cauter E (1999) Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function. *Lancet* 354: 1435-1439
- Spiegel K, Sheridan JF, Van Cauter E (2002) Effect of sleep deprivation on response to immunization. *Jama* 288: 1471-1472
- Srivatsan M, Peretz B (1996) Effect of acetylcholinesterase inhibition on behavior is age-dependent in freely moving Aplysia. *Behavioural brain research* 77: 115-124
- Strike PC, Steptoe A (2003) New insights into the mechanisms of temporal variation in the incidence of acute coronary syndromes. *Clin Cardiol* 26: 495-499
- Su TC, Lin LY, Baker D, Schnall PL, Chen MF, Hwang WC, Chen CF, Wang JD (2008) Elevated blood pressure, decreased heart rate variability and incomplete blood pressure recovery after a 12-hour night shift work. *J Occup Health* 50: 380-386
- Sullivan JM, Prewitt RL, Josephs JA (1983) Attenuation of the microcirculation in young patients with high-output borderline hypertension. *Hypertension* 5: 844-851
- Sun JX, Reisner AT, Saeed M, Heldt T, Mark RG (2009) The cardiac output from blood pressure algorithms trial. *Crit Care Med* 37: 72-80
- Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR, Jr., Lerman A (2000) Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 101: 948-954
- Taddei S, Caraccio N, Virdis A, Dardano A, Versari D, Ghiadoni L, Ferrannini E, Salvetti A, Monzani F (2006) Low-grade systemic inflammation causes endothelial dysfunction in patients with Hashimoto's thyroiditis. *F Clin Andoc Met* 91: 5076-5082
- Takase B, Akima T, Uehata A, Ohsuzu F, Kurita A (2004) Effect of chronic stress and sleep deprivation on both flow-mediated dilation in the brachial artery and the intracellular magnesium level in humans. *Clin Cardiol* 27: 223-227
- Takase H, Toriyama T, Sugiyama M, Nakazawa A, Hayashi K, Goto T, Sugiura T, Ikeda K, Sato K, Ueda R, Dohi Y (2005) Effect of nifedipine on C-reactive protein levels in the coronary sinus and on coronary blood flow in response to acetylcholine in patients with stable angina pectoris having percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol* 95: 1235-1237
- Takaya T, Hirata K, Yamashita T, Shinohara M, Sasaki N, Inoue N, Yada T, Goto M, Fukatsu A, Hayashi T, Alp NJ, Channon KM, Yokoyama M, Kawashima S (2007) A specific role for eNOS-derived reactive oxygen species in atherosclerosis progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 1632-1637
- Tartas M, Bouye P, Koitka A, Durand S, Gallois Y, Saumet JL, Abraham P (2005a) Early vasodilator response to anodal current application in human is not impaired by cyclooxygenase-2 blockade. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H1668-1673
- Tartas M, Bouye P, Koitka A, Jaquinandi V, Tan L, Saumet JL, Abraham P (2005b) Cathodal current-induced vasodilation to single application and the amplified response to repeated application in humans rely on aspirin-sensitive mechanisms. *J Appl Physiol* 99: 1538-1544
- Tartas M, Durand S, Koitka A, Bouye P, Saumet JL, Abraham P (2004) Anodal current intensities above 40 microA interfere with current-induced axon-reflex vasodilatation in human skin. *J Vasc Research* 41: 261-267
- Tesselaar E, Henricson J, Jonsson S, Sjoberg F (2009) A time-response model for analysis of drug transport and blood flow response during iontophoresis of acetylcholine and sodium nitroprusside. *J Vasc Research* 46: 270-277
- Tesselaar E, Sjoberg F (2011) Transdermal iontophoresis as an in-vivo technique for studying microvascular physiology. *Microvasc Res* 81: 88-96

- Thijssen DH, Black MA, Pyke KE, Padilla J, Atkinson G, Harris RA, Parker B, Widlansky ME, Tschakovsky ME, Green DJ (2011) Assessment of flow-mediated dilation in humans: a methodological and physiological guideline. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300: H2-12
- Tochikubo O, Ikeda A, Miyajima E, Ishii M (1996) Effects of insufficient sleep on blood pressure monitored by a new multibiomedical recorder. *Hypertension* 27: 1318-1324
- Tual-Chalot S, Guibert C, Muller B, Savineau JP, Andriantsitohaina R, Martinez MC (2010) Circulating microparticles from pulmonary hypertensive rats induce endothelial dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 261-268
- Turner J, Belch JJ, Khan F (2008) Current concepts in assessment of microvascular endothelial function using laser Doppler imaging and iontophoresis. *Trends Cardiovasc Med* 18: 109-116
- Vaara J, Kyrolainen H, Koivu M, Tulppo M, Finni T (2009) The effect of 60-h sleep deprivation on cardiovascular regulation and body temperature. *Eur J Appl Physiol* 105: 439-444
- Van der Struijs NR, Van Es EM, Raymann RJ, Daanen HA (2008) Finger and toe temperatures on exposure to cold water and cold air. *Aviat Space Environ Med* 79: 941-946
- van der Wouden EA, Ochodnický P, van Dokkum RP, Roks AJ, Deelman LE, de Zeeuw D, Henning RH (2006) The role of angiotensin(1-7) in renal vasculature of the rat. *J Hypertens* 24: 1971-1978
- van Leeuwen WM, Lehto M, Karisola P, Lindholm H, Luukkonen R, Sallinen M, Harma M, Porkka-Heiskanen T, Alenius H (2009) Sleep restriction increases the risk of developing cardiovascular diseases by augmenting proinflammatory responses through IL-17 and CRP. *PLoS One* 4: e4589
- Vanhoutte PM (2001) Endothelium-derived free radicals: for worse and for better. *J Clin Invest* 107: 23-25
- Vanhoutte PM (2003) Endothelial control of vasomotor function: from health to coronary disease. *Circ J* 67: 572-575
- Vanhoutte PM, Shimokawa H (1989) Endothelium-derived relaxing factor and coronary vasospasm. *Circulation* 80: 1-9
- Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M (2009) Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)* 196: 193-222
- Vgontzas AN, Mastorakos G, Bixler EO, Kales A, Gold PW, Chrousos GP (1999) Sleep deprivation effects on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal and growth axes: potential clinical implications. *Clin endocrinol* 51: 205-215
- Vgontzas AN, Pejovic S, Zoumakis E, Lin HM, Bixler EO, Basta M, Fang J, Sarrigiannidis A, Chrousos GP (2007) Daytime napping after a night of sleep loss decreases sleepiness, improves performance, and causes beneficial changes in cortisol and interleukin-6 secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E253-261
- Vgontzas AN, Zoumakis E, Bixler EO, Lin HM, Follett H, Kales A, Chrousos GP (2004) Adverse effects of modest sleep restriction on sleepiness, performance, and inflammatory cytokines. *F Clin Andoc Met* 89: 2119-2126
- Vila E, Salaices M (2005) Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H1016-1021
- Visniauskas B, Oliveira V, Carmona AK, D'Almeida V, de Melo RL, Tufik S, Chagas JR (2011) Angiotensin I-converting enzyme (ACE) activity and expression in rat central nervous system after sleep deprivation. *Biol Chem* 392: 547-553
- Viswambharan H, Carvas JM, Antic V, Marecic A, Jud C, Zaugg CE, Ming XF, Montani JP, Albrecht U, Yang Z (2007) Mutation of the circadian clock gene *Per2* alters vascular endothelial function. *Circulation* 115: 2188-2195
- Vita JA, Keaney JF, Jr. (2002) Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? *Circulation* 106: 640-2
- Walford G, Loscalzo J (2003) Nitric oxide in vascular biology. *J Thromb Haemost* 1: 2112-2118
- Wang CJ, Lin YL, Lin JK (1994) Mutagenicity and cytotoxicity of nitropyrrole compounds derived from the reaction of 2-acetyl pyrrole with nitrite. *Food Chem Toxicol* 32: 839-844
- Wang L, Lim EJ, Toborek M, Hennig B (2008) The role of fatty acids and caveolin-1 in tumor necrosis factor alpha-induced endothelial cell activation. *Met Clin Exp* 57: 1328-1339
- Weiergraber M, Henry M, Hescheler J, Smyth N, Schneider T (2005) Electrocorticographic and deep intracerebral EEG recording in mice using a telemetry system. *Brain Res Brain Res Protoc* 14: 154-164
- Weil BR, Mestek ML, Westby CM, Van Guilder GP, Greiner JJ, Stauffer BL, DeSouza CA (2010) Short sleep duration is associated with enhanced endothelin-1 vasoconstrictor tone. *Can J Physiol Pharmacol* 88: 777-781

- Weitzman ED, Zimmerman JC, Czeisler CA, Ronda J (1983) Cortisol secretion is inhibited during sleep in normal man. *F Clin Andoc Met* 56: 352-358
- Wimalasundera R, Fexby S, Regan L, Thom SA, Hughes AD (2003) Effect of tumour necrosis factor-alpha and interleukin 1beta on endothelium-dependent relaxation in rat mesenteric resistance arteries in vitro. *Brit J Pharmacol* 138: 1285-1294
- Wolk R, Gami AS, Garcia-Touchard A, Somers VK (2005) Sleep and cardiovascular disease. *Curr Probl Cardiol* 30: 625-662
- Wong BJ, Wilkins BW, Holowatz LA, Minson CT (2003) Nitric oxide synthase inhibition does not alter the reactive hyperemic response in the cutaneous circulation. *J Appl Physiol* 95: 504-510
- Woodman RJ, Watts GF (2003) Measurement and application of arterial stiffness in clinical research: focus on new methodologies and diabetes mellitus. *Med Sci Monit* 9: RA81-89
- Wu KK (2002) Regulation of endothelial nitric oxide synthase activity and gene expression. *Ann NY Acad Sci* 962: 122-130
- Yamasaki Y, Komoike Y, Higashinakagawa T (2006) Adaptive changes in TEF-1 gene expression during cold acclimation in the medaka. *Zoolog Sci* 23: 903-908
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411-415
- Yang J, Park Y, Zhang H, Gao X, Wilson E, Zimmer W, Abbott L, Zhang C (2009) Role of MCP-1 in tumor necrosis factor-alpha-induced endothelial dysfunction in type 2 diabetic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H1208-1216
- Yeboah J, Sutton-Tyrrell K, McBurnie MA, Burke GL, Herrington DM, Crouse JR (2008) Association between brachial artery reactivity and cardiovascular disease status in an elderly cohort: the cardiovascular health study. *Atherosclerosis* 197: 768-776
- Yi SL, Kantores C, Belcastro R, Cabacungan J, Tanswell AK, Jankov RP (2006) 8-Isoprostane-induced endothelin-1 production by infant rat pulmonary artery smooth muscle cells is mediated by Rho-kinase. *Free Radic Biol Med* 41: 942-949
- Yiu KH, Yeung CK, Chan HT, Wong RM, Tam S, Lam KF, Yan GH, Yue WS, Chan HH, Tse HF (2011) Increased arterial stiffness in patients with psoriasis is associated with active systemic inflammation. *Br J Dermatol* 164: 514-520
- Young AJ, Castellani JW, O'Brien C, Shippee RL, Tikuisis P, Meyer LG, Blanchard LA, Kain JE, Cadarette BS, Sawka MN (1998) Exertional fatigue, sleep loss, and negative energy balance increase susceptibility to hypothermia. *J Appl Physiol* 85: 1210-1217
- Zalokar JB, Richard JL, Claude JR (1981) Leukocyte count, smoking, and myocardial infarction. *N Engl J Med* 304: 465-468
- Zenko CE, Bergmann BM, Rechtschaffen A (2000) Vascular resistance in the rat during baseline, chronic total sleep deprivation, and recovery from total sleep deprivation. *Sleep* 23: 341-346
- Zhang H, Park Y, Wu J, Chen X, Lee S, Yang J, Dellsperger KC, Zhang C (2009) Role of TNF-alpha in vascular dysfunction. *Clin Sci (Lond)* 116: 219-230
- Zhong X, Hilton HJ, Gates GJ, Jelic S, Stern Y, Bartels MN, Demeersman RE, Basner RC (2005) Increased sympathetic and decreased parasympathetic cardiovascular modulation in normal humans with acute sleep deprivation. *J Appl Physiol* 98: 2024-2032

## Publications scientifiques

Ce travail a fait l'objet des communications scientifiques suivantes:

### Articles publiés

Sauvet F, Mahé G, Chennaoui M, Langrume C, Vasseur M, Abraham P, Leftheriotis G. Acetylcholine chloride as a potential source of variability in the study of cutaneous vascular function in man. *Microvascular research* 2011; 82:190-197.

Sauvet F, Leftheriotis G, Gomez-Merino D, Langrume C, Drogou V, Van Beers P, Bourrilhon C, Florence G, Chennaoui M. Effect of acute sleep deprivation on vascular function in healthy subjects. *J Appl Physiol* 2010 ; 108:68-75.

Chennaoui M, Sauvet F, Drogou C, Van Beers P, Langrume C, Guillard M, Gourby B, Bourrilhon C, Florence G, and Gomez-Merino D. Effect of one night of sleep loss on changes in tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) □ sleepiness and performance in healthy men. *Cytokine* 2011; 56:318-324.

### Article soumis

Sauvet F, Bourrilhon C, Alonso A, Cottet-Emard JM, Besnard Y, Savourey G, Launay JC. Effects of sleep deprivation on the local cold tolerance in humans.

### Présentations orales

Sauvet F, Chennaoui M, Florence G, Leftheriotis G. Effet de la privation de sommeil sur le contrôle de la pression artérielle et de la vasomotricité. 2<sup>nd</sup> journée des thésards. Institut de recherche biomédicale des armées – Antenne La Tronche, La Tronche, 28 juin 2011.

Sauvet F, Lefthériotis G, Gomez-Mérino D, Langrume C, Drogou C, Van Beers P, Bourrilhon C, Florence G, Chennaoui M. Effet d'une privation aiguë de sommeil sur la fonction endothéliale chez des sujets sains. Congrès de physiologie, pharmacologie et thérapeutique (P2T), Bordeaux, 23-25 mars 2010.

Sauvet F, Lefthériotis G, Gomez-Mérino D, Langrume C, Drogou C, Van Beers P, Bourrilhon C, Florence G, Chennaoui M. Effet d'une privation aiguë de sommeil sur la fonction endothéliale. L'espace cœur, Paris, 4-5 mars 2010.

Sauvet F, Leftheriotis G, Gomez-Merino D, Langrume C, Drogou C, Van Beers P, Florence G, Chennaoui M. Sleep loss and vascular reactivity. Biennale de la recherche de la Bundeswehr (armée allemande), Munich, 21-23 septembre 2009.



### Présentations affichées

Sauvet F, Drogou C, Langrume C, Van Beers P, Guillard M, Bourrilhon C, Florence G, Gomez-Merino D, Leftheriotis G, Chennaoui M. Effects of 40 hours of sleep deprivation on changes in tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) □ vascular function, sleepiness and performance in healthy men. 2<sup>nd</sup> international congress on soldiers' physical performance. 4-8 mai 2011. Javäskylä, Finlande.

Sauvet F, Bourrilhon C, Clerc N, Bompard J, Colin P, Gourby B, Van Beers P, Denis J, Cottet-Emard JM, Alonso A, Besnard Y, Savourey G, Launay JC. Effect of sleep deprivation on the cold tolerance of the hand in healthy subjects. VI<sup>ème</sup> Congrès de physiologie, pharmacologie et thérapeutique (P2T), Grenoble, 22-24 mars 2011.

Sauvet F, Chennaoui M, Florence G, Van Beers P, Langrume C, Chaumes C, Drogou C, Leftheriotis D. Acute sleep deprivation decreases endothelium-dependent vasodilation in young rats. A blood pressure independent mechanism. VI<sup>ème</sup> Congrès de physiologie, pharmacologie et thérapeutique (P2T), Grenoble, 22-24 mars 2011.

Chennaoui M, Sauvet F, Drogou C, Gourby B, Van Beers P, Langrume C, Guillard M, Bourrilhon C, Florence G, and Gomez-Merino D. Effects of 40 hours of sleep deprivation on sleepiness, performance, and inflammatory cytokines. 20<sup>th</sup> Congress of the European Sleep Research Society, Lisbonne, 14-18 septembre 2010.

Sauvet F, Lefthériotis G, Gomez-Mérino D, Langrume C, Drogou C, Van Beers P, Bourrilhon C, Florence G, Chennaoui M. Effet d'une privation aiguë de sommeil sur la fonction endothéliale. 4<sup>ème</sup> Biennale de la recherche du service de santé des armées, Paris, 1-3 juin 2010.

Sauvet F, Leftheriotis G, Gomez-Merino D, Langrume C, Drogou C, Van Beers P, Florence G, Chennaoui M. Effect of 40 hours sleep deprivation on vascular function in healthy subjects. 5<sup>th</sup> European Meeting on Vascular Biology and Medicine, Marseille, 14-17 Septembre 2009.

## Effect of acute sleep deprivation on vascular function in healthy subjects

Fabien Sauvet,<sup>1</sup> Georges Leftheriotis,<sup>2</sup> Danièle Gomez-Merino,<sup>1</sup> Christophe Langrume,<sup>1</sup> Catherine Drogou,<sup>1</sup> Pascal Van Beers,<sup>1</sup> Cyprien Bourrilhon,<sup>1</sup> Geneviève Florence,<sup>1</sup> and Mounir Chennaoui<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Département des Environnements Opérationnels, Brétigny sur Orge; and <sup>2</sup>Université d'Angers, Unité Mixte Centre National de la Recherche Scientifique 6214-Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale 771, Angers, France

Submitted 1 August 2009; accepted in final form 6 November 2009

Sauvet F, Leftheriotis G, Gomez-Merino D, Langrume C, Drogou C, Van Beers P, Bourrilhon C, Florence G, Chennaoui M. Effect of acute sleep deprivation on vascular function in healthy subjects. *J Appl Physiol* 108: 68–75, 2010. First published November 12, 2009; doi:10.1152/jappphysiol.00851.2009.—Sleep disorders are associated with inflammation and sympathetic activation, which are suspected to induce endothelial dysfunction, a key factor in the increased risk of cardiovascular disease. Less is known about the early effects of acute sleep deprivation on vascular function. We evaluated microvascular reactivity and biological markers of endothelial activation during continuous 40 h of total sleep deprivation (TSD) in 12 healthy men (29 ± 3 yr). The days before [*day 1* (D1)] and during TSD (D3), at 1200 and 1800, endothelium-dependent and -independent cutaneous vascular conductance was assessed by iontophoresis of acetylcholine and sodium nitroprusside, respectively, coupled to laser-Doppler flowmetry. At 0900, 1200, 1500, and 1800, heart rate (HR) and instantaneous blood pressure (BP) were recorded in the supine position. At D1, D3, and the day after one night of sleep recovery (D4), markers of vascular endothelial cell activation, including soluble intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, E-selectin, and interleukin-6 were measured from blood samples at 0800. Compared with D1, plasma levels of E-selectin were raised at D3, whereas intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-6 were raised at D4 ( $P < 0.05$ ). The endothelium-dependent and -independent CVC were significantly decreased after 29 h of TSD ( $P < 0.05$ ). By contrast, HR, systolic BP, and the normalized low-frequency component of HR variability (0.04–0.15 Hz), a marker of the sympathetic activity, increased significantly within 32 h of TSD ( $P < 0.05$ ). In conclusion, acute exposure to 40 h of TSD appears to cause vascular dysfunction before the increase in sympathetic activity and systolic BP.

vascular reactivity; iontophoresis; endothelial activation; blood pressure

CHRONIC SLEEP DISORDERS AND short sleep duration ( $\leq 5$  h per night) are associated with an increased incidence of cardiovascular and metabolic diseases in humans (14, 19). However, the biological mechanisms that link short sleep duration and cardiovascular disease are unknown (14), and little is known about the early effects of acute sleep deprivation on vascular function.

In healthy subjects, acute total sleep deprivation (TSD) induces a significant increase 1) in circulating levels of endothelial cell activation markers, such as soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and E-selectin (13); and 2) in pro- and anti-inflammatory markers, such as tumor necrosis

factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-1 receptor antagonist, and interleukin-6 (IL-6) (9, 13, 50). It has also been reported that a high level of IL-6, ICAM-1, or E-selectin could be linked to the development of endothelial dysfunction and cardiovascular disease (32, 44, 50). Indeed, in humans, the increase in cytokine levels (i.e., IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) is related to decreased arterial vascular tone via endothelial receptors (26). In particular, IL-6 inhibits endothelium-dependent, nitric oxide (NO)-mediated relaxation (37). Endothelial dysfunction is an early finding and marker in the development of atherosclerosis and associated with numerous risk factors for cardiovascular disease, including hypertension, coronary artery disease and sudden death and metabolic syndrome (51). A relationship between endothelial dysfunction assessed in the peripheral circulation and coronary artery dysfunction has also been evidenced (17, 45). Endothelial dysfunction has been reported after acute sleep restriction, although the mechanisms remain unclear (1, 46). All of these findings suggest that an acute exposure to TSD (i.e., one night) could represent a sufficient stimulus for triggering of endothelial dysfunction (35) that could, in turn, explain the relationship between sleep disorders and cardiovascular disease.

Other cardiovascular disturbances, such as an increase in heart rate (HR), blood pressure (BP), and sympathetic activity, have been suggested to affect endothelial function during both short and prolonged sleep deprivation (14, 32). In fact, contradictory findings suggest more complex mechanisms. Some studies have reported an increase in inflammatory markers after TSD in healthy subjects that was related to an increase in systolic BP (SBP) (28, 32, 36), probably mediated via an increase in sympathetic activity (52). Experimental studies have showed that an increase in both SBP and sympathetic activity decrease vascular reactivity (23) and increase plasma levels of endothelial cell activation markers (4, 18, 32, 39). Conversely, no changes in SBP after 24-h TSD were reported by others (38), suggesting that the contribution of increased SBP in the vascular inflammation during sleep deprivation remains to be established (6). Another study (28) rather reported a decrease in muscle sympathetic efferent nerve activity, but unchanged vascular resistance after TSD. These results ruled out the hypothesis that the pressor response after sleep deprivation was only mediated by a smooth muscle sympathetic vasoconstriction (28).

The present study was designed to determine, in healthy young subjects, the effect of 40 h of TSD 1) on the endothelium-dependent and -independent reactivity of the cutaneous microvasculature, along with plasma levels of endothelial activation markers, and 2) on BP, HR, autonomic activity, and catecholamine and cortisol levels to determine the possible mechanisms

Address for reprint requests and other correspondence: F. Sauvet, Département des Environnements Opérationnels, IRBA- antenne IMASSA, F-91223 Brétigny sur Orge, France (e-mail: fsauvet@imassa.fr).



and physiological relevance of their changes with vascular dysfunction.

## METHODS

### Subjects

Twelve healthy men, aged  $29.1 \pm 3.3$  yr (mean  $\pm$  SD), with a body mass index of  $23.4 \pm 1.5$  kg/m<sup>2</sup>, were included in the study, after giving written, informed consent. Institutional Paris-Cochin ethics committee approved the protocol (N°ID RCB: 2008-A00170-55), which was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki of 1975, as revised in 2001.

All subjects underwent a detailed medical history and examination. Exclusion criteria were as follows: shift-workers, smokers, daily consumption of alcoholic beverages, and those consuming  $>400$  mg of caffeine per day, subjects with body mass index  $>30$  kg/m<sup>2</sup>, and those taking medication. A blood test was performed to assess biological parameters (glucose, total cholesterol, triglycerides,  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase, and transaminases). Subjects with excessive daytime somnolence (Epworth Sleepiness Scales  $\geq 9$ ) (27), or sleep complaints (Pittsburgh sleep quality index  $<31$  or  $>69$ ) (3), or if they could not be considered as an intermediate chronotype on the Horne and Orstberg questionnaire (24) were also excluded. Sleep/wake patterns were checked using wrist actigraphy (Actiwatch, Cambridge Neurotechnology, Cambridgeshire, UK) 1 wk before the experiment. The mean subjects' total sleep duration was  $8.1 \pm 0.6$  h (mean  $\pm$  SD).

### Protocol

Subjects were housed individually in a temperature-controlled bedroom ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ) for 5 days (Fig. 1) at the Percy Military Hospital (Clamart, France). During the first day (D0), they were familiarized with the laboratory procedures and equipped for continuous polysomnography. During D0 and the day after (D1), subjects went to bed at 2300 and awoke at 0700. The TSD started on D2 at 0700 and finished on D3 at 2300, corresponding to 40 h of continuous awakening. Subjects left the laboratory on D4 after one night of sleep recovery (2300-0700).

All measurements were performed supine at rest in the subject's bedroom with eyes open. Blood samples were collected via an indwelling venous forearm catheter at 0800, during D1, D3, and D4. Samples were immediately centrifuged at 1,100 g, and plasma aliquots were frozen and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . Baseline HR and BP recordings were performed before TSD at D1 after a 10-min stabilization period and recorded for 10 min at 0900, 1200, 1500, and 1800. Microvascular reactivity was also evaluated at 1200 and 1800. All measurements were repeated after TSD on D3.

During the experiment, except for an every day shower between 2200 and 2230, the subjects' waking states were continuously monitored for polysomnography (Embla, Broomfield, CO) and analyzed offline (Embla Somnologica for Windows XP Software) to ensure that they remained alert throughout the 40-h TSD. Central body temperature was measured from an ingested wireless capsule (VitalSense, Mini Mitter, Bend, OR). Laboratory illumination was maintained at 150–200 lux during the entire period of sleep deprivation. When not engaged in any specific testing or meal, subjects were allowed to read, watch videos, or play games, or converse with the staff or visitors. Subjects were prohibited from exercise, caffeine, tobacco, alcohol,

and other psychoactive substances 24 h before and during the study. Meals and caloric intake were standardized for all subjects (2,600 kcal/day). Water was allowed ad libitum.

### Hormone and Cytokine Assays

Plasma samples were assayed using commercially available ELISA kits [soluble ICAM-1, E-selectin, VCAM-1, high-sensitivity (hs) C-reactive protein (CRP), IL-6 (hs), IL-1 $\beta$  (hs), TNF- $\alpha$  (hs), R&D Systems, Minneapolis, MN; epinephrine, norepinephrine, LDN Labor Diagnostika Nord, Nordhorn, Germany]. Plasma cortisol concentrations were measured using a commercial radio-immunoassay (gamma-Coat cortisol RIA Kit, Diasorin, Stillwater, MN).

The lower limits of detection for ICAM-1, E-selectin, VCAM, CRP, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , epinephrine, and norepinephrine ELISAs were 0.096 ng/ml, 0.009 ng/ml, 0.6 ng/ml, 0.059 ng/ml, 0.01 ng/ml, 0.039 pg/ml, 0.057 pg/ml, 8 pg/ml, and 5.4 ng/ml, respectively. Average intra-assay coefficients of variation were 5, 5.7, 3.5, 4.4, 6.9, 10.2, 8.5, 17.1, and 15.6%, respectively. Average interassay coefficients of variation for ICAM-1, E-selectin, VCAM, CRP, IL-6, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  were 5.3, 7.7, 7.7, 6.0, 9.6, 10.4, and 10.6%, respectively. The lower limit of detection was 5.9 nmol/l for the cortisol RIA, and the average inter- and intra-assay coefficients of variation were 9.8 and 7.7%, respectively.

### Cardiovascular Measurements

Vascular reactivity was determined from skin blood flow (SkBF) measurements monitored by laser-Doppler flowmetry (PF5000, Perimed AB, Stockholm, Sweden), connected to two laser-Doppler probes (481-1, Perimed AB), positioned on the ventral aspect of the forearm. The laser-Doppler flowmetry technique has been described elsewhere (43). Two laser-Doppler probes specifically designed with an embedded sponge for skin iontophoresis of agonists were fixed 5 cm apart to the skin with an adhesive patch. Before each experiment, the sponge of one probe was wetted with 0.2 ml of either acetylcholine (ACh) solution (1%, 5.5 mM, acetylcholine chloride, Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau, France), and the other probe with a sodium nitroprusside (SNP) solution (2%, 67 mM, Nitrate, Serb Laboratoires, Villiers de l'Isle-Adam, France). Each probe and its Ag-AgCl reference electrode (PF 384, Perimed AB) were connected to a current intensity-regulated generator (PeriIont 382, Perimed AB) for iontophoresis.

Endothelium-dependent vasodilatation in the cutaneous microcirculation was induced by ACh iontophoresis delivered at the first probe (anodal electrode). Endothelium-independent vasodilatation was induced by iontophoresis of SNP solution delivered at the second probe (cathodal electrode). For all drugs, the vehicle was deionized water (pH = 6.5). After 5 min of a baseline period, SNP and ACh were simultaneously administered by three successive current steps of 0.1 mA each during 10 s (S1, S2, and S3) with 120-s interstimulation intervals. For each probe, the electrical charge density was 2.5 mC/cm<sup>2</sup>, and the total electrical dose was 3 mC. This protocol was designed to avoid unwanted hyperemic effects, resulting from galvanic current (5, 12). Forearm skin temperature at recording sites was assessed by thermocouples fixed to the skin, 3 cm apart from each probe, and maintained within 33 and 34°C (5).

Arterial BP was continuously recorded from the left third finger contralateral to vascular reactivity measurements by a digital servo-photoplethysmography (Portapres, Finapres Medical Systems, Am-

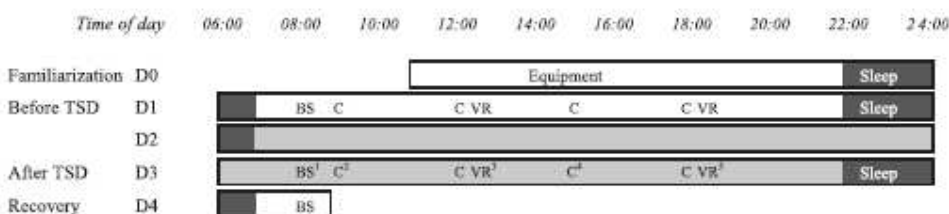


Fig. 1. Experimental design. BS, blood sample; C, cardiovascular measurements; VR, vascular reactivity assessment; D, day. <sup>1</sup>After 25 h of total sleep deprivation (TSD); <sup>2</sup>after 26 h of TSD; <sup>3</sup>after 29 h of TSD; <sup>4</sup>after 32 h of TSD; <sup>5</sup>after 35 h of TSD.



sterdam, The Netherlands) (25). The photoplethysmograph was automatically calibrated, and the SBP and diastolic BPs were controlled by a brachial cuff device before each test. HR was assessed by electrocardiography using a CM5 configuration (ECG 100 amplifiers, Biopac Systems, Goleta, CA). Respiratory movements of the rib cage were recorded with a piezoelectric sensor band (SS5LB, Biopac Systems).

#### Data Collection and Analysis

All nonfiltered signals were digitized and recorded with an analog-to-digital converter (MP150, Biopac Systems) with a sampling frequency of 1,000 Hz for offline computerized analysis.

**Microvascular reactivity.** Data collection began with a 5-min baseline rest period before the onset of current application and was continuously recorded for 14 min. The SkBF (expressed in arbitrary perfusion units) signal from each laser-Doppler probe was averaged every 10 s to reduce instantaneous variability owing to vasomotion. To take into account the possible changes in systemic hemodynamic conditions, cutaneous vascular conductance (CVC; expressed in perfusion units/mmHg) was calculated as the ratio of SkBF to mean BP. Baseline CVC values were calculated over the 2-min rest period before the first current stimulation (S1). Finally, all results were expressed as a percentage of the basal CVC value (5). The CVC peak was defined as the maximal value recorded after S3. The slopes of the CVC curves during the 60 s preceding and following S3 were determined by linear regression. Total SkBF was determined from the area under the curve (AUC) from the first stimulation to the end of the 5-min period after S3.

**HR and BP variability.** The last 5 min of artifact-free signal recorded in the supine rest position were selected for analysis. All data acquisition and analyses were carried out in accordance with established standards (47). ECG and BP waveforms were analyzed using Matlab software (Matlab V7.3, The MathWorks, Natick, MA) to obtain temporal and frequency domains components.

R-wave peaks were automatically detected from ECG signals using a validated algorithm (31), and mean HR was calculated. Power in the low-frequency (LF; 0.04–0.15 Hz) and high-frequency (HF; 0.15–0.40 Hz) ranges was computed for HR variability (HRV) and expressed in absolute ( $\text{ms}^2$ ) and normalized units (nu; in %), according to the following formula: [absolute power of the component/(LF + HF)]  $\times$  100. The normalized HF component of the HRV ( $\text{HF}_{\text{RR}}$  nu) provides an estimate of the vagal tone, whereas both sympathetic and vagal tones contribute to the normalized LF component ( $\text{LF}_{\text{RR}}$  nu) (47).

#### Statistical Analysis

All statistical analyses were conducted using Matlab software (Matlab V7.3, The MathWorks, Natick, MA). Biological and

cardiovascular variables were analyzed using nonparametric Friedman's analysis of variance, followed, when appropriate for pairwise comparisons, by Wilcoxon's test. Unless specified, for all statistics, the significance level was set at  $P < 0.05$ . All data are presented as means  $\pm$  SE.

#### RESULTS

All the subjects completed the protocol. After the experiment, EEG recordings verified that each subject remained awake during the 40 h of sleep deprivation (Fig. 1). The average sleep duration during the first, second, and fourth night were  $7.34 \pm 0.06$ ,  $7.51 \pm 0.05$ , and  $7.71 \pm 0.03$  h, respectively.

#### Microvascular Reactivity

Response to ACh iontophoresis (Table 1, Fig. 2). No significant differences were observed for basal CVC between D3 and D1, and between values at 1800 and 1200. Compared with D1, the CVC peak ( $P = 0.03$ ) and AUC ( $P = 0.02$ ) were significantly lower on D3 at 1200, but not significantly at 1800. At D1 and D3, the AUC and CVC peak were significantly higher at 1800 compared with 1200 (all  $P = 0.03$ ). The slope of the rising part of the CVC response to S3 did not differ during D3 compared with D1 at 1200 ( $33.7 \pm 5.8$  vs.  $40.9.8 \pm 7.5\%/s$ ) and 1800 ( $34.8 \pm 7.9$  vs.  $42.3 \pm 11.3\%/s$ ). However, the slope of the falling part of the CVC response to S3 was lower at D3 compared with D1 at 1200 ( $-15.9 \pm 7.5$  vs.  $32.1 \pm 4.45\%/s$ ,  $P = 0.03$ ), but no significant change was observed at 1800 ( $-28.4 \pm 6.5$  vs.  $33.2 \pm 9.3\%/s$ ).

#### Response to SNP Iontophoresis

No significant difference was observed for basal CVC observed at D3 compared with D1 and observed at 1800 compared with 1200 (Table 1, Fig. 2). Compared with D1, the AUC and CVC peaks were lower at 1200 ( $P = 0.02$ ) and 1800 ( $P = 0.02$ ) on D3, with no significant differences between 1200 and 1800. The slope of the rising part of the CVC response to S3 was lower on D3 at 1200 ( $1.6 \pm 0.7$  vs.  $0.6 \pm 0.3\%/s$ ,  $P = 0.02$ ) and 1800 ( $2.1 \pm 0.5$  vs.  $0.81 \pm 0.4\%/s$ ,  $P = 0.01$ ).

#### Biological Variables

Compared with D1, plasma levels of E-selectin were raised on D3 ( $P = 0.04$ ) (Table 2). After one night of sleep recovery

Table 1. Change in basal CVC and vascular reactivity parameters before and after total sleep deprivation at 1200 and 1800

	Before TSD (D1)		After TSD (D3)		Friedman <i>P</i> Value
	1200	1800	1200	1800	
<i>CVC before and after iontophoresis of ACh</i>					
Basal CVC, $10^2$ PU/mmHg	$8.2 \pm 1.3$	$6.91 \pm 0.7$	$8.6 \pm 1.39$	$8.47 \pm 1.6$	NS
CVC peak, %basal CVC	$454 \pm 158$	$774 \pm 183$	$283 \pm 163^*$	$608 \pm 139^*$	<0.01
AUC, $\% \cdot s^{-1} \cdot 10^{-3}$	$16.7 \pm 6.5$	$22.2 \pm 6.4$	$8.1 \pm 2.2^*$	$18.2 \pm 4.7$	0.01
<i>CVC before and after iontophoresis of SNP</i>					
Basal CVC, $10^2$ PU/mmHg	$7.6 \pm 0.7$	$8.7 \pm 0.8$	$7.7 \pm 1.5$	$8.1 \pm 1.2$	NS
CVC peak, %basal CVC	$778 \pm 158$	$584 \pm 126$	$476 \pm 138^*$	$316 \pm 52^*$	<0.01
AUC, $\% \cdot s^{-1} \cdot 10^{-3}$	$17.3 \pm 2.9$	$14.7 \pm 1.9$	$9.1 \pm 2.9^*$	$7.5 \pm 1.4^*$	<0.01

Values are means  $\pm$  SE. Acetylcholine (ACh) and sodium nitroprusside (SNP) were delivered in three (S1, S2, S3) 10-s galvanic current period (0.1 mA), with an interstimulation interval of 120-s (see Fig. 2). Basal cutaneous vascular conductance (CVC) was calculated as the average CVC observed during the 120 s before S1. Vascular reactivity parameters are CVC peak and area under the curve (AUC). CVC peak is the maximal observed within 10-s CVC following galvanic current stimulations. AUC was computed by integrating the curve from S1 to the end of the recovery period (5 min after S3). TSD, total sleep deprivation; D1 and D3, day 1 and day 3, respectively; PU, perfusion units; NS, nonsignificant. \* $P < 0.05$ , significant vs. before TSD value observed at the same time of day.



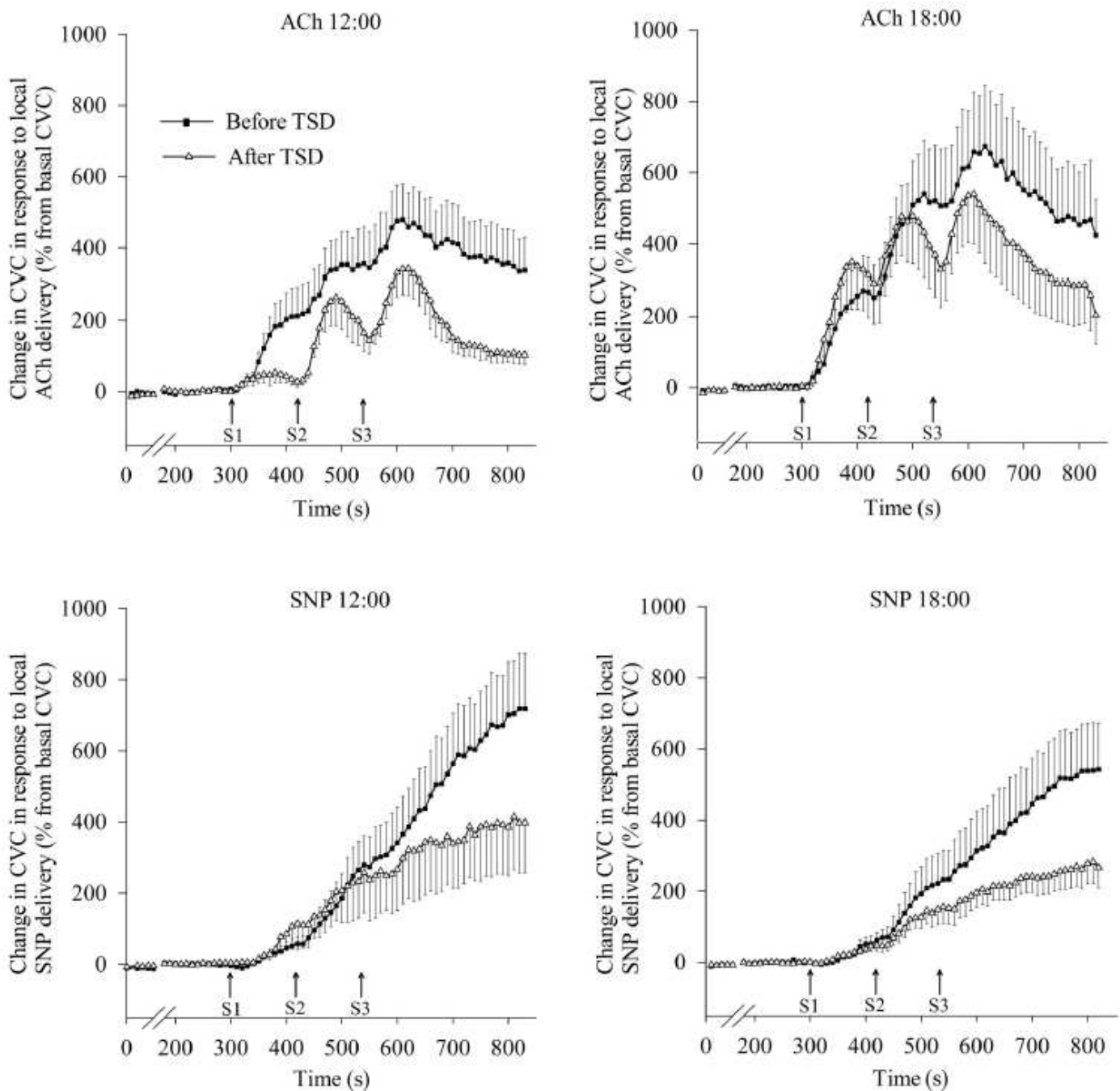


Fig. 2. Average relative increase in cutaneous vascular conductance (CVC) before and after acute sleep deprivation (TSD), after iontophoresis application of acetylcholine (ACh) and sodium nitroprusside (SNP) at 1200 and 1800. ACh and SNP were delivered in three (S1, S2, S3) 10-s current period (0.1 mA, 0.1 mC/min) with an interstimulation interval of 120 s. Basal CVC was calculated as the average CVC observed during the 120-s before S1. Values are presented as means  $\pm$  SE.

(D4), ICAM-1 ( $P = 0.03$ ), IL-6 ( $P = 0.02$ ), and norepinephrine ( $P = 0.02$ ) were significantly increased compared with D1. All other changes in biological variables were nonsignificant. However, >50% of IL-1 $\beta$  samples were below the lower limit of detection.

#### Cardiovascular Variables and Variability

Compared with D1, HR was increased after TSD at 1500 and 1800 (all  $P = 0.02$ ) (Table 3). No significant changes were

observed for LF+HF<sub>RR</sub>, but LF<sub>RR</sub> nu was higher ( $P < 0.01$ ), whereas HF<sub>RR</sub> nu was lower ( $P < 0.01$ ) after TSD, compared with D1.

#### BP and Variability

At D3, we observed an increase in SBP only at 1500 ( $P = 0.03$ ) (Table 3). During the day before TSD (D1), SBP was decreased at 1500 compared with 1200 and 1800 ( $P = 0.02$ ). This decrease was not observed after TSD. Concerning DBP



Table 2. Change in plasma levels of biological parameters at 0800

	Before TSD (D1)	After TSD (D3)	Recovery (D4)	Friedman <i>P</i> Value
ICAM-1, ng/ml	215 ± 13	227 ± 15	253 ± 16*	0.02
VCAM, ng/ml	491 ± 27	489 ± 24	513 ± 34	NS
E-selectin, ng/ml	35 ± 6	54 ± 8*	42 ± 6	0.02
CRP, µg/ml	1.22 ± 0.46	0.55 ± 0.13	0.61 ± 0.14	NS
IL-6, pg/ml	0.60 ± 0.13	0.62 ± 0.10	1.20 ± 0.23*	0.03
TNF-α, pg/ml	0.88 ± 0.32	1.05 ± 0.30	0.88 ± 0.24	NS
Cortisol, mmol/l	524 ± 42	491 ± 27	503 ± 16	NS
Epinephrine, pg/ml	81 ± 16	68 ± 10	57 ± 13	NS
Norepinephrine, pg/ml	757 ± 110	885 ± 121	1,113 ± 125*	0.04

Values are means ± SE. Plasma sample were collected at 0800 before TSD, after TSD, and after one night of recovery. ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; CRP, C-reactive protein; IL-6, interleukin-6; TNF-α, tumor necrosis factor-α. \**P* < 0.05, significant vs. before TSD value observed at the same time of day.

and mean BP, we observed no significant changes between the values observed before and after TSD at the same hour.

## DISCUSSION

To our knowledge, this is the first report on microvascular reactivity after an acute exposure to TSD. Two major findings emerged: 1) 40 h of acute TSD decreased endothelial-dependent and -independent cutaneous vascular reactivity with an increase in plasma levels of endothelial cell activation markers; and 2) this microvascular dysfunction occurred well before the changes in SBP, HR, and sympathetic activity reported in the literature (28, 52).

### Vascular Dysfunction

Acute TSD blunted the SkBF response to ACh and SNP after TSD, suggesting that both endothelium-independent and -dependent microvascular reactivities were altered (2, 17, 33). Amir et al. (1) observed a similar decrease in vascular reactivity after a 24-h shift, including night duty, which was more marked in subjects with a longer history of night-shift duty and in those reporting fewer sleeping hours during the shift. Takase et al. (46) reported the same results in healthy students after 4 wk of chronic sleep deprivation during an examination period. In these two studies, vascular reactivity was assessed by measurement of the brachial artery flow-mediated dilatation (FMD), a surrogate marker of large-conductance artery reactivity, while our study focused on microvascular cutaneous reactivity, reflecting the reactivity in resistance vascular beds.

There are major physiological differences between the mechanisms implicated in vasodilatation induced by shear stress (i.e., FMD) and ACh iontophoresis (22, 29). Endothelium-

dependent dilatation of arterioles triggered by ACh might involve NO, prostacyclin, and endothelium-derived hyperpolarizing factor, both inducing smooth muscle relaxation and vasodilatation (29). Although ACh-induced dilatation is mediated mainly by NO in large vessels via smooth muscle cyclic GMP (cGMP), the NO/cGMP pathway is not essential for ACh-induced dilatation of arterioles and for basal BP regulation (29). In vivo studies have indicated that endothelium-derived hyperpolarizing factor may serve as a backup and compensatory mechanism in conditions associated with an altered bioavailability of NO (15). This compensatory mechanism could explain why, in our study, as early as 35 h of TSD, the impairment of endothelium-independent reactivity was not associated with a significant alteration of endothelium-dependent reactivity. Moreover, acute TSD influenced the kinetics of the response to ACh, mainly the falling part of the slope of the CVC curve recorded during the third stimulation, suggesting a change in the time course of vasodilator mechanisms. For example, it has been shown that impaired prostaglandin bioavailability is characterized by a decrease in the time efficiency of ACh-induced vasodilatation (10).

In addition to this skin microvascular dysfunction, we also found changes in systemic biological markers of vascular endothelial cell activation and endothelial dysfunction (7). As reported by others after 32 h of TSD, we observed an increase in E-selectin levels after TSD (13), followed by an increase in ICAM-1 and IL-6 levels after one night of sleep recovery (i.e., D4). IL-6 is a sensitive marker of acute inflammatory response and vascular activation and high IL-6 plasma levels being associated with an increased mortality in patients at high risk of myocardial infarction (16). We found no significant changes in

Table 3. HR and BP temporal and spectral components before and after TSD at 0900, 1200, 1500, and 1800

	Before TSD (D1)				After TSD (D3)				Friedman <i>P</i> Value
	0900	1200	1500	1800	0900	1200	1500	1800	
HR, beats/min	65 ± 4	58 ± 2	59 ± 2	58 ± 2	66 ± 3	60 ± 2	67 ± 3*	62 ± 2*	0.001
LF+HF <sub>RR</sub> , 10 <sup>2</sup> /ms <sup>2</sup>	22 ± 5	19 ± 5	16 ± 4	20 ± 5	20 ± 7	18 ± 3	12 ± 2	23 ± 4	NS
LF <sub>RR</sub> nu, %	52 ± 6	60 ± 5	58 ± 5	52 ± 6	67 ± 5	70 ± 5	74 ± 3*	76 ± 4*	0.005
HF <sub>RR</sub> nu, %	48 ± 6	40 ± 5	42 ± 5	48 ± 6	33 ± 5	30 ± 5	26 ± 3*	25 ± 4*	0.003
SBP, mmHg	109 ± 6	114 ± 4	105 ± 5	117 ± 3	114 ± 5	125 ± 7	120 ± 5*	119 ± 5	0.008
DBP, mmHg	64 ± 4	71 ± 2	61 ± 4	72 ± 4	65 ± 3	80 ± 5	72 ± 4	75 ± 4	NS
MBP, mmHg	79 ± 4	85 ± 2	75 ± 4	87 ± 4	82 ± 4	95 ± 5	88 ± 4	90 ± 4	0.012

Values are means ± SE. Changes are shown in heart rate (HR), spectral components of HR variability, systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), and mean blood pressure (MBP). LF<sub>RR</sub>, power in low-frequency range of HRV; HF<sub>RR</sub>, power in high-frequency range of HRV; nu, normalized unit. \**P* < 0.05 vs. before TSD value observed at the same time of day.



IL-6 levels after 24 h of TSD, a result consistent with previous studies (44, 50), although one study reported a decrease in IL-6 levels within 24–33 h of TSD (13). After a 2-day TSD, an increase in IL-6 was consistently reported (44, 50), whereas, in our study, an increase in IL-6 levels was observed only after the night of sleep recovery (i.e., D4). Our results suggest that at least 40 h of TSD are sufficient to increase IL-6 levels with a remnant effect after one night of sleep recovery. In our study, the delayed increases of IL-6 and ICAM-1 levels could be explained by the pattern of release of circulating adhesion molecules that has been characterized in patients with acute ischemic stroke (11). Indeed, circulating adhesion molecules might be detectable in peripheral venous blood samples between 12 and 72 h after onset of acute ischemic stroke, although with large interindividual variability (11).

### BP Changes

One explanation for the vascular dysfunction after TSD could be linked to the changes in BP. In cardiovascular diseases, an increase in BP raises endothelial shear stress, inducing endothelial production of inflammatory mediators (4). However, our results rather indicated that vascular dysfunction occurred before the increase in BP. Indeed, we observed an increase in E-selectin levels after 25 h of TSD and a decrease in vascular reactivity after 29 h of TSD, without significant changes in BP and HR. Our results related to BP and HR are consistent with the findings of a recent study in controlled experimental conditions (38), where, in the absence of psychological or physical stresses, 24 h of TSD were not sufficient to induce autonomic disturbances and an increase in BP or HR. Consistent with other studies (28, 52), we found a significant increase in BP, HR, HRV, and plasma level of norepinephrine, suggesting a significant activation of sympathetic activity within 32 h of TSD.

These findings underline the fact that the vascular dysfunction induced by TSD occurred before the increase in BP or sympathetic activation. It is important to consider the circadian changes in BP in the vascular dysfunction induced by TSD (6). Indeed, sleep disturbances strongly affect both nighttime BP levels and the blunted nocturnal decline in BP (i.e., the "nondipping profile") (30). The nondipping profile has been reported to be associated with increased circulating levels of soluble endothelial adhesion molecules (6), indicating an early inflammatory vascular endothelium activation (51). Therefore, the lack of nocturnal decrease in SBP in our study could explain the acute increase in E-selectin observed as early as 24 h of TSD. In addition, a blunted nocturnal BP decline is associated with increased generation of reactive oxygen species, which are powerful mediators of atherogenesis and alter NO synthesis (41).

### Inflammatory Responses

While in our study IL-1 $\beta$  did not reach detectable levels, some studies have shown that sleep deprivation induces immune cell production of proinflammatory markers, such as IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6 (13, 32). This inflammatory response, in particular for IL-1 $\beta$ , could also explain the decrease in endothelial-dependent and -independent vascular reactivity. Several cytokines (i.e., IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10) modulate arterial vascular tone via endothelial receptors (26), and cul-

tured cells of aortic smooth muscles exposed to IL-1 $\beta$  displayed a reduction in SNP-stimulated cGMP levels (40). This decrease in cGMP accumulation could limit the biological effect of SNP, a NO donor (40). In IL-6-infused pregnant rats, Orshal and Khalil (37) demonstrated a reduction of the NO-cGMP pathway activity in systemic vessels that was the consequence of a decreased activity of NO synthase and guanylate cyclase of smooth muscles (37). In our study, after one night of sleep recovery, the increase in norepinephrine levels, a reliable marker of the increase in sympathetic nervous system activity induced by TSD, could also contribute to elevated inflammation via multiple pathway (35). Indeed, an increase in catecholamines is associated with increased inflammatory mediators (i.e., IL-6) in plasma (39) and in vivo models, with norepinephrine being able to upregulate, in human microvascular endothelial cells, the production of IL-6 and TNF- $\alpha$  (18). However, we observed no change in CRP and cortisol levels after TSD. CRP is a stable marker of the development of cardiovascular disease (42, 48) that increases with chronic sleep loss (32). There are contradictory findings on the effects of an acute TSD in healthy subjects, with some studies reporting an increase (32), a decrease (13), or no change (8). We surmised that our sleep deprivation conditions may not have lasted long enough to have an effect on CRP. Also, the effects of TSD on cortisol levels are unclear, with some studies reporting an increase (34), a decrease (49), or no change (21). Most of the discrepancies probably stem from differences in experimental conditions, such as timing of the blood samplings (i.e., circadian rhythm of cortisol) or nature of sampling (i.e., saliva vs. blood) (21).

The main limitation of our study is the lack of a control group. However, our findings did not differ from the crossover study of Pagani et al. (38), who evaluated the impact of 24 h of TSD on various hemodynamic and autonomic variables. Another limitation was the lack of continuous BP monitoring, mostly during the night, to check for possible alterations in circadian BP profile. Compared with the pre-TSD night and because of the prolonged activity during TSD, the observed increase in SBP likely reflected the lack of a decrease in SBP normally expected during sleep (30). Body posture, emotional stress, and cognitive and physical workload also influence regulatory factors, such as catecholamines that control BP and can exert significant effects on study outcomes (52). Although brachial artery FMD and the magnitude of the ACh-induced skin perfusion increase correlate (20), the present results are limited to the skin resistance vasculature. Indeed, there are major physiological differences in the mechanisms implicated in vascular reactivity between the conductance and resistance vessels and, in particular, the relative importance of the NO/cGMP pathway (29). Moreover, dysfunction of the peripheral vascular endothelium was shown to constitute an independent predictor of cardiovascular events (2). Finally, the time course of our findings are limited to the day after TSD (i.e., D4) when the changes reflecting an alteration in sympathovagal balance became significant.

In conclusion, in our controlled environmental conditions, without cognitive and physical workloads, our data suggest that acute TSD is a stimulus of sufficient strength to trigger dysfunction in the peripheral resistance vasculature of healthy subjects. This short-term response could initially result from alteration in circadian BP modulations and acute inflammatory



activation rather than an increase in SBP (i.e., not a hypertensive response). Although this is an open study, our results are relevant to human health, health risk management, and disease. Even if vascular dysfunction induced by acute TSD was mild and subclinical, we hypothesize that chronic repetition of transient sleep loss could elevate basal inflammatory mediators, thereby priming the development of cardiovascular disease (32, 42). Furthermore, the present data obtain in the cutaneous vasculature point to possible interference with thermoregulatory defense mechanisms. It should be borne in mind that our observations are limited to healthy young subjects and cannot be extrapolated to patients with already altered vascular function (e.g., with atherosclerosis, hypertension, smokers, etc.) (14). Further studies will be needed to elucidate the precise mechanisms for the vascular dysfunction and inflammatory activation induced by sleep deprivation and their recovery profile. This is important for the further understanding of the deleterious cumulative effects of sleep deprivation and also the link between cardiovascular diseases and sleep disorders.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank C. Delor, M. Bobee, B. Elio, B. Gourby, M. Guillard, E. Lapeyre, and all personnel from Institut de Médecine de Service de Santé des Armées and Percy Military Hospital for technical and logistic contributions to this work.

#### GRANTS

This work was supported by the French Délégation Générale pour l'Armement (contract no. 08co704).

#### DISCLOSURES

No conflicts of interest are declared by the author(s).

#### REFERENCES

- Amir O, Alroy S, Schliamser JE, Asmir I, Shiran A, Flugelman MY, Halon DA, Lewis BS. Brachial artery endothelial function in residents and fellows working night shifts. *Am J Cardiol* 93: 947–949, 2004.
- Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 168–175, 2003.
- Buyse DJ, Reynolds CF 3rd, Monk TH, Berman SR, Kupfer DJ. The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Res* 28: 193–213, 1989.
- Chae CU, Lee RT, Rifal N, Ridker PM. Blood pressure and inflammation in apparently healthy men. *Hypertension* 38: 399–403, 2001.
- Cracowski JL, Minson CT, Salvat-Melis M, Halliwill JR. Methodological issues in the assessment of skin microvascular endothelial function in humans. *Trends Pharmacol Sci* 27: 503–508, 2006.
- Desideri G, Croce G, Ferri C. Does nondipping blood pressure profile contribute to vascular inflammation during sleep deprivation? *J Am Coll Cardiol* 44: 1529–1530, 2004.
- DeSouza CA, Dengel DR, Macko RF, Cox K, Seals DR. Elevated levels of circulating cell adhesion molecules in uncomplicated essential hypertension. *Am J Hypertens* 10: 1335–1341, 1997.
- Dimitrov S, Lange T, Tieken S, Fehm HL, Born J. Sleep associated regulation of T helper 1/T helper 2 cytokine balance in humans. *Brain Behav Immun* 18: 341–348, 2004.
- Dinges DF, Douglas SD, Zugg L, Campbell DE, McMann JM, Whitehouse WG, Orne EC, Kapoor SC, Icaza E, Orne MT. Leukocytosis and natural killer cell function parallel neurobehavioral fatigue induced by 64 hours of sleep deprivation. *J Clin Invest* 93: 1930–1939, 1994.
- Durand S, Fromy B, Tartas M, Jardel A, Saumet JL, Abraham P. Prolonged aspirin inhibition of anodal vasodilation is not due to the trafficking delay of neural mediators. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R155–R161, 2003.
- Fassbender K, Mossner R, Motsch L, Kischka U, Grau A, Hennerici M. Circulating selectin- and immunoglobulin-type adhesion molecules in acute ischemic stroke. *Stroke* 26: 1361–1364, 1995.
- Ferrell WR, Ramsay JE, Brooks N, Lockhart JC, Dickson S, McNeece GM, Greer IA, Sattar N. Elimination of electrically induced iontophoretic artefacts: implications for non-invasive assessment of peripheral microvascular function. *J Vasc Res* 39: 447–455, 2002.
- Frey DJ, Fleshner M, Wright KP Jr. The effects of 40 hours of total sleep deprivation on inflammatory markers in healthy young adults. *Brain Behav Immun* 21: 1050–1057, 2007.
- Gangwisch JE, Heymsfield SB, Boden-Albala B, Buijs RM, Kreier F, Pickering TG, Rundle AG, Zammit GK, Malaspina D. Short sleep duration as a risk factor for hypertension: analyses of the first National Health and Nutrition Examination Survey. *Hypertension* 47: 833–839, 2006.
- Gaubert ML, Sigaudou-Roussel D, Tartas M, Berrut G, Saumet JL, Fromy B. Endothelium-derived hyperpolarizing factor as an in vivo back-up mechanism in the cutaneous microcirculation in old mice. *J Physiol* 585: 617–626, 2007.
- Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. The road ahead. *Cell* 104: 503–516, 2001.
- Gokec N, Keaney JF Jr, Hunter LM, Watkins MT, Menzoian JO, Vita JA. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation* 105: 1567–1572, 2002.
- Gornikiewicz A, Sautner T, Brostjan C, Schmierer B, Fugger R, Roth E, Muhlbacher F, Bergmann M. Catecholamines up-regulate lipopolysaccharide-induced IL-6 production in human microvascular endothelial cells. *FASEB J* 14: 1093–1100, 2000.
- Hall MH, Muldoon MF, Jennings JR, Buysse DJ, Flory JD, Manuck SB. Self-reported sleep duration is associated with the metabolic syndrome in midlife adults. *Sleep* 31: 635–643, 2008.
- Hansell J, Henareh L, Agewall S, Norman M. Non-invasive assessment of endothelial function—relation between vasodilatory responses in skin microcirculation and brachial artery. *Clin Physiol Funct Imaging* 24: 317–322, 2004.
- Heiser P, Dickhaus B, Schreiber W, Clement HW, Hasse C, Hennig J, Renschmidt H, Krieg JC, Wesemann W, Opper C. White blood cells and cortisol after sleep deprivation and recovery sleep in humans. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 250: 16–23, 2000.
- Henricson J, Tesselar E, Persson K, Nilsson G, Sjoberg F. Assessment of microvascular function by study of the dose-response effects of iontophoretically applied drugs (acetylcholine and sodium nitroprusside)—methods and comparison with in vitro studies. *Microvasc Res* 73: 143–149, 2007.
- Hijmering ML, Stroes ES, Olijhoek J, Hutten BA, Blankestijn PJ, Rabelink TJ. Sympathetic activation markedly reduces endothelium-dependent, flow-mediated vasodilation. *J Am Coll Cardiol* 39: 683–688, 2002.
- Horne JA, Ostberg O. A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *Int J Chronobiol* 4: 97–110, 1976.
- Imholz BP. Automated blood pressure measurement during ergometric stress testing: possibilities of Finapres. *Z Kardiol* 85, Suppl 3: 76–80, 1996.
- Iversen PO, Nicolaysen A, Kvernebo K, Benestad HB, Nicolaysen G. Human cytokines modulate arterial vascular tone via endothelial receptors. *Pflügers Arch* 439: 93–100, 1999.
- Johns MW. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. *Sleep* 14: 540–545, 1991.
- Kato M, Phillips BG, Sigurdsson G, Narkiewicz K, Pesek CA, Somers VK. Effects of sleep deprivation on neural circulatory control. *Hypertension* 35: 1173–1175, 2000.
- Koeppen M, Feil R, Siegl D, Feil S, Hofmann F, Pohl U, de Wit C. cGMP-dependent protein kinase mediates NO- but not acetylcholine-induced dilations in resistance vessels in vivo. *Hypertension* 44: 952–955, 2004.
- Manning G, Rushton L, Donnelly R, Millar-Craig MW. Variability of diurnal changes in ambulatory blood pressure and nocturnal dipping status in untreated hypertensive and normotensive subjects. *Am J Hypertens* 13: 1035–1038, 2000.
- Manriquez AI, Zhang Q. An algorithm for QRS onset and offset detection in single lead electrocardiogram records. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2007: 541–544, 2007.



32. Meier-Ewert HK, Ridker PM, Rifai N, Regan MM, Price NJ, Dinges DF, Mullington JM. Effect of sleep loss on C-reactive protein, an inflammatory marker of cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol* 43: 678–683, 2004.
33. Morris SJ, Shore AC. Skin blood flow responses to the iontophoresis of acetylcholine and sodium nitroprusside in man: possible mechanisms. *J Physiol* 496: 531–542, 1996.
34. Mullington J, Hermann D, Holsboer F, Pollmacher T. Age-dependent suppression of nocturnal growth hormone levels during sleep deprivation. *Neuroendocrinology* 64: 233–241, 1996.
35. Mullington JM, Haack M, Toth M, Serrador JM, Meier-Ewert HK. Cardiovascular, inflammatory, and metabolic consequences of sleep deprivation. *Prog Cardiovasc Dis* 51: 294–302, 2009.
36. Ogawa Y, Kanbayashi T, Saito Y, Takahashi Y, Kitajima T, Takahashi K, Hishikawa Y, Shimizu T. Total sleep deprivation elevates blood pressure through arterial baroreflex resetting: a study with microneurographic technique. *Sleep* 26: 986–989, 2003.
37. Orshal JM, Khalil RA. Interleukin-6 impairs endothelium-dependent NO-cGMP-mediated relaxation and enhances contraction in systemic vessels of pregnant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286: R1013–R1023, 2004.
38. Pagani M, Pizzinelli P, Traon AP, Ferreri C, Beltrami S, Bareille MP, Costes-Salon MC, Beroud S, Blin O, Lucini D, Philip P. Hemodynamic, autonomic and baroreflex changes after one night sleep deprivation in healthy volunteers. *Auton Neurosci* 145: 76–80, 2009.
39. Papanicolaou DA, Petrides JS, Tsigos C, Bina S, Kalogeras KT, Wilder R, Gold PW, Deuster PA, Chrousos GP. Exercise stimulates interleukin-6 secretion: inhibition by glucocorticoids and correlation with catecholamines. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 271: E601–E605, 1996.
40. Papapetropoulos A, Abou-Mohamed G, Marczin N, Murad F, Caldwell RW, Catravas JD. Downregulation of nitrovasodilator-induced cyclic GMP accumulation in cells exposed to endotoxin or interleukin-1 beta. *Br J Pharmacol* 118: 1359–1366, 1996.
41. Pierdomenico SD, Costantini F, Bucci A, De Cesare D, Bucciarelli T, Cuccurullo F, Mezzetti A. Blunted nocturnal fall in blood pressure and oxidative stress in men and women with essential hypertension. *Am J Hypertens* 12: 356–363, 1999.
42. Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation* 103: 1813–1818, 2001.
43. Saumet JL, Kellogg DL Jr, Taylor WF, Johnson JM. Cutaneous laser-Doppler flowmetry: influence of underlying muscle blood flow. *J Appl Physiol* 65: 478–481, 1988.
44. Shearer WT, Reuben JM, Mullington JM, Price NJ, Lee BN, Smith EO, Szuba MP, Van Dongen HP, Dinges DF. Soluble TNF-alpha receptor 1 and IL-6 plasma levels in humans subjected to the sleep deprivation model of spaceflight. *J Allergy Clin Immunol* 107: 165–170, 2001.
45. Suwaldi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR Jr, Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 101: 948–954, 2000.
46. Takase B, Akima T, Uehata A, Ohsuzu F, Kurita A. Effect of chronic stress and sleep deprivation on both flow-mediated dilation in the brachial artery and the intracellular magnesium level in humans. *Clin Cardiol* 27: 223–227, 2004.
47. Task Force. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation* 93: 1043–1065, 1996.
48. US Preventive Services Task Force. Using nontraditional risk factors in coronary heart disease risk assessment: US Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med* 151: 474–482, 2009.
49. Vgontzas AN, Bixler EO, Lin HM, Prolo P, Trakada G, Chrousos GP. IL-6 and its circadian secretion in humans. *Neuroimmunomodulation* 12: 131–140, 2005.
50. Vgontzas AN, Zoumakis E, Bixler EO, Lin HM, Follett H, Kales A, Chrousos GP. Adverse effects of modest sleep restriction on sleepiness, performance, and inflammatory cytokines. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2119–2126, 2004.
51. Vita JA, Keaney JF Jr. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? *Circulation* 106: 640–642, 2002.
52. Zhong X, Hilton HJ, Gates GJ, Jelic S, Stern Y, Bartels MN, De-meersman RE, Basner RC. Increased sympathetic and decreased parasympathetic cardiovascular modulation in normal humans with acute sleep deprivation. *J Appl Physiol* 98: 2024–2032, 2005.





## Effect of one night of sleep loss on changes in tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) levels in healthy men

M. Chennaoui <sup>\*</sup>, F. Sauvet, C. Drogou, P. Van Beers, C. Langrume, M. Guillard, B. Gourby, C. Bourrilhon, G. Florence, D. Gomez-Merino

Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), Département Environnements Opérationnels, Brétigny-sur-Orge, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 3 February 2011

Received in revised form 23 May 2011

Accepted 2 June 2011

Available online xxxx

#### Keywords:

Acute sleep deprivation

Proinflammatory cytokines

Healthy men

Sleep

Sleepiness

### ABSTRACT

Total sleep deprivation in humans is associated with increased daytime sleepiness, decreased performance, elevations in inflammatory cytokines, and hormonal/metabolic disturbances.

To assess the effects of 40 h of total sleep deprivation (TSD) under constant and well controlled conditions, on plasma levels of TNF- $\alpha$  and its receptor (TNFR1), interleukin-6 (IL-6), cortisol and C-reactive protein (CRP), sleepiness and performance, 12 healthy men ( $29 \pm 3$  years) participated in a 5-days sleep deprivation experiment (two control nights followed by a night of sleep loss and one recovery night). Between 0800 and 2300 (i.e. between 25 and 40 h of sleep deprivation), a serial of blood sampling, multiple sleep latency, subjective levels of sleepiness and reaction time tests were completed before (day 2: D2) and after (day 4: D4) one night of sleep loss. We showed that an acute sleep deprivation (i.e. after 34 and 37 h of sleep deprivation) induced a significant increase in TNF- $\alpha$  ( $P < 0.01$ ), but there were no significant changes in TNFR1, IL-6, cortisol and CRP. In conclusion, our study in which constant and controlled experimental conditions were realized with healthy subjects and in absence of psychological or physical stressors, an acute total sleep deprivation (from 34 h) was sufficient to induce secretion of pro-inflammatory cytokine such as TNF- $\alpha$ , a marker more described in chronic sleep restriction or deprivation and as mediators of excessive sleepiness in humans in pathological conditions.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Mounting evidence from both observational and experimental research suggests that sleep disturbance and short sleep duration adversely impact human physical health [1] and mortality risk [2,3]. The mechanisms by which altered sleep duration affects health are unclear, but experimental studies suggest altered sleep may impact levels of cytokines known to be important in regulating inflammation. Sleep deprivation has been found to alter immune responses [4] and to induce increases in circulating levels of inflammatory markers such as interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), and C-reactive protein (CRP) [5,6]. Moreover, acute sleep loss, either total or partial, is associated with increased sleepiness and decrements in neurobehavioral performance [7,8]. Also, more recently it has been shown that sleep loss is associated with next-day increase of proinflammatory cytokines, e.g. IL-6 and TNF- $\alpha$  [9–11], which have been proposed as mediators of pathological or experimentally induced sleepiness in humans

and have been shown to be associated with an unfavorable metabolic profile, a higher risk of cardiovascular adverse events, and decreased longevity [9,12]. However, the increases in IL-6 and TNF- $\alpha$  are very small, and contradictory results have also been reported. Frey et al. [13] looking at a single night of acute sleep loss under constant conditions of body posture, light levels, and nutritional intake, failed to see an increase, and in fact reported a decrease in IL-6 and CRP. In a study of mild sleep loss (2 h per night for seven nights in healthy men and women), men showed elevations of TNF- $\alpha$  as a consequence of sleep restriction, whereas women did not show this change [10]. In another study involving men who were sleep restricted to two 2 h naps per day for 4 days, Shearer et al. [5] found no increase in TNF- $\alpha$  or its receptors. In recent studies, Haack et al. [14] observed no significant changes in TNF- $\alpha$  or its soluble p55 receptor with men and women who underwent sleep reduction for 10 nights and Ruiz et al. [15] found no increase in TNF- $\alpha$  after two nights of total sleep deprivation (SD) or four nights of rapid eye movement (REM) SD. As yet, incompletely understood individual differences in vulnerability to sleep loss may underlie these discrepancies, or perhaps subtle but important differences in methods. Continuous use of an intravenous (IV) indwelling catheter across 24 h has been reported to be associated with an increase in IL-6 levels regardless of sleep or sleep deprivation [16].

<sup>\*</sup> Corresponding author. Address: Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), French Army Biomedical Research Institute, B.P. 73, 91223 Brétigny-sur-Orge Cedex, France. Tel.: +33 1 69 23 77 50; fax: +33 1 69 23 70 02.

E-mail address: [mchennaoui@imassa.fr](mailto:mchennaoui@imassa.fr) (M. Chennaoui).



The reported increase in IL-6 was hypothesized to be due to local inflammation at the IV site as higher IL-6 levels were reported for samples that were difficult to obtain, especially during sleep. The levels of other cytokines and soluble cytokine receptors, such as TNF- $\alpha$  and the soluble TNF receptors p55 and p75, are only slightly influenced by intravenous catheter [17].

In view of contradictory results related in different studies due to the experimental conditions, the aim of our study was to observe under constant and well controlled conditions the effect of an acute sleep deprivation in young healthy men ( $n = 12$ ) on plasma levels of TNF- $\alpha$  and its receptor (tumor necrosis factor receptor-1: TNFR1), interleukin-6 (IL-6), cortisol and C-reactive protein (CRP), and to determine the daytime period in which the proinflammatory response is observed.

## 2. Material and methods

### 2.1. Subjects

Twelve healthy men, aged  $29.1 \pm 3.3$  years (mean  $\pm$  SD), with a body mass index (BMI) of  $23.4 \pm 1.5$  kg/m<sup>2</sup>, were included in the study after giving written informed consent. Institutional Paris-Cochin ethics committee approved the protocol (N ID RCB; 2008-A00170-55), which was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki of 1975, as revised in 2001.

All subjects underwent a detailed medical history and examination. Exclusion criteria were: shift-workers, smokers, daily consumption of alcoholic beverages and those consuming more than 400 mg of caffeine per day, subjects with BMI greater than 30 kg/m<sup>2</sup>, and those taking medication. Clinical tests, including electrocardiogram, blood pressure assessment and blood test (glucose, total cholesterol, triglycerides,  $\gamma$ GT and transaminases) were negative for abnormal findings. Subjects with excessive daytime somnolence (i.e. Epworth Sleepiness Scales  $\geq 9$ ) [18] or sleep complaints (i.e. Pittsburg sleep quality index (PSQI)  $< 31$ , or  $> 69$ ) [19] or if they could not be considered as an intermediate chronotype on the Horne and Ostberg questionnaire [20] were also excluded.

### 2.2. Protocol

Subjects were housed individually in a temperature-controlled bedroom ( $24 \pm 1$  °C) for 5 days at the Percy Military Hospital (Clamart, France). During the first day (D1), they were familiarized with the laboratory procedures and equipped for continuous polysomnography (electroencephalogram [EEG], electrooculogram, electromyogram – Embla, Broomfield, CO, USA). During D1 and

the day after (D2), subjects went to bed at 2300 and awoke at 0700. The total sleep deprivation started on the 3rd day (D3) at 0700 and, finished the day after (D4) at 2300, (i.e. 40 h of continuous awakening). Subjects left the laboratory on the 5th day (D5) after one night of sleep recovery (2300–0700) (Table 1).

All measurements were performed in the subject's bedroom. Blood samples were collected serially only every 3 h during D2 and D4 via an indwelling venous forearm catheter at 0800, 1100, 1400, 1700, 2000 and 2300. In order to avoid a possible inflammatory local response due to the IV catheter, several precautions were set up. Indeed, the catheter was cautiously inserted in the distal antecubital vein (left forearm at D2 and contralateral arm at D4), before the first blood sample of the day (i.e. 0730). The catheter was kept patent with small amounts of heparin (the total amount of heparin did not exceed 100 U/24-h periods). The catheter was removed after the last blood sample of the day (i.e. 2315). Samples were immediately centrifuged at 1100g and plasma aliquots frozen and stored at  $-80$  °C.

During the experiment, except for a shower between 2200 and 2230 every day, the subjects were continuously monitored for polysomnography, analyzed offline (Embla Somnologica for Windows XP Software) to ensure that they remained alert throughout the 40 h of sleep loss. The investigators were continuously present to monitor wakefulness in order to ensure that subjects would not fall asleep during the sleep deprivation protocol. Central body temperature was measured from an ingested wireless capsule (VitalSense, Mini Mitter Company, Inc. Bend, OR, USA). Laboratory illumination was maintained at 150–200 lux during the entire period of sleep loss. When not engaged in any specific testing or meal, subjects were allowed to read, watch videos, or play games, or converse with the staff or visitors. Subjects were prohibited from exercise, caffeine, tobacco, alcohol, and other psychoactive substances 24 h before and during the study. Meals and caloric intake were standardized for all subjects (2600 kcal/day). Water was allowed *ad libitum*.

### 2.3. Sleep recordings

#### 2.3.1. Assessments of nighttime sleep

Sleep/wake patterns were checked using wrist actigraphy (Actiwatch TM, Cambridge Neurotechnology, Cambridgeshire, UK) 1 week before the experiment. The mean subjects' total sleep duration was  $8.1 \pm 0.6$  h (mean  $\pm$  SD). During the experiment, sleep laboratory recordings were carried in the comfortable subject's bedroom. Each subject was monitored with polysomnographic recordings continuously for the 5 days of the experiment. The sleep schedule in the laboratory at baseline was similar to the subjects'

**Table 1**  
Sleep deprivation protocol in healthy men ( $n = 12$ ).

<i>Adaptation day</i>														
Time (clock hours)	0800	1100	1400	1700	2000	2300	2400	0100	0200	0300	0400	0500	0600	0700
<i>Baseline day (D2)</i>							2400	0100	0200	0300	0400	0500	0600	0700
Time (clock hours)	0800	1100	1400	1700	2000	2300	2400	0100	0200	0300	0400	0500	0600	0700
BS > RT > MSLT	X	X	X	X	X	X								
<i>Sleep deprivation day</i>														
Time (clock hours)	0800	1100	1400	1700	2000	2300	2400	0100	0200	0300	0400	0500	0600	0700
<i>After night of sleep loss (D4)</i>														
Time (clock hours)	0800	1100	1400	1700	2000	2300	2400	0100	0200	0300	0400	0500	0600	0700
Sleep deprivation time	25 h	28 h	31 h	34 h	37 h	40 h								
BS > RT > MSLT	X	X	X	X	X	X								
<i>After recovery night (D5)</i>														
Time (clock hours)	0800													

BS, blood sample; RT, reaction time; MSLT, multiple sleep latency test.



normal sleep schedule. Specifically, the subjects' habitual times to go to bed and rise in the morning were no different than by an hour from their sleep schedule in the laboratory. Polysomnographic recordings were digitalized and were analyzed offline using standard methods [21]. For each night, sleep period time (SPT) and the percentage of time spent in different sleep stages (wakefulness after sleep onset [WASO]; sleep stages 1 [N1] and 2 [N2]; slow wave sleep [N3]; and rapid eye movement [REM]) were determined with reference to the SPT (in min). Total sleep time (TST) excluded the time of intermittent wakefulness (i.e. TST = SPT–WASO).

#### 2.4. Assessment of daytime sleepiness and vigilance performance

##### 2.4.1. Sleep latency

During the day 2 (D2) and the day 4 (D4) the measurement of the sleep latency was evaluated at 0900, 1200, 1500, 1800 and 2100 using the multiple sleep latency test (MSLT) [22]. Polysomnographic methods were used to determine whether the subjects fell asleep. Onset of sleep was defined as attaining 3 subsequent 30 s epochs of stage N1; or one epoch of stage N2, N3 or one epoch of REM. The MSLT was terminated 20 min after light-out if there had been no sleep or after sleep onset criteria.

##### 2.4.2. Subjective levels of sleepiness

It was assessed before MSLT using the Karolinska Institut Scale (KSS) [23]. This scale consists of 9 scores from 1: extremely alert to 9: extremely sleepy, falls asleep all the time.

##### 2.4.3. Psychomotor vigilance task

The simple reaction time (RT) from the STRES battery of the AGARD (NATO) [24] was design to evaluate the ability to sustain attention and respond in a timely manner to salient signals (i.e. basic vigilance) [8]. Subjects were to respond with their right hand when the stimulus appeared on the right side of the screen and with their left hand when the stimulus appeared on the left side of the screen. The primary variables assessed in our study were: (1) mean duration of the response to the signal (reaction time), (2) frequency of errors (% errors), which refers to the number of time the subject failed to respond to the signal or failed to respond in a timely manner (>2 s). One week before experiment subjects were individually trained during 20 min in order to observe stable performance. RT tests were performed after a 10 min stabilization period at D2 and D4 at 0830, 1130, 1430, 1730 and 2030 during 2 min.

#### 2.5. Hormone and cytokine assays

Plasma samples were assayed using commercially available ELISA kits (soluble high-sensitivity (hs) CRP, IL-6 (hs), TNF- $\alpha$  (hs) and sTNFR1 – R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Plasma cortisol concentrations were measured using a commercial radioimmuno assay (gammaCoat cortisol RIA Kit, Diasorin, Stillwater, MN, USA). The lower limits of detection for CRP, IL-6, TNF- $\alpha$ , and soluble TNF receptor 1 (sTNFR1) were 0.005 ng/ml, 0.016 ng/ml, 0.038 pg/ml and 0.43 pg/ml, respectively. Average intra-assay coefficients of variation were 4.4%, 6.9%, 8.5% and 4.7% respectively. Average inter-assay coefficients of variation for CRP, IL-6, TNF- $\alpha$  and sTNFR1 were 6.0%, 9.6%, 10.6% and 8.8%, respectively. The lower limit of detection was 5.9 nmol/l for the cortisol RIA and the average inter- and intra-assay coefficients of variation were 9.8% and 7.7%, respectively.

#### 2.6. Statistical analyses

In this study, we compared the differences between values observed during D2 and D4 at the same time. Biological parameters were analyzed using a one (day effect) or a two way (day and time effects) repeated measure ANOVA. ANOVAs were followed by a Tukey pairwise multiple comparison procedures. Homogeneity of variance was previously tested using the Levene's test. When this test failed, a log 10 transformation of the data was performed to equalize the variance and thereby perform parametric data analysis. Data are presented as means  $\pm$  SE (standard error). All statistical analyses were conducted using Statistica 6.0, StatSoft Inc., Maisons-Alfort, France. Unless specified, for all statistics the significance level was set at  $P < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Effectiveness of sleep deprivation protocol

##### 3.1.1. Sleep Pre- and Post deprivation

After a night of sleep loss, subjects demonstrated significantly shorter sleep latencies, increased percentage of total sleep time and sleep efficiency (TST/TIB), and decreased average of wake time after sleep onset. In terms of sleep stages, subjects spent more time in stage N3 and less time in stage N1. Also, REM latency was significantly decreased compared with baseline (Table 2).

**Table 2**  
Night-time sleep during the night before (night D2) and after (night 4) TSD in 12 healthy subjects.

	Baseline (night D2)	After TSD (night D4)	ANOVA $F(1,11)$
<i>Sleep continuity</i>			
Sleep period time (SPT), min	450.5 $\pm$ 2.4	462.63 $\pm$ 1.8	13.7**
Total sleep time (TST), min	426.6 $\pm$ 4.3	448.7 $\pm$ 2.3	24.8**
Sleep efficiency, %	92.2 $\pm$ 1.2	96.3 $\pm$ 0.4	22.6**
Sleep latency, min	14.5 $\pm$ 2.3	6.2 $\pm$ 1.2	23.1**
WASO, min	23.9 $\pm$ 2.7	14.0 $\pm$ 2.3	11.3**
<i>Sleep architecture</i>			
Stage 1, min	16.6 $\pm$ 1.4	8.2 $\pm$ 1.1	65.4**
% TST	3.9 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.5	75.9**
Stage 2, min	188.9 $\pm$ 8.7	184.7 $\pm$ 5.3	0.3
% TST	43.3 $\pm$ 2.3	41.2 $\pm$ 1.3	2.9
Stage 3, min	109.1 $\pm$ 6.8	170.1 $\pm$ 7.5	97.0**
% TST	25.6 $\pm$ 1.5	37.9 $\pm$ 2.1	60.5**
REM, min	112.0 $\pm$ 4.4	85.7 $\pm$ 3.2	45.7**
% TST	26.3 $\pm$ 0.8	19.1 $\pm$ 1.2	79.4**
Latency, min	68.5 $\pm$ 2.0	101.5 $\pm$ 5.4	6.9*

Values are means  $\pm$  SE. TSD, total sleep deprivation; WASO, wake time after sleep onset; REM, rapid eye movement sleep.

\*  $P < 0.05$ .

\*\*  $P < 0.01$ .

Please cite this article in press as: Chennaoui M et al. Effect of one night of sleep loss on changes in tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) levels in healthy men. Cytokine (2011), doi:10.1016/j.cyto.2011.06.002



**Table 3**  
Mean sleep latency and sleepiness during D2 and D4 at 0900, 1200, 1500, 1800 and 2100.

	Time (h)					ANOVA		
	0900	1200	1500	1800	2100	Day $F(1, 11)$	Hour $F(4, 44)$	Interac. $F(4, 44)$
<i>Sleep latency MSLT, min</i>								
D2	15.2 ± 1.7	10.6 ± 1.7	8.9 ± 1.4	12.4 ± 1.9	16.2 ± 1.3	111.1**	5.1**	4.9**
D4	1.6 ± 0.3 <sup>55</sup>	1.8 ± 0.5 <sup>55</sup>	2.2 ± 0.5 <sup>55</sup>	1.6 ± 0.4 <sup>55</sup>	2.6 ± 0.4 <sup>55</sup>			
<i>KSS</i>								
D2	2.3 ± 0.2	3.1 ± 0.2	2.8 ± 0.2	3.1 ± 0.3	3.3 ± 0.3	23.2**	0.9	2.5
D4	4.6 ± 0.4 <sup>55</sup>	4.5 ± 0.4 <sup>55</sup>	4.3 ± 0.4 <sup>55</sup>	4.3 ± 0.4 <sup>5</sup>	4.2 ± 0.3 <sup>5</sup>			

Values are mean ± SE. TSD, total sleep deprivation; KSS, Karolinska Sleepiness Scale.

\*\*  $P < 0.01$ .

<sup>5</sup> Difference vs. baseline day,  $P < 0.05$ .

<sup>55</sup> Difference vs. baseline day,  $P < 0.01$ .

**Table 4**  
Reaction time during D2 and D4 at 0800, 1100, 1400, 1700 and 2000.

	Time (h)					ANOVA		
	0800	1100	1400	1700	2000	Day $F(1, 11)$	Hour $F(4, 44)$	Interac. $F(4, 44)$
<i>Reaction time (ms)</i>								
D2	672.7 ± 37.9	674.5 ± 34.1	658.8 ± 32.9	693.0 ± 41.6	668.3 ± 33.6	12.3**	1.8	1.1
D4	710.4 ± 40.1	720.1 ± 41.4	735.4 ± 45.3 <sup>55</sup>	769.9 ± 47.0 <sup>5</sup>	737.7 ± 42.4			
<i>% Errors</i>								
D2	3.3 ± 1.0	2.0 ± 0.5	3.6 ± 0.9	3.4 ± 0.9	3.6 ± 0.8	0.2	0.4	0.4
D4	5.3 ± 1.6	3.8 ± 1.1	3.0 ± 1.0	3.4 ± 1.0	4.0 ± 1.1			

Values are mean ± SE. TSD, total sleep deprivation.

\*\*  $P < 0.01$ .

<sup>5</sup> Difference vs. baseline day,  $P < 0.05$ .

<sup>55</sup> Difference vs. baseline day,  $P < 0.01$ .

### 3.1.2. Multiple sleep latency test (MSLT)

After one night of total sleep loss, both the average daily sleep latency as well as sleep latencies at each time point of the MSLT (0900, 1200, 1500, 1800 and 2100) were significantly shorter compared with baseline. The differences were significant when we used the standard MSLT criterion of 30 s of any stage of sleep ( $15.2 \pm 1.7$  vs.  $1.6 \pm 0.3$ ,  $10.6 \pm 1.7$  vs.  $1.8 \pm 0.5$ ,  $8.9 \pm 1.4$  vs.  $2.2 \pm 0.5$ ,  $12.4 \pm 1.9$  vs.  $1.6 \pm 0.4$ ,  $16.2 \pm 1.3$  vs.  $2.6 \pm 0.4$ ; all  $P < 0.01$ ) (Table 3).

### 3.1.3. Subjective sleepiness

Subjective sleepiness, measured by the nine-point Karolinska Sleepiness Scale (KSS), increased significantly after a night of total sleep loss at each time point (at 0900, 1200 and 1500,  $P < 0.01$ ; at 1800 and 2100 h,  $P < 0.05$ ) (Table 3).

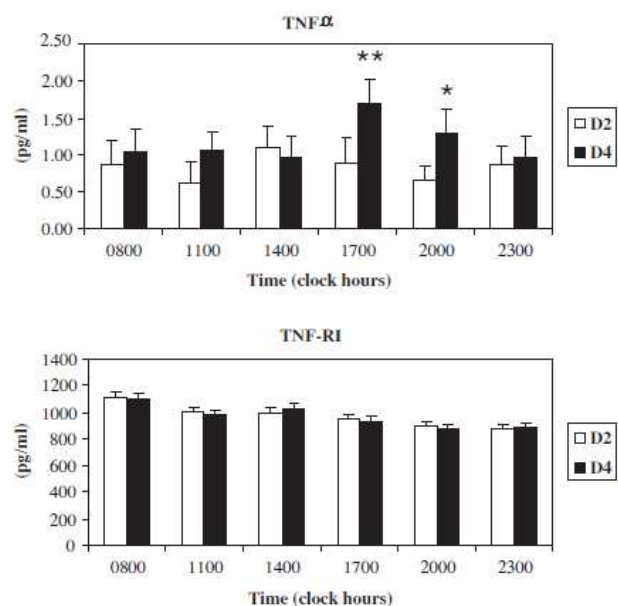
### 3.1.4. Vigilance performance

For the basic block of reaction time test, we observed an overall increase in response time from 1400 and 1700 ( $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively, see Table 4) without change in the percentage of errors, indicating a decrease in vigilance performance.

## 3.2. Effects of total sleep deprivation on TNF- $\alpha$ , TNFR1, IL-6, cortisol and CRP secretion

A total sleep deprivation induced a significant increase on TNF- $\alpha$  plasma levels at 1700 and 2000 (i.e. after 34 and 37 h of awakening) ( $1.70 \pm 0.31$  vs.  $0.90 \pm 0.34$  pg/ml at 1400 and  $1.29 \pm 0.33$  vs.  $0.66 \pm 0.19$  pg/ml;  $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively). No statistically significant differences on TNFR1, IL-6, cortisol and CRP plasma levels were observed between baseline period (D2) and after the night of total sleep loss (D4). However, there was a significant

effect in terms of the circadian secretory pattern of cortisol and IL-6, as indicated by the significant time effect (Figs. 1 and 2).



**Fig. 1.** Difference in plasma levels of tumor necrosis-alpha (TNF- $\alpha$ ) and tumor necrosis factor receptor-1 (TNFR1) between baseline (D2) and after TSD (D4). Values are presented as mean ± SE. TSD, total sleep deprivation. \*Difference vs. baseline day, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .



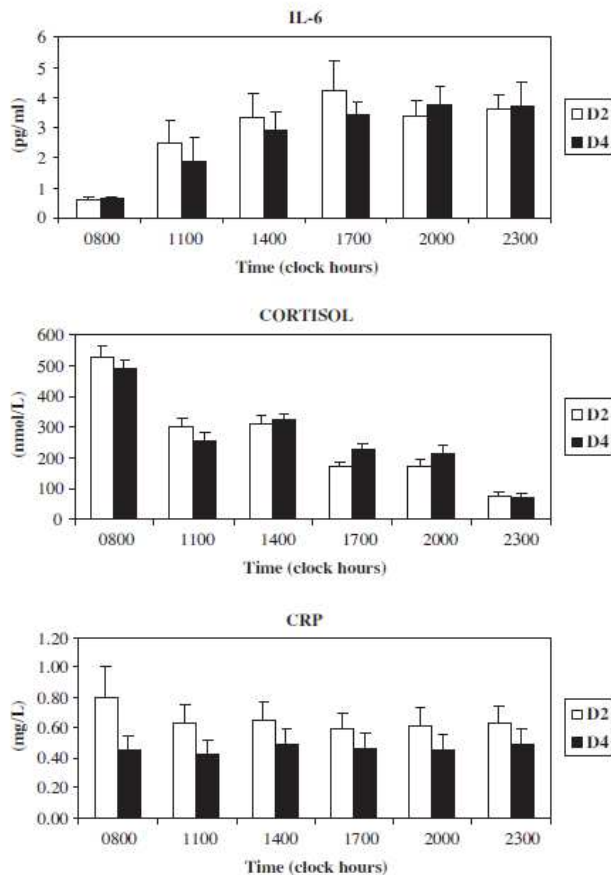


Fig. 2. Difference in plasma levels of interleukin-6 (IL-6), cortisol and C-reactive protein (CRP) between baseline (D2) and after TSD (D4). Values are presented as mean  $\pm$  SE. TSD, total sleep deprivation.

#### 4. Discussion

Our present study shows that a total sleep deprivation in young health men is associated with significant sleepiness, decrements in psychomotor performance and increased secretion of the only pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  and no changes in IL-6, CRP and cortisol secretion.

##### 4.1. Daytime sleepiness and vigilance performance

We observe a significant increase in sleepiness and decrements in psychomotor performance as described by Vgontzas et al., studies in which they show that a modest daily restriction of sleep by 2 h/night for 1 week in young healthy men and women is associated with significant increase in sleepiness and decrements in psychomotor vigilance performance [10,25,26].

##### 4.2. TNF- $\alpha$ , TNFR1 and IL-6 levels

The pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$  have been suggested as mediators of excessive sleepiness in humans in pathological conditions, e.g., sleep apnea [25] and narcolepsy [27], or in experimentally induced sleepiness, i.e., following sleep deprivation [5,10,11].

Few studies have described the effects of human sleep loss on the tumor necrosis factor (TNF) system. In a study of mild sleep loss (2 h per night for seven nights) in healthy men and women,

men showed elevations of TNF- $\alpha$  as a consequence of sleep restriction, whereas women did not show this change [10]. In another study involving men who were sleep restricted to two 2-hour naps per day for 4 days, Shearer et al. [5] observed no increase in TNF- $\alpha$  or its receptors. In another recent study involving men and women who underwent sleep reduction for 10 nights, there were no significant changes seen in TNF- $\alpha$  or its soluble p55 receptor [14]. As yet, incompletely understood individual differences in vulnerability to sleep loss may underlie these discrepancies, or perhaps subtle but important differences in methods. Although the TNF family sometimes responds to partial sleep deprivation, there is evidence that the type 1 (but not type 2) soluble TNF receptor is influenced by acute complete sleep loss [5]. Vgontzas and colleagues [26] have observed neither TNF- $\alpha$  nor TNFR1 were increased following a night of sleep loss, and their levels were not affected by the 2 h nap.

Our study in which constant and controlled experimental conditions were realized with healthy subjects and in absence of psychological or physical stressors; an acute total sleep deprivation (40 h) was sufficient to induce secretion of pro-inflammatory cytokine such as TNF- $\alpha$ , a marker more described in chronic sleep restriction or deprivation and as mediators of excessive sleepiness in humans in pathological conditions.

Indeed, in our study we observed a significant increase in TNF- $\alpha$  plasma levels only after 34 and 37 h of sleep deprivation in healthy men. We can suggest that one night of sleep loss can induce the functional alteration of the monocyte proinflammatory cytokine response [28]. Indeed, after a single night of sleep reduced by 50%, Irwin and colleagues [29] showed an increase in monocyte production of TNF- $\alpha$  messenger RNA and in the morning after a night of sleep loss, monocyte production of TNF- $\alpha$  differentially changed between the two sexes [30]. The increase in circulating levels of TNF- $\alpha$  could be induced by the activation of cellular expression of TNF- $\alpha$ , with effects on up-stream sources of cellular inflammatory cytokine expression [29]. Moreover, such up-regulation of inflammatory gene expression following such sleep loss [29] is due to activation of nuclear factor (NF)- $\kappa$ B transcription control pathways [31] that plays a key role in controlling cellular expression of proinflammatory genes [32].

Moreover, partial sleep deprivation induces marked increases in cardiovascular responses [33,34] as well as sympathoadrenal activity upon awakening [34]. In turn, adrenergic output is known to facilitate in vivo release of inflammatory mediators into circulating blood [35,36]. Although catecholamines in vitro are reported to suppress proinflammatory cytokine production [37,38], physiological concentrations of norepinephrine are reported to be sufficient to result in a significant dose dependent increase of NF- $\kappa$ B-binding activity in vitro [39], which might drive increases in the monocyte expression of proinflammatory cytokines.

In view of these data, the significant increase of heart rate (HR), systolic blood pressure, and the normalized low frequency component of HR variability (0.04–0.15 Hz), a marker of the sympathetic activity, within 32 h of TSD ( $P < 0.05$ ) data presented in our recent paper [40] could increase in the monocyte expression of proinflammatory cytokines, suggesting the increase of TNF- $\alpha$  levels at 34 and 37 h of sleep deprivation in our study.

As noted, total sleep deprivation has been reported to increase [5,10,11,26], decrease [13,16] or induce no measurable change [41,42] in IL-6 levels. Taken together, the effects of sleep deprivation on circulating levels of IL-6 appear equivocal, which may in part be related to both pro- and anti-inflammatory roles of IL-6 [43]. Continuous use of an indwelling IV catheter across 24 h has been reported to be associated with an increase in IL-6 levels regardless of sleep or sleep deprivation [16]. The reported increase in IL-6 was hypothesized to be due to local inflammation at the IV site as higher IL-6 levels were reported for samples that were



difficult to obtain, especially during sleep. Indeed, when circulating IL-6 levels were analyzed in plasma samples obtained from an indwelling venous catheter, they increased about 100% or even more after sampling periods of 10 h or longer. In contrast, no increase was observed when IL-6 concentrations were analyzed in samples obtained after the same time interval, but by a simple needle stick at the controlateral arm [17,44,45]. The levels of other cytokines and soluble cytokine receptors, such as TNF- $\alpha$  and the soluble TNF receptors p55 and p75, are not substantially affected by the use of an indwelling catheter [17]. This suggests that IL-6 might also be sensitive to other confounding factors: for example, the blood drawing process and related difficulties, e.g. frequent and/or strong aspiration of blood, may influence IL-6 levels. In general, blood drawing from an indwelling catheter is more difficult when subjects are asleep, because during sleep arm positions are often inept for blood drawing. These difficulties might induce subtle mechanical damage to the vessel wall or to individual cells, resulting in cytokine release. Therefore, blood samples taken during sleep from an indwelling catheter might yield higher IL-6 levels than those obtained during wakefulness. This may confound findings of differences of IL-6 levels between sleep and wakefulness.

In our experimental conditions, i.e. blood samples collected serially only every 3 h during D2 and D4 from only 0800 to 2300, no changes in IL-6 levels were observed after one night of sleep loss. These observations confirm that it is necessary to take precautions with the blood sampling in sleep deprivation studies as suggested by Haack et al., studies [16,17].

#### 4.3. CRP and cortisol secretions

CRP is a stable marker of the development of cardiovascular diseases [46] that increase in chronic sleep loss [6]. However, contradictory results also appeared on the effects of sleep deprivation in healthy subjects with studies reporting an increase [6], a decrease [13], or no measurable change [47] in CRP levels. Indeed, several methodological differences among the studies cited above may contribute to the inconsistent findings for CRP, including the duration of sleep deprivation, circadian phase, control over posture and light exposure, blood sampling frequency, the timing and type of nutrition, previous limits of assay sensitivity, and differences in subjects' BMI; obesity increases pro-inflammatory markers [48].

As observed with IL-6 plasma levels, no changes in CRP plasma levels were found after the night of sleep loss due probably to the precautions used in blood samples.

#### 4.4. Cortisol

Several studies have also examined the effect of total sleep deprivation on cortisol, with some reporting an increase [49–51], others reporting a decrease [11,13,52,53], and others reporting no change [16,54–59]. Methodological differences between studies, such as delayed bedtime vs. advanced wake time, constant recumbent condition during sleep loss vs. ambulatory, calories given IV in the form of glucose vs. regular meals, may explain the variance in terms of cortisol response. Also, it has been shown that upright position [60] or the transition from dim light to bright light [61] in the morning induces an elevation of the cortisol level. In our controlled experimental conditions no changes in cortisol levels were observed after a total sleep deprivation.

### 5. Conclusions

In conclusion, loss of sleep during only part of the night is one of the most common complaints of persons who experience environmental or psychological stress [62,63], travel across time

meridians, engage in shift work, or have a psychiatric disorder [64]. Our results show that an acute sleep deprivation activates TNF- $\alpha$  levels after 34 and 37 h. We speculate that this response is associated with up-regulation of molecular signaling pathways that mediate increases in the transcription of the TNF gene. Confirmatory studies that use signal antagonists will be required to fully validate these potential mechanisms, but the results presented herein support the general principle that sleep loss alters molecular processes that drive cellular immune activation and induce inflammatory cytokines. These data should also motivate further investigations to define the effects of sleep loss on inflammatory mechanisms with implications for cardiovascular and chronic inflammatory disorders in humans. Testing of interventions that target sleep and/or its biological consequences might identify new strategies to constrain inflammation and to promote health as people age. The existence of a period in which inflammatory response is present during an acute sleep deprivation in healthy men reinforce the fact to use napping strategies in order to avoid an unfavorable metabolic profile, a higher risk of cardiovascular adverse events, and decreased longevity especially if these conditions of acute sleep deprivation are often repeated. Future investigations with daytime napping strategies should be investigated in the same conditions of our present study because a recent study shows the important role of napping after acute sleep deprivation [65]. Moreover it will be interesting so to explore the kinetic of cytokine and hormonal responses on recovery sleep after total sleep deprivation.

### Acknowledgments

This work was supported by the French *Délégation Générale pour l'Armement* (Contract No. 08co704). We thank Mrs. Delor, Bobee Elio and Mr. Gourby, Guillard, Lapeyre and all personnel from IMASSA and Percy Military Hospital for their technical and logistic contributions to this work.

### References

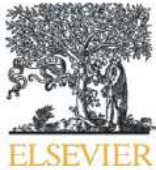
- [1] Gangwisch JE, Heymsfield SB, Boden-Albala B, Buijs RM, Kreier F, Pickering TG, et al. Sleep duration as a risk factor for diabetes incidence in a large US sample. *Sleep* 2007;30:1667–73.
- [2] Gangwisch JE, Heymsfield SB, Boden-Albala B, Buijs RM, Kreier F, Opler MG, et al. Sleep duration associated with mortality in elderly, but not middle-aged, adults in a large US sample. *Sleep* 2008;31:1087–96.
- [3] Shankar A, Koh WP, Yuan JM, Lee HP, Yu MC. Sleep duration and coronary heart disease mortality among Chinese adults in Singapore: a population-based cohort study. *Am J Epidemiol* 2008;168:1367–73.
- [4] Irwin M, McClintick J, Costlow C, Fortner M, White J, Gillin JC. Partial night sleep deprivation reduces natural killer and cellular immune responses in humans. *FASEB J* 1996;10:643–53.
- [5] Shearer WT, Reuben JM, Mullington JM, Price NJ, Lee BN, Smith EO, et al. Soluble TNF- $\alpha$  receptor 1 and IL-6 plasma levels in humans subjected to the sleep deprivation model of spaceflight. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:165–70.
- [6] Meier-Ewert HK, Ridker PM, Rifai N, Regan MM, Price NJ, Dinges DF, et al. Effect of sleep loss on C-reactive protein, an inflammatory marker of cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:678–83.
- [7] Rogers NL, Dorrian J, Dinges DF. Sleep, waking and neurobehavioural performance. *Front Biosci* 2003;8:s1056–67.
- [8] Van Dongen HP, Maislin G, Mullington JM, Dinges DF. The cumulative cost of additional wakefulness: dose-response effects on neurobehavioral functions and sleep physiology from chronic sleep restriction and total sleep deprivation. *Sleep* 2003;26:117–26.
- [9] Harris TB, Ferrucci L, Tracy RP, Corti MC, Wacholder S, Ettinger Jr WH, et al. Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *Am J Med* 1999;106:506–12.
- [10] Vgontzas AN, Zoumakis E, Bixler EO, Lin HM, Ffollett H, Kales A, et al. Adverse effects of modest sleep restriction on sleepiness, performance, and inflammatory cytokines. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2119–26.
- [11] Vgontzas AN, Mastorakos G, Bixler EO, Kales A, Gold PW, Chrousos GP. Sleep deprivation effects on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal and growth axes: potential clinical implications. *Clin Endocrinol* 1999;51:205–15.



- [12] Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 2000;101:1767-72.
- [13] Frey DJ, Fleshner M, Wright Jr KP. The effects of 40 h of total sleep deprivation on inflammatory markers in healthy young adults. *Brain Behav Immun* 2007;21:1050-7.
- [14] Haack M, Sanchez E, Mullington JM. Elevated inflammatory markers in response to prolonged sleep restriction are associated with increased pain experience in healthy volunteers. *Sleep* 2007;30:1145-52.
- [15] Ruiz FS, Andersen ML, Martins RC, Zager A, Lopes JD, Tufik S. Immune alterations after selective rapid eye movement or total sleep deprivation in healthy male volunteers. *Innate Immun* 2010.
- [16] Haack M, Kraus T, Schuld A, Dalal M, Koethe D, Pollmacher T. Diurnal variations of interleukin-6 plasma levels are confounded by blood drawing procedures. *Psychoneuroendocrinology* 2002;27:921-31.
- [17] Haack M, Reichenberg A, Kraus T, Schuld A, Yirmiya R, Pollmacher T. Effects of an intravenous catheter on the local production of cytokines and soluble cytokine receptors in healthy men. *Cytokine* 2000;12:694-8.
- [18] Johns MW. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. *Sleep* 1991;14:540-5.
- [19] Buysse DJ, Reynolds 3rd CF, Monk TH, Berman SR, Kupfer DJ. The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Res* 1989;28:193-213.
- [20] Home JA, Ostberg O. A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *Int J Chronobiol* 1976;4:97-110.
- [21] Iber C, Ancoli-Israel S, Chesson A, Quan S. Medicine. *ftAAoS*. The AASM manual for the scoring of sleep and associated events: rules, terminology and technical specification. Westchester: American Academy of Sleep Medicine; 2007.
- [22] Carskadon MA, Dement WC, Mitler MM, Roth T, Westbrook PR, Keenan S. Guidelines for the multiple sleep latency test (MSLT): a standard measure of sleepiness. *Sleep* 1986;9:519-24.
- [23] Lee KA, Hicks G, Nino-Murcia G. Validity and reliability of a scale to assess fatigue. *Psychiatry Res* 1991;36:291-8.
- [24] Batejat D, Coste O, Van Beers P, Lagarde D, Pierard C, Beaumont M. Prior sleep with zolpidem enhances the effect of caffeine or modafinil during 18 h continuous work. *Aviat Space Environ Med* 2006;77:515-25.
- [25] Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, Kales A, Tyson K, Chrousos GP. Elevation of plasma cytokines in disorders of excessive daytime sleepiness: role of sleep disturbance and obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1313-6.
- [26] Vgontzas AN, Pejovic S, Zoumakis E, Lin HM, Bixler EO, Basta M, et al. Daytime napping after a night of sleep loss decreases sleepiness, improves performance, and causes beneficial changes in cortisol and interleukin-6 secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;292:E253-61.
- [27] Okun ML, Giese S, Lin L, Einen M, Mignot E, Coussons-Read ME. Exploring the cytokine and endocrine involvement in narcolepsy. *Brain Behav Immun* 2004;18:326-32.
- [28] Mullington JM, Simpson NS, Meier-Ewert HK, Haack M. Sleep loss and inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2010;24:775-84.
- [29] Irwin MR, Wang M, Campomayor CO, Collado-Hidalgo A, Cole S. Sleep deprivation and activation of morning levels of cellular and genomic markers of inflammation. *Arch Inter Med* 2006;166:1756-62.
- [30] Irwin MR, Carrillo C, Olmstead R. Sleep loss activates cellular markers of inflammation: sex differences. *Brain Behav Immun* 2010;24:54-7.
- [31] Irwin MR, Wang M, Ribeiro D, Cho HJ, Olmstead R, Breen EC, et al. Sleep loss activates cellular inflammatory signaling. *Biol Psychiatry* 2008;64:538-40.
- [32] Pascual G, Glass CK. Nuclear receptors versus inflammation: mechanisms of transrepression. *Trends Endocrinol Metab* 2006;17:321-7.
- [33] Irwin M, Thompson J, Miller C, Gillin JC, Ziegler M. Effects of sleep and sleep deprivation on catecholamine and interleukin-2 levels in humans: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:1979-85.
- [34] Irwin MR, Ziegler M. Sleep deprivation potentiates activation of cardiovascular and catecholamine responses in abstinent alcoholics. *Hypertension* 2005;45:252-7.
- [35] Friedman EM, Irwin MR. Modulation of immune cell function by the autonomic nervous system. *Pharmacol Ther* 1997;74:27-38.
- [36] Johnson JD, Campisi J, Sharkey CM, Kennedy SL, Nickerson M, Greenwood BN, et al. Catecholamines mediate stress-induced increases in peripheral and central inflammatory cytokines. *Neuroscience* 2005;135:1295-307.
- [37] Cole SW, Korin YD, Fahey JL, Zack JA. Norepinephrine accelerates HIV replication via protein kinase A-dependent effects on cytokine production. *J Immunol* 1998;161:610-6.
- [38] Wahle M, Neumann RP, Moritz F, Krause A, Buttgerit F, Baerwald CG. Beta-2-adrenergic receptors mediate the differential effects of catecholamines on cytokine production of PBMC. *J Interferon Cytokine Res* 2005;25:384-94.
- [39] Bierhaus A, Wolf J, Andrassy M, Rohleder N, Humpert PM, Petrov D, et al. A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:1920-5.
- [40] Sauvet F, Leftheriotis G, Gomez-Merino D, Langrume C, Drogou C, Van Beers P, et al. Effect of acute sleep deprivation on vascular function in healthy subjects. *J Appl Physiol* 2010;108:68-75.
- [41] Born J, Lange T, Hansen K, Molle M, Fehm HL. Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells. *J Immunol* 1997;158:4454-64.
- [42] Dinges DF, Douglas SD, Hamarman S, Zaugg L, Kapoor S. Sleep deprivation and human immune function. *Adv Neuroimmunol* 1995;5:97-110.
- [43] Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998;101:311-20.
- [44] Seiler W, Muller H, Hiemke C. Interleukin-6 in plasma collected with an indwelling cannula reflects local, not systemic, concentrations. *Clin Chem* 1994;40:1778-9.
- [45] Gudmundsson G, Hunninghake GW. Interferon-gamma is necessary for the expression of hypersensitivity pneumonitis. *J Clin Invest* 1997;99:2386-90.
- [46] Mullington JM, Haack M, Toth M, Serrador JM, Meier-Ewert HK. Cardiovascular, inflammatory, and metabolic consequences of sleep deprivation. *Prog Cardiovasc Dis* 2009;51:294-302.
- [47] Dimitrov S, Lange T, Tiekens S, Fehm HL, Born J. Sleep associated regulation of T helper 1/T helper 2 cytokine balance in humans. *Brain Behav Immun* 2004;18:341-8.
- [48] Panagiotakos DB, Pitsavos C, Yannakoulia M, Chrysohoou C, Stefanadis C. The implication of obesity and central fat on markers of chronic inflammation: The ATTICA study. *Atherosclerosis* 2005;183:308-15.
- [49] Mullington J, Hermann D, Holsboer F, Pollmacher T. Age-dependent suppression of nocturnal growth hormone levels during sleep deprivation. *Neuroendocrinology* 1996;64:233-41.
- [50] Leproult R, Copinschi G, Buxton O, Van Cauter E. Sleep loss results in an elevation of cortisol levels the next evening. *Sleep* 1997;20:865-70.
- [51] Weitzman ED, Zimmerman JC, Czeisler CA, Ronda J. Cortisol secretion is inhibited during sleep in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;56:352-8.
- [52] Dinges DF, Douglas SD, Zaugg L, Campbell DE, McMann JM, Whitehouse WG, et al. Leukocytosis and natural killer cell function parallel neurobehavioral fatigue induced by 64 h of sleep deprivation. *J Clin Invest* 1994;93:1930-9.
- [53] Akerstedt T, Palmlad J, de la Torre B, Marana R, Gillberg M. Adrenocortical and gonadal steroids during sleep deprivation. *Sleep* 1980;3:23-30.
- [54] Heiser P, Dickhaus B, Schreiber W, Clement HW, Hasse C, Hennig J, et al. White blood cells and cortisol after sleep deprivation and recovery sleep in humans. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2000;250:16-23.
- [55] Dzaja A, Dalal MA, Himmerich H, Uhr M, Pollmacher T, Schuld A. Sleep enhances nocturnal plasma ghrelin levels in healthy subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;286:E963-7.
- [56] Ozturk L, Pelin Z, Karadeniz D, Kaynak H, Cakar L, Gozukimizi E. Effects of 48 h sleep deprivation on human immune profile. *Sleep Res Online* 1999;2:107-11.
- [57] Follenius M, Brandenberger G, Badesapt JJ, Libert JP, Ehrhart J. Nocturnal cortisol release in relation to sleep structure. *Sleep* 1992;15:21-7.
- [58] Gary KA, Winokur A, Douglas SD, Kapoor S, Zaugg L, Dinges DF. Total sleep deprivation and the thyroid axis: effects of sleep and waking activity. *Aviat Space Environ Med* 1996;67:513-9.
- [59] Gonzalez-Ortiz M, Martinez-Abundis E, Balcazar-Munoz BR, Pascoe-Gonzalez S. Effect of sleep deprivation on insulin sensitivity and cortisol concentration in healthy subjects. *Diabetes Nutr Metab* 2000;13:80-3.
- [60] Hennig J, Friebe J, Ryl I, Kramer B, Bottcher J, Netter P. Upright posture influences salivary cortisol. *Psychoneuroendocrinology* 2000;25:69-83.
- [61] Leproult R, Collecchia EF, L'Hermite-Baleñaux M, Van Cauter E. Transition from dim to bright light in the morning induces an immediate elevation of cortisol levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:151-7.
- [62] Akerstedt T. Psychological and psychophysiological effects of shift work. *Scand J Work Environ Health* 1990;16(Suppl 1):67-73.
- [63] McDermott OD, Prigerson HG, Reynolds 3rd CF, Houck PR, Dew MA, Hall M, et al. Sleep in the wake of complicated grief symptoms: an exploratory study. *Biol Psychiatry* 1997;41:710-6.
- [64] Benca RM, Okawa M, Uchiyama M, Ozaki S, Nakajima T, Shibui K, et al. Sleep and mood disorders. *Sleep Med Rev* 1997;1:45-56.
- [65] Faraut B, Boudjeltia KZ, Dyzma M, Rousseau A, David E, Stenuit P, et al. Benefits of napping and an extended duration of recovery sleep on alertness and immune cells after acute sleep restriction. *Brain Behav Immun* 2011;25:16-24.







Contents lists available at ScienceDirect

Microvascular Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ymvre](http://www.elsevier.com/locate/ymvre)

## Technical Report

## Acetylcholine chloride as a potential source of variability in the study of cutaneous vascular function in man

Fabien Sauvet<sup>a,\*</sup>, Guillaume Mahé<sup>b,c</sup>, Mounir Chennaoui<sup>a</sup>, Christophe Langrume<sup>a</sup>, Mélanie Vasseur<sup>b,c</sup>, Pierre Abraham<sup>b,c</sup>, Georges Leftheriotis<sup>b,c</sup><sup>a</sup> Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), F-93223 Brétigny sur Orge, France<sup>b</sup> Unité mixte CNRS 6214-INSERM 771, F-49045 Angers, France<sup>c</sup> Université d'Angers, F-49045 Angers, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Accepted 5 May 2011

Available online xxxx

## ABSTRACT

**Introduction:** Laser-Doppler flowmetry (LDF) coupled with acetylcholine chloride (ACh) iontophoresis is increasingly recognized as a reliable non-invasive method to study the endothelial function. However, ACh-vasodilation measurement appears highly variable possibly due to the ACh pharmacological properties itself. These problems may be partially overcome by using methacholine chloride (MCh), a more stable synthetic agonist of muscarinic receptors, instead of ACh. Therefore, we first studied the correlation between the two drugs and then the effects of (1) spatial variability (inter-site measurements), (2) temporal variability (inter-day measurements), (3) intra-day variability (morning versus evening), and (4) age on the variability of both ACh-vasodilation and MCh-vasodilation.

**Methods:** The endothelium-dependent vasodilation response to simultaneous iontophoretic applications (4 doses of 10 s at 0.1 mA with 2 min of current-free interval) of ACh (11 mM) or MCh (10 mM) was studied on the forearm of 40 healthy subjects (36 males, median 28 yr, range 21–59 yr). The percent change in perfusion (CVCpeak) from baseline and the area under the curve (CVC<sub>AUC</sub>) during iontophoresis were assessed. Inter-site, inter-day and intra-day coefficients of variation (CV) were studied for each drug as well as correlations between drugs and age.

**Results:** A linear relationship was found between ACh- and MCh-CVCpeak ( $r^2=0.75$ ,  $p=0.01$ ) and between ACh- and MCh-CVC<sub>AUC</sub> ( $r^2=0.55$ ,  $p=0.02$ ). MCh inter-site CV for both CVCpeak (12.2%) and CVC<sub>AUC</sub> (13.8%) was significantly lower than ACh inter-site CV for CVCpeak (15.5%) and CVC<sub>AUC</sub> (15.3%), respectively. MCh inter-day CV for CVCpeak (17.2%) and CVC<sub>AUC</sub> (14.6%) was significantly lower than ACh inter-day CV for CVCpeak (19.7%) and ACh CVC<sub>AUC</sub> (21.2%). For ACh and MCh, the CVCpeak and CVC<sub>AUC</sub> were higher at 16:00 pm than at 11:00 am ( $p<0.05$  for all). Finally, both ACh- and MCh-CVCpeak exhibited a logarithmic decrease with age ( $r^2=0.61$ ,  $p<0.01$  and  $r^2=0.58$ ,  $p<0.01$ ).

**Conclusion:** Although both drugs exhibited circadian and age variability, MCh exhibited less inter-site and interday variabilities than did ACh for the evaluation of cutaneous endothelium-dependent vasodilation. These findings should be taken into account in studies of cutaneous vascular function by iontophoresis coupled with laser Doppler flowmetry.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Introduction

Endothelial dysfunction is an early marker of atherosclerosis and is associated with numerous cardiovascular risk factors (Vita and Keaney, 2002). Since it may precede overt clinical manifestations, major research efforts have focused on the early detection of endothelial dysfunction in man. The clinical interest for detection and screening of endothelial dysfunction hinges on the reliability of the diagnostic tests, their prognostic value, their safety and their repeatability (Frick and Weidinger, 2007).

Over the past decade, measurement of changes in blood flow in the skin microcirculation using laser Doppler flowmetry (LDF) coupled with acetylcholine chloride (ACh) iontophoresis (LDF-ACh) has been widely

**Abbreviations:** ACh, acetylcholine chloride; AChE, acetylcholinesterase; CR, coefficient of repeatability (%); CV, coefficient of variation (%); CVC, cutaneous vascular conductance (PU/mm Hg); CVC<sub>AUC</sub>, area under the CVC curve (% baseline); CVC<sub>increase</sub>, maximal change in absolute CVC value (PU/mm Hg); CVCpeak, maximal relative value (% of baseline); LDF, laser Doppler flowmetry; MCh, methacholine chloride; NO, nitric oxide; SKBF, skin blood flow (PU).

\* Corresponding author at: Département Environnements Opérationnels, Institut de recherche biomédicale des armées (IRBA), F-91223 Brétigny sur Orge, France. Fax: +33 169 23 70 02.

E-mail address: [fsauvet@imassa.fr](mailto:fsauvet@imassa.fr) (F. Sauvet).

0026-2862/\$ – see front matter © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.mvr.2011.05.001

Please cite this article as: Sauvet, F., et al., Acetylcholine chloride as a potential source of variability in the study of cutaneous vascular function in man, *Microvasc. Res.* (2011), doi:10.1016/j.mvr.2011.05.001



developed (Andreassen et al., 1998; Cracowski et al., 2006; Debbabi et al., 2009). It is a technically challenging, non-invasive and operator-independent method, for assessing endothelial function in various physiological and pathological states in man (Andreassen et al., 1998; Cracowski et al., 2006; Debbabi et al., 2009). ACh exerts an agonistic effect on the muscarinic receptors of the endothelial cells of the cutaneous vasculature. The ACh-induced vasodilation is mediated by the release of endothelium-derived relaxing factors such as nitric oxide (NO), prostaglandins and possibly endothelium-derived hyperpolarizing factors (Cracowski et al., 2006; Newton et al., 2001). ACh is rapidly hydrolyzed into an inactive form by acetylcholinesterases (AChE) (Shibasaki and Crandall, 2001). One of the problems with the LDF-ACh iontophoresis technique is the variability of the in-vivo responses to the administration of ACh. The delivered dose of ACh transferred through the skin, the number of studied capillaries, the number of endothelial cell receptors, and the hydrolysis by AChE (Shibasaki and Crandall, 2001) are important sources of variability. Another potential source of variability is represented by the chemical properties of ACh and the stability of the ACh solutions utilized for the test (Sletten et al., 2005).

These problems may be partially overcome by using methacholine chloride (MCh) (Bruning et al., 1996; Kimura et al., 2007), a synthetic  $\beta$ -methyl homolog of ACh that acts as a non-selective muscarinic receptor agonist in the nervous system. Because of its resistance to AChE and its duration of action, MCh chloride is a widely used pharmacological agent in provocative tests to analyze non-specific bronchial responsiveness (Hayes et al., 1998). Another advantage of MCh is represented by its higher temporal stability in solution than ACh (Acar et al., 2001; Asmus et al., 2002; Hayes et al., 1998; Pratter et al., 1982; Sletten et al., 2005). Indeed, MCh is relatively stable at ambient temperature ( $>1$  month) and for longer periods ( $>1$  yr) after refrigeration ( $<4$  °C) or freezing ( $<-20$  °C) in various solvents such as isotonic sodium chloride (Pratter et al., 1982), deionized water (Acar et al., 2001) or phosphate buffer (Hayes et al., 1998). At lower concentrations (0.25 mg/ml), MCh solution remains stable for two weeks when stored between 2 and 8 °C (Asmus et al., 2002).

Both ACh and MCh cause concentration dependent vasodilation when administered in-vivo by iontophoresis (Bruning et al., 1996; Newton et al., 2001). While some authors observed no differences in the vascular responses induced by ACh or MCh (Newton et al., 2001), others reported a stronger vasodilatory response to MCh than to ACh (Bruning et al., 1996; Kimura et al., 2007). These differences in the cutaneous vascular responsiveness are related to methodological differences, but also chemical and pharmacological properties such as the employed dose, the chemical instability (Kimura et al., 2007) or resistance to enzymatic inactivation of ACh (Bruning et al., 1996; Kimura et al., 2007; Koppányi et al., 1953).

The vehicle itself used for the iontophoresis can be a potential source of variability. For the ACh iontophoresis, we used deionized water because this vehicle limits the current induced vasodilation when an anodal current is employed (Durand et al., 2002; Khan et al., 2004). Therefore, it is of interest to evaluate de-ionized water as a vehicle with MCh. Another potential source of variability between microvascular measurements is

linked to circadian variation of the vascular reactivity observed in particular using the ACh iontophoresis (Bau et al., 2008; Elherik et al., 2002; Sauvet et al., 2010). However, the effect of the time of the day on MCh-induced vasodilation using LDF coupled with iontophoresis method (LDF-MCh) had never been studied. Moreover a significant relationship between age and vascular reactivity has been described using ACh iontophoresis (Algotsson et al., 1995; Hodges et al., 2010) but never using MCh. However, it seems that age is related to changes in AChE activity level (Srivatsan and Peretz, 1996) that could induce differences in age effect on ACh- and MCh-induced vascular reactivity.

To date, no standardized choice for the cholinergic salt to be employed (ACh or MCh) has been established to study the endothelial function. The aims of this study were (1) to evaluate the association of cutaneous endothelium-mediated vasodilation mediated by MCh and ACh administered by iontophoresis, (2) to determine the inter-site, inter-day and intra-day (i.e. effect of the time of the experiment during the day) measurement variabilities, (3) to assess the effect of age on vascular-reactivity induced by iontophoresis of ACh and MCh. Finally, the effect of the vehicle on ACh vasodilation and MCh vasodilation was studied to ascertain that the iontophoretic protocol does not induce a non specific current-induced vasodilation which could be a potential confounding factor of vasodilation.

## Materials and methods

### Subjects

Forty healthy subjects (36 men, 4 women) were included in the study after giving their written informed consent. The protocol was approved by the Institutional Paris-Cochin ethics committee (N°ID RCB: 2008-A00170-55). Their biometric characteristics are summarized in Table 1.

All subjects underwent a detailed medical history and examination. Exclusion criteria were: history of cardiovascular or cutaneous disease, acute infectious disease, shift-workers, smokers, daily consumption of alcoholic beverages and those consuming more than 400 mg of caffeine per day, subjects with body mass index (BMI) over 30 kg/m<sup>2</sup> and those taking medication.

### Cardiovascular measurements

All measurements were performed supine at rest in a temperature-controlled room ( $24 \pm 1$  °C) after a 10 min stabilization period. Vascular reactivity was determined from skin blood flow (SkBF) monitored by two laser-Doppler flowmetry probes (481-1, Perimed AB) connected to a laser-Doppler unit (PF5000, Perimed AB, Stockholm, Sweden). The probes were installed on the ventral aspect of the non-dominant forearm (Tesselaar and Sjöberg, 2011). The laser-Doppler probes were coupled to an iontophoretic annular electrode with an embedded sponge (1.2 cm<sup>2</sup>) filled with the drugs and attached to the skin, 5 cm apart, with an adhesive patch. Before the experiment, the sponge of each probe was wetted blindly with 0.2 ml of a freshly prepared 1% (11 mM)

**Table 1**  
Biometrical characteristics, blood pressure and skin temperature.

	Protocol 1		Protocols 2 and 4		Protocol 3	
	Mean $\pm$ SE	Range	Mean $\pm$ SE	Range	Mean $\pm$ SE	Range
Age, yr	29.1 $\pm$ 2.4	[22–51]	30.0 $\pm$ 2.0	[22–51]	29.46 $\pm$ 2.5	[21–59]
Height, m	1.77 $\pm$ 0.05	[1.67–1.84]	1.76 $\pm$ 0.07	[1.67–1.84]	1.75 $\pm$ 0.6	[1.61–1.88]
Weight, kg	74.2 $\pm$ 2.9	[55.1–82.4]	76.1 $\pm$ 2.2	[55.0–82.0]	70.9 $\pm$ 2.0	[62.0–91.6]
BMI, kg/m <sup>2</sup>	24.2 $\pm$ 0.6	[19.7–26.1]	22.9 $\pm$ 0.9	[19.7–26.1]	23.4 $\pm$ 0.3	[20.3–28.4]
SBP, mm Hg	124.9 $\pm$ 3.1	[108–144]	132.4 $\pm$ 4.3	[110–141]	126.8 $\pm$ 2.7	[110–148]
MBP, mm Hg	90.4 $\pm$ 3.5	[74–100]	93.5 $\pm$ 2.4	[82–93]	89.0 $\pm$ 3.1	[85–99]
DBP, mm Hg	73.2 $\pm$ 2.9	[57–85]	79.0 $\pm$ 2.1	[63–79]	66.8 $\pm$ 2.5	[73–85]
Tsk, °C	33.6 $\pm$ 0.4	[32.7–34.9]	33.3 $\pm$ 0.3	[32.3–34.9]	33.1 $\pm$ 0.4	[32.5–36.1]

Protocol 1, n = 8, Protocols 2, 3 and 4, n = 16. BMI: Body Mass Index, SBP: systolic blood pressure, MBP: mean blood pressure, DBP: diastolic blood pressure, Tsk: skin temperature.



acetylcholine chloride solution (acetylcholine chloride, Sigma-Aldrich Corporation, L'Isle d'Abeau, France) or a 1% (10 mM) methacholine chloride solution (TCI Europe, Zwijndrecht, Belgium) or a 2% (67 mM) solution of sodium nitroprusside (SNP, Nitrate, Serb Laboratoires, Villiers de l'Isle-Adam, France). Each iontophoretic probe and its Ag–AgCl reference electrodes (PF 384, Perimed AB) were connected to a closed current intensity-regulated generator (Perilont 382, Perimed AB). The ACh or MCh was delivered at the anodal electrode while SNP was delivered at the cathodal electrode. For all drugs, the vehicle was de-ionized water (pH = 6.5).

After a five-minute baseline period, the drugs were simultaneously administered by four successive periods of 10 s iontophoretic currents of 0.1 mA (I1, I2, I3, and I4) with a two minute interval between each current administration. Using this validated iontophoretic procedure, there is no blood flow return to baseline between sequential current applications (Debbabi et al., 2009). For each probe, the electrical charge density was 2.5 mC/cm<sup>2</sup> and the total electrical dose administered was 4 mC. This protocol was designed to avoid non-specific hyperemic effects resulting from the stimulation by a galvanic current (Cracowski et al., 2006; Ferrell et al., 2002; Tartas et al., 2005b). Surface temperature (Tsk) at the recording sites was monitored by thermocouples attached to the skin, 3 cm away from the probes. Experiments were performed at stable skin temperatures ranging from 33 °C to 34 °C (Cracowski et al., 2006).

During the experiment, arterial blood pressure was continuously recorded from the left 3rd finger using a digital servo-photoplethysmograph (Portapres, Finapres Medical Systems, Amsterdam, The Netherlands). The brachial systolic and diastolic blood pressures were also measured using a standard sphygmomanometer before each test.

#### Protocols

The experiment was divided into four different protocols. For each protocol, we used a previously published procedure (Debbabi et al., 2009). In this procedure, electrical stimulation was set at 0.10 mA and consisted in four consecutive 10-second applications.

#### Protocol 1 – Assessment of the anodal- and cathodal-current induced vasodilation

The potential effect of anodal- and cathodal-current stimulations on the skin vasculature was studied in a subgroup of 8 subjects at 11:00 am with 4 successive periods of iontophoresis (0.1 mA) of the vehicle (deionized water) alone with a two minute interval between each current administration.

#### Protocol 2 – Comparison between ACh- and MCh-induced vasodilation

The vascular response to ACh and MCh was recorded in a group of 16 other subjects at 11:00 am. The sites of ACh and MCh iontophoresis were assigned randomly on the non-dominant forearm.

#### Protocol 3 – Assessment of the inter-site and inter-day variabilities

The inter-site variability was assessed in another subgroup of 16 subjects, via two probes attached to the same non-dominant forearm and filled with ACh, MCh or SNP. Inter-day variability tests were performed at 11:00 on two separate days (median: 5 days, range: 3–12 days).

#### Protocol 4 – Intra-day variability (effect of the time of the day)

Measurements of the vascular response were assessed in 16 subjects, on the non-dominant forearm. It was the same group as in protocol 3. Subjects received either ACh and SNP or MCh and SNP on two separate days (median: 8 days, range: 1–21 days) at two different times of the day (11:00 am or 16:00 pm).

#### Data collection and analysis

The LDF signals were digitized and recorded by an analog-to-digital converter (MP150, Biopac Systems Inc., Goleta, CA, USA) at a sampling frequency of 1000 Hz for offline analysis. Data collection began with a 5 min baseline rest period before the onset of iontophoresis and was recorded continuously for 15 min.

The SkBF signal (expressed in arbitrary perfusion units – PU) from each laser-Doppler probe was averaged every 10 s to reduce instantaneous variability from vasomotion. To take the concomitant changes in the systemic arterial blood pressure into account, the cutaneous vascular conductance (CVC expressed in PU/mm Hg) was calculated as the ratio of SkBF to the mean blood pressure (MBP). For all microvascular measurements, baseline CVC was defined as the average of conductance over the 2 min rest period prior to the first iontophoresis dose (I1). Vasodilatation responses were evaluated in percent of baseline CVC (Cracowski et al., 2006). The CVCpeak was defined as the 10 s averaged maximal CVC recorded after each iontophoretic dose divided by the baseline CVC. The CVCpeak was expressed in percent. As four current applications (from I1 to I4) were performed, 4 CVCpeak were obtained and called CVCpeakI1, CVCpeakI2, CVCpeakI3 and CVCpeakI4. The CVC<sub>increase</sub> (PU/mm Hg) was also calculated as the difference between the maximal absolute CVC value and the absolute basal CVC value. Finally, the CVC<sub>AUC</sub> (%·s·10<sup>3</sup>) was determined from the area under the curve ranging from the first stimulation to the end of the 5 min period after the last current stimulation (i.e. I4).

#### Statistical analysis

All data are presented as means ± standard error of the mean (SE). All statistical analyses were performed with Statistica (StatSoft Inc, Maison alfort, France). Statistical significance was taken as p < 0.05.

#### Statistical analysis for protocol 1

The effect of the vehicle with an anodal current or cathodal current on the CVC was determined using a non-parametric two-way Friedman test followed by pairwise comparisons between CVCpeak and baseline.

#### Statistical analysis for protocol 2

The vascular response was determined by repeated analyses of variance (ANOVA) with 1 or 2 factors ('drug' or 'drug' + 'iontophoresis stimulation'). The strength of the correlation between ACh and MCh was determined by the correlation coefficient and regression analysis after the equality of variance was tested between the groups. The slope of the relationship between ACh and MCh as well as the intercept were compared to the reference equation ( $y = x$ ) using ANCOVA analysis. A log<sub>10</sub>-transform was performed when needed. A Bland–Altman plot was employed to assess repeatability between the ACh and MCh tests. The limit of agreement (LOA) was calculated as the mean of the differences ± 1.96 SD of differences (Bland and Altman, 1986).

#### Statistical analysis for protocol 3

The inter-site and inter-day variabilities between measurements were determined by the coefficient of variation (CV) expressed as the standard deviation (SD) of the differences between pairs of measurements obtained during different measurements divided by the average of the mean of each pair of readings. A CV < 35% was deemed acceptable (Harris et al., 2007; Roustit et al., 2010). CV values were compared using ANOVA analysis. The coefficient of repeatability (CR) was calculated as 2 × SD (Bland and Altman, 1986). The repeatability was considered good if 95% of the differences between the two measurements were less than 1.96 standard deviations of the differences (Bland and Altman, 1986).



#### Statistical analysis for protocol 4

The vascular response was determined by ANOVA with two factors: time of day and one repeated (iontophoresis) followed by a pairwise multiple comparison procedures (Tukey's test). A prior Levene's test was used to test variance equality between the groups and a log10 transformation was performed to equalize the variance when needed.

A multiple regression analysis was performed on the pooled value of all iontophoretic tests to determine the influence of age on the vascular reactivity measurements. Comparisons between the slopes and the intercepts of the relationships between ACh and MCh with age were assessed using ANCOVA analysis.

## Results

### Protocol 1

Basal CVC was not significantly different between the anodal and cathodal probes. After the fourth iontophoretic stimulation, no significant change in the CVC at the anodal electrode ( $0.07 \pm 0.01$  vs  $0.10 \pm 0.02$  PU/mm Hg respectively,  $p = \text{non significant}$ ) was observed as compared to baseline CVC at the anode, whereas CVC after the fourth stimulation at the cathode was significantly increased as compared to the baseline CVC at the cathode ( $0.59 \pm 0.15$  vs  $0.06 \pm 0.01$  PU/mm Hg respectively,  $p < 0.05$ ).

### Protocol 2

We observed no significant drug effect but a significant 'stimulation' effect ( $F_{3,45} = 68.9$ ,  $p < 0.001$ ) and a significant interaction ( $F_{3,42} = 68.9$ ,  $p < 0.001$ ). The post hoc analysis showed that after ACh iontophoresis, CVC significantly increased (Figs. 1 and 2) compared to baseline CVC from I1 to I4 ( $p < 0.001$ , I1 vs. baseline:  $p = 0.04$ ; I2 vs. baseline CVC:  $p = 0.02$ , I3 or I4 vs. baseline:  $p < 0.02$ ), whereas after MCh iontophoresis, CVC values only differed significantly from baseline CVC values after I2 (I2 vs. baseline:  $p = 0.03$ , I3 and I4 vs. baseline  $p = 0.01$ ). Moreover, we observed significant differences between ACh- and MCh-CVCpeak after I1 ( $p < 0.05$ ) but no significant differences were noted between the ACh- and MCh-CVCpeak after I2, I3 or I4. Vascular reactivity

parameters observed after ACh and MCh iontophoresis were correlated for baseline CVC ( $p < 0.02$ ), baseline flux ( $p < 0.02$ ), CVCpeak (after I3 and I4,  $p = 0.01$ ) and CVC<sub>AUC</sub> ( $p < 0.02$ ). Moreover, we observed a significant difference between slope of the relationship with the reference equation ( $x = y$ ) ( $F_{1,15} = 9.1$ ,  $p < 0.01$ ) but no difference between the intercepts.

The Bland-Altman analysis (Fig. 3) shows the repeatability between ACh-CVCpeak and MCh-CVCpeak (assessed after I4). The mean differences between values were  $-83.5 \pm 35.1$  and the limits of agreement (LOA) ranged from 363.9% to 197.0%. Only one value was out of LOA so that 93.9% of the 16 differences were included in LOA.

### Protocol 3 (Table 2)

In the present study, the best inter-site and inter-day CV were observed for MCh-CVCpeak after I4 (12.2% and 17.7%, respectively) and MCh-CVC<sub>AUC</sub> (13.8% and 14.6%, respectively). Inter-site and inter-day CV below 35% were observed for ACh-CVCpeak after I3 and I4 (I3: 14.4% and 19.7%; I4: 15.5% and 18.6% respectively) and ACh-CVC<sub>AUC</sub> (15.3% and 21.2%). ACh and MCh between-site CV were slightly smaller than the day-to-day ones. As recommended by the British Standards Institution, the inter-site and inter-day repeatabilities were classified as good for AUC (ACh and MCh) and for CVCpeak observed after the I3 and I4 for ACh and only after I4 for MCh. After I4, inter-site and inter-day CV of MCh-CVCpeak were significantly lower ( $p < 0.05$ ) than CV of ACh-CVCpeak observed after I3 or I4.

### Protocol 4

After ACh iontophoresis (Fig. 4), we observed a significant increase in CVCpeak (after I3 and I4) and CVC<sub>AUC</sub> at 16:00 pm compared to 11:00 am ( $F_{1,15} = 4.5$ ,  $p = 0.04$ ;  $F_{1,15} = 12.5$ ,  $p = 0.003$ ,  $F_{1,15} = 12.3$ ,  $p = 0.004$ , respectively). After MCh iontophoresis, CVCpeak (after I3 and I4) and CVC<sub>AUC</sub> values were significantly higher at 16:00 pm compared to 11:00 am ( $F_{1,15} = 6.6$ ,  $p = 0.02$ ;  $F_{1,15} = 12.5$ ,  $p = 0.003$ ;  $F_{1,15} = 12.5$ ,  $p = 0.003$ , respectively). After SNP iontophoresis, we did not observe any difference between the values observed at 11:00 and 16:00. No changes were observed for Tsk, basal flux and blood pressure parameters between the two times of day.

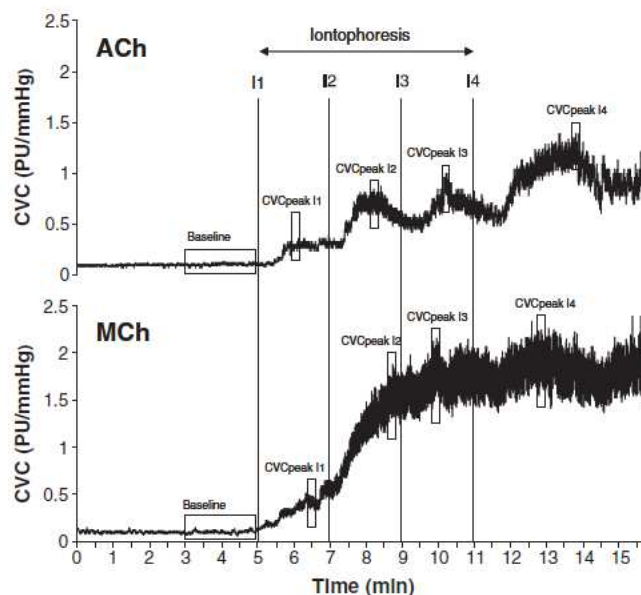
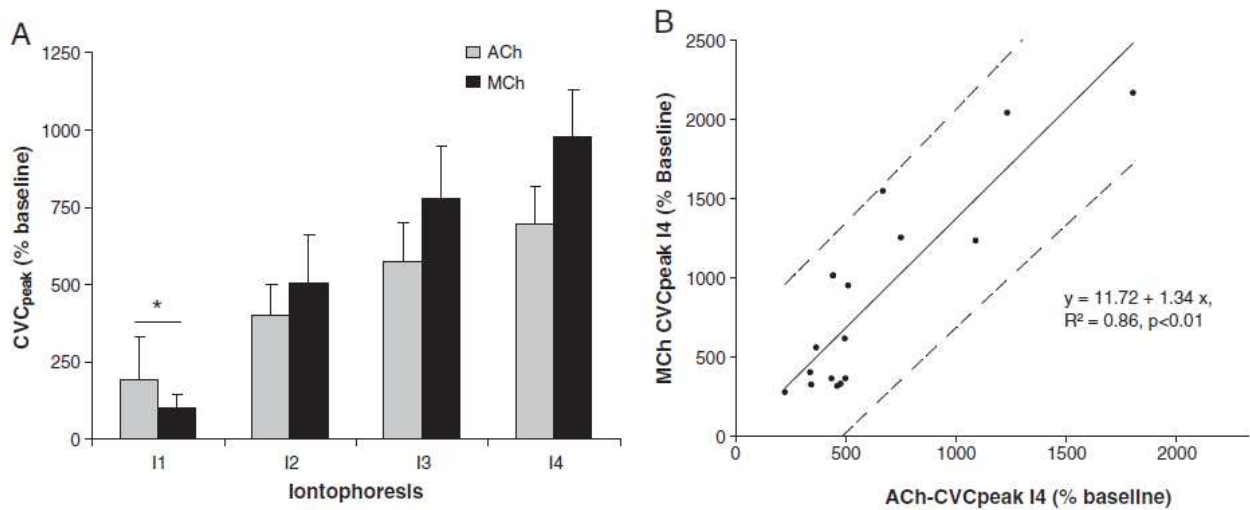


Fig. 1. Example Acetylcholine (ACh)- and Metacholine (MCh)-induced changes on the cutaneous vascular conductance (CVC). ACh and MCh were delivered in 4 (I1, I2, I3, I4) 10 s current periods (0.1 mA, 0.1 mC/min) with an interstimulation interval of 120 s. Baseline CVC was calculated as the average CVC observed during the 120 s before I1. CVCpeak (I1 to I4) are the maximal values observed within 10 s following each iontophoretic doses of current.





**Fig. 2.** Comparison of the effects of Acetylcholine (ACh) and Metacholine (MCh) on the cutaneous vascular conductance (CVC). A. ACh and MCh were delivered in 4 (I1, I2, I3, I4) 10 s current periods (0.1 mA, 0.1 mC/min) with an interstimulation interval of 120 s. CVC<sub>peak</sub>, expressed as % of baseline CVC, is the maximal value observed within 10 s following each iontophoretic doses of current. Baseline CVC was calculated as the average CVC observed during the 120 s before I1. Values are mean  $\pm$  SE. \*Significant differences between ACh- and MCh-CVC<sub>peak</sub>,  $p < 0.05$ . B. Correlation between ACh-CVC<sub>peak</sub> and MCh-CVC<sub>peak</sub> values (i.e. maximal value of CVC observed after I4, express as % of baseline CVC).

#### Relationships between age and vascular reactivity parameters

There was a significant relationship between age and ACh-CVC<sub>peak</sub> at I4 ( $R^2 = 0.57$ ,  $p < 0.01$ ), ACh-CVC<sub>AUC</sub> ( $R^2 = 0.46$ ,  $p < 0.01$ ), MCh-CVC<sub>peak</sub> at I4 ( $R^2 = 0.49$ ,  $p = 0.03$ ) and MCh-CVC<sub>AUC</sub> ( $R^2 = 0.44$ ,  $p = 0.04$ ). The best fit regression model (Fig. 5) between CVC<sub>peak</sub> at I4 and age was logarithmic (ACh-CVC<sub>peak</sub> =  $-1382.9 \ln(\text{age}) + 5486.8$ ,  $R^2 = 0.61$ ,  $p < 0.01$ ; MCh-CVC<sub>peak</sub> =  $-991.37 \ln(\text{age}) + 4098.2$ ,  $R^2 = 0.51$ ,  $p < 0.01$ ). We observed no significant differences between the slopes and the intercepts of the MCh- and ACh relationships with age equations. No significant correlation was observed between age and SNP-CVC<sub>increase</sub> or SNP-CVC<sub>AUC</sub>.

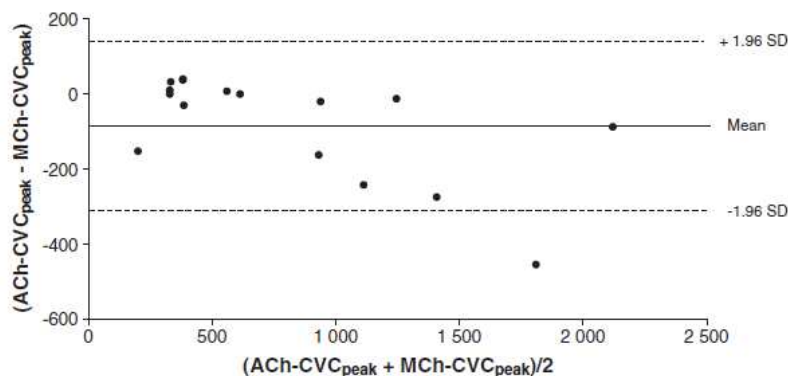
#### Discussion

Our results show a close linear relationship between ACh- and MCh-induced cutaneous vasodilation using LDF coupled with iontophoresis. Although both ACh- and MCh-induced vasodilations were significantly modified by age and the time of the day, MCh induces less inter-site and inter-day variabilities than ACh in our experimental conditions. Further, these vasodilations were independent from the vehicle. These results suggest that it is better to use MCh instead of ACh to assess the endothelial function using LDF and iontophoresis.

The study of peripheral endothelial function is increasingly recognized as a non-invasive surrogate marker for the study of vascular function that carries important prognostic information for cardiovascular risk (Jadhav et al., 2007; Khan et al., 2008). The major advantage of LDF coupled to ACh or MCh iontophoresis is represented by its operator-independent sensitivity in detecting and quantifying relative changes in skin blood flow in response to vasoactive drugs (Cracowski et al., 2006). Therefore, any factor that helps to reduce the variability of the measurements should increase the usefulness of this technique for clinical tests or research.

#### Comparisons between ACh and MCh induced vasodilations

Our data showed that the maximal vascular responses to ACh and MCh were not statistically different and that the cumulated concentrations of exogenous ACh and MCh resulted in a stepwise increase in CVC. However, we did observe some differences between the ACh and MCh vascular effects. With ACh, the increase in CVC started after the 1st dose of current, whereas it started at the 2nd dose of current with MCh. Moreover, the slope of the MCh–ACh relationship is higher than 1, indicating a different dose (current charge)–effect between MCh- and ACh-induced vasodilation. These differences may stem from differences in bioavailability of ACh and MCh. Indeed, at moderate



**Fig. 3.** Repeatability between ACh-CVC<sub>peak</sub> and MCh-CVC<sub>peak</sub> (Bland–Altman plots). Closed lines represent the mean of the differences between ACh-CVC<sub>peak</sub> and MCh-CVC<sub>peak</sub> ( $-83.5 \pm 35.1\%$ ), whereas dotted lines represent the limit of agreement (mean  $\pm$  1.96 SD of differences).



**Table 2**  
Variability and repeatability of cutaneous vascular response to iontophoresis of ACh, MCh and SNP.

	ACh		MCh		SNP	
	Inter-site variability CV (CR)	Inter-day variability CV (CR)	Inter-site variability CV (CR)	Inter-day variability CV (CR)	Inter-site variability CV (CR)	Inter-day variability CV (CR)
Baseline flux, PU	16.6 (5.4) <sup>a</sup>	57.2 (8.9)	15.5 (3.1) <sup>a</sup>	38.0 (15.3)	19.4 (9.1) <sup>a</sup>	39.3 (4.4)
Baseline CVC, PU/mm Hg	13.5 (0.14) <sup>a</sup>	57.2 (0.15)	10.5 (0.12) <sup>a</sup>	38.0 (1.15)	10.3 (1.8) <sup>a</sup>	37.8 (1.2)
CVCpeak1, % basal CVC	32.1 (289.1)	65.6 (312.1)	11.8 (189.5) <sup>a</sup>	41.4 (285.3)	5.1 (152.5) <sup>a</sup>	27.6 (513.1)
CVCpeak2, % basal CVC	36.6 (343.1)	31.9 (334.6)	36.8 (300.2)	39.4 (241.6)	50.5 (553.2)	41.8 (412.2)
CVCpeak3, % basal CVC	14.4 (217.2) <sup>a</sup>	19.7 (189.6) <sup>a</sup>	24.8 (224.7)	28.9 (143.9)	22.2 (488.2)	27.5 (495.2)
CVCpeak4, % basal CVC	15.5 (156.5) <sup>a</sup>	18.6 (165.2) <sup>a</sup>	12.2 <sup>b</sup> (212.5) <sup>a</sup>	17.2 <sup>b</sup> (132.14) <sup>a</sup>	23.1 (552.2)	24.7 (508.2)
CVC <sub>increase</sub> , PU/mm Hg	28.2 (1.4)	50.9 (1.6)	35.4 (1.6)	47.4 (1.7)	23.1 (0.5)	60.6 (0.6)
AUC, %s.10 <sup>3</sup>	15.3 (3.1) <sup>a</sup>	21.2 (2.9) <sup>a</sup>	13.8 (1.3) <sup>a</sup>	14.6 (3.3) <sup>a</sup>	19.2 (2.9) <sup>a</sup>	35.2 (3.2)

Acetylcholine (ACh), Methacholine (MCh), and Sodium Nitroprusside (SNP) were delivered in four (I1, I2, I3, I4) 10 s iontophoresis dose of current period (0.1 mA with an interstimulation interval of 120 s). Baseline flux and cutaneous vascular conductance (CVC) were calculated as the average flux and CVC observed during the 120 s before I1. Vascular reactivity parameters are CVCpeak and CVC<sub>increase</sub>, and area under the curve (CVC<sub>AUC</sub>). CVCpeak is the relative maximal value observed within 10 s CVC following each dose of current. CVC<sub>increase</sub> is the difference between maximal CVC value and basal CVC. CVC<sub>AUC</sub> was computed by integrating the curve from I1 to the end of the recovery period (5 min after I4). CV is the coefficient of variation, expressed as %, CR is the coefficient or repeatability (2×SD of differences between pairs of measurements).

<sup>a</sup> Good repeatability (95% of the differences between values <1.96 standard deviations of the differences).

<sup>b</sup> Significant differences between ACh and MCh coefficients of variation p<0.05.

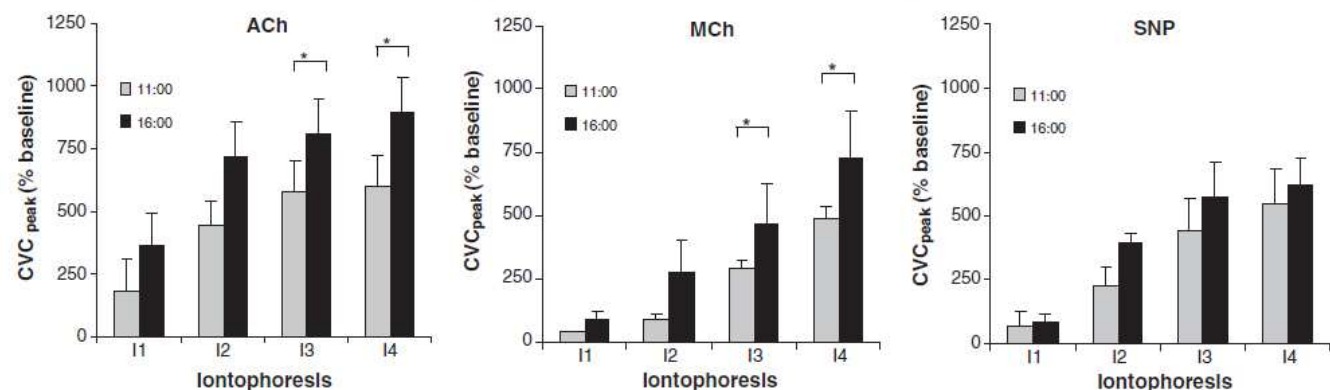
doses (i.e. 1000 ng/kg/min using subcutaneous microdialysis) other authors observed that the increase in CVC induced by MCh was significantly greater than that observed with the same dose of ACh (Bruning et al., 1996). These different responses can probably be accounted for by the metabolic instability of ACh in response to endogenous cholinesterases (Bruning et al., 1996; Duff et al., 1953). Since ACh is less resistant than MCh to hydrolysis by acetylcholinesterases, the time-course of the hydrolysis would seem to be an important factor (Foster, 1971; Koppányi et al., 1953; Newton et al., 2001). Therefore, differences in the response to ACh and MCh could result from an abnormal activity of AChE (Shibasaki and Crandall, 2001) as described for example in chronic fatigue syndrome or illness following exposure to organophosphates (Khan et al., 2004). To overcome such potential limitations, MCh has been proposed as a replacement for ACh in the evaluation of the endothelium-dependent cutaneous vasodilator responses (Chowienzyk et al., 1993; Kimura et al., 2007).

#### Repeatability of the measurements

Several methodological questions remain about the variability and repeatability of measurements with laser-Doppler flowmetry coupled with iontophoresis of ACh. Comparisons between previous studies (Henricson et al., 2007; Morris and Shore, 1996; Roustit et al., 2010) are difficult due to differences in studied populations and methodological conditions such as concentration and type of drugs, the

strength of the iontophoretic doses of current, the number of current application, and the expression of the vasomotor responses (i.e. flow or conductance) to the iontophoretized substances. In common with other published studies, our results were mostly dependent on the expression of the data expressed in relative or absolute variation in blood flow or CVC (Henricson et al., 2007; Morris and Shore, 1996). As reported by others (Morris and Shore, 1996; Roustit et al., 2010), at best, the inter-day coefficient of variation (CV) observed in this study ranged from 15% to 23%. This high variability is also partially explained by the higher coefficient of variability observed with the laser-Doppler fiber optic probes compared to the laser-Doppler imaging techniques (Jadhav et al., 2007).

Nevertheless, in spite of a good repeatability between ACh- and MCh-CVCpeak, a new finding of our study was lower intersite and interday variabilities of CVC with MCh than with ACh. Indeed, the variability of the vascular response decreased after the 3rd dose of current for ACh and after the 4th dose for MCh. Therefore, the number of stimulations seems to play a significant role in the variability of the measurements. Indeed after several doses of current applications, the relative ACh-induced increase in CVC appeared to have the poorest repeatability (i.e. >20%) (Brocx and Drummond, 2009; Henricson et al., 2007). However, other authors observed that after three identical iontophoretic doses of current, the ACh-related increase in CVC was the most reproducible variable of those studied (Al-Tahami et al., 2010; Andersson et al., 2003; Henricson et al., 2007). Jadhav et al. (2007) showed that fractioning the iontophoretic application in multiple small



**Fig. 4.** Effect of Acetylcholine (ACh), Methacholine (MCh), and Sodium Nitroprusside (SNP) on cutaneous vascular conductance (CVC). ACh, MCh and SNP were delivered in 4 (I1, I2, I3, I4) 10 s iontophoretic doses of current (0.1 mA, interstimulation interval 120 s.). CVCpeak, expressed as % of baseline CVC, is the maximal value observed within 10 s CVC following each iontophoretic dose of current. Baseline CVC was calculated as the average CVC observed during the 120 s before I1. Values are presented as mean ± SE. \*Difference vs. 11:00 p<0.05.



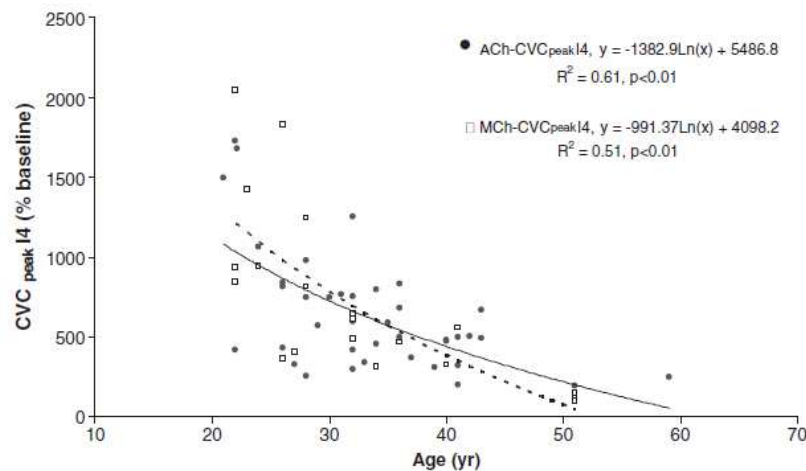


Fig. 5. Effect of age on ACh-CVCpeak and MCh-CVCpeak. Closed symbols are ACh-CVCpeak and open symbols are MCh-CVCpeak, expressed as % of baseline CVC. There is a logarithmic decline in both ACh-CVCpeak (dashed line) and MCh-CVCpeak (dotted line) values with increasing age.

doses improves the repeatability (Jadhav et al., 2007). It has been demonstrated that the CVC changes induced by at least three doses of current with ACh are well-correlated with the post-occlusive hyperemic brachial-artery flow mediation, the gold standard for the measurement of endothelial function (Debbabi et al., 2009). Therefore, the use of four low intensity (0.1 mA) iontophoretic doses of current using MCh solution should help reduce variability of the endothelial dependent vascular responses.

#### Effect of the time of the day

In addition to the other factors of variability, we observed a significant effect of the time of the experiment with both ACh and MCh. To date, there is no clear recommendation about the schedule of the experiment that could be a source of within-day variability. Indeed, studies have shown that the time of the day has a significant influence on endothelial-dependent vascular dilatation (Elherik et al., 2002; Sauvet et al., 2010) with an attenuation in the morning compared to the afternoon suggesting a circadian variation (Elherik et al., 2002; Sauvet et al., 2010). This variation is linked to the circadian variation of many secreted endothelial-derived factors (Elherik et al., 2002) that are suspected to induce, in part, an attenuation of vascular reactivity in the morning. As in a previous study (Sauvet et al., 2010), we did not observe any significant effect of time of the day on the SNP-induced response contrary to Elherik et al. (2002) who observed a circadian variation.

Nevertheless, because of this time dependency, a standardization of the time schedule of the evaluation of the vascular reactivity would be desirable to reduce inter-subject variability and produce comparable results. This methodological recommendation is pertinent for both clinical and research measurements. However, further studies are needed to determine the best schedule leading to the lower variability with the highest repeatability.

#### Influence of age

Another important source of variability is represented by age. We observed here that the vascular responses (i.e. CVCpeak) to both drugs were strongly and negatively correlated with age with a curvilinear best-fit. Relationships between age and ACh have been reported (Hodges et al., 2010; Pierzga et al., 2003), but to our knowledge, the link between age and MCh has not been published. The reason for this decrease is probably multifactorial including a reduction in microvascular density (Pierzga et al., 2003), an increase in vascular resistance

(Briones et al., 2007) and a decrease in NO availability (Garry et al., 2007). Furthermore, despite a probable age-dependent decline in cholinesterase activity (Srivatsan and Peretz, 1996) we observed a similar ACh and MCh relationship with age. Indeed, the relationship between age and endothelial-independent vasodilation is a matter of debate. As observed in our study, some studies showed no significant effect of age on the SNP blood flow response (Rossi et al., 2002; Tao et al., 2004), whereas Andersson et al. (2003) found a decrease in both vascular reactivity to SNP and ACh in their older subjects ( $23 \pm 2$  yr vs.  $74 \pm 2$  yr).

#### Effect of the vehicle

In this study, we previously controlled that the iontophoretic protocol using deionized water as a vehicle did not induced non-specific vasodilation resulting from the current-induced vasodilation that interferes with the microvascular response to iontophoresis drug delivery (Cracowski et al., 2006; Ferrell et al., 2002; Tartas et al., 2005b). Tartas et al. (2005a) observed a persistent increase of CVC, although induced by higher anodal currents (i.e. 6 mC) than in the present study (4 mC in the present study). Their results suggested that the early anodal current-induced vasodilation was mainly dependent on COX-1-induced prostaglandin synthesis (Tartas et al., 2005a). In order to limit this unwanted effect and to assess the true endothelial reactivity to ACh or MCh, repeated iontophoresis with low anodal doses of current should be preferred (Tartas et al., 2005a). Our results also showed that a vasodilatory effect is induced by the cathodal current despite the low dose of current delivered (Tartas et al., 2005b) but not by the anodal current delivered as the same way. Therefore, the anodal current and the vehicle participate neither with ACh iontophoresis nor with MCh iontophoresis using this sequential protocol.

#### Study limitation

A major limitation of our study was the lack of a dose-response relationship in the cutaneous response to ACh and MCh. The dose-response relationship, commonly used in pharmacological in-vitro studies, remains a gold standard for study of the affinity and efficacy of drugs (Tesselaar and Sjöberg, 2011). Some authors have considered the iontophoretic application of drugs using consecutive increased current levels as being analogous to a dose-response study allowing the assessment of the actions of drugs in terms of slope parameters and in effective dose 50% (ED50) instead of the maximal value



(Tesselaar and Sjoberg, 2011). However, fitting the vascular response using this method is not truly based on the pharmacological process underlying the response to the drug (Tesselaar and Sjoberg, 2011). Moreover, this method needs the use of cumulative doses of current leading to higher current intensities (up to 12 mC) (Tesselaar and Sjoberg, 2011) that would in turn increase the current-induced vasodilation. Some authors have also suggested that microdialysis coupled with laser Doppler is better to study the microvascular function than the iontophoresis coupled with laser Doppler. However, this technique is expensive and requires the introduction into the skin of a guide needle and is therefore an "invasive" technique (Cracowski et al., 2006), which cannot be used to study large population, in whom the assessment of the endothelial function is of interest.

## Conclusion

Our data show that MCh exhibits less inter-site and inter-day variabilities than ACh for the evaluation of cutaneous vascular reactivity using the iontophoresis coupled with LDF. Among the multifactorial sources of variability of the small vessel reactivity evaluated by laser-Doppler flowmetry coupled with iontophoresis, the ACh solution represents probably a significant part. In several countries, there is an increasing request from health-regulatory and safety administrations to use pharmaceutically approved forms of ACh solution. In this respect, MCh solutions prepared by pharmaceutical companies would better comply with this policy than ACh obtained from chemical companies. Further works are needed to improve standardization and production of reference values for the laser technique. Finally, the time of the day and age are important confounding factors that should be considered for the clinical and research use of this technique.

## Acknowledgments

We thank the staff from the Institut de Recherche Biomédicale des Armées and Angers University Hospital for their technical and logistic contributions to this work. This work was supported by the French Délégation Générale pour l'Armement (Contracts N° 08co704 and 10co703).

## References

- Acar, V., et al., 2001. Stability of stored methacholine solutions: study of hydrolysis kinetic by IP-LC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25, 861–869.
- Al-Tahami, B.A., et al., 2010. Reproducibility of laser Doppler fluximetry and the process of iontophoresis in assessing microvascular endothelial function using low current strength. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 32, 181–185.
- Algotsson, A., et al., 1995. Influence of age and gender on skin vessel reactivity to endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilators tested with iontophoresis and a laser Doppler perfusion imager. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 50, M121–M127.
- Andersson, S.E., et al., 2003. Cutaneous vascular reactivity is reduced in aging and in heart failure: association with inflammation. *Clin. Sci. (Lond.)* 105, 699–707.
- Andreassen, A.K., et al., 1998. Endothelium-dependent vasodilation of the skin microcirculation in heart transplant recipients. *Clin. Transplant.* 12, 324–332.
- Asmus, M.J., et al., 2002. Stability of frozen methacholine solutions in unit-dose syringes for bronchoprovocation. *Chest* 121, 1634–1637.
- Bau, P.F., et al., 2008. Diurnal variation of vascular diameter and reactivity in healthy young men. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 41, 500–503.
- Bland, J.M., Altman, D.J., 1986. Regression analysis. *Lancet* 1, 908–909.
- Briones, A.M., et al., 2007. Mechanisms underlying hypertrophic remodeling and increased stiffness of mesenteric resistance arteries from aged rats. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 62, 696–706.
- Brocx, K.A., Drummond, P.D., 2009. Reproducibility of cutaneous microvascular function assessment using laser Doppler flowmetry and acetylcholine iontophoresis. *Skin Pharmacol. Physiol.* 22, 313–321.
- Bruning, T.A., et al., 1996. Comparison of cholinergic vasodilator responses to acetylcholine and methacholine in the human forearm. *Blood Press.* 5, 333–341.
- Chowienzyk, P.J., et al., 1993. Differential inhibition by NG-monomethyl-L-arginine of vasodilator effects of acetylcholine and methacholine in human forearm vasculature. *Br. J. Pharmacol.* 110, 736–738.
- Cracowski, J.L., et al., 2006. Methodological issues in the assessment of skin microvascular endothelial function in humans. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 503–508.
- Debbabi, H., et al., 2009. Noninvasive assessment of endothelial function in the skin microcirculation. *Am. J. Hypertens.* 23, 541–546.
- Duff, F., et al., 1953. A quantitative study of the response to acetylcholine and histamine of the blood vessels of the human hand and forearm. *J. Physiol.* 120, 160–170.
- Durand, S., et al., 2002. Oral single high-dose aspirin results in a long-lived inhibition of anodal current-induced vasodilatation. *Br. J. Pharmacol.* 137, 384–390.
- Elherik, K., et al., 2002. Circadian variation in vascular tone and endothelial cell function in normal males. *Clin. Sci. (Lond.)* 102, 547–552.
- Ferrell, W.R., et al., 2002. Elimination of electrically induced iontophoretic artefacts: implications for non-invasive assessment of peripheral microvascular function. *J. Vasc. Res.* 39, 447–455.
- Foster, K.G., 1971. Factors affecting the quantitative response of human eccrine sweat glands to intradermal injections of acetylcholine and methacholine. *J. Physiol.* 213, 277–290.
- Frick, M., Weidinger, F., 2007. Endothelial function: a surrogate endpoint in cardiovascular studies? *Curr. Pharm. Des.* 13, 1741–1750.
- Garry, A., et al., 2007. Altered acetylcholine, bradykinin and cutaneous pressure-induced vasodilation in mice lacking the TREK1 potassium channel: the endothelial link. *EMBO Rep.* 8, 354–359.
- Harris, R.A., et al., 2007. Reproducibility of the flow-mediated dilation response to acute exercise in overweight men. *Ultrasound Med. Biol.* 33, 1579–1585.
- Hayes, R.D., et al., 1998. Stability of methacholine chloride solutions under different storage conditions over a 9 month period. *Eur. Respir. J.* 11, 946–948.
- Henninson, J., et al., 2007. Assessment of microvascular function by study of the dose-response effects of iontophoretically applied drugs (acetylcholine and sodium nitroprusside)—methods and comparison with in vitro studies. *Microvasc. Res.* 73, 143–149.
- Hodges, G.J., et al., 2010. Influence of age, sex, and aerobic capacity on forearm and skin blood flow and vascular conductance. *Eur. J. Appl. Physiol.* 109, 1009–1015.
- Jadhav, S., et al., 2007. Reproducibility and repeatability of peripheral microvascular assessment using iontophoresis in conjunction with laser Doppler imaging. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 50, 343–349.
- Khan, F., et al., 2004. Peripheral cholinergic function in humans with chronic fatigue syndrome, Gulf War syndrome and with illness following organophosphate exposure. *Clin. Sci. (Lond.)* 106, 183–189.
- Khan, F., et al., 2008. Relationship between peripheral and coronary function using laser Doppler imaging and transthoracic echocardiography. *Clin. Sci. (Lond.)* 115, 295–300.
- Kimura, K., et al., 2007. Cutaneous blood flow and sweat rate responses to exogenous administration of acetylcholine and methacholine. *J. Appl. Physiol.* 102, 1856–1861.
- Koppanyi, T., et al., 1953. Correlation between pharmacological responses to benzoylcholine, methacholine and acetylcholine and activity of cholinesterases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 107, 482–500.
- Morris, S.J., Shore, A.C., 1996. Skin blood flow responses to the iontophoresis of acetylcholine and sodium nitroprusside in man: possible mechanisms. *J. Physiol.* 496 (Pt 2), 531–542.
- Newton, D.J., et al., 2001. Assessment of microvascular endothelial function in human skin. *Clin. Sci. (Lond.)* 101, 567–572.
- Pierzga, J.M., et al., 2003. Delayed distribution of active vasodilation and altered vascular conductance in aged skin. *J. Appl. Physiol.* 94, 1045–1053.
- Pratter, M.R., et al., 1982. Stability of stored methacholine chloride solutions: clinically useful information. *Am. Rev. Respir. Dis.* 126, 717–719.
- Rossi, M., et al., 2002. Endothelium-dependent and endothelium-independent skin vasoreactivity in the elderly. *Aging Clin. Exp. Res.* 14, 343–346.
- Roustit, M., et al., 2010. Excellent reproducibility of laser speckle contrast imaging to assess skin microvascular reactivity. *Microvasc. Res.* 80, 505–511.
- Sauvet, F., et al., 2010. Effect of acute sleep deprivation on vascular function in healthy subjects. *J. Appl. Physiol.* 108, 68–75.
- Shibasaki, M., Crandall, C.G., 2001. Effect of local acetylcholinesterase inhibition on sweat rate in humans. *J. Appl. Physiol.* 90, 757–762.
- Sletten, D.M., et al., 2005. Stability of acetylcholine chloride solution in autonomic testing. *J. Neurol. Sci.* 234, 1–3.
- Srivatsan, M., Peretz, B., 1996. Effect of acetylcholinesterase inhibition on behavior is age-dependent in freely moving *Aplysia*. *Behav. Brain Res.* 77, 115–124.
- Tao, J., et al., 2004. Reduced arterial elasticity is associated with endothelial dysfunction in persons of advancing age: comparative study of noninvasive pulse wave analysis and laser Doppler blood flow measurement. *Am. J. Hypertens.* 17, 654–659.
- Tartas, M., et al., 2005a. Early vasodilator response to anodal current application in human is not impaired by cyclooxygenase-2 blockade. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288, H1668–H1673.
- Tartas, M., et al., 2005b. Cathodal current-induced vasodilation to single application and the amplified response to repeated application in humans rely on aspirin-sensitive mechanisms. *J. Appl. Physiol.* 99, 1538–1544.
- Tesselaar, E., Sjoberg, F., 2011. Transdermal iontophoresis as an in-vivo technique for studying microvascular physiology. *Microvasc. Res.* 81, 88–96.
- Vita, J.A., Keaney Jr., J.F., 2002. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? *Circulation* 106, 640–642.

## EFFECTS OF 29 HOURS SLEEP DEPRIVATION ON LOCAL COLD TOLERANCE IN HUMANS

SAUVET F<sup>1</sup>, BOURRILHON C<sup>1</sup>, BESNARD Y<sup>2</sup>, ALONSO A<sup>2</sup>, COTTET-EMARD JM<sup>3</sup>, SAVOUREY G<sup>2</sup>, LAUNAY JC<sup>2</sup>

1. Institut de recherche biomédicale des armées, 91223 Brétigny sur Orge, France
2. Institut de recherche biomédicale des armées, antenne La Tronche-CRSSA, 38702 La Tronche, France
3. Exploration Fonctionnelle Endocrinienne et Métabolique (EFEM), Centre de Biologie Nord, Hôpital de la Croix-Rousse, 103 Grande rue de la Croix Rouse, 69317 Lyon, France

Corresponding author:

SAUVET Fabien (MD)

Département environnements opérationnels

IRBA

BP 73

F 91223 Brétigny sur Orge, France

e-mail : fsauvet@imassa.fr / phone : +33 6 62 20 93 31

Running head : sleep deprivation and local cold tolerance

Keywords: cold-induced vasodilation, sleep deprivation, skin blood flow, skin temperature, thermoregulation

### ABSTRACT

To study the effects of a 29-h total sleep deprivation (TSD) on local cold tolerance, 10 healthy men immersed their right hand for 30 min in a 5°C water bath (CWI) after a 30-min rest period in a thermoneutral environment (Control), after a normal night (NN) and after a 29-h TSD. CWI was followed by a 30-min passive rewarming (Recovery). Finger 2 and 4 skin temperatures (Tfi2, Tfi4) and finger 2 cutaneous vascular conductance (CVC) were monitored to study cold-induced vasodilation (CIVD). Moreover, rectal temperature (Tre), mean skin temperature ( $\bar{T}_{sk}$ ), heart rate (HR) and blood pressure (BP) were measured. Blood samples were collected at the end of Control, at the lower and at the first maximal Tfi2 values during CWI and at Recovery. Tfi2, Tfi4 and CVC didn't differ after TSD at Control, whereas they were lowered during CWI ( $-2.6 \pm 0.7$  °C for Tfi2;  $-2.0 \pm 0.8$  °C for Tfi4,  $-79 \pm 25$  % for relative CVC,  $P < 0.05$ ) as during Recovery ( $-4.9 \pm 1.9$  °C for Tfi2,  $-2.6 \pm 1.8$  °C for Tfi4,  $-70 \pm 22$  % for relative CVC,  $P < 0.05$ ). After TSD the lower CVC values appeared earlier during CWI ( $-59 \pm 19.6$  s,  $P < 0.05$ ). At Control and CWI after TSD, plasma endothelin levels were higher and negatively correlated to Tfi2, Tfi4 and CVC. However, no effect of TSD was found in the number and amplitude of CIVD and in Tre,  $\bar{T}_{sk}$ , HR, BP and catecholamines, whatever the period. However We conclude that TSD induces thermal and vascular changes in the hand which impair the local cold tolerance suggesting that TSD could increase the risk of local cold injuries.

## INTRODUCTION

Cold-related injuries, especially frostbites of the distal extremities, are always a medical problem for armies (Grieve et al. 2011; Moran et al. 2003), rescue teams (Kupper et al. 2003), climbers and indoor or outdoor workers (Makinen et al. 2009; Piedrahita et al. 2008) in cold environments. Fatigue and sleep deprivation were empirically identified as individual risk's factors for cold injuries (Rintamaki 2000) but to date the physiological relationships between sleep deprivation and local cold tolerance of the extremities have never been studied.

When exposed to cold the human body reacts by cutaneous vasoconstriction to limit heat losses and by shivering to produce more heat. The cutaneous vasoconstriction reduces the skin blood flow (SkBF) to the peripheral limbs particularly in the fingers and toes which are the most exposed to cold. Then, SkBF of the extremities can be almost negligible during exposure to extreme cold (Daanen 2003; Kellogg 2006) and the skin can reach very low temperatures increasing the risk of local cold injuries. However, cold exposure of the extremities (i.e.  $< 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) may lead to a cold induced vasodilation (CIVD) which occurs generally within the first 15 min of the cold water exposure (Lewis 1930). This vasodilation last a few minutes and is characterized by short cycles of blood flow that rewarm the extremities and help to maintain the dexterity (Daanen 2003). Furthermore, subjects with a weak CIVD during experimental cold water immersion (CWI) of the fingers in a laboratory setting were shown to have a higher risk of frostbite when exposed to cold in real life (Daanen 2009). CIVD is generally studied during a 30-min CWI of the hand or a finger because it is a reproducible test (O'Brien 2005) recognized to be valid to assess microvascular function in human skin (Sendowski et al. 1997; Sendowski et al. 2000) and to evaluate the risk of local cold injuries (Van der Struijs et al. 2008).

The main vasoconstrictor response of the human skin exposed to cold involves both reflexes and local factors (Kellogg 2006). In non glabrous skin the role of orthosympathetic vasoconstrictor nerves in the initial phase of the local cooling responses of the skin is well characterized (Kellogg 2006; Pergola et al. 1993). Basically the vasoconstrictor response to cold is mediated by a rapid and selective increase in  $\alpha 2$ -adrenoreceptors ( $\alpha 2$ -AR) activity mediated by the Rho-associated kinase pathways (Bailey et al. 2004). However the non-neural mechanisms that mediate the prolonged response to local cooling, especially those involved in CIVD, are unknown (Kellogg 2006). Various factors may be implied: alteration of endothelial and/or vascular smooth muscle functions, high blood viscosity and/or changes in receptor affinity (Kellogg 2006; Racchi et al. 1997). It has also been suggested that CIVD may be caused by a sudden decrease in the release of vasoconstrictive neurotransmitters from the sympathetic nerves to the muscular coat of the arterio-venous anastomoses (AVAs) due to local cold (Bergersen et al. 1999). Finally it appears today that the physiological mechanisms of the cutaneous vascular responses of the extremities to a local cold exposure are not well established.

Even if total sleep deprivation doesn't modify significantly heart rate (HR), blood pressure (BP), forearm vascular conductance (the ratio of vascular perfusion to mean arterial pressure) and plasma catecholamines in healthy subjects not submitted to stressful constraints (Pagani et al. 2009; Sauvet et al.

2010), it appears that sleep deprivation affects autonomic and hemodynamic responses to a stressful stimuli as a cold pressor test (Kato et al. 2000). In a same way Sauvet et al. (2010) showed that a 29-h total sleep deprivation at comfortable ambient air temperature is sufficient to induce endothelial dysfunction through an increase in plasmatic levels of endothelial activation factors associated with a decrease in cutaneous vascular reactivity in response to acetylcholine (ACh). As ACh-induced vasodilation is mediated in human skin by nitric oxide (NO) and prostaglandins, and in a lesser part by endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF), both inducing smooth muscle relaxation and vasodilation (Kellogg et al. 2005), we may consequently hypothesize that TSD could alter microcirculation mechanisms during local cold exposure of the extremities, especially during CIVD, which is considered as a protective mechanism for cold injuries (Daanen 2009). To test this hypothesis we studied in 10 healthy subjects the effects of a 29-h TSD both on thermal and vascular changes not only during a 30-min hand CWI (5 °C) but also during the subsequent 30-min recovery in comfortable ambient air (passive rewarming).

## **METHODS**

### **Subjects**

Ten healthy young men ( $30.6 \pm 2.1$  yrs) participated in this study. All subjects underwent a detailed medical history and examination with an electrocardiogram. The study was approved by the ethics committee of the Grenoble University and the subjects provided a written informed consent. Exclusion criteria were: shift-workers, smokers, acute or chronic hand diseases, daily consumption of alcoholic beverages and those consuming more than 400 mg of caffeine per day, subjects with body mass index (BMI) greater than  $30 \text{ kg/m}^2$  and those taking medication. A blood test was performed to assess biological parameters (glucose, total cholesterol, triglycerides and transaminases). Subjects with excessive daytime somnolence (Epworth Sleepiness Scales  $\pm 9$ ) (Johns 1991) or sleep complaints (Pittsburg sleep quality index (PSQI)  $< 31$  or  $> 69$ ) (Buysse et al. 1989) or if they could not be considered as an intermediate chronotype on the Horne and Orstberg questionnaire (Horne and Ostberg 1976) were also excluded.

Biometrical characteristics were measured and calculated. Body mass (W in kg) was assessed using an electronic balance (KCC300/ID 7, Mettler-Toledo GmbH, G), height (H in m) using a standard height gauge, the skin folds [tricipital (Pct), underscapular (Pcs)] using a Holtain skin fold calliper (Crymich, UK) (mean of two measurements of each by 2 physicians). Body surface area (AD in  $\text{m}^2$ ) was calculated using Dubois and Dubois equation (1916), the lean body mass (LBM) was calculated with Lohman's formula (Lohman et al. 1975) and percentage of body fat mass (BFM) was calculated as  $(1 - \text{LBM}/W) \times 100$ .



### **Cold hand test**

Each subject completed two cold hand tests: one after a normal night of sleep (NN) and one after a 29-h total sleep deprivation (TSD). The subjects were not allowed to drink coffee or tea during the experimental day or to exercise at least 2 h before the start of the experiment. The two tests separated by two weeks were randomized and performed in the morning at 10:00 in a thermoclimatic chamber [Tdb (dry bulb temperature) = Tg (globe temperature) =  $23 \pm 2$  °C ; RH (relative humidity) = 30 - 50 % throughout the experiment].

The cold hand test was made of 3 periods each lasting 30 min. After the subject entered the thermoclimatic chamber, he was instrumented and remained in sitting position for the 30-min period in air (Control). Then the subject immersed his right hand up to the styloid process into the cold water bath maintained at 5 °C (Unistat 142 W, Huber, Offenburg, G) for 30 min (Cold Water Immersion, CWI). Following CWI the subject removed his hand from the water bath and dried with a towel; then the 30-min passive rest rewarming period (Recovery) began.

### **Sleep deprivation**

Subjects were housed in the laboratory for 2 days at the Institut de recherche biomédicale des armées – antenne CRSSA (La Tronche, France). The total sleep deprivation period (TSD) started at 07:00 and finished at 12:00 the following day after the cold hand test was completed corresponding to 29 h of continuous awakening (i.e. 29-h TSD). During the experiment the subjects' waking states were continuously monitored by polysomnography (Actiwave, CamNtech Ltd., Cambridge, UK) analyzed offline (Somnologica TM, Medcare, Reykjavik, Iceland) to ensure that they remained alert throughout the 29-h TSD. Laboratory illumination was maintained at 200 lx during the entire period of sleep deprivation. When not engaged in any specific testing or meal, subjects were allowed to read, watch videos, play games, or converse with the staff or visitors. Subjects were prohibited from exercise, caffeine and alcohol before and during the study. Meals and caloric intake were standardized for each subject (2600 kcal/day i.e 10900 kJ/day). Water drinking was available ad libitum.

### **Instrumentation**

As soon as they arrived at the laboratory, the subjects emptied their bladder and an indwelling venous catheter (BD Insyte-W, 18 G, 1  $\frac{3}{4}$  in, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) was inserted in an antecubital vein in the anterior cubital region. The subjects were only dressed in shorts, socks and T-shirt and rested quietly in sitting position during the test in a comfortable armchair inside the climatic chamber.

During experiments the skin temperatures of the fingers 2 (Tfi2) and 4 (Tfi4), of the thenar (Tte) and hypothenar (Thte) eminences of the right hand as well as the temperature of the middle of the right arm (Tarm) were continuously recorded using copper-constantan (Cu-Ct) thermocouples (accuracy  $\pm 0.05$  °C) insulated with a small patch of Neoprene®. We used double-sticking o-ring tape and adhesive tape (Blenderm, 3M, USA) to fasten the patch to ensure that no water entered between skin and thermocouple. Moreover ten skin temperatures (forehead, arm, forearm, hand, chest, abdomen, thigh, calf, ankle, back)

on the half left of the subjects' body were taken with Cu-Ct thermocouples (accuracy  $\pm 0.05$  °C) for the calculation of mean skin temperature ( $\bar{T}_{sk}$ ) using the Colin and Houdas (1965) equation. The rectal temperature ( $T_{re}$ ) was also recorded continuously using a Cu-Ct thermocouple inserted 12 cm into the rectum (accuracy  $\pm 0.05$  °C). All of the thermocouples were previously calibrated using a high precision thermometer ( $\pm 0.01$  °C) (PHP602 thermometer with PT100-5847-03 probe and a Hyperion-Basic calibration bath, AOIP, Ris Orangis, France). Continuous skin blood flow (SkBF) measurement was made using a laser-Doppler flowmeter (Periflux PF4001, Perimed, Järfälla, Sweden). The submersible laser-Doppler probe (PF 405, Perimed, Järfälla, Sweden) was attached to the pulp of the second finger in the same manner used for the thermocouples placed on the hand (Sendowski et al. 1997; Sendowski et al. 2000). The calibration of the laser-Doppler flowmeter was verified before each test; if necessary a calibration was done just before the test (Saumet et al. 1988). Systolic (SAP) and diastolic (DAP) arterial blood pressures were measured every minute from the left arm using an automatic sphygmomanometer and the heart rate (HR) was monitored continuously by a heart rate monitor (Dinamap PLUS, Model 8723, Critikon, USA).

All signals were recorded every 10 sec through a data acquisition system on a personal computer (IPO, Décines, France) running a dedicated software (LADO3C, Icône Group, Eybens, France).

### **Blood samples**

Blood samples were collected at the end of Control, during CWI at the lower  $T_{fi}$  value (CWI<sub>onset</sub>) and at the first maximal  $T_{fi}$  (CWI<sub>peak</sub>) whichever the finger and 10 minutes after the beginning of the rewarming period (10-min Recovery). For each blood sample we filled, two heparinised tubes (5 mL, S-Monovette, Sarstedt, G) one for the dosage of the catecholamines and another for the dosage of the nitrates and nitrites. We also used two EDTA tubes with aprotinine (5 mL, Vacutainer, Becton-Dickinson, Le Pont de Claix, France) for the dosages of renin and endothelin-1. Just after they were filled the tubes were centrifuged and aliquoted and the aliquots immediately frozen at -80 °C.

### **Biochemical and hormone assays**

Free plasma catecholamines (CA), noradrenaline (NA), adrenaline (A) and dopamine (DA) were determined using a high performance liquid chromatography assay with electrochemical detection (HPLC-ED) as previously described (Sagnol et al. 1990). The detection limit for plasma NA, A and DA were 32 ng/L, 16 ng/L and 2 ng/L, respectively.

Endothelin was measured with a commercial ELISA kit (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA). The lower limit of detection was 0.1 pg/ml and inter- and intra-assay best coefficients of variation were 2.6 % and 4.6 % respectively. Renin was measured with a commercial RIA kit (Renin III generation, CisBio International, Gif sur Yvette, France). The lower limit of detection was 2.5 pg/mL and inter- and intra-assay coefficients of variation were 4.5 % and 7.4 %, respectively. The levels of the more stable nitric oxide (NO) metabolites, nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) and nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), were measured with a commercial ELISA

kit (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA). The lower limit of detection was 3.1  $\mu\text{mol/L}$  and the inter- and intra-assay coefficients of variation were 2.5 % and 4.6 %, respectively.

### **Subjective pain assessment**

During the test, the volunteers were asked before each blood sample to rate their pain using a continuous pain scale from 0 (“no pain at all”) to 10 (“unbearable pain”).

### **Calculations**

Mean arterial pressure (MAP, mmHg) was calculated as:  $\text{MAP} = \text{SAP}/3 + (2/3)\text{DAP}$ . The SkBF signal (expressed in arbitrary perfusion units, PU) from the laser-Doppler probe was averaged every 10 sec to reduce instantaneous variability owing to vasomotion (Cracowski et al. 2006). To take into account the possible changes in systemic hemodynamic conditions, cutaneous vascular conductance (CVC expressed in PU/mmHg), reflect of vascular perfusion, was calculated as the ratio of SkBF to MAP (Cracowski et al. 2006; Sendowski et al. 1997). Relative CVC response was expressed as the percent change in CVC from the baseline. The baseline was obtained by averaging values for the last 5 min of the 30-min Control period.

For each subject averaged temperatures ( $T_{re}$ ,  $\bar{T}_{sk}$ , skin temperatures), HR, blood pressure variables and CVC were calculated for the last 5 minutes of the 30-min control period (Control), for the 30-min CWI period and for the last 5 min of the 30-min rewarming period (Recovery). To examine CIVID, a change in skin temperature of at least 0.5  $^{\circ}\text{C}$  was chosen to represent an occurrence of CIVID (Daanen 2009). CIVID was assessed by examining the following variables (Figure 1) across the CWI: initial nadir reached during CWI ( $T_{fi_{min}}$ ,  $\text{CVC}_{min}$ ), onset time of  $T_{fi_{min}}$  and  $\text{CVC}_{min}$ , initial maximal value during CIVID ( $T_{fi_{max}}$ ,  $\text{CVC}_{max}$ ),  $\Delta T_{fi} = T_{fi_{max}} - T_{fi_{min}}$ , time of  $T_{fi_{max}}$  from onset (Peak time), minimal  $T_{fi}$  value during all the CWI ( $T_{fi_{min}}$  CWI), and maximal value observed during all the CWI period ( $T_{fi_{max}}$  CWI) (O'Brien 2005; Sendowski et al. 1997; Sendowski et al. 2000). Finally  $T_{fi}$  and CVC area under the curve ( $T_{fi_{AUC}}$  and  $\text{CVCAUC}$ ) were determined for the 30-min CWI period.

### **Statistical analysis**

Results are expressed as mean  $\pm$  SE. Levene test was previously used to test variances equality between groups. Variables were analysed using a two-way ANOVA with repeated measures testing the TSD effect (two levels) and the ‘test’s period’ effect of the cold hand test (3 levels: Control, CWI and Recovery). When a global statistical significance or interaction was found, values observed during test’s period were compared with Control and values observed after TSD were compared with values observed after NN (at the same test’s period) using a post-hoc Tukey test. CIVID variables were compared using a one way ANOVA with repeatable measures (TSD effect, two levels). Relationships between variables were studied using a Pearson linear correlation. Statistical analyses were performed with Statistica for

Windows (V9, StatSoft France, Maisons-Alfort, France). The level of statistical significance was set at  $P < 0.05$  in all the cases.

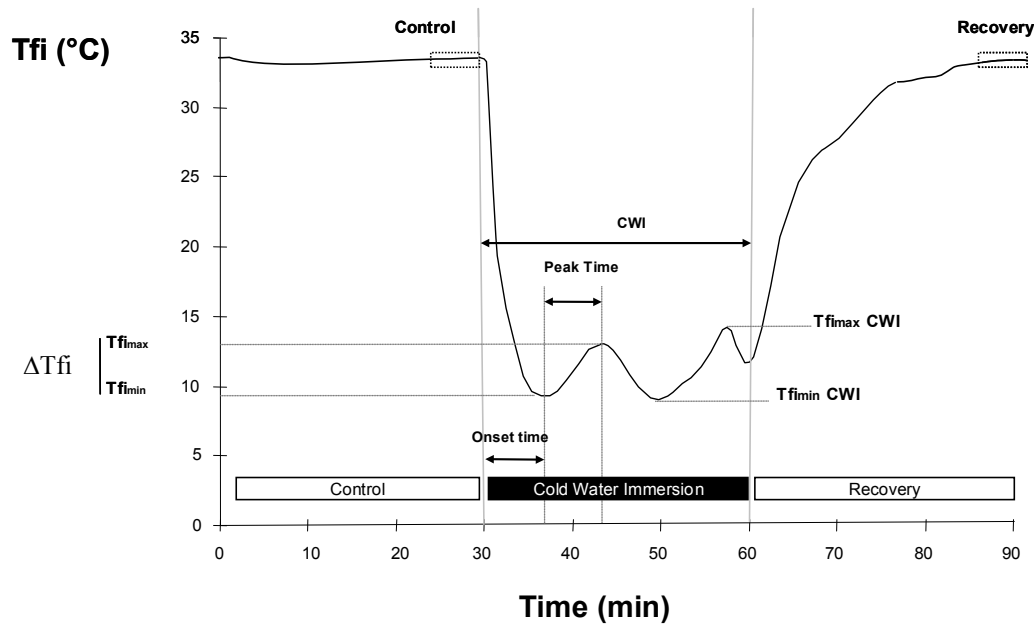


Figure 1. Parameters calculated from  $T_{fi}$  during Control, Cold Water Immersion (CWI) and Recovery. Control is the last 5-min of the 30-min control period in ambient air (30 °C). CWI is the 30-min Cold Water Immersion (5 °C) period. Recovery is the last 5-min of the 30-min rewarming period in ambient air (30 °C). Onset is the initial lower  $T_{fi}$  value ( $T_{fi_{min}}$ ) during CWI immersion and  $T_{fi_{max}}$  is the first maximal value corresponding to the Cold Induced Vasodilation (CIVD).  $\Delta T_{fi} = T_{fi_{max}} - T_{fi_{min}}$ .  $T_{fi_{min}}$  CWI and  $T_{fi_{max}}$  CWI are the lesser and the higher  $T_{fi}$  values observed during the CWI period, respectively.

## RESULTS

### Subjects

All subjects completed the protocol. Subjects' average body mass was  $77 \pm 2.2$  kg, height was  $1.77 \pm 0.25$  m, percentage of body fat mass was  $18.1 \pm 1.2$  %, lean body mass was  $63.2 \pm 1.7$  kg and body surface area was  $1.94 \pm 0.03$  m<sup>2</sup>. All of the subjects were submitted to a total sleep deprivation (i.e. 29-h continuous awaking) as showed by the analysis of the polysomnographic recordings and there was no medical problem (data not shown).

### Temperature responses



No significant difference in  $T_{re}$  was observed during the cold hand test between TSD and NN (Table 1). We observed a global significant 'test's period' effect for  $T_{re}$ ,  $\bar{T}_{sk}$ ,  $T_{arm}$ ,  $T_{te}$ ,  $T_{hte}$ ,  $T_{fi2}$  and  $T_{fi4}$  and a significant 'TSD effect' for  $T_{fi2}$  and  $T_{fi4}$  ( $P < 0.05$ ). During CWI compared to Control all the local skin temperatures studied decreased significantly ( $P < 0.05$ ) both after NN and TSD. At the end of Recovery, local skin temperatures reached similar temperature as Control except for  $T_{fi2}$ ,  $T_{fi4}$ ,  $T_{te}$  and  $T_{hte}$  observed after TSD which did not reach the values observed at Control as shown in Table 1 and Figure 2.  $T_{fi2}$  and  $T_{fi4}$  both at CWI and during Recovery were at a lower level after TSD compared to NN (Table 1,  $P < 0.05$ ).

During CWI both the max and min of  $T_{fi2}$  and  $T_{fi4}$  (Table 2) didn't change after TSD though  $T_{fi2_{AUC}}$  and  $T_{fi4_{AUC}}$  were lowered after TSD (Table 2,  $P < 0.05$ ). The various characteristics of the CIVD described from the time courses of  $T_{fi2}$  and  $T_{fi4}$  showed that the number of CIVD and the characteristics of the first CIVD ( $T_{fi_{min}}$ ,  $T_{fi_{max}}$ ,  $\Delta T_{fi}$ , Onset and Peak times) were not statistically modified after TSD.

### **Cutaneous vascular conductance responses (Table 3)**

After TSD compared to NN the results showed that at Control there was no difference in CVC whereas during CWI,  $CVC_{max}$ , CVC and  $CVC_{AUC}$  were lowered ( $P < 0.05$  for all). After TSD the lower CVC value (Onset time) during the CWI appeared earlier ( $P < 0.05$ ). Moreover, during Recovery CVC was higher after NN than after TSD ( $P = 0.03$ ).

In this study, we observed during CWI significant relationships first between averaged  $T_{fi2}$  and CVC ( $R^2 = -0.41$ ;  $P = 0.02$ ) and second between averaged  $T_{fi4}$  and CVC ( $R^2 = -0.52$ ;  $P = 0.02$ ). Moreover we observed a significant linear relationship during CWI between averaged  $T_{fi2}$  and  $CVC_{AUC}$  ( $R^2 = -0.63$ ;  $P < 0.01$ ) and between averaged  $T_{fi4}$  and  $CVC_{AUC}$  ( $R^2 = -0.57$ ;  $P = 0.01$ ).

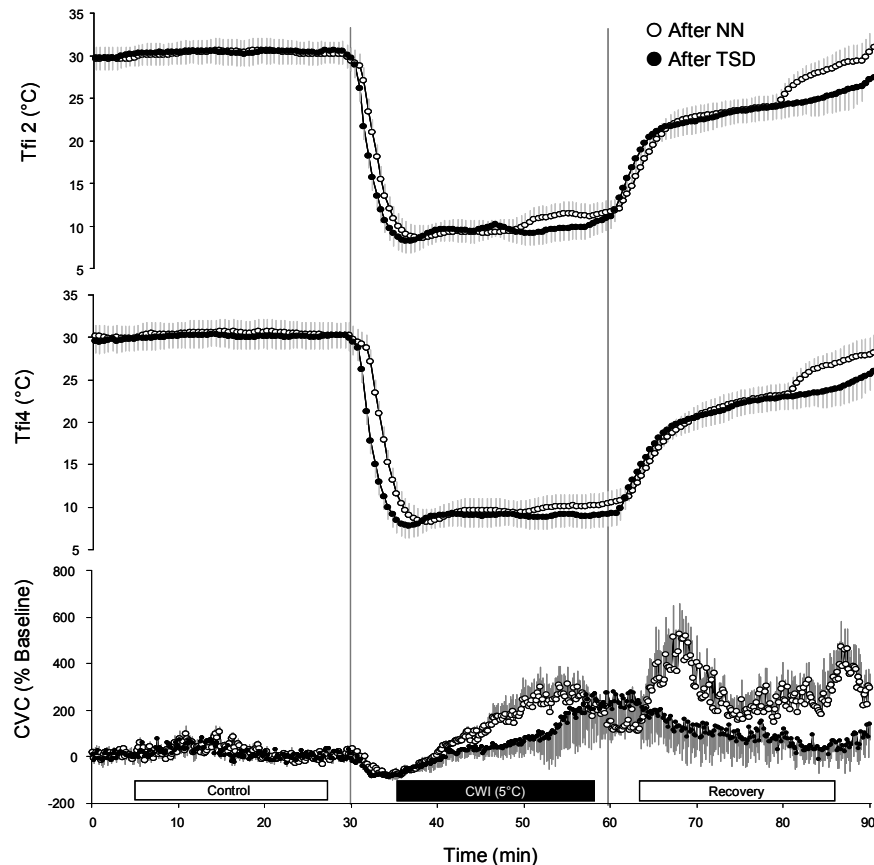


Figure 2. Average response in finger 2 (Tfi2) and 4 (Tfi4) skin temperatures and cutaneous vascular conductance (CVC) during 30-min control period in ambient air, 30-min Cold Water Immersion (5 °C, CWI) and 30 ambient air recovery period after normal night (NN) and after 29-h of Total Sleep Deprivation (TSD). Cutaneous Vascular Conductance (CVC) is expressed as % of baseline (i.e. last 5-min of control). Values are mean  $\pm$  SE.

#### Heart rate and blood pressure responses (Table 4)

HR, SAP, DAP and MAP were not statistically modified after TSD during Control ( $P > 0.05$ ). However, compared to Control HR was decreased during CWI and Recovery ( $P < 0.05$ ). On contrast SAP, DAP and MAP increased only during CWI ( $P < 0.05$ ) both after NN and TSD. The TSD has no significant overall effect on HR and BP responses whichever the periods of the cold hand test.

#### Biochemical and hormonal variables (Table 5)

We observed a significant 'test's period' and TSD effects on the endothelin plasma levels ( $P < 0.05$ ) without significant interaction. After TSD compared to Control, the endothelin plasma levels were higher at CWIonset and CWIpeak ( $P < 0.05$ ) but not at the 10-min Recovery. After NN endothelin levels were higher during Recovery ( $P < 0.05$ ) compared to Control, whereas after TSD no difference was observed between Control and Recovery. After TSD endothelin levels at CWIonset are negatively related to averaged Tfi2 and Tfi4 ( $R^2 = 0.54$ ,  $P < 0.01$ ;  $R^2 = 0.47$ ,  $P < 0.01$ , respectively) (Figure 3) and to CVC ( $R^2 = 0.35$ ,  $P = 0.01$ ).

We didn't find any significant effect of TSD on the catecholamines and renin levels but we observed a significant 'test's period' effect for adrenaline ( $P < 0.001$ ), noradrenaline ( $P < 0.001$ ), dopamine ( $P < 0.01$ ) and renin ( $P < 0.01$ ) with an increase in plasma levels at Recovery compared to Control ( $P < 0.05$  for all).

We didn't observe any significant 'test's period' or 'TSD effect' for nitrites and nitrates plasma levels.

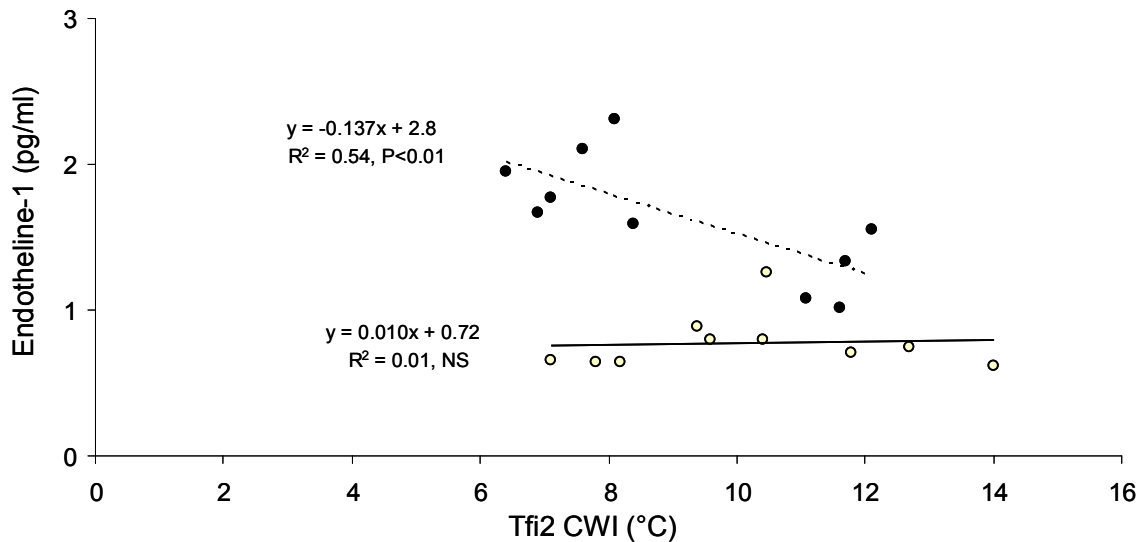


Figure 3. Correlation between endothelin-1 plasma level and finger skin temperature during cold water immersion (Tfi CWI) observed at  $CWI_{onset}$  after (O) a normal sleep night (NN) and after (●) 29-h total sleep deprivation (TSD).

### Pain ratings

Pain subjective levels were equal to zero at Control as expected, both after NN and after TSD. At  $CWI_{onset}$ ,  $CWI_{peak}$  and at 10-min Recovery after NN pain was assessed to  $4.1 \pm 0.7$ ,  $4.3 \pm 0.7$  and  $2.7 \pm 0.8$ , respectively; and after TSD to  $4.6 \pm 0.8$ ,  $5.4 \pm 0.9$  and  $3.8 \pm 1.0$ . We observed a significant test effect ( $P < 0.01$ ) but no significant "TSD effect".

## DISCUSSION

To our knowledge, this is the first time that a decreased hand tolerance to cold exposure is reported after total sleep deprivation (TSD) in healthy subjects. This observation is supported by the fact that both the averaged fingers' skin temperatures (Tfi2 and Tfi4) and the cutaneous vascular conductance (CVC) during the 30-min cold water immersion (CWI) and subsequent Recovery decreased significantly after the

29-h TSD. This occurs without significant change both in CIVD indexes and in general thermal and vascular physiological variables such as rectal temperature ( $T_{re}$ ), mean skin temperature ( $\bar{T}_{sk}$ ), blood pressure (BP) and heart rate (HR). Moreover, the higher endothelin plasma levels observed after TSD are related to the decreases of CVC during CWI and Recovery ( $P < 0.01$ ) despite no significant change in catecholamine plasma levels. These findings raise questions about how does TSD impair local cold tolerance and what are the physiological and/or hormonal mechanisms implied. Those points are important to answer because decreased local cold tolerance induced by TSD may represent a risk factor for local cold injuries of the extremities.

### **Total sleep deprivation (TSD) impairs local tolerance to cold**

In this study we observed a decrease of the averaged cutaneous temperatures in index (Tfi2) and annular (Tfi4) fingers during CWI ( $-2.6$  °C;  $P < 0.05$  for Tfi2 and  $-2.1$  °C;  $P < 0.05$  for Tfi4) and Recovery ( $-4.9$  °C;  $P < 0.05$  for Tfi2 and  $-2.6$  °C for Tfi4) after TSD without any effect on CIVD. Furthermore the decrease of fingers' skin temperatures was correlated ( $R^2 = -0.41$ ;  $P = 0.02$  for Tfi2 and  $R^2 = -0.52$ ;  $P = 0.02$  for Tfi4) to the decrease of cutaneous vascular conductance (CVC) during both CWI and Recovery. These results attest that TSD enhances vasoconstriction during CWI and impairs vasodilation during Recovery but doesn't modify CIVD indexes in our study. These observations are in line with those reported by Sawada et al. (Sawada et al. 2000) who showed that after successive repeated 10-min CWI significant lower skin finger temperatures were observed not only during CWI without any changes in CIVD indexes but also during Recovery. Consequently we may postulate that the lower skin temperatures of the extremities induced by TSD, even without changes in CIVD, increases the risk of freezing of the extremities and thus TSD may be considered as a risk factor for local cold injuries.

### **Vasomotricity impairment mechanisms**

The physiological mechanisms underlying the effects of TSD on local cold tolerance are today unknown. However our results show that the observed lower skin finger's temperatures are related to a lesser perfusion of the skin during CWI and Recovery which could have two main causes: an increase of vasoconstriction and/or a decrease of vasodilation mechanisms induced by TSD. The hypothesis of an increased vasoconstriction is supported in our study by the fact that we observed an increase in endothelin-1 (ET-1) plasma levels even without significant changes in plasma catecholamines after TSD. This result confirms previous studies which reported higher ET-1 plasma levels in rodents after sleep deprivation (Palma et al. 2002) and in chronic short sleep duration deprivation in humans (Weil et al. 2010). Furthermore after TSD we observed a significant inverse relationship between ET-1 plasma levels and averaged Tfi2 (Figure 3) as with CVC and Tfi4. ET-1 is a powerful vasoconstrictor peptide released

by the endothelium which acts by two ways: a direct one on smooth muscular vascular cells and an indirect one promoting the vasoconstrictive effects of catecholamines.

We could also hypothesize that after TSD the lesser Tfi and CVC values observed during CWI and Recovery could be related to an impairment of the vasodilatory pathways. Indeed after TSD we observed first during CWI lower maximal CVC values (Figure 2) and second during Recovery a one-phase increased blood flow instead of a two-phase one as shown by the CVC, Tfi2 and Tfi4 time courses (Figure 2). These changes suggest an alteration of the reperfusion mechanisms. After the initial vasoconstriction during CWI after NN, there are transient increases in peripheral blood flow and cutaneous vascular conductance which seems dependent in part on the decreased noradrenalin's release from nerves' endings (Johnson et al. 2005; Pergola et al. 1993; Yamasaki et al. 2006) and in part on other vasodilatory mechanisms that probably involve the endothelial function and the nitric oxide (NO) pathway (Hodges et al. 2006; Yamasaki et al. 2006). In recent studies authors suggested that acute TSD in healthy subjects is a sufficient stress to trigger an endothelial dysfunction (Amir et al. 2004; Sauvet et al. 2010) associated with a decrease of vasodilatory capacity (i.e. vascular reactivity) of the cutaneous vascular bed (Sauvet et al. 2010). This dysfunction is related to an increase in plasma levels of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukine-6 (IL-6) (Chennaoui et al. 2011; Haack et al. 2007; Irwin et al. 2010; Sauvet et al. 2010; Vgontzas et al. 2007) that decrease NO-synthases activity and increase ET-1 production inducing a decrease of vascular reactivity (Ohsuzu 2004). In another study Sawada (Sawada 1996) observed during an immersion in cold water lower finger temperature and lesser vasodilation during CIWD in old men (62-70 yrs) compared to younger ones (20-29 yrs). This lesser vasodilation is probably mediated by the increased-age impairment of peripheral vascular reactivity and endothelial NO-synthase activity (Sauvet et al. 2011; Sawada 1996). Nevertheless, in our study we didn't observe significant changes in nitrite plasma levels, an index of NO synthase activity (Kleinbongard et al. 2003). However the half-life of nitrite is very short (Bryan et Grisham 2007) and baseline nitrite levels show great variability and are under the sensibility of the ELISA kit used that could mask potential changes in nitrite plasma levels after TSD. In conclusion it seems that TSD modifies both vasoconstriction and vasodilation during a cold hand test at least mediated by complex changes in CA and ET-1 levels as suggested by our study.

#### **Did TSD diminish cold tolerance through a local or a general mechanism?**

It is questionable whether the observed changes in local cold tolerance reported above could be consecutive to physiological general or local effects of TSD. The effects of TSD on body temperatures and cardiovascular system are controversial. Indeed, as in our case the lack of significant effect of TSD on  $T_{re}$ ,  $\bar{T}_{sk}$  and metabolic heat production has been previously described at ambient temperature (Caine-Bish et al. 2004; Meney et al. 1998; Savourey and Bittel 1994). But conversely Landis et al. (1998) found that in a comfortable thermal environment both esophageal and rectal temperatures were reduced after 24 h of sleep deprivation and Launay et al. (2002) found modifications of the circadian rhythm of rectal temperature after 24 h of sleep deprivation as an increased mesor and a reduced amplitude but without

change in the acrophase. However sleep deprivation modifies general thermoregulatory responses to a whole body cold exposure (Landis et al. 1998; Savourey and Bittel 1994; Young et al. 1998) by increasing the sensitivity of the thermoregulatory system. This is shown by the higher  $\bar{T}_{sk}$  and heat metabolic production without change in  $T_{re}$  during a 1°C whole body cold exposure (Savourey and Bittel 1994). After 24-h TSD the higher  $\bar{T}_{sk}$  observed during a general cold exposure may be due to a lower vasoconstriction but no direct measurement of skin blood flow was made to confirm this (Landis et al. 1998; Savourey and Bittel 1994; Young et al. 1998). As in our study there is no change in general and local thermal and cardiovascular reactions during Control, after TSD and in local responses during CWI and Recovery, we can conclude that TSD didn't modify general thermal and vascular responses but only local thermal and vascular responses during local cold exposure and its subsequent rewarming period. These results support the hypothesis that local cold tolerance is mainly of peripheral origin (Daanen 2003) and doesn't support the hypothesis of a centrally originating phenomenon caused by sympathetic vasoconstrictor withdrawal (Flouris and Cheung 2009a, b).

## **CONCLUSION**

In this study we showed that one night of TSD in healthy subjects didn't modify whole body temperatures and cardiovascular state but reduced local cold tolerance during a CWI and subsequent Recovery period as the lower finger temperatures and CVC showed. These vascular changes could be in part related to higher levels of plasma endothelin after TSD responsible of lower vascular reactivity during CWI and Recovery. Consequently, we propose that local cold tolerance and local vascular reactions to cold must be studied not only during a 30-min CWI but also during the 30-min subsequent Recovery period in order to improve the whole sensitivity of the cold hand test. Furthermore TSD should be considered as a risk factor for cold injuries mainly through local rather than general mechanisms and must be taken into account in the future not only for studies on local cold tolerance but above all for the prevention of local cold injuries.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Nicole CLERC, Julie BOMPARD, Philippe COLIN, Bruno GOURBY, Pascal VAN BEERS and Josiane DENIS, from the Institut de Recherche Biomédicale des Armées and Mme VOUILLARMET from Exploration Fonctionnelle Endocrinienne et Métabolique (EFEM), Centre de



Biologie Nord, Hôpital de la Croix-Rousse, Lyon, France for their technical and logistic contributions to this work. This work was supported by a grant from Direction Générale de l'Armement N° 06 CO 026.

## REFERENCES

- Amir O, Alroy S, Schliamser JE, Asmir I, Shiran A, Flugelman MY, Halon DA, Lewis BS (2004) Brachial artery endothelial function in residents and fellows working night shifts. *Am J Cardiol* 93: 947-949
- Bailey SR, Eid AH, Mitra S, Flavahan S, Flavahan NA (2004) Rho kinase mediates cold-induced constriction of cutaneous arteries: role of alpha2C-adrenoceptor translocation. *Circ Res* 94: 1367-1374
- Bergersen TK, Hisdal J, Walloe L (1999) Perfusion of the human finger during cold-induced vasodilatation. *Am J Physiol* 276: R731-737
- Buysse DJ, Reynolds CF, 3rd, Monk TH, Berman SR, Kupfer DJ (1989) The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Res* 28: 193-213
- Caine-Bish NL, Potkanowicz ES, Otterstetter R, Glickman EL (2004) Thermal and metabolic responses of sleep deprivation of humans during acute cold exposure. *Aviat Space Environ Med* 75: 964-968
- Chennaoui M, Sauvet F, Drogou C, Van Beers P, Langrume C, Guillard M, Gourby B, Bourrilhon C, Florence G, Gomez-Merino D (2011) Effect of one night of sleep loss on changes in tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) levels in healthy men. *Cytokine*
- Colin J, Houdas Y (1965) Initiation of sweating in man after abrupt rise in environmental temperature. *J Appl Physiol* 20: 984-990
- Cracowski JL, Minson CT, Salvat-Melis M, Halliwill JR (2006) Methodological issues in the assessment of skin microvascular endothelial function in humans. *Trends in pharmacological sciences* 27: 503-508
- Daanen H (2009) Cold-induced vasodilation. *Eur J Appl Physiol* 105: 663-664
- Daanen HA (2003) Finger cold-induced vasodilation: a review. *Eur J Appl Physiol* 89: 411-426
- Flouris AD, Cheung SS (2009a) Authors' response to H. Daanen's 'Cold-induced vasodilation' letter. *Eur J Appl Physiol* 106: 317-319
- Flouris AD, Cheung SS (2009b) Influence of thermal balance on cold-induced vasodilation. *J Appl Physiol* 106: 1264-1271
- Grieve AW, Davis P, Dhillon S, Richards P, Hillebrandt D, Imray CH (2011) A clinical review of the management of frostbite. *J R Army Med Corps* 157: 73-78
- Haack M, Sanchez E, Mullington JM (2007) Elevated inflammatory markers in response to prolonged sleep restriction are associated with increased pain experience in healthy volunteers. *Sleep* 30: 1145-1152
- Hodges GJ, Zhao K, Kosiba WA, Johnson JM (2006) The involvement of nitric oxide in the cutaneous vasoconstrictor response to local cooling in humans. *The Journal of physiology* 574: 849-857
- Horne JA, Ostberg O (1976) A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *Int J Chronobiol* 4: 97-110
- Irwin MR, Carrillo C, Olmstead R (2010) Sleep loss activates cellular markers of inflammation: sex differences. *Brain, behavior, and immunity* 24: 54-57
- Johns MW (1991) A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. *Sleep* 14: 540-545
- Johnson JM, Yen TC, Zhao K, Kosiba WA (2005) Sympathetic, sensory, and nonneuronal contributions to the cutaneous vasoconstrictor response to local cooling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H1573-1579
- Kato M, Phillips BG, Sigurdsson G, Narkiewicz K, Pesek CA, Somers VK (2000) Effects of sleep deprivation on neural circulatory control. *Hypertension* 35: 1173-1175
- Kellogg DL, Jr. (2006) In vivo mechanisms of cutaneous vasodilation and vasoconstriction in humans during thermoregulatory challenges. *J Appl Physiol* 100: 1709-1718

- Kellogg DL, Jr., Zhao JL, Coey U, Green JV (2005) Acetylcholine-induced vasodilation is mediated by nitric oxide and prostaglandins in human skin. *J Appl Physiol* 98: 629-632
- Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Rassaf T, Schindler A, Picker O, Scheeren T, Godecke A, Schrader J, Schulz R, Heusch G, Schaub GA, Bryan NS, Feelisch M, Kelm M (2003) Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic Biol Med* 35: 790-796
- Kupper T, Steffgen J, Jansing P (2003) Cold exposure during helicopter rescue operations in the Western Alps. *Ann Occup Hyg* 47: 7-16
- Landis CA, Savage MV, Lentz MJ, Brengelmann GL (1998) Sleep deprivation alters body temperature dynamics to mild cooling and heating not sweating threshold in women. *Sleep* 21: 101-108
- Launay JC, Savourey G, Guinet A, Lallement G, Besnard Y, Bittel J (2002) Circadian rhythm of rectal temperature during sleep deprivation with modafinil. *Aviat Space Environ Med* 73: 985-990
- Lewis T (1930) Observations upon the reactions of the vessels of the human skin to cold. *Heart* 15: 177-208
- Lohman TG, Boileau RA, Massey BH (1975) Prediction of lean body mass in young boys from skinfold thickness and body weight. *Hum Biol* 47: 245-262
- Makinen TM, Jokelainen J, Nayha S, Laatikainen T, Jousilahti P, Hassi J (2009) Occurrence of frostbite in the general population--work-related and individual factors. *Scand J Work Environ Health* 35: 384-393
- Meney I, Waterhouse J, Atkinson G, Reilly T, Davenne D (1998) The effect of one night's sleep deprivation on temperature, mood, and physical performance in subjects with different amounts of habitual physical activity. *Chronobiol Int* 15: 349-363
- Moran DS, Heled Y, Shani Y, Epstein Y (2003) Hypothermia and local cold injuries in combat and non-combat situations--the Israeli experience. *Aviat Space Environ Med* 74: 281-284
- O'Brien C (2005) Reproducibility of the cold-induced vasodilation response in the human finger. *J Appl Physiol* 98: 1334-1340
- Ohsuzu F (2004) The roles of cytokines, inflammation and immunity in vascular diseases. *J Atheroscler Thromb* 11: 313-321
- Pagani M, Pizzinelli P, Traon AP, Ferreri C, Beltrami S, Bareille MP, Costes-Salon MC, Beroud S, Blin O, Lucini D, Philip P (2009) Hemodynamic, autonomic and baroreflex changes after one night sleep deprivation in healthy volunteers. *Auton Neurosci* 145: 76-80
- Palma BD, Gabriel A, Jr., Bignotto M, Tufik S (2002) Paradoxical sleep deprivation increases plasma endothelin levels. *Braz J Med Biol Res* 35: 75-79
- Pergola PE, Kellogg DL, Jr., Johnson JM, Kosiba WA, Solomon DE (1993) Role of sympathetic nerves in the vascular effects of local temperature in human forearm skin. *Am J Physiol* 265: H785-792
- Piedrahita H, Oksa J, Malm C, Rintamaki H (2008) Health problems related to working in extreme cold conditions indoors. *Int J Circumpolar Health* 67: 279-287
- Racchi H, Schliem AJ, Donoso MV, Rahmer A, Zuniga A, Guzman S, Rudolf K, Huidobro-Toro JP (1997) Neuropeptide Y Y1 receptors are involved in the vasoconstriction caused by human sympathetic nerve stimulation. *Eur J Pharmacol* 329: 79-83
- Rintamaki H (2000) Predisposing factors and prevention of frostbite. *Int J Circumpolar Health* 59: 114-121
- Sagnol M, Claustre J, Cottet-Emard JM, Pequignot JM, Fellmann N, Coudert J, Peyrin L (1990) Plasma free and sulphated catecholamines after ultra-long exercise and recovery. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 60: 91-97
- Saumet JL, Kellogg DL, Jr., Taylor WF, Johnson JM (1988) Cutaneous laser-Doppler flowmetry: influence of underlying muscle blood flow. *J Appl Physiol* 65: 478-481
- Sauvet F, Leftheriotis G, Gomez-Merino D, Langrume C, Drogou C, Van Beers P, Bourrilhon C, Florence G, Chennaoui M (2010) Effect of acute sleep deprivation on vascular function in healthy subjects. *J Appl Physiol* 108: 68-75
- Sauvet F, Mahe G, Chennaoui M, Langrume C, Vasseur M, Abraham P, Leftheriotis G (2011) Acetylcholine chloride as a potential source of variability in the study of cutaneous vascular function in man. *Microvasc Res* 82: 190-197
- Savourey G, Bittel J (1994) Cold thermoregulatory changes induced by sleep deprivation in men. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 69: 216-220

- Sawada S (1996) Cold-induced vasodilatation response of finger skin blood vessels in older men observed by using a modified local cold tolerance test. *Ind Health* 34: 51-56
- Sawada S, Araki S, Yokoyama K (2000) Changes in cold-induced vasodilatation, pain and cold sensation in fingers caused by repeated finger cooling in a cool environment. *Ind Health* 38: 79-86
- Sendowski I, Savourey G, Besnard Y, Bittel J (1997) Cold induced vasodilatation and cardiovascular responses in humans during cold water immersion of various upper limb areas. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 75: 471-477
- Sendowski I, Savourey G, Launay JC, Besnard Y, Cottet-Emard JM, Pequignot JM, Bittel J (2000) Sympathetic stimulation induced by hand cooling alters cold-induced vasodilatation in humans. *Eur J Appl Physiol* 81: 303-309
- Van der Struijs NR, Van Es EM, Raymann RJ, Daanen HA (2008) Finger and toe temperatures on exposure to cold water and cold air. *Aviat Space Environ Med* 79: 941-946
- Vgontzas AN, Pejovic S, Zoumakis E, Lin HM, Bixler EO, Basta M, Fang J, Sarrigiannidis A, Chrousos GP (2007) Daytime napping after a night of sleep loss decreases sleepiness, improves performance, and causes beneficial changes in cortisol and interleukin-6 secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E253-261
- Weil BR, Mestek ML, Westby CM, Van Guilder GP, Greiner JJ, Stauffer BL, DeSouza CA (2010) Short sleep duration is associated with enhanced endothelin-1 vasoconstrictor tone. *Can J Physiol Pharmacol* 88: 777-781
- Yamasaki Y, Komoike Y, Higashinakagawa T (2006) Adaptive changes in TEF-1 gene expression during cold acclimation in the medaka. *Zoolog Sci* 23: 903-908
- Young AJ, Castellani JW, O'Brien C, Shippee RL, Tikuisis P, Meyer LG, Blanchard LA, Kain JE, Cadarette BS, Sawka MN (1998) Exertional fatigue, sleep loss, and negative energy balance increase susceptibility to hypothermia. *J Appl Physiol* 85: 1210-1217

Table 1. Rectal and skin temperatures during Control, Cold Water Immersion (CWI) and Recovery periods after a normal sleep night (NN) and after 29-h total sleep deprivation (TSD).

		Cold hand test			ANOVA		
		Control	CWI	Recovery	Test's period (F <sub>2-18</sub> )	TSD (F <sub>1-9</sub> )	Inter. (F <sub>2-18</sub> )
T <sub>re</sub> (°C)	After NN	37.3 ± 0.1	37.2 ± 0.1	37.1 ± 0.1	6.8	3.7	0.6
	After TSD	37.1 ± 0.1	37.0 ± 0.1	37.0 ± 0.1	P < 0.01	ns	ns
T̄ <sub>sk</sub> (°C)	After NN	32.8 ± 0.2	32.6 ± 0.2	32.1 ± 0.2	17.8	3.2	2.0
	After TSD	33.1 ± 0.2	33.2 ± 0.2	32.7 ± 0.2	P = 0.01	ns	ns
T <sub>arm</sub> (°C)	After NN	32.3 ± 0.3	24.8 ± 0.9*	27.7 ± 1.2*	83.6	1.1	0.2
	After TSD	33.0 ± 0.5	25.8 ± 0.5*	27.9 ± 1.5*	P < 0.001	ns	ns
T <sub>te</sub> (°C)	After NN	30.7 ± 1.0	12.0 ± 0.9*	27.9 ± 2.1	159.4	1.7	1.8
	After TSD	29.4 ± 1.3	12.0 ± 0.9*	25.7 ± 1.8*	P < 0.001	ns	ns
T <sub>hte</sub> (°C)	After NN	30.3 ± 1.1	12.6 ± 0.9*	27.7 ± 2.1	108.2	0.8	0.5
	After TSD	30.3 ± 1.3	12.9 ± 0.5*	25.4 ± 1.9*	P < 0.001	ns	ns
T <sub>fi2</sub> (°C)	After NN	29.9 ± 1.5	12.2 ± 0.7*	30.9 ± 1.8	131.2	5.2	1.2
	After TSD	29.7 ± 1.5	9.6 ± 0.7* <sup>§</sup>	26.0 ± 1.9* <sup>§</sup>	P < 0.001	P = 0.04	ns
T <sub>fi4</sub> (°C)	After NN	30.0 ± 1.7	11.1 ± 0.8*	29.3 ± 2.0	104.2	5.7	2.1
	After TSD	29.0 ± 1.7	9.0 ± 0.6* <sup>§</sup>	26.7 ± 1.8* <sup>§</sup>	P < 0.001	P = 0.04	ns

Values are means ± SE. Abbreviations are: rectal temperature (T<sub>re</sub>), mean skin temperature (T̄<sub>sk</sub>), arm skin temperature (T<sub>arm</sub>), thenar eminence skin temperature (T<sub>te</sub>), hypothenar eminence skin temperature (T<sub>hte</sub>), finger 2 and finger 4 skin pad temperatures (T<sub>fi2</sub> and T<sub>fi4</sub>), interaction (Inter.). Control is the last 5 min of the control period in ambient air (30-min). CWI is the 30-min Cold Water Immersion (5 °C). Recovery is the last 5 min of the 30-min Recovery period in ambient air. \*: P<0.05 vs control, <sup>§</sup>: P<0.05 vs NN, ns: non significant.

Table 2. Characteristics of the Cold Induced Vasodilation (CIVD) determined from finger 2 and 4 skin temperatures after a normal sleep night (NN) and after 29-h total sleep deprivation (TSD).

Situations	Finger 2		ANOVA		Finger 4		ANOVA	
	After NN	After TSD	TSD ( $F_{1,9}$ )	P	After NN	After TSD	TSD ( $F_{1,9}$ )	P
Number of CIVD, n	1.5 ± 0.3	1.3 ± 0.2	0.3	ns	1.2 ± 0.2	1.5 ± 0.3	0.7	ns
1 <sup>st</sup> CIVD								
Tf <sub>min</sub> (°C)	8.1 ± 0.8	7.4 ± 0.3	1.3	ns	7.8 ± 0.7	7.2 ± 0.4	0.9	ns
Tf <sub>max</sub> (°C)	12.0 ± 0.9	11.7 ± 1.0	4.0	ns	10.9 ± 1.0	10.3 ± 0.9	0.4	ns
Δ Tf <sub>i</sub> (°C)	3.7 ± 0.9	4.3 ± 0.8	0.0	ns	3.0 ± 0.7	3.1 ± 0.7	0.1	ns
Onset time (s)	455 ± 80	530 ± 81	0.1	ns	441 ± 31	386 ± 43	0.9	ns
Peak time (s)	442 ± 77	642 ± 99	3.0	ns	462 ± 119	532 ± 111	0.8	ns
Tf <sub>max</sub> CWI (°C)	13.4 ± 0.9	11.8 ± 1.2	4.0	ns	12.1 ± 1.0	10.7 ± 0.9	2.0	ns
Tf <sub>min</sub> CWI (°C)	7.6 ± 0.6	7.4 ± 0.3	0.1	ns	7.6 ± 0.7	7.1 ± 0.3	0.2	ns
Tf <sub>AUC</sub> (°C.s)	20162 ± 1475	16995 ± 971	9.5	0.01	19846 ± 1553	16818 ± 1034	7.3	0.02

Values are means ± SE. Abbreviations are total sleep deprivation (TSD), Cold Water Immersion (CWI), normal sleep night (NN), Cold Induced Vasodilation (CIVD), ΔTf<sub>i</sub> = Tf<sub>max</sub>-Tf<sub>min</sub>, Area Under the Curve (AUC), interaction (Inter.), non significant (ns). CWI is the 30-min cold water immersion (5 °C).

Table 3. Finger 2 cutaneous vascular conductance (CVC) during Control, Cold Water Immersion (CWI) and Recovery periods after a normal sleep night (NN) and after 29-h total sleep deprivation (TSD).

Situations	After NN	After TSD	ANOVA	
			TSD ( $F_{1,9}$ )	P
Control (PU/mmHg)	0.6 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.9	ns
CWI				
CVC <sub>min</sub> CWI (% baseline)	-91.8 ± 1.6	-83.9 ± 8.3	1.6	ns
CVC <sub>max</sub> CWI (% baseline)	385.9 ± 169.7	240.0 ± 133.7	5.6	0.04
Onset time (s)	146.0 ± 19.6	87.0 ± 10.2	16.5	0.01
Peak time (s)	900.6 ± 125.8	1066.5 ± 143.4	0.3	ns
CVC (% baseline)	143.6 ± 78.0	30.0 ± 40.2	5.2	0.04
CVC <sub>AUC</sub> (%.s)	995.0 ± 181.6	745.3 ± 86.9	5.2	0.04
Recovery (% baseline)	738.1 ± 333.6	225.3 ± 123.9	6.1	0.03

Values are mean ± SE. Abbreviations: total sleep deprivation (TSD), normal sleep night (NN), cold induced vasodilation (CIVD), Area Under the Curve (AUC), non significant (ns). Cutaneous Vascular Conductance (CVC) is expressed as percent change from baseline (i.e. last 5 min of the control period). CWI is the 30-min Cold Water Immersion (5 °C). Recovery is the last 5 min of the 30-min rewarming period in ambient air.



Table 4. Cardiovascular variables during Control, Cold Water Immersion (CWI) and Recovery periods after a normal sleep night (NN) and after 29-h total sleep deprivation (TSD).

		Cold hand test			ANOVA		
		Control	CWI	Recovery	Test's period (F <sub>3-27</sub> )	TSD (F <sub>2-9</sub> )	Inter. (F <sub>3-27</sub> )
HR (bpm)	After NN	67.8 ± 2.1	65.8 ± 1.9*	63.8 ± 1.9*	18.9	2.3	0.6
	After TSD	71.5 ± 2.6	69.5 ± 3.0*	65.0 ± 2.7*	P < 0.001	ns	Ns
SAP (mmHg)	After NN	120.3 ± 4.0	131.7 ± 6.1*	112.7 ± 3.1	12.2	0.1	0.9
	After TSD	118.4 ± 3.3	129.5 ± 3.7*	113.1 ± 3.7	P < 0.001	ns	Ns
DAP (mmHg)	After NN	69.0 ± 2.8	75.3 ± 3.9*	64.9 ± 2.8	18.7	1.5	0.3
	After TSD	66.0 ± 2.2	72.4 ± 2.6*	62.2 ± 2.4	P < 0.001	ns	Ns
MAP (mmHg)	After NN	87.6 ± 2.5	97.5 ± 4.4*	84.3 ± 2.8	18.8	1.0	0.1
	After TSD	85.4 ± 2.5	94.0 ± 3.0*	80.7 ± 2.7	P < 0.001	ns	ns

Values are means ± SE. Abbreviations are: heart rate (HR), systolic arterial pressure (SAP), diastolic arterial pressure (DAP), mean arterial pressure (MAP). Control is the last 5 min of the control period in ambient air (30-min). CWI is the 30-min Cold Water Immersion (5 °C). Recovery is the last 5 min of the 30-min Recovery period in ambient air. \*: P < 0.05 vs control, ns: non significant.

Table 5. Biochemical and hormonal variables

Values		Cold hand test				ANOVA		
		Control	CWI <sub>onset</sub>	CWI <sub>peak</sub>	10-min recovery	Test's period (F <sub>3-27</sub> )	TSD (F <sub>2-9</sub> )	Inter. (F <sub>3-27</sub> )
Endothelin (pg/mL)	After NN	0,82 ± 0.1	0.75 ± 0.1	0.69 ± 0.1	0.77 ± 0.1*	6.0	28.4	1.9
	After TSD	1.64 ± 0.1 <sup>§</sup>	1.41 ± 0.1 <sup>§</sup>	1.18 ± 0.1 <sup>§</sup>	1.44 ± 0.1*	P < 0.05	P < 0.01	ns
Adrenaline (ng/L)	After NN	41.2 ± 6.6	58.0 ± 8.0	94.8 ± 17.9	59.1 ± 15.2*	7.0	3.1	1.0
	After TSD	60.0 ± 8.1	77.1 ± 9.1	109.0 ± 13.2	168.0 ± 31.7*	P < 0.01	ns	ns
Noradrenaline	After NN	388 ± 33	479 ± 36	527 ± 34	467 ± 78*	26.4	3.5	1.9
	After TSD	480 ± 30	518 ± 36	550 ± 28	802 ± 91*	P < 0.01	ns	ns
Dopamine (ng/L)	After NN	16.1 ± 1.3	15.3 ± 1.5	14.0 ± 2.3	18.0 ± 3.9*	5.5	4.5	2.3
	After TSD	20.1 ± 4.2	20.7 ± 3.7	26.7 ± 6.9	26.9 ± 11.9*	P < 0.01	ns	ns
Renin (pg/mL)	After NN	16.0 ± 2.3	17.1 ± 2.9	18.1 ± 2.6	22.0 ± 2.6*	6.0	4	0.9
	After TSD	28.6 ± 6.2	26.5 ± 5.6	26.7 ± 6.9	31.3 ± 5.9*	P < 0.01	ns	ns
Nitrites (µmol/L)	After NN	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.2	0.9 ± 0.2	1.8	1.6	0.6
	After TSD	1.2 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.2	ns	Ns	ns
Nitrates (µmol/L)	After NN	21.8 ± 4.2	22.2 ± 3.7	19.2 ± 4.2	21.9 ± 4.1	0.3	1.4	2.1
	After TSD	25.2 ± 4.2	24.8 ± 3.8	25.0 ± 3.9	24.4 ± 4.2	ns	Ns	ns

Values are means ± SE. Abbreviations are total sleep deprivation (TSD), Cold Water Immersion (CWI), normal sleep night (NN), interaction (Inter.), Blood samples were collected at the end of Control, and during immersion at the lower Tfi value (CWI<sub>onset</sub>) and at the first maximal Tfi (CWI<sub>peak</sub>) whichever the finger, and 10-minutes after the beginning of the rewarming period (Recovery). \*: P < 0.05 vs control, <sup>§</sup>: P < 0.05 vs after NN; ns: non significant.

