



HAL
open science

Altérations cardiaques et vasculaires induites par le syndrome d'apnées obstructives du sommeil: role de HIF-1 et d'un de ses gènes-cibles, l'endothéline-1

Emmanuelle Gras

► To cite this version:

Emmanuelle Gras. Altérations cardiaques et vasculaires induites par le syndrome d'apnées obstructives du sommeil: role de HIF-1 et d'un de ses gènes-cibles, l'endothéline-1. Médecine humaine et pathologie. Université de Grenoble, 2014. Français. NNT: 2014GRENV026 . tel-01553659

HAL Id: tel-01553659

<https://theses.hal.science/tel-01553659v1>

Submitted on 3 Jul 2017

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : Physiologie, Physiopathologie, Pharmacologie

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Emmanuelle GRAS

Thèse dirigée par **Pr. Diane Godin-Ribuot**

préparée au sein du **Laboratoire Hypoxie et Physiopathologie Cardiovasculaires et Respiratoires –Inserm U1042...**
dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du vivant...**

Altérations cardiaques et vasculaires induites par le syndrome d'apnées obstructives du sommeil : rôle de HIF-1 et d'un de ses gènes-cibles, l'endothéline-1

Thèse soutenue publiquement le **28 octobre 2014**,
devant le jury composé de :

Dr. Anne Garnier

MCU, Université Paris-Sud, Rapporteur

Pr. Frédéric Roche

PU-PH, Université Jean Monnet, CHU de St Etienne, Rapporteur

Dr. Cyril Reboul

MCU, Université d'Avignon, Examineur

Dr. Claire Arnaud

CR Inserm, Université de Grenoble, Examineur

Pr. Diane Godin-Ribuot

PU, Université de Grenoble, Directeur

Pr. Jean-Louis Pépin

PU-PH, Université de Grenoble, CHU de Grenoble, Président



REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont au Professeur Diane Godin-Ribuot, qui a su me faire confiance dès le début et m'a orienté dans la voie de la recherche lors de mon stage de master1. Sa pertinence scientifique et ses raisonnements toujours très vifs m'ont permis de progresser tous au long de ces années de thèse. Sans elle, ce travail n'aurait pas pu être réalisé, encore merci.

Je tenais également à remercier les membres du jury Dr. Anne Garnier, Pr. Frédéric Roche, Dr. Cyril Reboul, Dr. Claire Arnaud et Pr. Jean-Louis Pépin qui ont accepté d'évaluer ce travail. J'ai particulièrement apprécié les remarques constructives ainsi que la discussion qui a eu lieu durant l'oral de soutenance.

Je remercie également les directeurs du laboratoire Pr. Christophe Ribuot, Pr. Patrick Lévy puis ensuite Pr. Jean-Louis Pépin de m'avoir accueillie au sein de leur équipe de recherche.

Merci au Pr. Geneviève Desrumaux et au Dr. Hélène Thibault pour leur expertise et le temps consacré aux échographies et à l'analyse des données. Merci de m'avoir accordé un temps que je sais précieux.

Claire et Elise, merci pour votre dynamisme, pour les conseils dans les manips et pour les discussions scientifiques que nous avons pu avoir. Votre aide et votre expérience m'ont été très profitables.

Ma reconnaissance se dirige aussi vers Emeline Lemarié, Marie Baldazza, Sandrine Brasseur, Dominique Bonnot puis Audrey Pfrimmer qui ont su m'aider tout au long de ces années par leurs conseils (pour les manips ou les commandes pas toujours évidentes) mais également pour leur soutien et leurs attentions.

Mille mercis aux "Girls d'HP2"!! Jessica, Marielle, Amandine, Mélanie, Perle et Guillaume et Sylvain aussi (un peu moins Girls...) merci pour tous ces moments au labo et en dehors. Pour les fous rires, les footings et les coups de blues aussi! Sans vous, cela aurait été nettement moins facile, c'est certain!!! Bonne suite à tous!

Anne, Emilie et Marion, vos encouragements n'ont jamais failli durant ces 4 années. Merci pour tous ces moments partagés et ceux qui viendront je l'espère!

Les "biologistes", vous qui êtes là depuis la première année de bio ou qui vous êtes greffés au fur et à mesure. L'aventure de la thèse, je crois que nous l'avons faite un peu tous ensemble. Merci à vous.

Merci aussi à ma famille, mes parents et mon frère, qui m'ont soutenue et encouragée dans cette aventure tumultueuse. Merci pour m'avoir toujours permis et donner les moyens de faire ce que je souhaitais.

Et à Manu, qui à découvert les joies et les peines de la thèse et de la rédaction, merci pour l'aide que tu as su m'apporter, à ta manière!

RESUME

Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil est un problème de santé publique affectant plus de 5 % de la population, se caractérisant par des obstructions répétées des voies aériennes durant la nuit. L'hypoxie intermittente (HI) qui en résulte, induit des complications cardiovasculaires (hypertension, athérosclérose, insuffisance cardiaque). Le but de cette thèse est d'explorer le remodelage cardiovasculaire induit par l'HI et de comprendre le rôle de HIF-1 et de l'endothéline (ET-1) dans ces modifications. Pour cela nous avons exposé à 14 jours d'HI des souris *HIF1 α ^{+/-}* ou traitées avec un antagoniste des récepteurs à l'ET-1. Chez les souris contrôles, nous avons observé un épaississement de la paroi aortique, une inflammation systémique et locale dans l'aorte ainsi qu'une hypertrophie du ventricule droit qui sont absents chez les souris *HIF1 α ^{+/-}* ou traitées au bosentan. La délétion de *HIF1 α* prévient également l'augmentation de contractilité observée dans le ventricule gauche après HI. En conclusion HIF-1 et ET-1 semblent fortement impliqués dans le remodelage vasculaire et myocardique induit par l'HI.

Mots-clefs : Syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS), Remodelage cardiovasculaire, HIF-1 alpha, Endothéline, Inflammation, Hypertrophie

ABSTRACT

Obstructive sleep apnea is a public health problem affecting more than 5% of the population, characterized by repeated airway obstructions during sleep. The resulting intermittent hypoxia (IH) induces cardiovascular complications (hypertension, atherosclerosis, heart failure). The aim of this thesis is to characterize the cardiovascular remodeling induced by IH and understand the role of HIF-1 and endothelin (ET-1) in these alterations. For this, we exposed to IH for 14 days *HIF1 α ^{+/-}* mice or mice treated with an ET-1 receptor antagonist. Control mice developed thickening of the aortic wall, systemic and local inflammation in the aorta and right ventricular hypertrophy that were absent in *HIF1 α ^{+/-}* or bosentan-treated mice. *HIF1 α* deletion also prevents the increase in left ventricular contractility observed after HI. In conclusion, HIF-1 and ET-1 appear to be strongly involved in the vascular and myocardial remodeling induced by IH.

Key words: Obstructive sleep apnea (OSA), Cardiovascular remodeling, HIF-1 alpha, Endothelin, Inflammation, Hypertrophy

Table des matières

INTRODUCTION.....	11
I. Syndrome d'apnées obstructives du sommeil	12
1. Définition et diagnostique du SAOS	12
2. Prévalence du SAOS	13
3. Conséquences directes du SAOS.....	14
a. Modifications des pressions intra-thoraciques et abdominales	15
b. Micro-éveils.....	15
c. Hypoxie intermittente	15
4. SAOS et risque cardiovasculaire	19
5. Les traitements du syndrome d'apnées obstructives du sommeil.....	21
a. La chirurgie	21
b. L'orthèse d'avancée mandibulaire	21
c. La pression positive continue	22
II. L'athérosclérose, sa formation et son évolution.....	24
1. Le développement de l'athérosclérose	24
a. La dysfonction endothéliale	24
b. L'inflammation.....	25
c. La chape fibreuse et la thrombose	26
2. Impact du SAOS sur l'athérosclérose.....	28
III. De l'hypertrophie à l'insuffisance cardiaque.....	30
1. L'hypertrophie myocardique	30
2. L'insuffisance cardiaque	34
3. Impact du SAOS sur l'insuffisance cardiaque.....	37
IV. HIF-1 et hypoxie intermittente	40
1. Le facteur de transcription sensible à l'hypoxie HIF-1	40
2. HIF-1 et athérosclérose.....	44
3. HIF-1 et insuffisance cardiaque.....	45
V. L'endothéline	47
1. Structures et fonctions de l'endothéline et de ses récepteurs	47
2. ET-1 et athérosclérose	48
3. ET-1 et insuffisance cardiaque	49
OBJECTIFS	50

MATERIELS ET METHODES	52
I. Animaux	53
1. Etude du système endothéline	53
2. Etude de l'implication de HIF-1	53
3. Génotypage des souches de souris	54
II. Modèle d'hypoxie intermittente	55
III. Techniques d'expérimentation animale.....	57
1. Echographie transthoracique	57
2. Mesures de pression intracardiaque du ventricule gauche	57
3. Prélèvements de différents organes	58
IV. Techniques de mesures de paramètres biologiques sur tissus frais	59
1. Isolation des splénocytes	59
2. Migration des splénocytes	59
3. Prolifération des splénocytes	60
V. Techniques d'analyses et de dosages biochimiques sur tissus congelés	61
1. Mesure de l'épaisseur intima-média aortique.....	61
2. Extraction séparée des fractions protéiques cytosoliques et nucléaires.....	61
3. Western blot	62
4. Dosage de l'activité de NF- κ B	63
5. Dosage des cytokines dans la paroi aortique	63
6. Dosage de la desmosine et de l'hydroxyproline.....	64
7. PCR quantitative.....	64
VI. Analyses statistiques.....	65
RESULTATS	66
Partie I	67
I. Article I : “HIF-1 and endothelin promote an inflammatory vascular remodelling upon intermittent hypoxia”	67
II. Résultats complémentaires de l'article I et interprétation	96
1. Dosage d'ICAM dans la paroi aortique.....	96
2. Mesure de l'épaisseur intima-média chez les souris <i>PHD1</i>	97
3. Dosage d'hydroxyproline et de desmosine dans la paroi aortique	98
Partie II.....	100
I. Article II : “HIF-1 regulates myocardial function and remodeling in response to chronic exposure to intermittent hypoxia”	100

II. Résultats complémentaires de l'article II et interprétation	125
1. Masse du ventricule droit et du ventricule gauche en fonction de la durée d'exposition à l'HI	125
2. Hypertension pulmonaire et remodelage du ventricule droit chez les souris bosentan ...	125
3. Courbes pression/volumes chez les souris <i>HIF1α</i>	127
4. Dosage myocardique de HIF-1.....	128
5. Dosage myocardique de l'endothéline et du facteur natriurétique auriculaire	129
DISCUSSION	131
I. Hypoxie intermittente et inflammation / remodelage vasculaire.....	132
1. Rôle de HIF-1 dans le remodelage vasculaire	132
2. Rôle de l'ET-1 dans le remodelage vasculaire	133
3. Impact du SAOS sur l'apparition de l'athérosclérose.	134
4. Critiques et perspectives de la partie I.....	135
II. Hypoxie intermittente et fonction/remodelage myocardique.	137
1. Rôle de HIF-1 dans les altérations myocardiques induites par l'HI.	138
a. Impact sur le ventricule droit.....	138
b. Impact sur le ventricule gauche	138
2. Rôle de l'ET-1 dans les altérations myocardiques induites par l'HI.	139
a. Impact sur le ventricule droit.....	139
b. Impact sur le ventricule gauche	140
3. SAOS et insuffisance cardiaque	141
4. Critiques et perspectives.....	143
III. Nouveaux traitements et perspectives générales	145
IV. Article III : Targeting the ROS-HIF-1-endothelin axis as a therapeutic approach for the treatment of sleep apnea-related cardiovascular complications	147
CONCLUSION	181
BIBLIOGRAPHIE	183

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

Ang II: Angiotensine II

ARNm : Acide ribonucléique messenger

CC : Corps carotidiens

CE : Cellules endothéliales

CML : Cellules musculaires lisses

CRP : Protéine C réactive

EIM : Epaisseur intima-media

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

ET-1 : Endothéline-1

ET-A ou B : Récepteurs à l'endothéline de type A ou B

FNA : Facteur natriurétique auriculaire

FNB : Facteur natriurétique de type B

HI : Hypoxie intermittente

HIF-1 : Facteur de transcription sensible à l'hypoxie

HRE : Hypoxia response element

HTAP : Hypertension artérielle pulmonaire

IAH : Index d'apnées hypopnées

IC : Insuffisance cardiaque

IGF-1 : Insulin-like growth factor-1

KO : Knock-out

LDL : Lipoprotéines de basse densité

NAD(P)H oxydase : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate oxidase

NF- κ B : Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NO : Monoxyde d'azote

OAM : Orthèse d'avancée mandibulaire

PHD-1, 2 ou 3 : Prolyl-hydroxylase 1, 2 ou 3

PPC : Pression positive continue

SAOS : Syndrome d'apnées obstructives du sommeil

SERCA2a : SarcoEndoplasmic Reticulum Ca⁺⁺ ATPase

SNS : Système nerveux sympathique

TA/TE : Temps d'accélération du flux pulmonaire/ Temps éjection du ventricule droit

VD : Ventricule droit

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VG : Ventricule gauche

Liste des figures

Figure 1. Les différentes sévérités des évènements respiratoires en fonction de la gravité du collapsus pharyngé.....	12
Figure 2. Exemple de tracé de polysomnographie	13
Figure 3. Schéma récapitulatif des conséquences délétères de l'hypoxie intermittente induite par le SAOS.....	19
Figure 4. Pourcentage cumulatif de survenue d'évènements cardiovasculaires mortels ou non mortels	20
Figure 5. Schéma montrant l'action d'une orthèse mandibulaire et le dégagement des voies aérienne.....	22
Figure 6. Schéma montrant les voies aériennes supérieures normales, lors de l'apnée et en présence de la Pression Positive Continue.....	22
Figure 7. Figure schématisant les différentes étapes de la formation de la plaque d'athérosclérose	27
Figure 8. Schéma récapitulatif des acteurs de la dysfonction endothéliale engendrée par le SAOS....	29
Figure 9. Schéma des voies activées lors de l'hypertrophie physiologique et pathologique	31
Figure 10. Activité des corps carotidiens en normoxie et en réponse à l'hypoxie chez des animaux normaux et insuffisants cardiaques	36
Figure 11. Schéma des mécanismes et conséquences de l'interaction entre l'hypertrophie cardiaque, l'hypertension artérielle et l'hypoxie intermittente sur la réponse des chémorécepteurs carotidiens	39
Figure 12. Schéma des différents acteurs de la régulation de la stabilisation et de l'activité de HIF-1 en normoxie et en hypoxie	41
Figure 13. Schéma représentant différents gènes cibles de HIF-1 ainsi que les domaines dans lesquels son activité intervient	42
Figure 14. Schéma des cascades de signalisation activées par l'hypoxie intermittente qui stabilisent HIF-1 α et favorisent sa synthèse	44
Figure 15. Schéma de la synthèse de l'endothéline par les cellules endothéliales ainsi que son action sur les cellules musculaires lisses via ses récepteurs ET-A et ET-B.....	48
Figure 16. Dispositif d'hypoxie intermittente.....	56
Figure 17. Schéma d'un Transwell ® avec une coupe transversale ainsi que son fonctionnement.....	60
Figure 18. Induction d'ICAM-1 par l'hypoxie intermittente dans l'aorte.....	96
Figure 19. Effet de la délétion de <i>PHDI</i> sur le remodelage vasculaire induit par l'hypoxie intermittente (HI).....	97
Figure 20. Variation du taux d'hydroxyproline dans la paroi aortique de souris après hypoxie intermittente (HI) ou normoxie (N).....	98
Figure 21. Variation du taux de desmosine dans la paroi aortique de souris après hypoxie intermittente (HI) ou normoxie (N)	98
Figure 22. Effet du traitement par bosentan durant l'hypoxie intermittente (HI) sur le rapport TA/TE. Mesures réalisées avant et après 2 semaines d'HI ou de normoxie (N).....	126
Figure 23. Effet du traitement par bosentan durant l'hypoxie intermittente (HI) sur l'indice de Fulton (VD/VG+S). Mesures effectuées après 2 semaines d'HI ou de normoxie (N)	127
Figure 24. Dosage de HIF-1 myocardique dans les fractions nucléaires et cytosoliques. Dosages effectués chez des souris WT et <i>HIF1α^{+/-}</i> après 2 semaines d'hypoxie intermittente (HI) ou de normoxie (N).....	128
Figure 25. Dosage de l'ARNm de HIF-1 α myocardique après exposition à l'hypoxie intermittente (HI) ou la normoxie (N). Dosages effectués chez des souris WT ou <i>HIF1α^{+/-}</i>	129
Figure 26. Effet de la délétion partielle de HIF1 α sur la transcription de pré-pro-ET-1 et de FNA après deux semaines d'hypoxie intermittente (HI) ou en condition normoxique (N).....	130

Figure 27. Figure résumant les conséquences de l'hypoxie intermittente (HI) induite par le SAOS sur les atteintes cardiovasculaires..... 182

Liste des tableaux

Tableau 1. Description des différences entre l'hypertrophie physiologique et pathologique	33
Tableau 2. Mélange de PCR utilisé pour le géotypage	55
Tableau 3. Récapitulatif des primers utilisés pour géotyper les différentes souches de souris	55
Tableau 4. Récapitulatif des différents anticorps utilisés lors des expériences de Western blot.....	62
Tableau 5. Résumé des amorces utilisées pour la PCR quantitative	65
Tableau 6. Effet de la durée d'exposition à l'HI sur le remodelage cardiaque. Indice de Fulton, masse du VG +S et du VD rapportés au poids corporel (PC).	125

INTRODUCTION

I. Syndrome d'apnées obstructives du sommeil

Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil ou SAOS, se caractérise par l'obstruction partielle ou totale des voies aériennes supérieures durant la nuit. Ces obstructions répétées sont associées à une qualité de sommeil médiocre et donc à de la somnolence diurne.

Plusieurs raisons en font un problème majeur de santé publique. En effet, la somnolence diurne est associée à une augmentation des accidents de la route. La prévalence de la pathologie est en constante progression car elle intimement liée à celle de l'obésité. Et surtout, parce qu'il est maintenant reconnu que le SAOS est un facteur de risque indépendant de maladies cardiovasculaires.

1. Définition et diagnostique du SAOS

Une obstruction complète est une apnée, elle est définie par la cessation totale du flux respiratoire pour une période ≥ 10 secondes. Une hypopnée correspond à une diminution du flux respiratoire suffisante pour induire une diminution de la saturation sanguine en oxygène. Les différences entre l'apnée et l'hypopnée sont décrites dans la Figure 1. L'apnée et l'hypopnée sont suivies toutes les deux, la plupart du temps, par un micro-éveil. Il faut également différencier les apnées centrales des apnées obstructives. Les apnées centrales ont pour origine le dysfonctionnement des centres du système nerveux central régulant la respiration. On quantifie la sévérité du SAOS par l'index d'apnées ou hypopnées par heure (IAH), qui représente le nombre d'évènements par heure. Un diagnostic de SAOS est établi en présence d'un IAH ≥ 5 associé à une somnolence diurne (Young et al. 1993; Thorpy 2012).

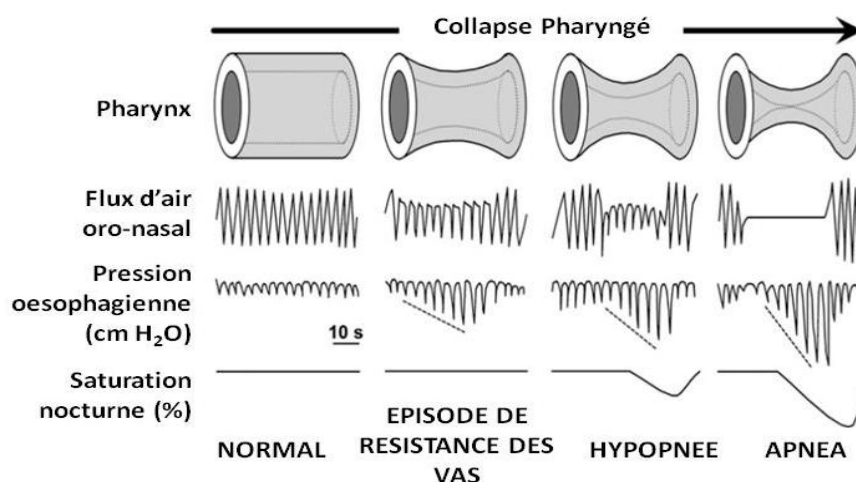


Figure 1. Les différentes sévérités des évènements respiratoires en fonction de la gravité du collapsus pharyngé. VAS : voies aériennes supérieures. (d'après (Dematteis et al. 2009).

La polysomnographie reste le moyen de référence de diagnostic du SAOS. Elle consiste en l'enregistrement simultané de plusieurs paramètres physiologiques durant une nuit de sommeil. Elle est composée d'un électroencéphalogramme, un électromyogramme, un électro-oculogramme, un transducteur de pression nasale mesurant le flux d'air oronasal, un oxymètre mesurant la saturation en oxygène sanguine, un brassard de pression artérielle, un microphone au niveau de la trachée enregistrant les ronflements, un capteur au niveau des jambes pour analyser leur mouvement lors du sommeil ainsi qu'une ceinture d'impédance thoraco-abdominale enregistrant les mouvements respiratoires (Figure 2)

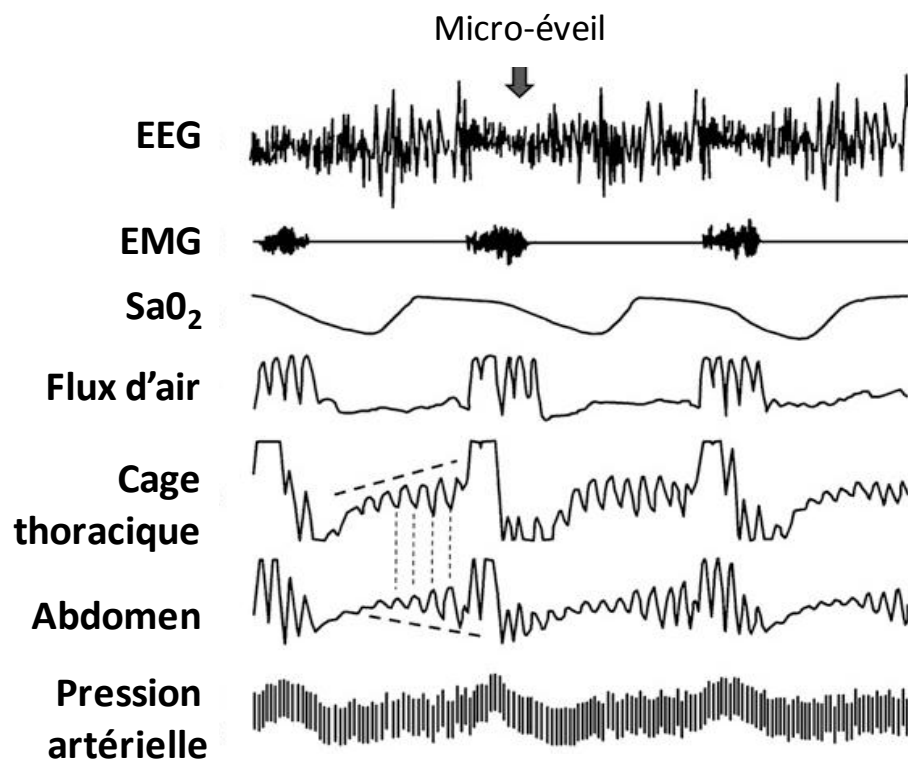


Figure 2. Exemple de tracé de polysomnographie montrant la fragmentation du sommeil, les fluctuations de saturation en oxygène, les efforts respiratoires thoraco-abdominaux et l'augmentation de la pression artérielle lors des événements respiratoires. EEG, Electroencéphalogramme ; EMG, Electromyogramme ; SaO₂, Saturation en oxygène (d'après (Dematteis et al. 2009).

Cet examen (Figure 2) permet de déceler la présence d'apnées et d'hypopnées et de quantifier la sévérité du SAOS en comptabilisant le nombre d'évènements par heure.

2. Prévalence du SAOS

Le SAOS est une pathologie sous diagnostiquée. En effet, on estime que 82% des hommes et 93% des femmes atteints de SAOS sont non-diagnostiqués (Young et al. 1997).

Aux Etats-Unis, sa prévalence est comprise entre 15 à 20 millions d'adultes, ce qui correspond aux mêmes données que le diabète (Young et al. 1993). Aujourd'hui aux Etats-Unis la prévalence chez les hommes d'un SAOS modéré (IAH > 15) est estimée à 10% entre 30 et 49 ans et à 17% entre 40 et 70 ans. Pour les femmes la prévalence est plus faible puisqu'elle est de 3% pour la première tranche d'âge et de 9% entre 50 et 70 ans (Peppard et al. 2013). En France, la prévalence de cette pathologie est estimée à plus de 7% de la population générale (Meslier et al. 2007). On peut également noter que la prévalence du SAOS augmente avec l'âge alors que la sévérité associée semble diminuer (Bixler et al. 1998). Le statut hormonal fait partie des raisons pouvant expliquer que les femmes sont moins atteintes que les hommes. En effet, les femmes présentant un syndrome des ovaires polykystiques ont plus de risque de développer un SAOS (Vgontzas et al. 2001). De plus, les femmes ménopausées sans traitement hormonal substitutif présentent une prévalence plus élevée comparativement aux femmes ménopausées avec traitement de substitution ou aux femmes pré-ménopausées (Bixler et al. 2001). Le poids influence également la prévalence du SAOS puisqu'il a été montré qu'un gain de 10% de poids entraîne une augmentation d'environ 32% de l'IAH (Peppard et al. 2000). Le tabagisme et la consommation d'alcool sont connus comme facteurs aggravant de SAOS. En effet, comparés à des non-fumeurs, les fumeurs ont un risque plus élevé de ronflement et de présenter un syndrome modéré à sévère (Wetter et al. 1994). La consommation d'alcool impacte sur la tonicité des voies aériennes supérieures et la prise d'une seule dose d'alcool avant la nuit majore l'IAH ainsi que la désaturation sanguine lors des événements nocturnes (Mitler et al. 1988).

3. Conséquences directes du SAOS

Chez la personne saine le sommeil profond est le sommeil réparateur. Durant cette phase on observe une nette diminution du rythme cardiaque, de la pression artérielle ainsi que des résistances vasculaires systémiques. Chez l'apnéique, les nombreux événements respiratoires nocturnes altèrent cette diminution d'activité du système cardiovasculaire. En effet, à chaque apnée, le patient est soumis à des modifications des pressions intra-thoracique et abdominale, à une diminution de la saturation en oxygène qui répétée à de nombreuses reprises se traduit par de l'hypoxie intermittente (HI) et enfin à des micro-éveils à la fin des apnées. Chacune de ses modifications impacte à différents degrés le système cardiovasculaire.

a. Modifications des pressions intra-thoraciques et abdominales

Une apnée obstructive se produit suite à un collapsus pharyngé. Comme ce n'est pas une apnée centrale, il persiste une activité respiratoire et des efforts respiratoires vont induire des modifications de pressions intra-thoracique et intra-abdominale. Il y a une diminution progressive de la pression intra-thoracique au cours de l'apnée qui reviendra à la normale à la reprise de la respiration, en parallèle la pression intra-abdominale va augmenter (Figure 1 et 2). Cette nette diminution de la pression intra-thoracique, qui peut aller jusqu'à -80 cm H₂O (Shiomi et al. 1991), a des conséquences sur le système cardiovasculaire. Il résulte de cette pression négative dans le thorax, une diminution de la pression dans l'oreillette droite ainsi qu'un collapse partiel de la veine cave en aval du diaphragme (Virolainen et al. 1995). La pression développée iso-volumique du ventricule gauche (VG) est elle augmentée durant l'apnée (Virolainen et al. 1995). La pression sanguine moyenne tend également à être augmentée suite à la diminution de pression intra-thoracique (Somers et al. 1993). Les vaisseaux se trouvant dans la cage thoracique subissent des modifications structurelles durant l'apnée. Ainsi un modèle qui simule l'apnée obstructive chez le chien et qui induit une pression négative de -25 mmHg dans la cage thoracique, aboutit à une augmentation de 6,5 % du diamètre aortique (Peters et al. 1988). Chez l'homme, il est possible de simuler une apnée grâce à la manœuvre de Mueller (inspiration forcée à glotte fermée), ce qui permet de voir une augmentation de pression transmurale au niveau aortique (Magder et al. 1983).

b. Micro-éveils

Le micro-éveil arrive au cours ou à la fin de l'apnée. Il permet une tonification des muscles trachéaux et donc une réouverture du pharynx ce qui entraîne le passage de l'air et la remontée de la saturation en oxygène (Figure.1). Il a été démontré que les micro-éveils pouvaient à eux seuls entraîner une augmentation de pression systolique et diastolique à chaque survenue (Morgan et al. 1996). En plus de causer des perturbations dans le système cardiovasculaire, les micro-éveils répétés entraînent une fragmentation du sommeil qui est la cause de la somnolence diurne associée au SAOS. En effet, les patients apnéiques ont plus de risque d'avoir un accident de la route que les personnes non-apnéiques (Teran-Santos et al. 1999) mais également plus de risque d'accidents du travail (Lindberg et al. 2001).

c. Hypoxie intermittente

Il existe une troisième composante qui apparaît lors d'apnées répétées : l'hypoxie intermittente (HI). A chaque occlusion, l'oxygénation est interrompue et la saturation

sanguine en oxygène diminue (Figure 1 et 2). Il est reconnu actuellement que l'HI est la principale cause des conséquences cardiovasculaires associées au SAOS. Brooks et ses collaborateurs ont notamment montré dans un modèle chez le chien que la fragmentation du sommeil seule n'induit pas d'hypertension dans la journée comparativement aux apnées obstructives seules (Brooks et al. 1997). Un modèle d'HI chez la souris montre une élévation de pression artérielle après 14 jours d'HI mais également à chaque cycle d'hypoxie (Dematteis et al. 2008).

L'hypoxie intermittente a de nombreuses conséquences sur l'organisme et elle va notamment induire une activation du système nerveux sympathique, une production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), de l'inflammation, la libération de substances vasoactives ainsi qu'une élévation de la pression sanguine (Kohler et Stradling 2010).

Des modèles animaux et cellulaires permettant d'isoler la composante hypoxique des autres composantes ont permis de mettre en évidence la formation d'espèces ERO. En effet, Peng et ses collaborateurs ont montré que les cycles répétés d'hypoxie et de réoxygénation pouvaient entraîner une dysfonction du complexe I de la chaîne mitochondriale, une augmentation de l'activité de la NAD(P)H oxydase et de la xanthine oxydase ainsi qu'une diminution de l'activité des molécules antioxydantes (Peng et al. 2003). Chez l'animal, de nombreuses observations démontrent que l'HI entraîne une augmentation du stress oxydant. Une équipe a notamment montré une augmentation de l'oxydation des protéines, des lipides ainsi que de l'ADN, dans le cerveau de souris exposées à l'HI après seulement 5 jours (Xu et al. 2004). Notre laboratoire a également montré cette conséquence, avec une augmentation de la quantité d'anions superoxydes dans les cœurs de rats exposés à l'HI (Ramond et al. 2013; Totoson et al. 2013). Grâce à un modèle d'hypoxie intermittente chez l'homme sain, Pialoux et ses collaborateurs ont montré une augmentation significative de l'oxydation de l'ADN après une exposition de 4 jours à l'HI (Pialoux et al. 2009). Chez le patient, où le facteur hypoxique n'est pas isolé, on retrouve également une forte corrélation entre la présence de marqueurs du stress oxydatif et l'IAH (Carpagnano et al. 2003; Alonso-Fernandez et al. 2009; Monneret et al. 2010). De plus, le taux de molécules antioxydantes est lui aussi fortement diminué, ce qui aggrave le stress oxydant déjà présent (Barcelo et al. 2006). Plusieurs équipes font un lien entre SAOS et stress oxydant (Jelic et al. 2008; Lavie et Lavie 2009) (A lire pour revue {Lavie, 2014 #340}).

L'HI seule peut aussi induire une activation de différents facteurs inflammatoires. Il

est possible d'observer sur un modèle cellulaire d'HI, utilisant des cellules HeLa ou des cellules endothéliales, une activation du facteur de transcription pro-inflammatoire NF- κ B, proportionnelle à la durée d'exposition (Ryan et al. 2005; Ryan et al. 2007). Les modèles animaux permettent eux aussi d'apporter de nombreuses preuves de l'activation de l'inflammation par l'HI et ce dans différents organes. Ainsi, il est facile d'observer une inflammation dans la paroi des vaisseaux, avec la présence de NF- κ B augmentée ainsi qu'une infiltration de leucocytes (Arnaud et al. 2011). Le tissu adipeux viscéral est lui aussi impacté et montre une augmentation du nombre de macrophages, et de sa capacité à produire des cytokines pro-inflammatoires (Poulain et al. 2014). Il faut noter que l'inflammation observée dans les modèles animaux ne se cantonne pas à une inflammation locale mais elle est également systémique, démontrée par une activité de prolifération plus importante des splénocytes de souris ayant été exposées à l'HI (Arnaud et al. 2011). Les démonstrations de la présence d'inflammation chez le patient SAOS sont nombreuses. Des études montrent une augmentation des cytokines circulantes comme IL-8, MCP-1 dans le plasma des patients (Ohga et al. 2003). Les monocytes extraits de patients présentent une capacité augmentée de production de CRP ou IL-6 (Yokoe et al. 2003). Il existe également une corrélation entre la quantité d'IL-6 mesuré dans le condensat respiratoire et l'IAH des patients (Carpagnano et al. 2003). Dans la même continuité, on observe que la sévérité du SAOS est proportionnelle au taux sérique de CRP (Shamsuzzaman et al. 2002). Une étude similaire faite sur une population d'enfants apnéiques montre elle-aussi une association indépendante entre la sévérité du SAOS et le niveau de CRP sérique (Li et al. 2008).

L'HI a la capacité d'induire la libération de substances vasoactives, comme l'endothéline-1 (ET-1), qui vont favoriser et renforcer la survenue de l'hypertension. Ainsi un modèle d'HI chez le rat montre une augmentation de l'expression tissulaire d'ET-1, de son précurseur, la big-endothéline (big-ET-1), mais aussi de ses récepteurs ET-A, qui ont de puissants effets vasoconstricteurs (Belaidi et al. 2009). Une augmentation de sensibilité à l'endothéline a également été observée sur des artères mésentériques (Allahdadi et al. 2005) et sur des carotides (Lefebvre et al. 2006). Chez le patient des études montrent une augmentation des taux plasmatiques d'ET-1 (Gjorup et al. 2007) et de big-ET-1 (Jordan et al. 2005). Les variations d'endothéline sont corrélées avec les changements de pressions systémiques et l'IAH (Phillips et al. 1999). Les rôles de l'endothéline seront plus largement développés dans le paragraphe V.

L'HI induit également une activation du système nerveux sympathique (SNS). Cette

activation est observable après 30 jours d'HI et engendre une élévation de la pression artérielle chez le rat (Lesske et al. 1997). On peut observer également chez le rat une augmentation de sécrétion de noradrénaline plasmatique après exposition à l'HI (Fletcher et al. 1992; Gonzalez-Martin et al. 2009). Dans la continuité, Fletcher et ses collaborateurs ont montré que le SNS était nécessaire pour engendrer l'augmentation de pression sanguine induite par l'hypoxie (Fletcher et al. 1992). Un modèle d'HI chez le sujet sain, démontre que seulement 14 nuits d'HI suffisent pour entraîner une activation accrue du système sympathique (Tamisier et al.). Dans une étude sur des enfants atteints de SAOS, une corrélation entre les taux urinaires de noradrénaline et d'adrénaline avec la sévérité de la pathologie a été mise en évidence, montrant ainsi une activation du tonus sympathique (O'Driscoll et al. 2011).

Finalement, l'HI va induire une forte stabilisation associée à une transcription du facteur sensible à l'hypoxie, HIF-1. Ce dernier va intervenir, du fait de sa quantité importante de gènes-cible, dans la majorité des modifications que nous avons vues ci-dessus. La stabilisation de HIF-1 ainsi que ses différentes actions seront abordées dans la partie IV.

Comme le résume la Figure 3, l'HI a des conséquences dramatiques car elle va augmenter la vasoconstriction, le stress oxydant, l'inflammation ainsi que le tonus sympathique. Toutes ces modifications sont extrêmement délétères notamment pour le système cardiovasculaire entraînant une mortalité accrue des patients apnéiques.

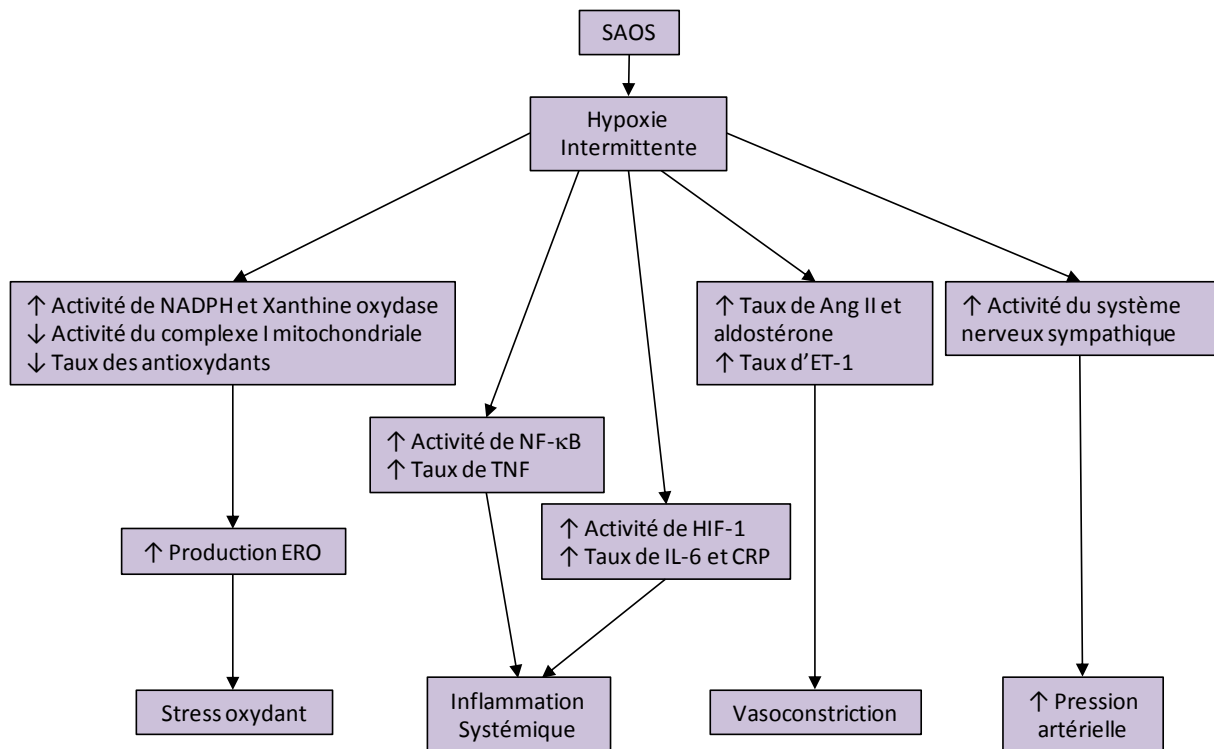


Figure 3. Schéma récapitulatif des conséquences délétères de l'hypoxie intermittente induite par le SAOS qui induisent un stress oxydant, une inflammation systémique, une vasoconstriction et une augmentation de la pression artérielle. Ang II, l'angiotensine II; ET-1, endothéline-1; ERO, espèces réactives de l'oxygène ; NF-κB, Nuclear Factor-kappa B ; TNF, Facteur de nécrose tumorale ; HIF-1, Facteur induit par l'hypoxie-1 ; IL-6, Interleukine-6 ; CRP, protéine C réactive d'après(Kohler et Stradling 2010)

4. SAOS et risque cardiovasculaire

Le SAOS est considéré comme un facteur de risque cardiovasculaire indépendant, au même titre que le tabagisme ou l'obésité (McNicholas et Bonsignore 2007). Plusieurs études, dont celle de Marin et al., ont démontré que les événements cardiovasculaires fatals ou non fatals sont significativement augmentés chez les patients SAOS et cela d'autant plus que l'IAH est important (Figure 4) (Marin et al. 2005). Une équipe ayant fait un suivi de 7 ans, montre que les patients apnéiques ont un risque de survenue de maladies cardiovasculaires significativement augmenté et ce indépendamment de l'indice de masse corporelle, de la pression artérielle et du tabagisme, notamment pour l'apparition d'hypertension ou de maladie des artères coronaires (Peker et al. 2002).

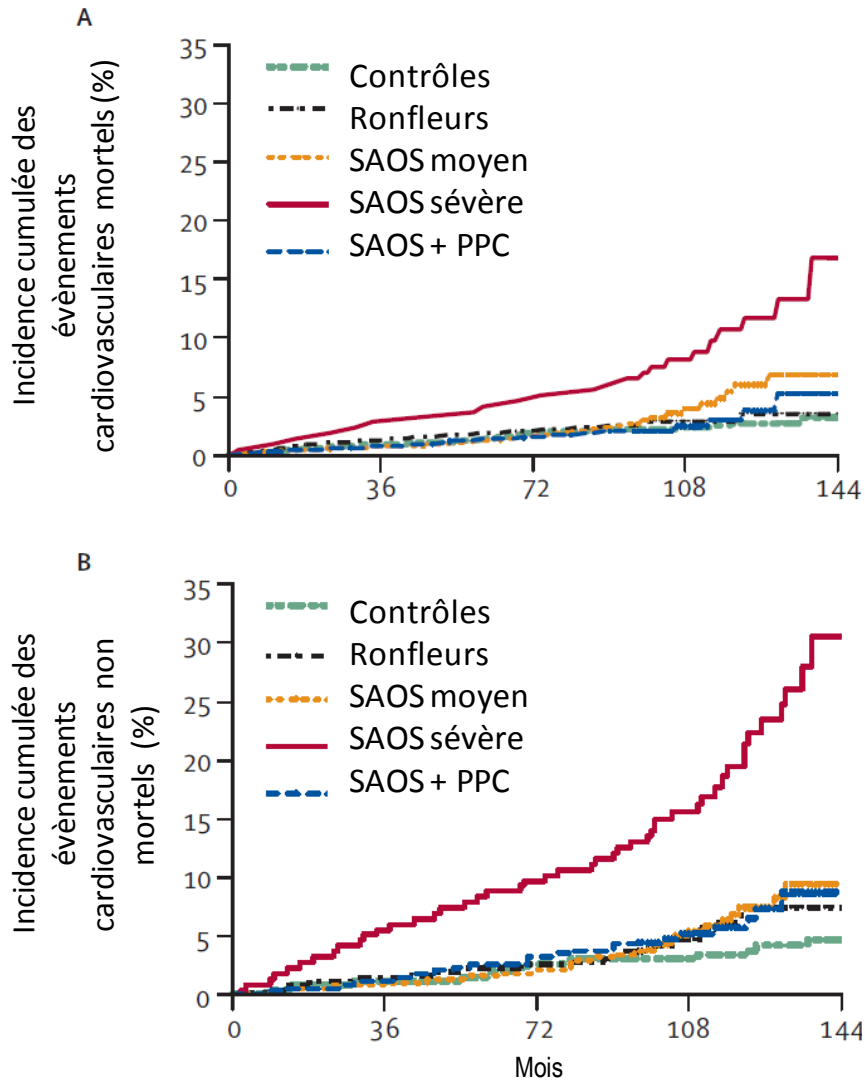


Figure 4. Pourcentage cumulatif de survenue d'évènements cardiovasculaires mortels (A) ou non mortels (B) chez des sujets contrôles, des ronfleurs, des apnéiques moyen, sévère (SAOS moyen ou sévère) ou des apnéiques traités (SAOS + PPC) (d'après (Marin et al. 2005))

En ce qui concerne l'hypertension, on sait depuis longtemps que la pression sanguine augmente de façon linéaire avec l'IAH (Young et al. 1997). Les patients SAOS présentent aussi un risque élevé d'arythmies surtout à la fin de l'épisode apnéique, le risque relatif d'apparition d'arythmies étant de 18 fois supérieur chez ces personnes (Monahan et al. 2009). Le risque d'accident vasculaire ischémique est lui aussi augmenté de façon importante chez les patients SAOS (Kiely et McNicholas 2000). Le risque d'accident vasculaire cérébral, une équipe a montré un risque 3 fois supérieur lorsque le SAOS est modéré ou sévère (Redline et al. 2010). Pour la maladie coronarienne, les patients ayant un IAH ≥ 30 ont 68% plus de risque de développer cette pathologie que les patients ayant un IAH < 5 . Le risque d'insuffisance cardiaque est également augmenté de 58% chez les patients avec un IAH sévère

(Gottlieb et al. 2010). La fonction endothéliale diminue fortement en association avec une hypoxémie intermittente élevée (Seif et al. 2013). Le SAOS a donc un effet aggravant et surtout prédisposant à de multiples maladies cardiovasculaires qui nécessitent le développement de traitements spécifiques pour cette maladie.

5. Les traitements du syndrome d'apnées obstructives du sommeil

Il existe différents types de traitements ou de dispositifs pour contrer les conséquences délétères du SAOS, tels que la chirurgie, l'orthèse d'avancée mandibulaire et surtout la pression positive continue ou PPC.

a. La chirurgie

L'objectif de la chirurgie est d'agrandir les voies aériennes supérieures dans le but de lever l'obstruction nocturne. Parmi les interventions possibles, il y a l'ablation d'une partie du palais mou, l'ablation de la luette, l'ablation des amygdales ou la rectification de la cloison nasale. Les méthodes chirurgicales semblent moins efficaces que les autres traitements. Une nouvelle technique de chirurgie, l'uvulopalatoplastie assistée par laser, qui proposait une résection simultanée de la luette et des amygdales, semblait plus prometteuse. Toutefois la PPC reste significativement plus efficace que cette technique pour réduire le nombre d'évènements respiratoires par heure (Lin et al. 2006).

b. L'orthèse d'avancée mandibulaire

Cette orthèse, portée pendant le sommeil, permet d'avancer la mandibule et/ou la langue toujours dans le but d'ouvrir les voies aériennes supérieures (Figure 5). L'orthèse semble cependant moins efficace que la PPC, puisqu'une revue montre que pour les paramètres de l'IAH, la saturation minimum en oxygène et le nombre de micro-éveils, les résultats chez les patients sous PPC sont meilleurs que ceux obtenus chez les patients utilisant une orthèse (Lim et al. 2006). Toutefois dans cette même étude, ils montrent que les patients ont une légère préférence pour l'orthèse d'avancée mandibulaire. Malgré cela, l'orthèse d'avancée mandibulaire obtient une assez faible compliance puisque 50% des personnes abandonnent cet appareillage au bout de 3 ans (Clark et al. 2000).

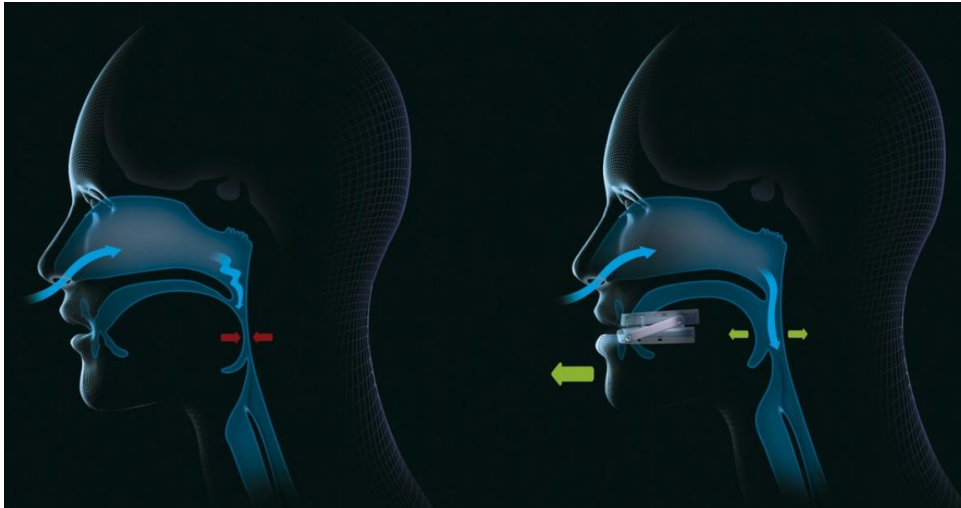


Figure 5. Schéma montrant l'action d'une orthèse mandibulaire et le dégagement des voies aériennes qui en découlent.

c. La pression positive continue

La pression positive continue ou PPC est également portée pendant le sommeil, et permet de maintenir les voies aériennes ouvertes en permanence grâce à un masque nasal qui envoie de l'air dans les voies aériennes (Figure 6). Il permet ainsi d'éviter l'obstruction des voies aériennes supérieures et donc la survenue des apnées.

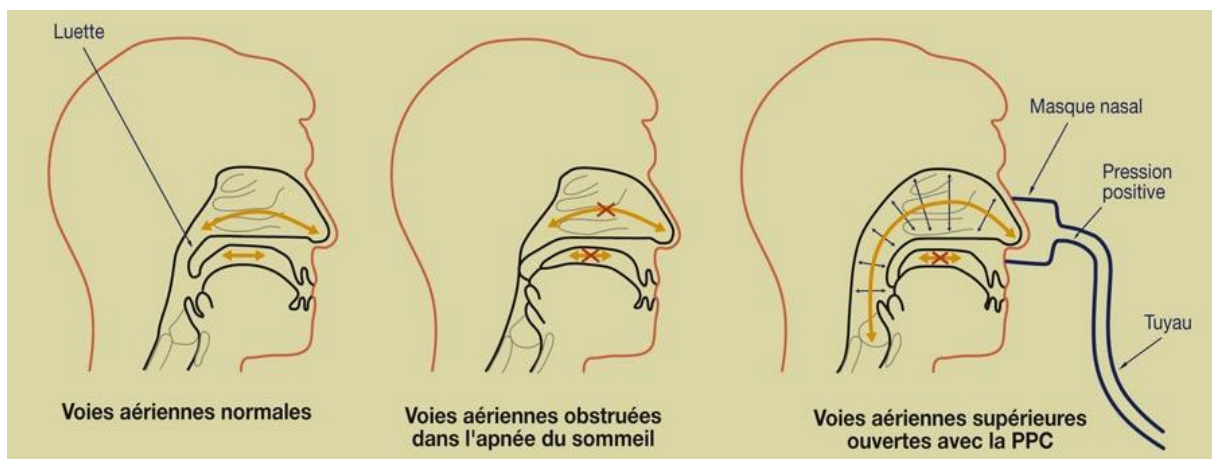


Figure 6. Schéma montrant les voies aériennes supérieures normales, lors de l'apnée et en présence de la Pression Positive Continue (d'après la Revue du praticien).

Ce dispositif est relativement opérant et il existe de nombreuses études montrant son efficacité sur les différentes conséquences du SAOS. En effet, sur l'inflammation notamment, on observe une normalisation des niveaux plasmatiques de TNF-alpha, d'IL-8, d'ICAM-1, de CRP et d'IL-6 avec l'utilisation de la PPC (Ohga et al. 2003; Yokoe et al. 2003; Ryan et al. 2005). Cependant il faut noter que certaines études sont en contradiction avec ces résultats et

montrent que notamment le taux de CRP n'est pas modifié par la PPC. Kohler et ses collaborateurs ont réalisé un essai randomisé et contrôlé qui a montré que 4 semaines de PPC n'avaient pas d'influence sur les taux de CRP, d'IFN gamma et d'IL-6 (Kohler et al. 2009). Une autre étude démontre un effet positif de la PPC sur le niveau de CRP mais en revanche le TNF-alpha n'est pas diminué (Nural et al. 2013).

En ce qui concerne le stress oxydatif, le traitement par PPC diminue la production d'ERO par les neutrophiles de patients apnéiques (Schulz et al. 2000). Les dérivés du monoxyde d'azote (NO) sont augmentés après la thérapie (Schulz et al. 2000). Le 8-isoprostane, marqueur du stress oxydatif, est augmenté dans le condensat exhalé des apnéiques et significativement diminué après l'utilisation de la PPC (Carpagnano et al. 2003). Barcelo et ses collaborateurs observent aussi une diminution de la peroxydation lipidique mais ils nuancent l'efficacité de la PPC en soulignant qu'elle ne restaure que partiellement seulement le statut antioxydant des patients (Barcelo et al. 2000; Barcelo et al. 2006).

En ce qui concerne l'hypertension, une méta-analyse montre que la PPC est significativement efficace mais qu'elle engendre une diminution de la pression artérielle moyenne de seulement -1,69 mmHg (Haentjens et al. 2007). Des études ont également montré que chez des patients qui ne possèdent pas de somnolence diurne, la PPC n'a pas d'effet bénéfique sur la pression artérielle, même pour des apnéiques sévères avec un IAH > 30 (Barbe et al. 2001; Robinson et al. 2006).

La PPC reste souvent mal tolérée d'autant plus chez les patients qui ne présentent pas de somnolence diurne et qui n'en ressentent pas les bénéfices (Kohler et Stradling 2010). Néanmoins ces patients présentent quand même un risque cardiovasculaire élevé qui doit être pris en charge. Il faut ajouter à cela que, d'une façon générale, l'observance et la bonne utilisation (plus de 4h par nuit au minimum) de la PPC ne sont pas optimales. Ainsi, 43 à 89% des patients sont signalés comme non adhérents au traitement (Weaver et Grunstein 2008).

Il apparaît donc, au vu de ces études, que le PPC est relativement efficace, mais ne semble pas être la panacée de toutes les conséquences délétères du SAOS de plus son observance n'est pas toujours très bonne. Il est donc nécessaire de trouver des thérapeutiques alternatives ou complémentaires qui pourraient être médicamenteuses.

II. L'athérosclérose, sa formation et son évolution

Le chapitre qui suit propose de rappeler brièvement la chronologie du développement d'athérosclérose. L'impact du SAOS sur le développement de cette pathologie vasculaire sera ensuite abordé.

1. Le développement de l'athérosclérose

L'athérosclérose est une pathologie complexe avec de multiples causes comme l'hypercholestérolémie mais surtout l'inflammation. Elle est définie par un épaissement asymétrique de l'intima (Stary et al. 1995) des artères de gros et moyen diamètre. Cet épaissement se compose d'une accumulation de cellules et facteurs inflammatoires (Massberg et al. 2002) ainsi que d'une accumulation de lipides et d'éléments fibreux (Lusis 2000). L'évolution de cette maladie peut aboutir à une rupture de la plaque, une thrombose et un accident vasculaire (Stary et al. 1994; Stary et al. 1995).

a. La dysfonction endothéliale

Elle constitue la première étape du développement de l'athérosclérose et va entraîner une activation des cellules endothéliales. Lors de cette dysfonction, l'endothélium ne peut plus assurer son rôle protecteur et régulateur. On note surtout une diminution de la disponibilité du NO qui a de multiples conséquences, comme une vasoconstriction accrue. La diminution de NO peut être due, entre autres, à une augmentation des ERO et en particulier des anions superoxyde qui vont le transformer en péroxynitrite (ONOO^-), un radical nitré très délétère (Bauersachs et Widder 2008). Les flux turbulents vont favoriser l'expression d'ERO et diminuer la production de facteurs anti-inflammatoires et de NO (Harrison et al. 2006). De plus, un flux sanguin turbulent modifie la forme des cellules endothéliales qui adoptent une conformation polygonale et ne sont plus orientées dans le sens du flux sanguin (Gimbrone 1999). Cette conformation particulière peut entraîner une augmentation de l'espacement des cellules, ce qui va favoriser la pénétration de macromolécules comme des lipoprotéines de basse densité ou Low Density Lipoprotein (LDL) au travers des jonctions entre les cellules endothéliales (Lusis 2000). Les bifurcations artérielles, où le flux est particulièrement turbulent, sont des lieux prédisposant tout particulièrement à la formation de plaques d'athérosclérose. Les LDL qui s'amoncellent dans l'espace sous-endothélial vont subir des modifications, le plus souvent une oxydation (Cyrus et al. 1999) mais cela peut aussi être une attaque enzymatique qui aboutit à la formation de phospholipides qui ont la capacité d'activer les cellules endothéliales (Cushing et al. 1990; Herbst et al. 1999; Bochkov 2007). De plus,

comme la dysfonction endothéliale entraîne une accumulation d'ERO, celle-ci va augmenter le phénomène d'oxydation des LDL. L'activation des cellules endothéliales par l'accumulation et l'oxydation de LDL, associée à un flux turbulent, semble être l'étape initiatique de la formation de la plaque d'athérosclérose.

b. L'inflammation

L'accumulation des LDL oxydés initie la réponse inflammatoire, activant les cellules endothéliales mais également les macrophages présents dans la paroi vasculaire. Ces différents types cellulaires vont alors produire des cytokines pro-inflammatoires. De plus, les cellules endothéliales activées vont exprimer à leur surface des molécules d'adhésion recrutant des cellules inflammatoires (Eriksson et al. 2001). Il faut également noter que les cellules endothéliales soumises à un stress hémodynamique important (flux turbulent) vont exprimer plus de molécules d'adhésion. En effet, ce stress hémodynamique entraîne des modifications du phénotype des cellules endothéliales avec une activation pro-inflammatoire de NF- κ B et une expression de VCAM-1 (Dai et al. 2004). En parallèle, les plaquettes sont recrutées sur le site de la lésion. L'adhésion plaquettaire coïncide avec l'expression de gènes inflammatoires par les cellules endothéliales et précède l'arrivée des leucocytes. Il faut aussi noter que les glycoprotéines à la surface des plaquettes participent également à l'activation des cellules de l'endothélium (Gawaz et al. 1998). Les molécules d'adhésion comme VCAM ou les sélectines (P ou E), vont permettre l'adhésion des monocytes, phénomène également appelé "rolling". Des modèles animaux ont pu montrer par des constructions de KO chez la souris, qu'une absence de chémokines ou de molécules d'adhésion diminuait la formation de plaques d'athérosclérose (Boring et al. 1998; Collins et al. 2000). Ceci montre bien que le recrutement des cellules inflammatoires est essentiel à l'initiation et à la progression de l'athérosclérose. Des souris KO pour le récepteur aux LDL, qui élimine les LDL de la circulation sanguine, développent énormément de plaques lorsqu'alimentées avec un régime riche en cholestérol. Lorsque ces souris sont croisées avec des souris KO pour le récepteur de MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1 ou CCL2), elles ne développent que très peu de plaques (Gu et al. 1998). Ceci montre une nouvelle fois le rôle primordial de l'inflammation dans le développement de la plaque d'athérosclérose.

L'activation des cellules endothéliales va engendrer la sécrétion de cytokines, de facteurs pro-inflammatoires ou encore de facteurs de croissance. Une cytokine primordiale est le M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor). Ce facteur de croissance a la

particularité d'induire une prolifération et une différenciation des monocytes en macrophages. Il va également induire l'expression de récepteurs CD36 à la surface des macrophages. Les récepteurs CD36 sont qualifiés de « scavenger » car ils permettent l'internalisation par les macrophages des LDL oxydés afin de les éliminer (Ishibashi et al. 1990; Podrez et al. 2007). Ceci va transformer les macrophages en cellules spumeuses qui vont majorer l'inflammation régnant au sein de la lésion athérosclérotique. En effet, les cellules spumeuses deviennent présentatrices d'antigènes et vont permettre le recrutement des lymphocytes T (Hansson et al. 2006).

c. La chape fibreuse et la thrombose

La libération importante des cytokines, mais également la présence des LDL oxydés, vont participer à la prolifération et à la migration des cellules musculaires lisses sous-jacentes (Grainger et al. 1994; Lusis 2000; Pidkovka et al. 2007). Les cellules spumeuses sont gorgées de lipides et ne peuvent plus capter les LDL oxydés qui s'accumulent en gouttelettes lipidiques dans l'espace extracellulaire. Tous ces composants vont constituer ce qu'on appelle le noyau nécrotique qui est recouvert par une chape fibreuse. Avec la formation du noyau nécrotique la lumière du vaisseau se réduit progressivement. Cependant le principal problème qui peut survenir est surtout la rupture de la plaque d'athérosclérose et de l'endothélium qui engendre la formation d'un caillot et peut ainsi causer un accident vasculaire. On parle donc de vulnérabilité de la plaque lorsque la chape fibreuse s'affine. La plaque est vulnérable surtout lorsqu'elle est extrêmement riche en cellules inflammatoires, car leur action va favoriser la déstructuration de la matrice extracellulaire (van der Wal et al. 1994). En effet, les macrophages vont sécréter des protéases, plus spécifiquement des métalloprotéases, qui vont digérer la matrice extracellulaire. Les lymphocytes T participent également à ce phénomène en produisant de l'interféron gamma qui va inhiber la production des protéines de la matrice extracellulaire par les cellules musculaires lisses (Libby 2000). Toutes les différentes étapes de la formation de la plaque sont résumées dans la Figure 7.

Après ces brefs rappels sur la formation de la plaque d'athérosclérose, nous pouvons conclure que le stress oxydant et l'inflammation sont des acteurs majeurs de l'initiation et de la progression de la plaque d'athérosclérose.

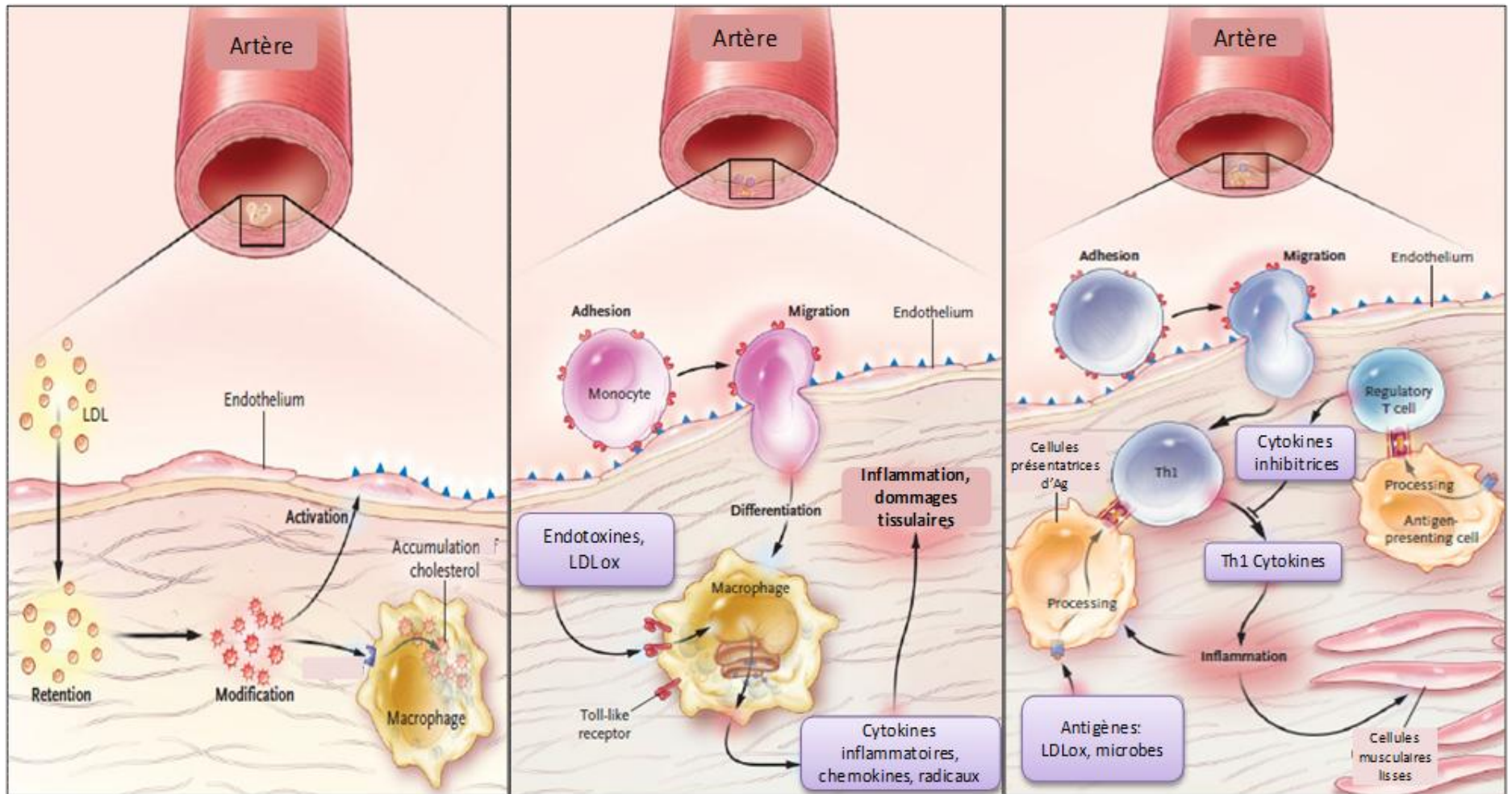


Figure 7. Figure schématisant les différentes étapes de la formation de la plaque d'athérosclérose. On retrouve la dysfonction endothéliale et l'inflammation qui sont décrites de façon plus détaillée dans le texte (d'après (Hansson 2005)).

2. Impact du SAOS sur l'athérosclérose

L'augmentation de l'épaisseur intima média (EIM) ainsi que celle de la vitesse de l'onde de pouls sont des marqueurs précoces du développement de l'athérosclérose chez l'homme (Saijo et al. 2009; Katakami et al. 2014). Ces modifications se retrouvent souvent chez le patient apnéique. Par exemple l'EIM de la carotide commune est corrélée avec le temps passé avec une saturation en oxygène inférieure à 90% (Schulz et al. 2005) ou encore avec l'IAH (Ciccione et al. 2012). Il existe également une association entre la désaturation en O₂ et l'augmentation de la vitesse de l'onde de pouls (Korcarz et al. 2010).

La dysfonction endothéliale semble être l'une des premières étapes de la formation de la plaque athérosclérotique. De nombreuses études montrent une diminution de la fonction endothéliale chez le patient apnéique (Kato et al. 2000; Ip et al. 2004; Nieto et al. 2004). La mesure de la vasodilatation régulée par le flux, qui permet d'estimer la fonction endothéliale, est corrélée négativement avec l'IAH et les valeurs de CRP (Panoutsopoulos et al. 2012). Le SAOS va par ailleurs favoriser l'apoptose des cellules endothéliales, diminuer la biodisponibilité du NO ainsi que la capacité de régénération de l'endothélium (Ip et al. 2000; El Solh et al. 2007; Jelic et al. 2008). Le stress oxydant qui joue une part importante dans l'apparition de la dysfonction endothéliale et dans la progression de la maladie athéromateuse est lui-aussi fortement augmenté chez le patient apnéique, comme nous l'avons vu précédemment. Ainsi les patients apnéiques possèdent une dysfonction vasculaire associée à une augmentation de marqueurs du stress oxydant tels que le 8-isoprostane ou le 15-F_{2t}-isoprostane (Monneret et al. 2010; Del Ben et al. 2012). Il en est de même pour les marqueurs de l'inflammation, qui elle aussi joue un rôle essentiel dans l'initiation et le développement de l'athérosclérose. Il existe une corrélation entre les marqueurs inflammatoires de l'athérosclérose et l'EIM carotidienne (Ciccione et al. 2014). Les substances vasoconstrictrices, comme l'ET-1, qui favorisent la progression de la dysfonction endothéliale, sont fortement augmentées chez les patients SAOS (Phillips et al. 1999; Zamarron-Sanz et al. 2006; Gjorup et al. 2007). La Figure 8 résume tous les mécanismes de la dysfonction endothéliale activés par le SAOS.

En résumé, le SAOS semble avoir pour conséquences d'activer tous les mécanismes responsables de la dysfonction endothéliale et de l'athérosclérose. En effet, le SAOS engendre une augmentation du stress oxydant, une inflammation ainsi qu'une augmentation des substances vasoconstrictrices. Tous ces mécanismes sont principalement activés par l'HI.

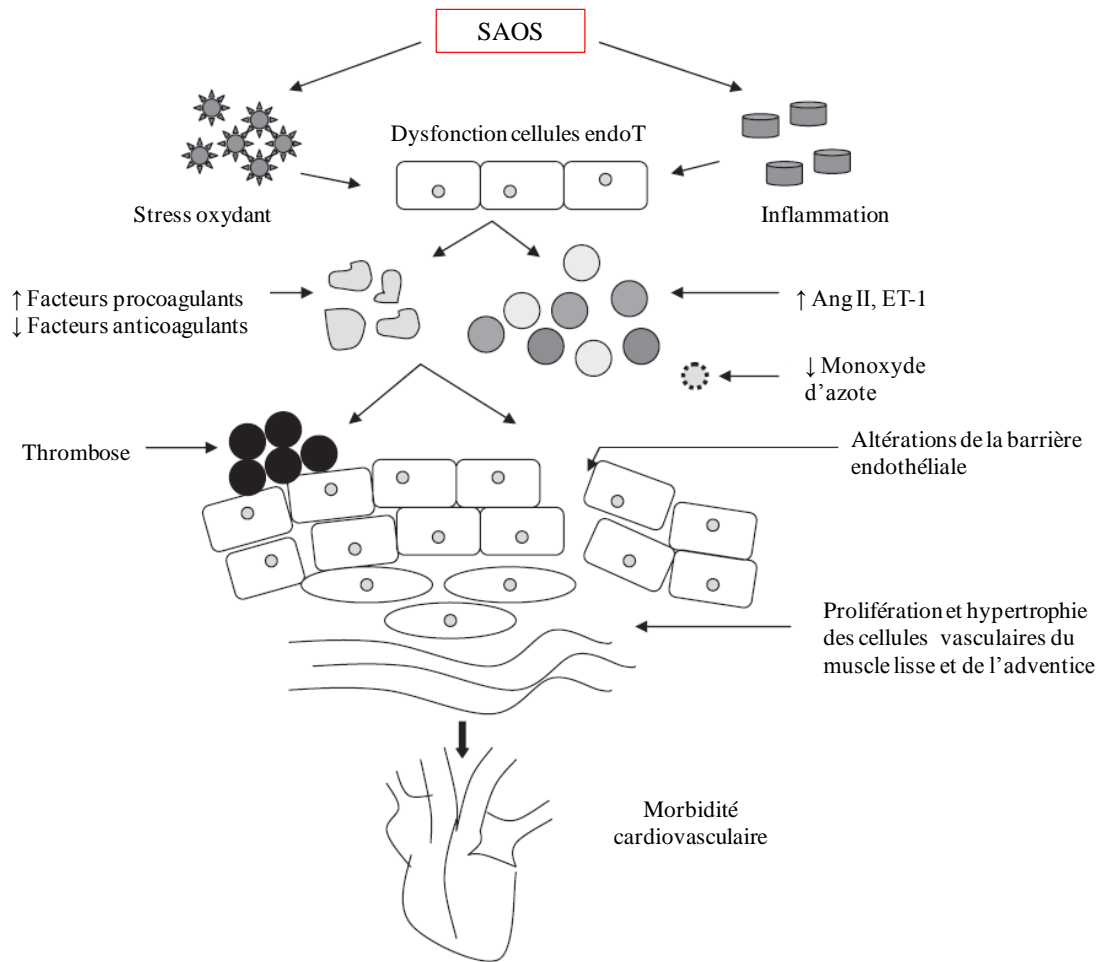


Figure 8. Schéma récapitulatif des acteurs de la dysfonction endothéliale engendrée par le SAOS, entraînant l'augmentation de la morbidité cardiovasculaires. On retrouve l'action prédominante du stress oxydant et de l'inflammation mais également de l'endothéline dans le développement de la dysfonction endothéliale. Ang II, Angiotensine II ; ET-1, endothéline-1 (d'après (Budhiraja et al. 2007))

III. De l'hypertrophie à l'insuffisance cardiaque

Le chapitre qui suit propose de rappeler brièvement la physiopathologie de l'hypertrophie et le passage à l'insuffisance cardiaque. L'impact du SAOS sur le développement de ces pathologies sera ensuite abordé.

1. L'hypertrophie myocardique

Le cœur peut devenir hypertrophié pour différentes raisons qui peuvent être physiologiques ou pathologiques. Après la naissance, les cellules du cœur se multiplient peu et la seule façon de pouvoir augmenter la taille du cœur est d'augmenter la taille des myocytes (Nakagawa et al. 1988; Soonpaa et al. 1996).

Des situations physiologiques, comme l'entraînement intensif, entraînent une augmentation de la taille des cardiomyocytes à la fois en longueur et en largeur. Le cœur grossit mais de façon uniforme en gardant des proportions normales entre la taille des parois et celle des chambres ventriculaires (van Berlo et al. 2013). Les voies de signalisation activées pour augmenter la masse cardiaque en conditions physiologiques et pathologiques sont différentes.

En situation physiologique, l'augmentation de masse cardiaque est associée à une fonction cardiaque préservée ou améliorée (Schaible et Scheuer 1981) et cette hypertrophie est bien sûr réversible. Elle s'effectue par exemple en réponse à la grossesse ou à l'entraînement intensif (Bernardo et al. 2010; Weeks et McMullen 2011). La cascade de signalisation de l'hypertrophie cardiaque physiologique commence par l'activation du récepteur « Insulin-like Growth Factor 1 » (IGF-1) qui va induire la voie PI3kinase-Akt dans le but de provoquer une hypertrophie en engendrant la croissance des cardiomyocytes (McMullen et al. 2004). On remarque d'ailleurs qu'un entraînement de natation chez le rat, qu'il soit de courte ou de longue durée, entraîne une augmentation de l'expression cardiaque de l'ARNm d'IGF-1 (Scheinowitz et al. 2003). Les mécanismes responsables de l'hypertrophie physiologique sont représentés dans la partie gauche de la Figure 9 ainsi que dans le Tableau 1.

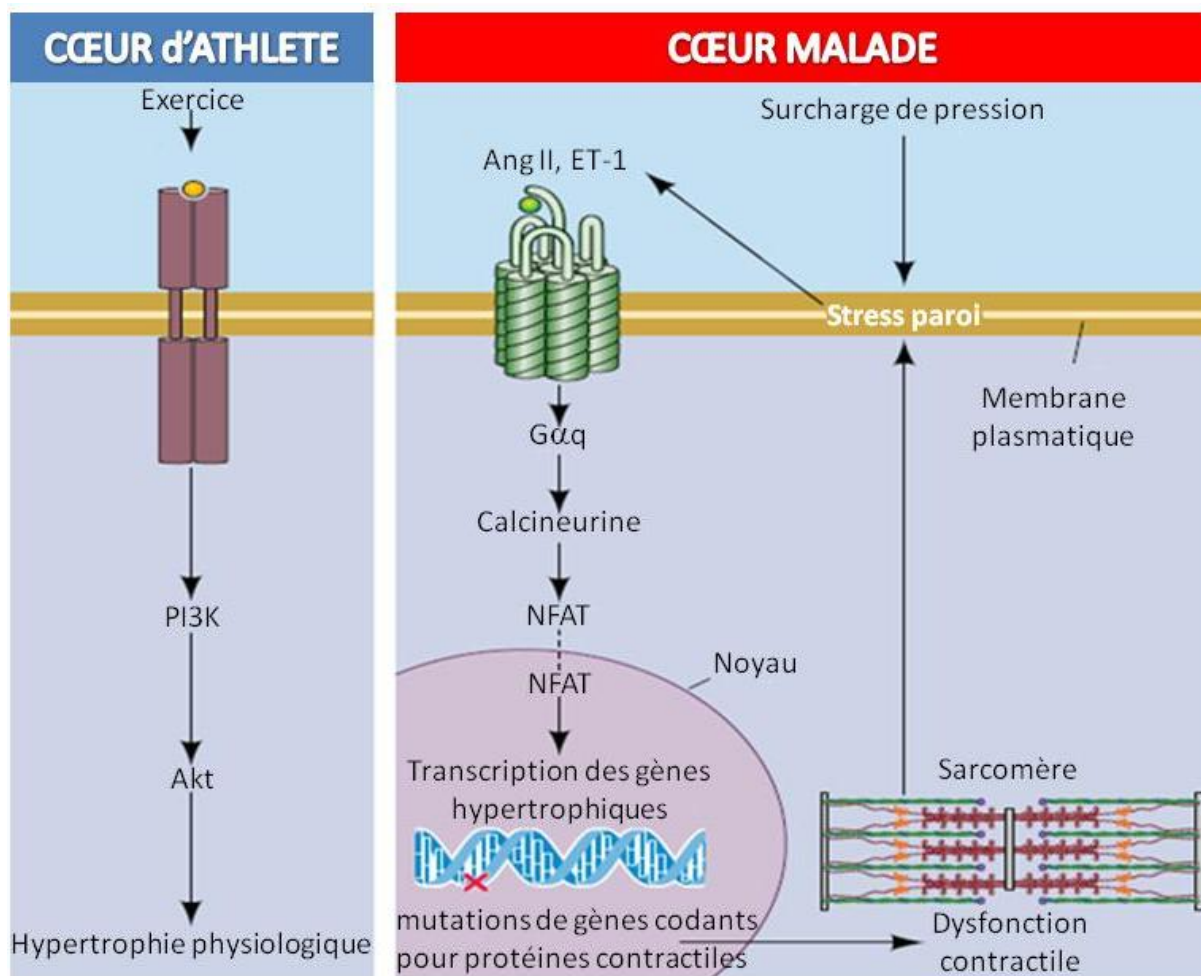


Figure 9. Schéma des voies activées lors de l'hypertrophie physiologique et pathologique. A gauche, cascade de signalisation lors de l'hypertrophie physiologique chez le cœur d'athlète. A droite, cascade de signalisation du cœur malade aboutissant à la dysfonction contractile (d'après (Weeks et McMullen 2011)).

En revanche, l'hypertrophie cardiaque pathologique se produit en réponse à un stimulus pathologique comme l'hypertension, l'infarctus du myocarde ou encore une coronaropathie (Bernardo et al. 2010). L'hypertrophie pathologique induit de la fibrose, une diminution de la fonction cardiaque, une mort cellulaire et elle est irréversible.

Les parois du cœur possèdent des mécanorécepteurs qui permettent de répondre au stress pariétal et de déclencher un phénomène hypertrophique en réponse à la surcharge de pression (Hoshijima 2006). L'étirement de la paroi va activer notamment l'angiotensine II (Ang II) et l'ET-1 (Sadoshima et al. 1993). Ces deux peptides hypertrophiques exercent leurs activités via des récepteurs couplés à la protéine G, qui vont ensuite activer la calcineurine et le facteur de transcription NFAT pour induire la transcription de gènes hypertrophiques. Des souris surexprimant la sous-unité Gαq (Comme dans la Figure 9) développent une hypertrophie avec une diminution de la fonction contractile similaire à celle observée chez le

patient insuffisant cardiaque. Elles présentent également une surexpression de gènes caractéristiques de l'hypertrophie pathologique tels que ceux des peptides natriurétiques ou encore de la forme beta de la chaîne légère de myosine (D'Angelo et al. 1997). Par opposition, il n'y a aucune activation de l'Ang II ou de l'ET-1 dans le cœur de l'homme sportif (Neri Serneri et al. 2001). On peut noter également que les profils d'expression d'ARNm chez des souris ayant un cœur hypertrophié par entraînement ou par rétrécissement aortique sont très différents. Les souris avec un rétrécissement aortique vont exprimer d'avantage le facteur natriurétique auriculaire, le facteur natriurétique de type B (FNB), la chaîne légère de myosine et l'actine du muscle squelettique. Les souris entraînées ne présentent pas un profil d'expression d'ARNm très modifié (Perrino et al. 2006; Bernardo et al. 2010). Des rats SHR avec une hypertrophie cardiaque induite par l'hypertension vont surexprimer les ARNm de l'ET-1, de l'Ang II et du FNB (Iemitsu et al. 2001). Il y a donc bien un profil très spécifique d'expression d'ARNm et de protéines associées à l'hypertrophie cardiaque pathologique.

La fibrose se traduit par l'accumulation des fibres de collagène, principalement de type I, qui vont participer à la rigidité des ventricules et détériorer l'efficacité des phases de contraction et de relaxation myocardique (Brilla et al. 1992). Le facteur de croissance de transformation, TGF- β 1, qui fait partie des plus importants médiateurs de l'activation de la fibrose cardiaque, est sous le contrôle de l'Ang II, elle-même très fortement activée dans cette pathologie, favorisant ainsi la fibrose (Rosenkranz 2004).

La mort cellulaire dans l'hypertrophie cardiaque pathologique est plus présente car des voies de signalisation pro-apoptotiques sont activées contrairement à ce que l'on observe dans l'hypertrophie physiologique (Kang et al. 2004). Les souris surexprimant la sous-unité $G\alpha$, une des voies activée par l'hypertrophie pathologique, présentent plus de mort de cardiomyocytes par apoptose (Geng et al. 1999).

Les protéines sarcomériques sont elles-aussi affectées par l'hypertrophie pathologique. On observe ainsi une diminution de la SarcoEndoplasmic Reticulum Ca^{++} ATPase (SERCA2a) qui est une protéine associée à la fonction contractile. Ainsi la modification de ces protéines va aboutir à la diminution de la fonction cardiaque aussi bien diastolique que systolique (Muller et al. 2003) (Ito et al. 2001).

Le cœur malade va aussi modifier sa source énergétique de prédilection en diminuant l'oxydation des acides gras au profit du métabolisme du glucose. Ce mécanisme au départ protecteur et qui permet de produire plus d'ATP avec une molécule d'oxygène va devenir

délétère à long terme. En effet, plus la pathologie avance, plus le cœur va devenir insulino-résistant et aura des difficultés à utiliser le glucose réduisant ainsi la capacité du myocarde à produire suffisamment d'énergie pour fonctionner (Neubauer 2007).

Tous ces résultats confirment bien que les voies d'activation ainsi que les mécanismes mis en place lors de l'hypertrophie physiologique ou pathologique sont très différents et n'aboutissent pas à la même finalité. Le tableau ci-après résume les différences qui existent entre ces deux types d'hypertrophie. Comprendre les mécanismes et les événements initiateurs de l'hypertrophie cardiaque est essentiel car il existe une association entre l'hypertrophie et la dysfonction myocardique, et l'apparition de l'insuffisance cardiaque (Pfeffer et Braunwald 1990; Vasan et al. 1997).

Caractéristiques	Hypertrophie Pathologique	Hypertrophie physiologique
Stimuli	Maladie Surcharge de pression ou de volume Cardiomyopathie	Entraînement physique Croissance postnatal Grossesse
Morphologie cardiaque	↑ volume des myocytes Formation de nouveaux sarcomères ↑ volume du cœur	↑ volume des myocytes Formation de nouveaux sarcomères ↑ volume du cœur
Fibrose cardiaque	OUI	NON
Apoptose	OUI	NON
Expression de gène foetaux	↑ FNA, FNB, b-HMC, actine squelettique a	Peu modifiée
Expression de gènes associés à la fonction contractile	↓ a-HMC, SERCA2a	Normale ou augmentée
Fonction cardiaque	Diminuée	Normale ou augmentée
Métabolisme	↓ oxydation des acides gras ↑ utilisation du glucose	Amélioration de l'oxydation des acides gras et de l'utilisation du glucose
Réversibilité	NON	OUI
Association avec IC et mortalité	OUI	NON

Tableau 1. Description des différences entre l'hypertrophie physiologique et pathologique. (d'après (Bernardo et al. 2010))

2. L'insuffisance cardiaque

Une étude anglaise a montré, sur une population de près de 4000 personnes de plus de 45 ans, qu'environ 3% de cette population avait une insuffisance cardiaque définie ou supposée (Davies et al. 2001). L'insuffisance cardiaque (IC) engendre une diminution de la qualité de vie des patients qui en sont atteints avec comme principaux symptômes le manque d'énergie, l'essoufflement ou encore la somnolence (Blinderman et al. 2008). L'insuffisance cardiaque se définit comme l'incapacité du myocarde à assurer un apport en oxygène suffisant pour répondre aux besoins de l'organisme. Elle concerne le ventricule droit, le gauche ou les deux et dans ce cas on parle d'insuffisance globale. Elle peut avoir différentes origines comme l'hypertension ou l'infarctus du myocarde où le cœur a perdu une partie de sa capacité contractile. Des mutations des protéines sarcomériques conduisent à des cardiomyopathies hypertrophiques de formes familiales (Figure 9) (Morimoto 2008). Le cœur ne pouvant plus répondre aux besoins de l'organisme va dans un premier temps s'hypertrophier pour répondre à la surcharge permanente, on dit alors qu'il compense. Le myocarde va ensuite développer différentes stratégies afin de ne pas décompenser, la plupart du temps en essayant d'augmenter l'apport en oxygène au myocarde afin qu'il soit plus performant.

L'une de ces stratégies est d'augmenter l'angiogenèse afin de résoudre l'hypoxie du myocarde hypertrophique et de maintenir sa fonction contractile. Des auteurs ont ainsi montré que l'hypertrophie physiologique avec une fonction contractile préservée est associée avec une augmentation de l'angiogenèse alors que l'hypertrophie pathologique est associée à une altération de l'angiogenèse (Shiojima et al. 2005). Le VEGF et l'angiopoïétine font partie des principaux facteurs de croissance de l'angiogenèse (Gale et Yancopoulos 1999; Carmeliet 2000). L'activation du VEGF serait sous le contrôle de la voie PI3kinase/Akt. L'inactivation de cette voie est associée à des modèles de surcharge de pression alors que cette voie est activée dans des modèles d'entraînement (Kemi et al. 2008). Ceci est en accord avec le bénéfice du réentraînement physique dans un modèle d'IC induit par l'hypertension chez le rat. En effet, l'entraînement active la voie PI3kinase/Akt améliorant ainsi l'angiogenèse et induisant un remodelage bénéfique du ventricule gauche (Miyachi et al. 2009). Plusieurs études confirment le rôle primordial du VEGF dans le maintien d'une fonction cardiaque adéquate. Des souris possédant un leurre du récepteur au VEGF soumises à une constriction aortique transverse développent une hypertrophie qui décompense beaucoup plus vite vers l'IC que les souris possédant un récepteur au VEGF fonctionnel. Les auteurs concluent que le VEGF est essentiel pour assurer un lit capillaire suffisant pour maintenir le cœur dans un état

compensatoire (Izumiya et al. 2006). Comme on peut s'y attendre, l'ajout de VEGF recombinant en intracardiaque chez des lapins nouveau-nés ayant subi une constriction aortique transverse, a des effets bénéfiques permettant de maintenir la croissance des capillaires et de préserver une bonne fonction contractile évitant la survenue de l'IC (Friehs et al. 2006). Chez le patient atteint de cardiomyopathie dilatée, une étude histologique montre également une diminution de la quantité des capillaires au niveau myocardique (Karch et al. 2005).

En plus de la quantité des vaisseaux qui apportent les nutriments et l'oxygène au myocarde, la qualité de leur fonction doit également être prise en compte. La dysfonction endothéliale est une cause importante de transition vers l'IC. Des études chez le patient montrent que la sévérité de l'atteinte endothéliale peut servir de marqueur pronostique d'IC. Ainsi, la sévérité de la dysfonction endothéliale est directement corrélée à une augmentation du risque de mortalité chez le patient insuffisant cardiaque (Fischer et al. 2005; Katz et al. 2005). La principale cause de la dysfonction endothéliale est la diminution de la biodisponibilité du NO. L'une des sources de NO physiologique est le stress de cisaillement vasculaire (Harrison et al. 2006), or une dysfonction du ventriculaire gauche entraîne une diminution du flux sanguin ce qui va diminuer les forces de cisaillement et par conséquent entraîner une diminution d'une des voies majeures de production du NO. Ceci contribue à aggraver l'IC. Une étude montre d'ailleurs une diminution de la libération de NO dans la circulation coronaire de patients insuffisants cardiaques (Mohri et al. 1997). Comme nous l'avons vu précédemment, les ERO jouent également un rôle important dans la dysfonction endothéliale. Les lipides peroxydés, marqueurs du stress oxydant, sont augmentés dans le sang des patients présentant une IC congestive et il existe même une corrélation négative significative entre le taux de lipides peroxydés et la fraction d'éjection du ventricule gauche (Belch et al. 1991). Comme nous l'avons vu précédemment, l'Ang II est fortement augmentée dans l'hypertrophie pathologique et elle a la capacité d'induire une augmentation de l'activité de la NADPH oxydase, ce qui se traduit par une production accrue d'anions superoxydes (Griendling et al. 1994; Rajagopalan et al. 1996). L'expression et l'activité de la xanthine oxydase est elle-aussi augmentée dans le cœur défaillant, ce qui en fait une source additionnelle d'ERO aggravant la dysfonction endothéliale et donc l'IC. Les auteurs suggèrent qu'elle a un rôle dans le passage du cœur hypertrophié au cœur défaillant (de Jong et al. 2000).

Une activation sympathique soutenue est associée au développement et au maintien d'une hypertension artérielle qui contribue à promouvoir l'IC chronique. Des études récentes chez le patient insuffisant cardiaque chronique montrent une réponse exagérée du chémoréflexe carotidien qui participerait à l'augmentation du tonus nerveux sympathique fréquemment retrouvée dans cette pathologie (Narkiewicz et al. 1999; Schultz et al. 2013). Les cellules des corps carotidiens (CC) sont spécialisées dans la réponse à l'hypoxie. On peut observer ce phénomène dans un modèle d'IC chez le lapin, où l'on remarque une activité basale des CC bien supérieure à la normale et une réponse exagérée à l'hypoxie. Ceci est associé à une hyperactivité du système nerveux sympathique (Figure 10) (Schultz et al. 2007).

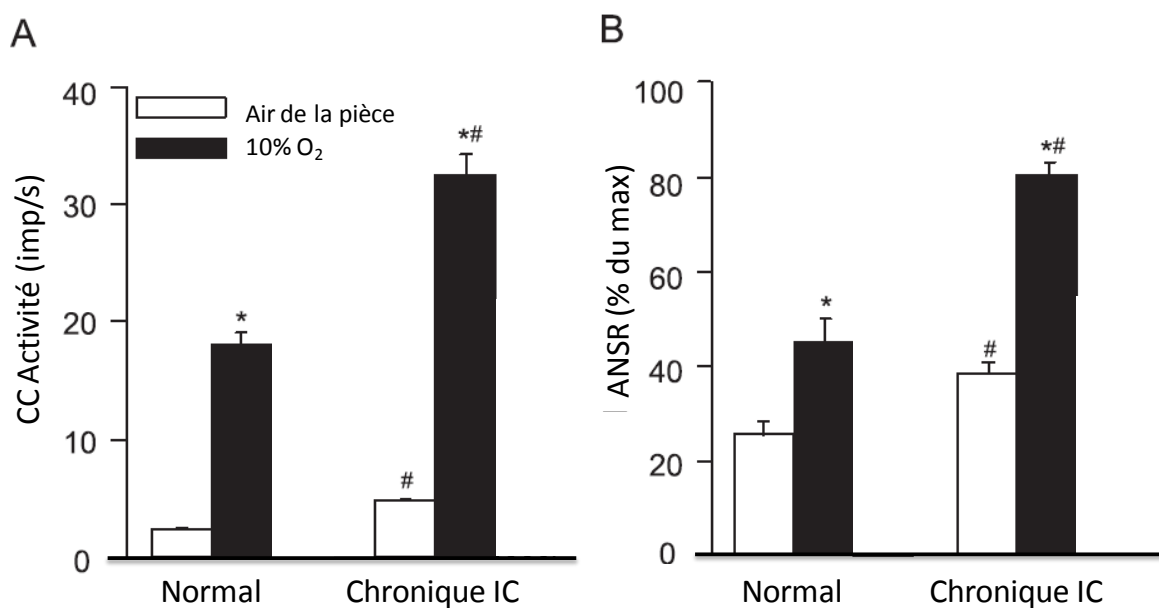


Figure 10. Activité des corps carotidiens en normoxie et en réponse à l'hypoxie chez des animaux normaux et insuffisants cardiaques. CC, corps carotidiens ; ANSR, Activité nerveuse sympathique rénale. * $p < 0,05$ en comparaison à l'air de la pièce et # $p < 0,05$ en comparaison à la normale (d'après (Schultz et al. 2007)).

Parmi les mécanismes qui pourraient expliquer cette activation des corps carotidiens, l'Ang II et le NO sont de bons candidats. L'ET-1 est également impliquée dans ce phénomène et sera décrit dans le paragraphe V.3. En plus de l'augmentation de l'Ang II lors de l'IC, il faut ajouter une surexpression de son récepteur AT1 dans les corps carotidiens. L'exagération de la réponse chémoréflexe à l'hypoxie est normalisée par l'administration d'un inhibiteur des récepteurs AT1 chez le lapin présentant une IC (Li et al. 2006). En ce qui concerne le NO, la

NOS neuronale semble fortement diminuée dans les corps carotidiens de lapins présentant une IC. De plus l'effet inhibiteur du NO sur l'activité des CC n'a aucun effet chez le lapin insuffisant cardiaque. Ces données suggèrent que la suractivation des CC pourrait provenir d'une altération de la production du NO chez ces lapins (Sun et al. 1999). Elles sont confirmées par l'effet bénéfique du transfert du gène de la nNOS dans les corps carotidiens d'animaux insuffisants cardiaques. Ce transfert normalise l'activité sympathique même en réponse à l'hypoxie (Li et al. 2005).

En résumé, la néoangiogenèse, la dysfonction endothéliale et l'augmentation du tonus sympathique sont des éléments importants dans la transition vers l'insuffisance cardiaque ou dans l'aggravation de cette pathologie.

3. Impact du SAOS sur l'insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque est étroitement liée au SAOS. Ainsi une étude montre que 51% des patients atteints d'IC stable ont des troubles respiratoires nocturnes (Javaheri et al. 1998). De même, des patients avec un SAOS important, avec un IAH > 30, présentent une augmentation de 58% du risque de développer une IC (Gottlieb et al. 2010).

Comme nous l'avons vu précédemment pour l'athérosclérose (Figure 7), la dysfonction endothéliale induite par le SAOS joue un rôle déterminant dans le développement de l'insuffisance cardiaque.

En ce qui concerne la réponse exacerbée des corps carotidiens, elle est retrouvée chez le patient atteint de SAOS (Narkiewicz et al. 1998) tout comme chez l'hypertendu (Trzebski et al. 1982). Comme nous l'avons vu également, les patients apnéiques présentent souvent de l'hypertension. Or il existe un cercle vicieux entre l'hypertension et l'IC dans la défaillance du chémoréflexe carotidien (Figure 11). L'hypoxie intermittente, principale composante du SAOS, semble jouer un rôle majeur dans ce cercle vicieux.

Peng et ses collaborateurs ont ainsi montré, dans un modèle rat exposé à l'hypoxie intermittente chronique, que ces animaux avaient une réponse des corps carotidiens augmentée (Peng et al. 2001). Il semble que cette exacerbation d'activité soit en partie causée par le stress oxydant et plus particulièrement, par la production accrue d'anions superoxydes. En effet, le pré-traitement par un mimétique de la superoxyde dismutase permet d'abolir cet effet (Peng et Prabhakar 2003). L'endothéline semble également être un acteur important dans la sensibilisation des corps carotidiens par l'HI. En effet, l'ET-1 est connue pour augmenter la réponse des chémorécepteurs (Chen et al. 2000). De plus, on retrouve un marquage

immunohistochimique très augmenté d'ET-1 dans les corps carotidiens de chats exposés 4 jours à l'HI, alors que le taux plasmatique d'ET-1 reste inchangé (Rey et al. 2006). L'endothéline a également plus d'effet sur la décharge des corps carotidiens chez des animaux exposés à l'HI (Rey et al. 2006). Le dénominateur commun entre l'élévation de l'ET-1 et l'augmentation du stress oxydant dans les corps carotidiens pourrait être HIF-1, le facteur de transcription sensible à l'hypoxie dont on sait qu'il est activé majoritairement par l'HI (Belaidi et al. 2009). Ainsi, une étude récente montre une augmentation de HIF-1 et de ET-1 dans les corps carotidiens, associée au développement de l'hypertension chez des rats exposés à l'HI. Un traitement à l'apocynine (inhibiteur de la NADPH oxydase) durant la période d'exposition permet de rétablir ces altérations, impliquant bien un rôle du stress oxydant (Liu et al. 2013). Au vu des données exposées, il semblerait l'HI que provoquée par le SAOS soit un élément majeur dans l'accélération de la pathologie de l'insuffisance cardiaque. En effet, le stress oxydant et l'activation de HIF-1 et de ET-1 dans les corps carotidiens semblent jouer un rôle prépondérant dans deux des conséquences délétères de l'HI à savoir l'hypertension artérielle et l'insuffisance cardiaque (Figure 11).

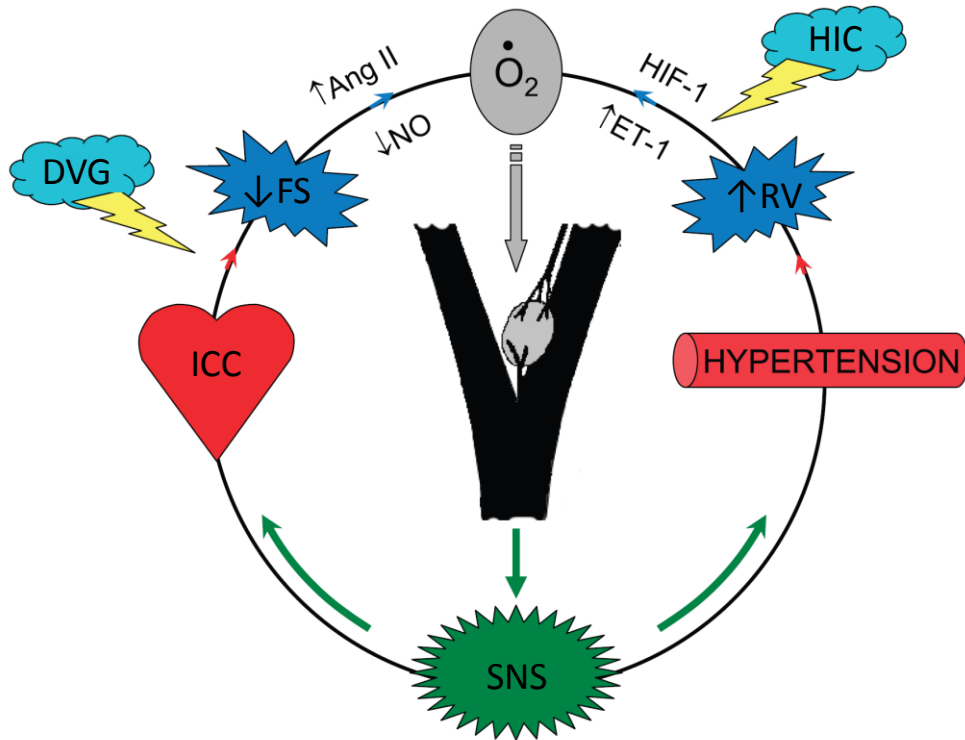


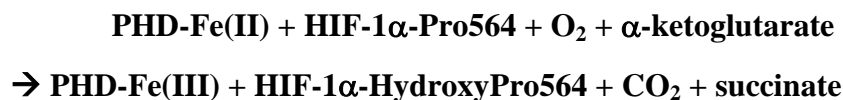
Figure 11. Schéma des mécanismes et conséquences de l'interaction entre l'hypertrophie cardiaque, l'hypertension artérielle et l'hypoxie intermittente sur la réponse des chémorécepteurs carotidiens. Ang II, Angiotensine II ; DVG, Dysfonction du ventricule gauche; ET-1, Endothéline-1; FS, Flux sanguin; HIC, Hypoxie intermittente chronique; HIF-1, Hypoxia inducible factor-1 ; ICC, Insuffisance cardiaque chronique ; NO, Monoxyde d'azote ; RV, Résistances vasculaires ; SNS, Système nerveux sympathique (d'après (Schultz et al. 2007).

IV. HIF-1 et hypoxie intermittente

1. Le facteur de transcription sensible à l'hypoxie HIF-1

HIF-1 pour " Hypoxia Inducible Factor " a été découvert au début des années 90 et il est alors décrit comme un facteur nucléaire induit par l'hypoxie et capable d'activer la transcription du gène de l'érythropoïétine (Semenza et Wang 1992). Il sera ensuite purifié et présenté comme un hétérodimère possédant deux sous-unités, toutes deux nécessaires pour assumer sa fonction, HIF-1 α et HIF-1 β (Wang et Semenza 1995). Trois différentes formes de HIF ont été décrites (HIF-1, HIF-2 et HIF-3), avec le même type de sous-unité et de régulation (Smith et al. 2008). Cependant, seul le rôle du facteur de transcription HIF-1 a été investigué dans ce manuscrit.

En conditions de normoxie, la sous-unité HIF-1 α est perpétuellement dégradée. HIF-1 α possède deux prolines, situées en position 564 et 402, qui vont subir une hydroxylation via des enzymes spécifiques. Ces enzymes, appelées PHD, possèdent une activité prolyl-4-hydroxylase et elles sont au nombre de 3. Elles contiennent toutes un ion Fe (II) central et sont dénommées PHD1, PHD2 et PHD3. La réaction produite lors de l'hydroxylation de la proline 564 est la suivante,



Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer la diminution d'activité de ces enzymes en conditions d'hypoxie. La première est que le manque d'oxygène empêche tout simplement la réaction de fonctionner. La deuxième est que la production d'ERO par la mitochondrie en cas de diminution d'O₂ entraîne une oxydation de l'ion fer qui inactive les PHD (Prabhakar et Semenza 2012). En faveur de la première hypothèse, une équipe a montré, qu'en situation hypoxique, HIF-1 α est stabilisé même lorsque l'on inhibe la production d'ERO par le complexe III de la mitochondrie (Chua et al.). Cependant, une autre équipe a démontré que la surexpression de la glutathion peroxydase ou de la catalase, qui limite la production d'ERO, diminue la stabilisation de HIF-1 α en conditions hypoxiques (Brunelle et al. 2005). Les deux prolines jouent un rôle différent dans la dégradation de HIF-1 α . En effet, en conditions de normoxie, la proline 564 est hydroxylée avant celle située en position 402. De plus, si on empêche l'hydroxylation de la proline 564 par mutation, cela diminue fortement le taux d'hydroxylation de la proline 402. Ceci implique que l'hydroxylation de la première

proline semble nécessaire pour celle de la deuxième. En conditions d'hypoxie, le proline 402 serait plus sensible aux variations d'oxygène que la proline 564, ce qui lui conférerait un rôle de régulation important dans la stabilisation de HIF-1 α (Chan et al. 2005). La double hydroxylation entraîne *in fine* la fixation du facteur von Hippel-Lindau, nécessaire pour permettre ensuite le recrutement des ubiquitinasés (Kamura et al. 2000). La polyubiquitination dirige ensuite la sous-unité α vers le protéasome pour sa destruction. Lorsque le taux d'oxygène diminue, la sous-unité HIF-1 α n'est pas dégradée et migre vers le noyau où elle se dimérise avec la sous-unité HIF-1 β et recrute deux co-facteurs, p300 et CBP, pour activer la transcription de ses différents gènes cibles. Un inhibiteur intervient dans la régulation de cette activité. Il s'agit de FIH-1, pour Facteur inhibiteur de HIF-1, qui engendre, en conditions de normoxie, l'hydroxylation d'une asparagine dans la portion C-terminale de HIF-1 α . Cette hydroxylation empêche la liaison de HIF-1 α avec ses co-facteurs p300 et CBP (Lando et al. 2002). Les diverses actions régulatrices de PHD ou de FIH-1 sont illustrées dans la Figure 12.

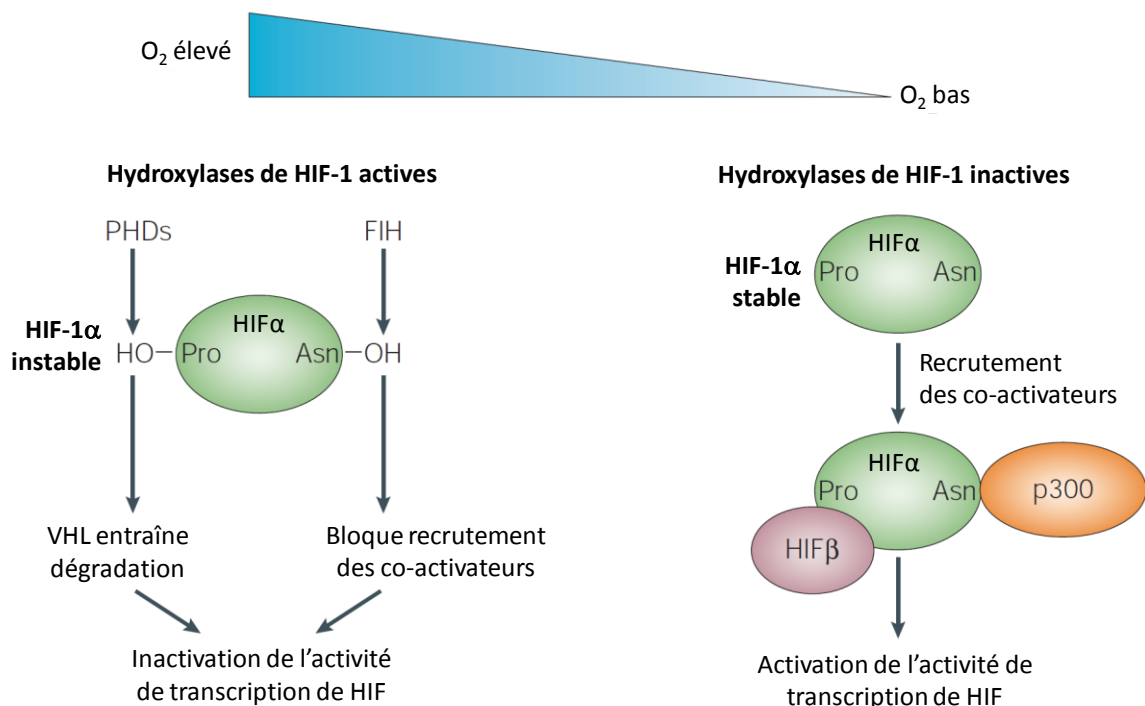


Figure 12. Schéma des différents acteurs de la régulation de la stabilisation et de l'activité de HIF-1 en normoxie et en hypoxie (d'après (Schofield et Ratcliffe 2004).

La totalité des gènes cibles de HIF-1 actuellement connus atteint le nombre de 200 et une partie est résumée à la Figure 13 (Schofield et Ratcliffe 2004). Parmi ces gènes, certains ont plus d'impact sur le système cardiovasculaire. Ainsi, se trouve le gène de l'érythropoïétine, qui est à la base de la découverte de HIF-1, de même que des gènes impliqués dans la régulation du tonus vasculaire comme ceux de l'ET-1, de l'adrénoméduline, du récepteur adrénergique α_1 ou encore ceux de la NOS inductible (iNOS) et endothéliale (eNOS). Nous retrouvons également des gènes impliqués dans la régulation de la matrice extracellulaire comme ceux de la pro-collagène prolyl hydroxylase et du collagène de type V, et des gènes impliqués dans l'angiogénèse comme celui du VEGF. HIF-1 se fixe sur une séquence conservée, appelée HRE pour Hypoxia Response Element, qui est un pentanucleotide 3'-(A/G)CGTG-5' présent dans le promoteur de ses gènes cibles.

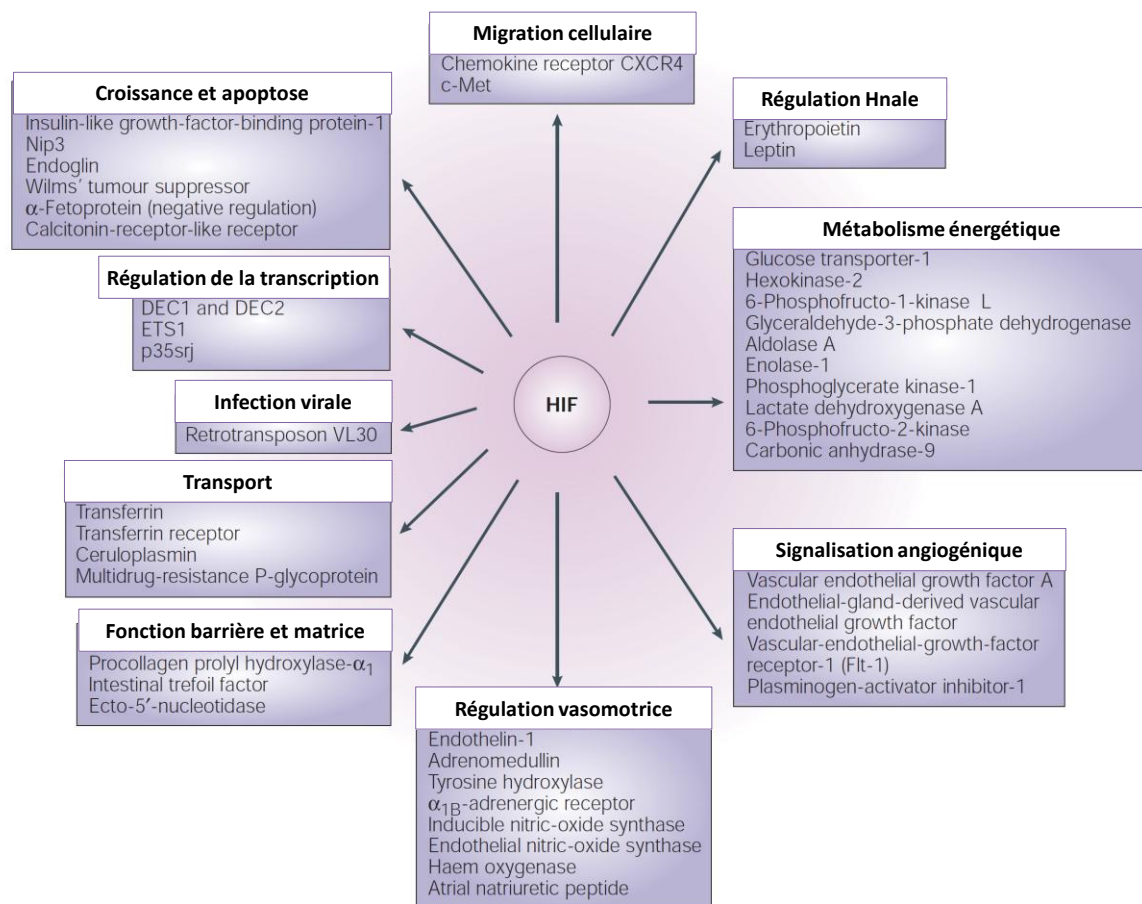


Figure 13. Schéma représentant différents gènes cibles de HIF-1 ainsi que les domaines dans lesquels son activité intervient (d'après (Schofield et Ratcliffe 2004))

Les PHD sont des protéines dont la structure est très conservée. On retrouve effectivement un alignement de séquences important entre les 3 différents types de PHD chez l'homme mais également avec une PHD de la drosophile (Bruick et McKnight 2001). Ces enzymes sont toutes capables d'hydroxyler une proline, comme le montre l'équation ci-dessus, cependant elles diffèrent par leur distribution cellulaire et leur sensibilité à l'hypoxie. Chez le rat, on sait par exemple que les PHD2 et 3 sont fortement exprimées dans le cœur en réponse à l'hypoxie ce qui n'est pas le cas de la PHD1 (Willam et al. 2006). Cela s'explique probablement par le fait que les gènes des PHD2 et 3 possèdent des séquences HRE qui leur permettent d'être activés par HIF-1 α pour PHD2 et HIF-2 α pour PHD3 en conditions d'hypoxie (Metzen et al. 2005; Pescador et al. 2005). Il semble tout de même que les 3 PHDs participent à la régulation de l'hydroxylation de HIF et que leur rôle ne soit pas redondant (Appelhoff et al. 2004).

L'activation de HIF-1 en réponse à l'HI est beaucoup plus importante que celle produite par l'hypoxie continue. En effet, lorsque l'on regarde la quantité de protéine HIF-1 dans des cellules exposées à l'HI, on observe qu'elle augmente à chaque cycle d'HI de façon concomitante avec l'activité des promoteurs des gènes cibles de HIF-1 (Yuan et al. 2005). Les mécanismes d'activation de HIF-1 en HI et en hypoxie soutenue semblent très différents. En effet, en hypoxie continue, la Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase, ou CamK, n'est activée que transitoirement (Premkumar et al. 2000) alors que l'HI l'active beaucoup plus longtemps avec comme conséquence un effet prolongé sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1 (Figure 14). De plus, l'HI augmente la synthèse de HIF-1 via un mécanisme impliquant une activation de la NADPH oxydase et une production d'ERO activant la voie mTOR (Figure 14). Cette voie est beaucoup moins activée en conditions d'hypoxie continue. Finalement, les ERO ont une puissante activité inhibitrice des PHD ce qui favorise également la stabilisation de HIF-1 (Figure 14) (Yuan et al. 2008). En conséquence, la demi-vie de HIF-1 est supérieure à 90 min après une exposition à l'HI alors qu'elle est inférieure à 5 min après une hypoxie continue (Wang et al. 1995). En définitive, l'activation de HIF-1 par l'HI entraîne une majoration du stress oxydant ce qui n'est pas le cas en hypoxie continue (Prabhakar et Semenza 2012). En résumé, tous ces mécanismes permettent de dire que l'activation majeure de HIF-1 produite par l'HI aura potentiellement des effets délétères plus importants que l'hypoxie continue sur l'organisme, et notamment sur le système cardiovasculaire.

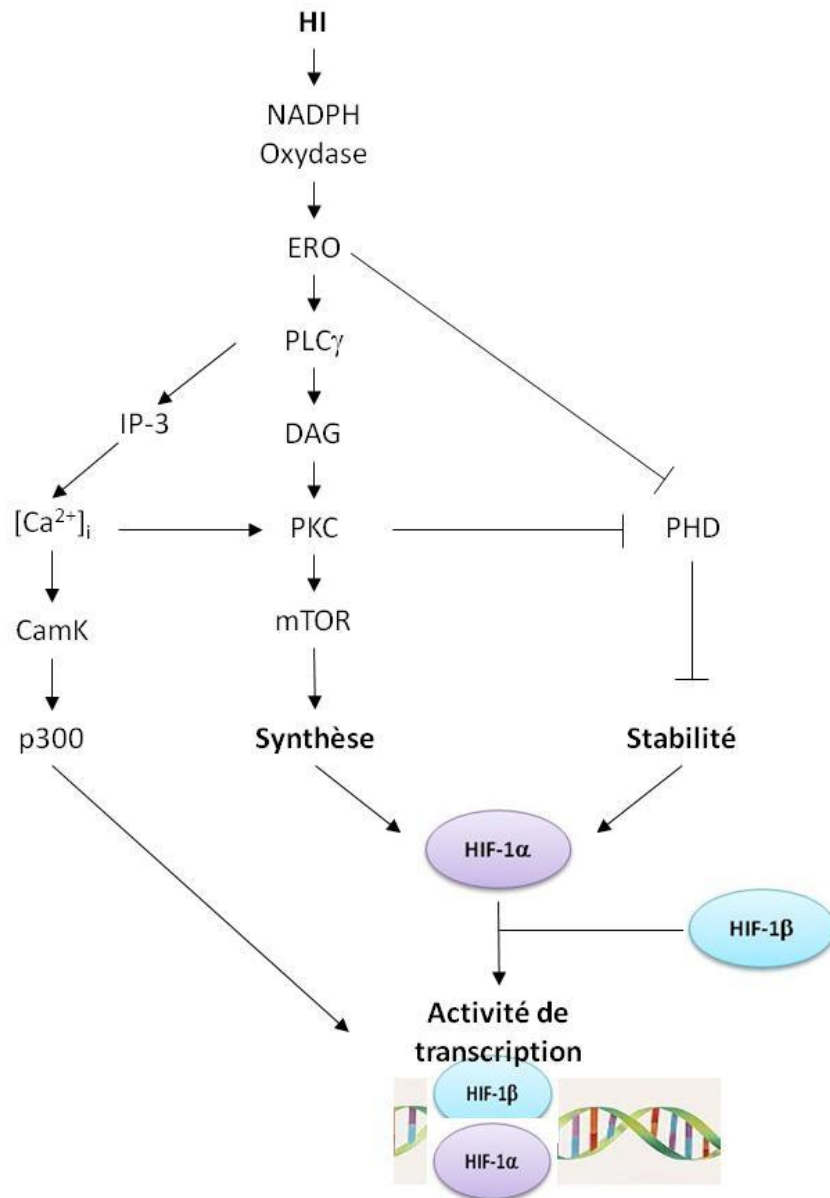


Figure 14. Schéma des cascades de signalisation activées par l'hypoxie intermittente qui stabilisent HIF-1 α et favorisent sa synthèse. On observe le rôle important des ERO à l'origine de cette signalisation. ERO, Espèces réactives de l'oxygène ; PLC γ , Phospholipase-C gamma ; DAG, Diacylglycérol ; PKC, Protéine kinase C ; mTOR, cible de la rapamycine chez les mammifères ; PHD, prolyl-hydroxylases ; IP-3, Inositol triphosphate ; CamK, protéine kinases Ca²⁺/calmoduline-dépendantes (d'après (Yuan et al. 2008)).

2. HIF-1 et athérosclérose

En dehors du contexte du SAOS, HIF-1 est retrouvé au sein de la plaque d'athérome et sa présence est même corrélée à l'avancement de la plaque. Une équipe a proposé que le stress oxydant présent dans la plaque pourrait activer HIF-1 qui induirait par la suite des

cascades de signalisation engendrant de l'inflammation, de la calcification et de l'apoptose. HIF-1 semble donc à l'origine de la progression délétère de la plaque d'athérome (Bitto et al. 2010). Dans la plaque, les zones hypoxiques sont beaucoup plus riches en macrophages, en VEGF et en HIF-1. Les auteurs supposent donc que l'hypoxie au sein des macrophages stimule HIF-1, le VEGF et donc l'angiogenèse (Sluimer et al. 2008). La stimulation de l'angiogenèse dans la plaque pourrait favoriser l'instabilité de la plaque, l'hémorragie et donc le thrombus (Higashida et al. 2008).

HIF-1 pourrait être aussi impliqué dans la transition entre macrophages et cellules spumeuses. En effet, une étude a montré que l'inhibition de HIF-1 *in vitro*, grâce à de petits ARN interférents, permettait une diminution significative de la formation de cellules spumeuses ainsi que de la taille des gouttelettes lipidiques s'accumulant dans les cellules en présence de LDL oxydés (Jiang et al. 2007). Il existe également un cross-talk entre HIF-1 et le « liver X receptor alpha » ou LXR α qui sont tous les deux présents dans les macrophages de plaques athérosclérotiques. L'activation de ces deux protéines nucléaires est impliquée dans l'accumulation de triglycérides au sein des macrophages et donc dans la transition vers la cellule spumeuse (Na et al. 2011).

On peut également noter que la présence de HIF-1 dans la plaque d'athérome est associée à un phénotype inflammatoire important (Vink et al. 2007). De plus, HIF-1 participe au processus de maturation des monocytes (Oda et al. 2006). Il existe également un cross-talk entre HIF-1 et NF κ B, favorisant aussi la survenue d'une inflammation (Eltzschig et Carmeliet 2011). HIF-1 est également fortement impliqué dans les voies de régulation de la défense immunitaire innée ainsi HIF-1 participe ainsi au contrôle de l'activité des cellules inflammatoires myéloïdes (Nizet et Johnson 2009)

En résumé, HIF-1 semble jouer un rôle important dans le développement de la plaque d'athérome puisqu'il favorise l'angiogenèse et l'apoptose qui déstabilisent la plaque, l'accumulation lipidique et surtout l'inflammation.

3. HIF-1 et insuffisance cardiaque

Chez certains patients insuffisants cardiaques, on retrouve une activation de la voie de HIF-1, ce qui suppose également son implication dans le développement de cette pathologie (Holscher et al. 2012).

Comme nous l'avons mentionné précédemment, le stress oxydant favorise la survenue des pathologies cardiaques telles que l'insuffisance cardiaque. L'augmentation du stress oxydant induite par l'activation de HIF-1 peut ainsi contribuer directement au développement de l'IC. De façon plus indirecte, le stress oxydant et la transcription accrue d'ET-1 générés par HIF-1 entraînent une sensibilisation du chémoréflexe et une activation sympathique qui contribue également au développement de l'IC (Figure 11) (Schultz et al. 2007).

Le cœur hypertrophié est en partie hypoxique et a recours à l'angiogenèse pour conserver une bonne fonction contractile. L'angiogenèse se trouve être sous le contrôle de HIF-1 et du VEGF, comme nous l'avons vu précédemment. Un modèle de surcharge de pression chez la souris, montre d'ailleurs bien l'augmentation de la transcription de HIF-1 avec le développement de l'IC (Sano et al. 2007). Or ce mécanisme, dans un premier temps protecteur, peut s'avérer délétère à long terme. En effet, lorsque l'hypoxie devient sévère, HIF-1 induit la transcription de p53, une protéine à activité pro-apoptotique et suppresseur de tumeur, qui se lie à HIF-1 α , favorise sa dégradation et inhibe son activité transcriptionnelle ce qui va participer à la décompensation (Sano et al. 2007; Oka et al.).

Finalement, une étude expérimentale a démontré que des souris sur-exprimant HIF-1 au niveau cardiaque uniquement développaient des signes d'IC avec l'âge. Ces souris ont effet plus de difficulté à préserver leur fonction cardiaque en réponse à une surcharge de pression par comparaison avec les souris contrôles. Les auteurs de cette étude concluent que les voies induites par HIF-1 semblent bénéfiques à court terme, comme lors de l'adaptation à une ischémie aiguë du myocarde. Cependant à long terme, l'activation de HIF-1 entraîne des effets préjudiciables pour le myocarde, comme une diminution de la fonction contractile (Holscher et al. 2012).

En résumé, la forte activation de HIF-1, entraînant l'expression de gènes ayant un impact majeur sur le système cardiovasculaire, en fait une cible importante à étudier dans le contexte des complications cardiovasculaires liées au SAOS.

V. L'endothéline

1. Structures et fonctions de l'endothéline et de ses récepteurs

L'endothéline-1 ou ET-1, découverte à la fin des années 80, est un puissant peptide vasoconstricteur produit par les cellules endothéliales (Yanagisawa et al. 1988). C'est le membre le plus important de la famille des endothélines qui comprend également ET-2 et ET-3. Ces peptides se caractérisent par une structure de 21 acides aminés et deux ponts disulfures en position N-terminale. ET-1 est traduite à partir du gène EDN1 qui produit d'abord la pré-pro-endothéline, comprenant environ 200 résidus, qui sera ensuite clivée par une endopeptidase de type furine en big-ET-1. La big-ET-1 est un peptide intermédiaire et inactif de 38 acides aminés qui est clivé par l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) pour donner le produit final actif de 21 acides aminés (Figure 15) (Pinet 2004). ET-1 interagit avec deux récepteurs différents, ET-A et ET-B, qui sont tous deux couplés aux protéines G mais qui ont des effets très différents (Masaki et al. 1994). Les deux types de récepteurs sont exprimés dans la majorité de cellules. Cependant dans les cellules endothéliales, on retrouve majoritairement les récepteurs ET-B alors que les cellules musculaires lisses ou les cardiomyocytes contiennent surtout des récepteurs ET-A. Le récepteur ET-A semble plutôt associé à des effets de vasoconstriction et de prolifération cellulaire (Wang et al. 1992). ET-B lui est rattaché à des effets de vasodilatation en induisant la libération de NO. Il participe également à la clairance de ET-1 (Figure 15) (Kohan et al. 2011). Les forces de cisaillement, l'hypoxie ou encore l'Ang II sont des stimulants de la sécrétion d'ET-1. En effet, l'endothéline fait partie des gènes cibles de HIF-1, possédant une séquence HRE dans son promoteur (Yamashita et al. 2001).

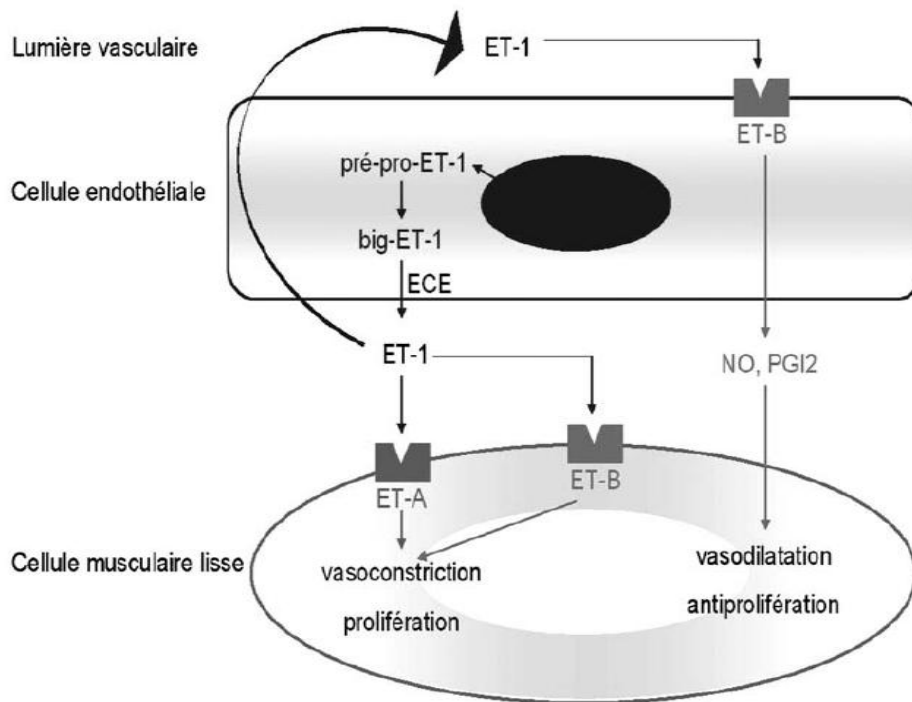


Figure 15. Schéma de la synthèse de l'endothéline par les cellules endothéliales ainsi que son action sur les cellules musculaires lisses via ses récepteurs ET-A et ET-B (d'après (Belaidi et Godin-Ribuot 2010))

L'endothéline a un rôle essentiel pour le système cardiovasculaire. Elle a, entre autre, des effets bénéfiques comme dans le développement embryonnaire cardiaque. Chez l'adulte, le système endothéline permet, en situations physiologiques, le maintien du tonus vasculaire et l'homéostasie rénale (Pinet 2004). Toutefois, l'endothéline est également impliquée dans plusieurs maladies cardiovasculaires dont l'athérosclérose et l'insuffisance cardiaque.

2. ET-1 et athérosclérose

L'endothéline va participer de différentes façons à l'évolution de l'athérosclérose. Par exemple, les LDL oxydés vont stimuler sa transcription et sa libération. L'ET-1 va ensuite favoriser la prolifération des cellules musculaires lisses et induire une vasoconstriction ce qui va participer à la progression de la pathologie (Boulanger et al. 1992). L'ET-1 et son enzyme de conversion sont retrouvées de façon abondante dans les artères athérosclérotiques. Leur présence est observée à des stades très précoces de l'évolution de la maladie et est aussi associée avec la présence d'une inflammation chronique (Ihling et al. 2001). Chez l'animal, la surexpression d'ET-1 entraîne une accélération importante de la maladie en augmentant le stress oxydant et l'inflammation (Li et al. 2013). Chez l'homme, un traitement de 6 mois par un

antagoniste des récepteurs ET-A, l'atrasentan, a permis d'atténuer la progression des plaques d'athérome coronariennes (Yoon et al. 2013).

3. ET-1 et insuffisance cardiaque

Il existe de nombreuses preuves montrant l'implication de l'ET-1 dans l'IC. Un premier argument pour son implication est le fait que son taux est augmenté dans le plasma de patients ayant une insuffisance cardiaque congestive (McMurray et al. 1992). Les taux d'endothéline plasmatique sont très augmentés surtout dans l'IC sévère (Wei et al. 1994). L'endothéline participe au développement de l'hypertrophie pathologique qui est la première phase de l'IC, comme cela a été décrit précédemment dans ce manuscrit. L'administration de BQ-123, un inhibiteur des ET-A, dans un modèle d'IC chez le rat, permet de maintenir une bonne fonction cardiaque (Sakai et al. 1996). Chez l'homme, l'administration d'ET-1 à des concentrations similaires à celles retrouvées chez les patients en IC entraîne une diminution de la fonction cardiaque et une augmentation de la pression artérielle qui sont abolies par l'administration conjointe d'un inhibiteur des récepteurs de l'ET-1 (Vuurmans et al. 2003). Chez le patient insuffisant cardiaque, l'utilisation d'inhibiteurs des récepteurs à l'ET-1 a toutefois donné des résultats ambivalents. Certaines études ne montrent pas d'amélioration de la fonction cardiaque après traitement (Anand et al. 2004). Une autre étude montre au contraire une amélioration de l'index cardiaque, une diminution de la pression artérielle et du FNB après seulement 3 semaines de traitement (Bergler-Klein et al. 2004).

En résumé, le système endothéline semble impliqué de façon importante dans le développement de pathologies cardiaques telles que l'athérosclérose ou l'IC. Etant donné son activation chez le patient apnéique et chez l'animal exposé à l'HI, il semble primordial d'approfondir les connaissances sur les mécanismes d'action de ce peptide dans ce contexte.

OBJECTIFS

Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) est reconnu comme facteur indépendant de survenue de maladies cardiovasculaires au même titre que l'obésité, le diabète ou le tabac. Il est maintenant établi que l'hypoxie intermittente, l'une des trois composantes du SAOS, est la principale cause des conséquences délétères de ce syndrome. Parmi celles-ci, on note la présence de remodelage vasculaire précoce suivi d'athérosclérose ainsi qu'une hypertrophie ventriculaire droite ou gauche pouvant amener à l'insuffisance cardiaque.

L'objectif général de cette thèse est de mettre en évidence certains des mécanismes impliqués dans l'induction de ces altérations cardiovasculaires par l'hypoxie intermittente. Nous avons choisi de nous intéresser tout particulièrement au facteur de transcription HIF-1 car il est fortement activé par l'HI et possède de nombreux gènes cibles ayant un impact sur le système cardiovasculaire et sur l'inflammation. Parmi ceux-ci, nous nous sommes intéressés à l'endothéline car elle a des répercussions majeures tant au niveau cardiaque que vasculaire, de part ses propriétés vasoconstrictrices, prolifératives et pro-inflammatoires.

La première partie de cette thèse traite de l'inflammation associée au remodelage vasculaire induit par l'HI. La deuxième partie s'intéresse au remodelage cardiaque à la fois fonctionnel et structural. Dans chaque partie, l'utilisation de souris génétiquement modifiées ou traitées avec un antagoniste mixte des récepteurs à l'endothéline, nous a permis d'étudier l'influence du système HIF-1/ET-1 dans la survenue de ces altérations.

MATERIELS ET METHODES

I. Animaux

Les animaux utilisés sont des souris mâles adultes de lignées différentes, âgées de 8 ± 2 semaines au moment de l'exposition. Les animaux sont hébergés dans des conditions réglementaires de température (20-24°C) et d'hygrométrie avec des cycles 12h de jour et 12h de nuit et un accès libre à l'eau et à la nourriture.

1. Etude du système endothéline

Les souris de cette étude sont des C57Bl/6J qui proviennent de l'élevage Janvier (Le Genest St Isle, Mayenne, France) et sont gardées une semaine en stabulation avant exposition à la Plate-forme de Haute Technologies Animale (PHTA) de l'Institut Jean Roget.

Afin d'étudier l'impact du système endothéline sur le système cardiovasculaire, les souris sont traitées avec du bosentan (Actélon, Allschwil, Suisse) ajouté à la nourriture pendant les 14 jours d'exposition à l'hypoxie intermittente à raison de 100 mg/kg/jour. Le groupe traité est défini par le terme "Bos"

2. Etude de l'implication de HIF-1

Les souris utilisées sont génétiquement modifiées et sont élevées à la PHTA. Les couples fondateurs de chaque lignée ont été gracieusement offerts par le Pr. Peter Carmeliet (VIB, Leuven, Belgique). Trois souches différentes ont été utilisées lors de l'étude de l'implication de HIF-1.

- La première est une souche de souris partiellement invalidée pour le gène de la sous-unité α du facteur de transcription HIF-1 : *HIF1a*^{+/-}.
- La deuxième est complètement invalidée pour une des enzymes de dégradation de HIF-1, la PHD-1 : *PHD1*^{-/-}.
- La troisième est une souche partiellement invalidée pour une autre des enzymes de dégradation de HIF-1, la PHD-2 : *PHD2*^{+/-}.

Les deux premières souches décrites sont des souris à double fond génétique 50% Swiss et 50% Sv129. La troisième a un fond génétique C57Bl/6J. Chaque souche possède son propre contrôle qui sera noté WT.

Les différentes souris transgéniques sont géotypées au laboratoire afin d'être réparties équitablement dans les conditions normoxiques et hypoxiques.

Toutes les souris ont servi à la fois pour l'étude de la partie I : « Impact de l'HI au niveau vasculaire » et l'étude de la partie II : « Impact de l'HI au niveau cardiaque ».

3. Géotypage des souches de souris

L'ADN qui sert au géotypage des souris, est extrait à partir de prélèvements de doigts effectués au 10^{ème} jour de vie des souriceaux, lors du marquage individuel des animaux. Le morceau de doigt est d'abord digéré sur la nuit à 56°C, grâce à une solution de digestion contenant du Tris (50 mM), de l'EDTA (5 mM), du NaCl (200 mM), du SDS (1%) et de la protéinase K (0.5 mg/ml). Le lendemain, le surnageant est récupéré après une centrifugation de 15 min à 14000g.

L'ADN est ensuite séparé des protéines grâce à l'ajout d'un mélange phénol/chloroforme. Après une centrifugation de 2 min à 14000g, on obtient 3 phases. L'ADN se trouve dans la phase aqueuse supérieure. L'ajout d'éthanol va permettre la précipitation de l'ADN, sous forme d'une petite pelote ou méduse d'ADN qui est isolée après une centrifugation de 15 min à 14000g à 4°C, qui permet d'enlever la phase liquide. La pelote est alors resuspendue dans du tampon TE (Tris (20 mM)-EDTA (0.1M)) pour effectuer la PCR.

La PCR est réalisée avec un mélange de PCR ainsi qu'une paire d'amorces propre à chaque souche qui sont résumées dans les tableaux 2 et 3

	Volume	Concentration finale
Buffer 5X	4 µL	1X
MgCL2 25 mM	2 µL	2,5mM
dNTP's 20 mM	0,2 µL	200µM
Amorce sens	0,32 µL	0,4µM
Amorce anti-sens	0,32 µL	0,4µM
KAPA Taq Hotstats	0,1 µL	1X
H2O qsp 18µL	11,06 µL	

Tableau 2. Mélange de PCR utilisé pour le génotypage (volume nécessaire pour l'amplification d'un échantillon d'ADN de souris)

Gène	Bande	Primers	Cycles
HIF-1	WT : 230 pb	forward 5'CAA-GCA-TTC-TTA-AAT-GTG-GAG-CTA-TCT 3' reverse 5'TTG-TGT-TGG-GGC-AGT-ACT-GGA-AAG-ATG 3'	1-95°C pour 3min, 2-95°C pour 30 sec, 3- 65°C pour 30 sec, 4- 72°C pour 30 sec, aller à l'étape 2 pour 34 fois , 5- 4°C en permanence
	Tg : 380 pb	forward 5'TTG-TGT-TGG-GGC-AGT-ACT-GGA-AAG-ATG 3' reverse 5'CGA-AGG-GGC-CAC-CAA-AGA-ACG-CAG-CCG 3'	
PHD-1	WT : 350 pb	forward 5' GGG-CCC-ACA-GTC-AGC-TAA-AG 3' reverse 5' GAA-GGA-GGA-CAA-AGG-TCT-CTT 3'	1-95°C pour 3min, 2-95°C pour 30 sec, 3- 59°C pour 30 sec, 4- 72°C pour 30 sec, aller à l'étape 2 pour 34 fois , 5- 4°C en permanence
	Tg : 380 pb	forward 5' AGA-GGC-CAC-TTG-TGT-AGC-GC 3' reverse 5' CCT-ATA-TTC-ACG-GGA-GGA-CAG-ATC-CTG 3'	
PHD-2	WT : 340 pb	forward 5' ACC-TAT-GAT-CTC-AGC-ATT-TGG-GAG 3' reverse 5'AA-TTC-TAA-TCG-TAG-CTG-ATGTGA-GC 3'	1-95°C pour 3min, 2-95°C pour 30 sec, 3- 59°C pour 30 sec, 4- 72°C pour 30 sec, aller à l'étape 2 pour 34 fois , 5- 4°C en permanence
	Tg : 380 pb	forward 5' AAA-TTC-TAA-TCG-TAG-CTG-ATG-TGA-GC 3' reverse 5' TCA-GCA-CAG-TGA-AGC-CTA-GAA-ACT-CT 3'	

Tableau 3. Récapitulatif des primers utilisés pour génotyper les différentes souches de souris (WT représente l'allèle sauvage et Tg les allèles invalidés pour le gène d'intérêt)

La PCR est réalisée avec un cycle spécifique à chacun des gènes étudiés grâce à un thermocycleur (C1000™ Thermal Cycler, Bio Rad, Marne la coquette, France). Une migration sur gel d'agarose 0.8% est ensuite effectuée avec les produits de PCR et le résultat de la migration est révélé par une mesure de la fluorescence émise aux ultraviolets après un bain de 20 min dans du bromure d'éthidium.

II. Modèle d'hypoxie intermittente

Après une période de stabulation d'une semaine dans la même pièce que celle où s'effectue l'HI, afin qu'ils s'habituent aux bruits liés à l'appareil, les animaux sont installés en

fonction de leur génotypage dans le dispositif au sein des cages de normoxie ou au sein des cages d'hypoxie intermittente. L'hypoxie est obtenue par un enrichissement du milieu en azote, directement dans les cages d'hébergements des animaux. Ce mélange est injecté dans les cages en alternance avec de l'air afin d'obtenir une hypoxie intermittente. Un système d'électrovannes dont l'ouverture et la fermeture sont commandées de façon électronique par un système de pilotage informatisé, permet d'obtenir des cycles hypoxie/normoxie de très courte durée grâce à une injection très précise des mélanges gazeux. Le développement de ce système a été réalisé au sein du laboratoire en collaboration avec un partenaire industriel (Entreprise André CROS S.A., Echirolles, France).

Les animaux du groupe HI sont exposés 8h par jour (de 6h à 14h) à des cycles de 1 minute, composés de 30 secondes d'hypoxie avec une FiO_2 à 5% suivies de 30 secondes de normoxie avec une FiO_2 à 21%. Les animaux en normoxie sont soumis aux mêmes cycles mais avec une FiO_2 de 21% en permanence, de cette façon ils sont eux aussi soumis au stress du bruit et du souffle d'air induit par le dispositif. La teneur en oxygène à l'intérieur des cages est vérifiée fréquemment au cours des expositions grâce à un oxymètre dont la sonde est placée directement dans la cage (ML-206, AD Instrument).

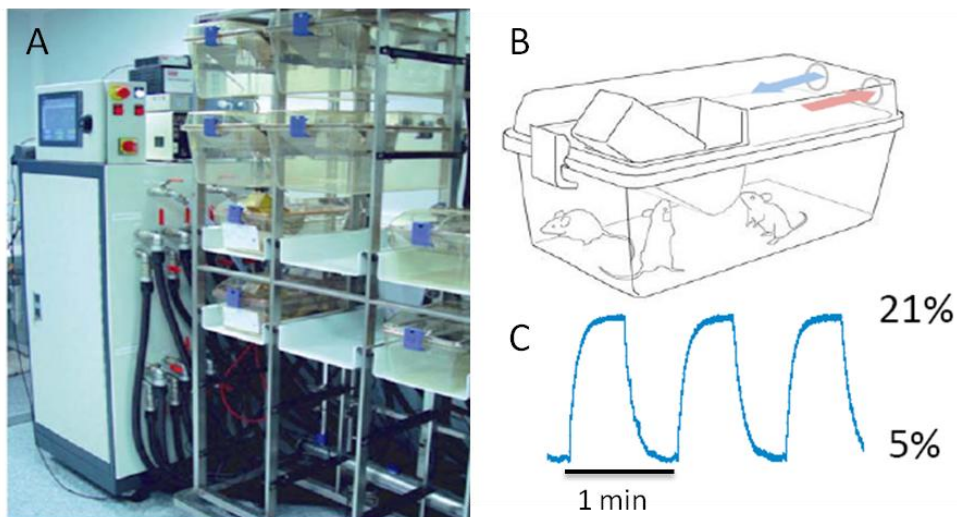


Figure 16. Dispositif d'hypoxie intermittente. Les cages sont placées sur un portoir modifié (A) permettant de faire varier la composition de l'air distribué aux cages (B). Un enrichissement intermittent en azote permet d'obtenir des cycles d'hypoxie intermittente de 1 minute alternant 30 secondes de FiO_2 à 5% et 30 secondes de FiO_2 à 21% (C).

III. Techniques d'expérimentation animale

1. Echographie transthoracique

Dans un premier temps, une échographie de référence est réalisée sur toutes les souris (souris WT et *HIF1 α* ^{+/-} et souris traitées ou non par bosentan) avant exposition à l'HI ou à la normoxie. Une seconde échographie est effectuée après 2 semaines d'exposition.

L'échographie est pratiquée sous légère anesthésie (kétamine 50mg/kg i.p.) et après épilation par une crème dépilatoire. Une sonde de 13 MHz est utilisée avec un système d'ultrason digital (Vivid 7, GE Medical Systems). Pour les coupes para-sternales grand axe, la sonde à ultrasons est positionnée au milieu du sternum et inclinée vers l'épaule droite. Les vues para-sternales petit axe sont obtenues en inclinant la sonde vers l'épaule gauche et peuvent être recueillies à plusieurs niveaux, en déplaçant la sonde par un mouvement de translation : base du ventricule, muscles papillaires, apex.

A partir de la coupe petit axe passant à la base du cœur, un doppler pulsé est obtenu au niveau de la valve pulmonaire. Cette acquisition nous permet de mesurer le temps d'accélération du flux pulmonaire et le temps d'éjection. Ces deux paramètres servent ensuite à déterminer la pression télé-systolique du ventricule droit. Toutes les échographies ont été effectuées dans le laboratoire du Pr. Michel Ovize à l'Université Claude Bernard Lyon 1. Elles ont été réalisées et analysées en double-aveugle par deux expérimentateurs différents (Pr. Geneviève Derumeaux et Dr. Hélène Thibault). Les images ont été analysées à l'aide du logiciel EchoPac (GE Medical, Saint Cyr au Mont d'or, France).

2. Mesures de pression intracardiaque du ventricule gauche

Pour effectuer ces mesures, l'animal est anesthésié à l'isoflurane. Grâce à cette anesthésie, nous avons réussi à conserver une fréquence cardiaque proche de la fréquence de l'animal vigile (≈ 500 battements/minute). L'anesthésie est d'abord induite dans une chambre à induction avec 5% d'isoflurane. L'animal est ensuite mis sous masque avec un pourcentage de 2% d'isoflurane, sur une plaque chauffante qui permet de maintenir sa température corporelle à 37°C durant la manipulation ainsi que sous une loupe binoculaire. Une petite incision est effectuée au niveau du cou afin de pouvoir visualiser la trachée en écartant les glandes salivaires et les muscles trachéaux. On intube la souris pour pouvoir la ventiler et permettre une meilleure respiration durant cette relativement longue période d'anesthésie (Volume $\approx 250\mu\text{l}$; fréquence ≈ 150 fois/minute). De plus cela permet également une meilleure anesthésie car le respirateur est directement relié au diffuseur d'isoflurane. La

carotide droite est également visible par l'incision effectuée au niveau trachéal ce qui permet un accès à cette dernière sans faire une nouvelle incision. La carotide droite est alors isolée pour permettre l'insertion de la sonde Millar (sp-839, emka TECHNOLOGIES, Paris, France) qui sera ensuite poussée dans la cavité cardiaque gauche. Une fois la sonde en place dans le cœur, l'isoflurane est diminué à 1,5% et une période de stabilisation de 5 minutes est observée. Les mesures sont ensuite acquises en temps réel par le logiciel LabChart (AD Instrument Inc., Oxford, United Kinddom).

3. Prélèvements de différents organes

Dans toutes les études, le jour suivant le dernier jour d'exposition à l'HI ou la normoxie, les souris sont anesthésiées par une injection de pentobarbital sodique (Céva Santé Animale) (180 mg/kg, i.p.) ou d'un mélange de kétamine-xylazine (100 mg/kg–10 mg/kg i.p.). Le sang est rapidement prélevé par ponction cardiaque puis conservé dans un tube EDTA (K2E, BD Microtainer®) en vue de la mesure de l'hématocrite. Celle-ci s'effectue grâce à un capillaire spécial centrifugé à 12000 rpm pendant 10 minutes.

- Pour la mesure de la masse ventriculaire et l'analyse biochimique, le ventricule droit est séparé du ventricule gauche + septum. Les deux ventricules sont pesés séparément, congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C.
- L'aorte thoracique est prélevée et congelée directement dans l'azote liquide puis conservée à -80°C ou congelée dans un bloc d'OCT (Optimal Cutting Temperature, Tissue-Tek®) et conservée à -20°C en vue de l'analyse morphologique.
- Pour les mesures sur splénocytes, la rate est prélevée est conservée dans du PBS à 4°C quelques minutes avant l'extraction des splénocytes.

IV. Techniques de mesures de paramètres biologiques sur tissus frais

1. Isolation des splénocytes

La rate est broyée au travers d'un tamis cellulaire de 70 μ m de diamètre (BD Falcon, Pont de Claix, France), au-dessus d'un tube Falcon (BD Falcon, Pont de Claix, France) contenant 5ml de milieu de culture cellulaire composé de RPMI 1640 agrémenté de tampon HEPES à 25 mM, L-glutamine à 2 mM, pénicilline à 100 U/ml, streptomycine à 0.1 mg/ml et de 10% de sérum de vœu fœtal (GIBCO® - Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Le filtre est rincé à l'aide de 15ml de milieu de culture. Après une sédimentation de 10 minutes à température ambiante, le surnageant est transféré dans un nouveau tube qui sera centrifugé 10 minutes à 1000 rpm. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot re-suspendu dans 15ml de milieu de culture. Une deuxième centrifugation de 10 minutes à 1000 rpm est faite pour éliminer une nouvelle fois le surnageant. Le culot subit alors un choc osmotique qui consiste à le re-suspendre dans 10ml de NaCl 0,2% durant 30 secondes, auquel on ajoute ensuite 10ml de NaCl 1,8%, pour stopper le choc osmotique. Après une dernière centrifugation dans les mêmes conditions, le culot est re-suspendu dans un 1ml de milieu. Les splénocytes ainsi isolés vont pouvoir être utilisés pour le test de prolifération ou de migration cellulaire.

2. Migration des splénocytes

La migration des cellules de la rate est un test qui permet d'évaluer l'activation des cellules inflammatoires. Cette technique repose sur l'utilisation de Transwell[®] (Corning, NY, États-Unis) qui sont des inserts que l'on dispose sur les puits des plaques de culture cellulaire et qui permettent de créer deux compartiments séparés par une membrane perméable grâce à des micropores de 8 μ m de diamètre. Les micropores de la membrane permettent aux cellules du compartiment supérieur de passer dans le compartiment inférieur uniquement de façon active. Nous avons utilisé la capacité chémoattractante de MCP-1 pour apprécier le taux d'activation des cellules inflammatoires de la rate.

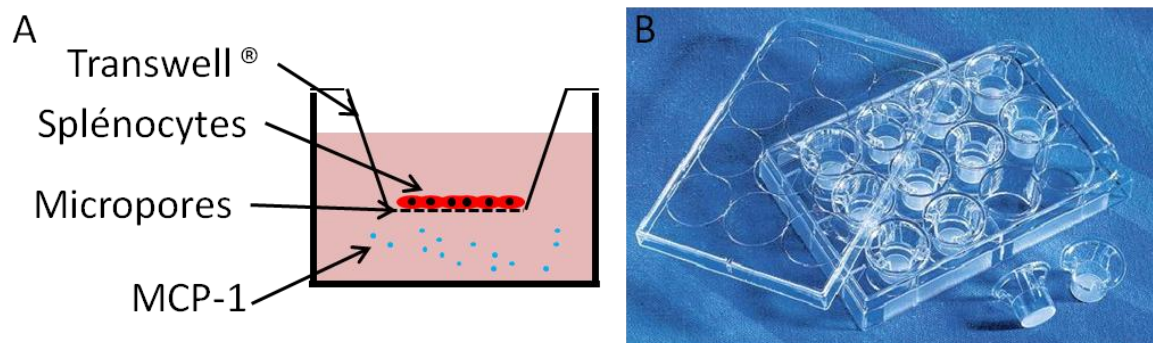


Figure 17. Schéma d'un Transwell ® avec une coupe transversale ainsi que son fonctionnement (A). Photographie de transwell adapté sur une plaque de culture 12 puits (B).

Une quantité de 100 µl d'une solution de splénocytes dans du milieu cellulaire sans sérum, à une concentration de 10^5 cellules/ml, est déposée dans la chambre supérieure. Dans la chambre inférieure 600 µl de milieu cellulaire sans sérum supplémenté avec du MCP-1 à 1nM est déposé. Après une incubation de 90 minutes à 37°C, la chambre supérieure est retirée et le nombre de cellules passées dans la chambre inférieure sont comptabilisées au microscope inversé (Zeiss, Marly le Roi, France).

3. Prolifération des splénocytes

Le test de prolifération des splénocytes en réponse à la concanavoline-A (Sigma, Saint-Quentin-Falavier, France), est lui-aussi un test qui permet d'évaluer l'activation des splénocytes et donc d'avoir un reflet de l'état inflammatoire de l'animal.

Les cellules sont stimulées sur une plaque 96 puits en triplicata avec des concentrations croissantes de concanavalin-A (0 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 ou 10 µg/ml). Après 48h, la prolifération cellulaire est déterminée avec un test de prolifération non radioactif, le " MTS cell proliferation assay " (Promega). Ce test est basé sur une réaction colorimétrique.

V. Techniques d'analyses et de dosages biochimiques sur tissus congelés

1. Mesure de l'épaisseur intima-média aortique

Des sections de 8µm d'épaisseur sont effectuées sur les blocs d'OCT (Tissue-Tek® O.C.T., Sakura, Leiden, Pays-Bas) contenant les aortes thoraciques à l'aide d'un cryostat (Leica CM 1900, Solms, Allemagne). Les coupes sont ensuite colorées à l'hématoxyline-éosine. Les mesures de l'épaisseur de la paroi aortique, ont été effectuées en microscopie optique (Nikon Eclipse 80i, Chagny-sur-Marne, France) en utilisant le logiciel d'analyse 3.10 NIS-Element AR. L'analyse morphométrique a été réalisée sur 8 à 10 sections aortiques par animal et plus de 10 mesures sont faites pour chaque section.

2. Extraction séparée des fractions protéiques cytosoliques et nucléaires.

L'extraction des fractions nucléaires et cytosoliques de façon séparée est indispensable pour l'étude des facteurs de transcription tels que HIF-1 et NF-κB. Pour cela nous utilisons un kit d'extraction qui fournit des tampons permettant d'extraire de façon distincte ces deux fractions, le kit Nuclear extract (Active Motif, Carlsbad, USA). Le tissu est d'abord homogénéisé à l'aide d'un micropotter directement dans un tube Eppendorf contenant du tampon hypotonique 1X additionné de DTT et de détergent. La quantité de tampon à ajouter correspond à 3ml de tampon par gramme de tissu. Une incubation de 15min sur glace est réalisée après le broyage, puis une centrifugation à 4°C de 10 min à 850 g. Le surnageant est collecté et réservé dans le tube stockant la fraction cytoplasmique. Le culot est ensuite re-suspendu une seconde fois dans du tampon hypotonique seul et incubé une nouvelle fois sur glace durant 15 min. Du détergent, fourni par le kit, est ajouté à ce mélange qui est vortexé fortement puis centrifugé 30 secondes à 14 000 g. Le surnageant est collecté et ajouté à celui récupéré précédemment. La fraction cytosolique de l'échantillon est alors extraite et conservée à -80°C. Le culot nucléaire est re-suspendu avec du tampon de lyse et incubé sur glace durant 30 min avec une agitation de 150 rotation par minute. On vortexe ensuite une nouvelle fois fortement l'échantillon durant 30 secondes avant de le centrifuger 10 min à 1400 g. Le surnageant obtenu contient la fraction nucléaire qui est collectée puis conservée à -80°C.

La quantité protéique de chaque extrait cytosolique et nucléaire est dosée à l'aide du kit de dosage BCA (Pierce Biotechnology, Inc.).

3. Western blot

La première étape est la migration qui s'effectue sur un gel d'acrylamide dont le pourcentage varie selon la taille de la protéine d'intérêt. Après la migration, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF. Le transfert est réalisé en 10 min grâce au Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (BioRad). Après le transfert toutes les étapes s'effectuent sous une légère agitation. La première étape est l'étape de blocage qui permet de saturer la membrane limitant ainsi la fixation non spécifique des anticorps sur la membrane. Le blocage se fait avec des protéines de lait ou albumine de sérum bovin durant 1h à température ambiante. Ensuite, la détection de la protéine d'intérêt se fait à l'aide d'une réaction anticorps/antigène. On utilise donc un premier anticorps qui reconnaît la protéine cible, la dilution de l'anticorps varie selon les cas. L'anticorps primaire est incubé sur la nuit à 4°C. Après une étape de plusieurs rinçages pour éliminer l'anticorps primaire en excès, l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort (HRP), dirigé contre l'espèce de production de l'anticorps primaire, est déposé pour une incubation de 2h à température ambiante. Après les derniers rinçages, la révélation s'effectue grâce à une technique de chimiluminescence, qui utilise un substrat qui réagit avec la peroxydase pour émettre de la luminescence de façon proportionnelle à la quantité de la protéine d'intérêt. La réaction colorimétrique se détecte grâce à la caméra Chemidoc™ XRS+ (Biorad, Marne-la-coquette, France). Les images obtenues sont analysées et quantifiées à l'aide du logiciel Image J. Les différentes cibles ainsi que les anticorps utilisés lors des expériences de WB, sont récapitulés dans le tableau 4.

Protéines	% d'acrylamide du gel	Blocage	Anticorps primaires	Anticorps secondaires
ICAM	10	Lait 5%	R&D AF796 au 1/500°	Anti-goat sc-2768 au 1/2500°
HIF-1	8	BSA 5%	sc-10790 au 1/500°	Anti-Rabbit sc-2004 au 1/2500°
ABT1	8	BSA 5%	sc-15411 au 1/200°	Anti-goat sc-2768 au 1/2500°
Actine	8 ou 10	Lait 5%	Sigma A3853 au 1/1000°	Anti mouse sc-2005 au 1/5000°

Tableau 4. Récapitulatif des différents anticorps utilisés lors des expériences de Western blot ainsi que les conditions d'utilisation.

4. Dosage de l'activité de NF- κ B

L'activité de NF- κ B a été mesurée sur des extraits nucléaires de cellules provenant d'aortes thoraciques. Le dosage de l'activité de NF- κ B s'effectue grâce un kit commercial TransAM (Active Motif). La plaque commerciale est pré-coatée avec une séquence consensus du facteur de transcription NF- κ B, 5'-GGGACTTCC-3'. Un dépôt de 20 μ l d'extraits nucléaires est réalisé dans chaque puits, concentrés à 1mg/ml, auquel sont ajoutés 30 μ l de tampon de fixation durant 1h à température ambiante sous une agitation de 100 rpm. Un blanc ainsi qu'un témoin positif sont également déposés. Pour le blanc, on remplace l'échantillon par le tampon qui a servi à l'extraction nucléaire (paragraphe 5.2). L'extrait à déposer pour effectuer le témoin positif est fourni par le kit et la quantité nécessaire est de 5 μ g par puits. Après 3 lavages, 100 μ l d'anticorps primaire dilué au 1/1000^{ème} dans le tampon prévu à cet effet, sont déposés pendant une heure sous agitation à température ambiante. Après une deuxième étape de lavage, l'anticorps secondaire couplé à la HRP est déposé à raison de 100 μ l par puits, dilué au 1/1000^{ème} dans le tampon de dilution, pendant 1 heure à température ambiante sous agitation. Après 4 rinçages, la réaction colorimétrique s'effectue avec 100 μ l de solution de développement. La réaction est stoppée par ajout de 100 μ l de solution STOP. La lecture de la plaque se fait dans les 5 minutes suivant le dépôt de la solution STOP, au spectrophotomètre, à une longueur d'onde de 450 nm avec une correction à 655 nm. Les résultats sont alors interprétés après soustraction pour chaque valeur de la valeur du blanc, puis ils sont exprimés en pourcentage par rapport au groupe normoxique contrôle.

5. Dosage des cytokines dans la paroi aortique

La quantification des cytokines a été effectuée grâce à un kit commercial (AAM-CYT-2-4, RayBiotech, Inc, Norcross, USA). Ce kit fournit des membranes comme celles que l'on peut utiliser lors d'un Western blot mais celles-ci sont déjà recouvertes avec les cytokines d'intérêt. Ces membranes ont permis une analyse semi-quantitative de 32 cytokines murines (6Ckine, CTACK: cutaneous T-cell attracting chemokine, Eotaxin-1: eosinophil chemotactic protein, G-CSF: granulocyte colony-stimulating factor, GM-CSF: granulocyte macrophage colony-stimulating factor, IL: interleukines 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 12 p40/p70, 12 p70, 13 et 17, IFN- γ : interferon gamma, CXCL1: chemokine (C-X-C motif) ligand 1, leptine MCP: monocyte chemotactic proteins 1 et 5, MIP: macrophage inflammatory proteins 1 α , 2 et 3 β , RANTES, SCF: stem cell factor, sTNFRI: soluble tumour necrosis factor receptor I, TARC:

thymus- and activation-regulated chemokine, TIMP-1: tissue inhibitor of metalloproteinases 1, TNF α : tumour necrosis factor alpha, THPO: thrombopoietin, VEGF-A: vascular endothelial growth factor A). Une membrane a été utilisée pour chacun des 4 groupes testés dans l'étude bosentan de la partie I (N, IH, N+Bos et IH+Bos). Afin d'avoir des résultats plus représentatifs, nous avons rassemblé 125 μ g d'extrait cytoplasmique aortique de 2 animaux différents pour obtenir un total de 250 μ g de protéines par membrane. Les membranes sont bloquées avec un tampon de blocage pendant 30 min à température ambiante. Les échantillons sont déposés sur la membrane à raison de 250 μ g d'extrait aortique par membrane, s'en suit une incubation sur la nuit à 4°C avec une légère agitation. Chaque membrane est ensuite lavée 5 fois avec les 2 tampons de lavage fournis avec le kit. L'anticorps biotinylé est alors incubé 2h à température ambiante. Après lavage, la HRP-streptavidine est incubée 2h à température ambiante. Après un dernier lavage, la chimiluminescence est détectée grâce à la caméra Chemidoc™ XRS+ (Biorad, Marne-la-coquette, France). L'analyse des images est faite grâce au logiciel ImageLab™ (Biorad, Marne-la-Coquette, France).

6. Dosage de la desmosine et de l'hydroxyproline

Un morceau de 3 mm d'aorte thoracique est utilisé pour le dosage de la composition de la paroi aortique. Les tissus sont lysés grâce à des vapeurs d'HCl. Après élimination de l'HCl, le lysat est re-suspendu dans de l'eau milli-Q. Le taux de desmosine, considéré comme représentatif du contenu en élastine, est quantifié par dosage radio-immunologique tel que décrit par Starcher et al. (Starcher et Conrad 1995), grâce à une collaboration avec Barry Starcher (Université du Texas). Le taux d'hydroxyproline, qui est considéré comme représentatif du contenu en collagène de l'échantillon, est évalué par Jean-Pierre Andrieu (IBS, Grenoble) avec une analyse des acides aminés grâce à une chromatographie par échange d'ions effectué sur « Biochrom 30 amino acid analyzer » (Cambridge, Royaume-Uni).

7. PCR quantitative

Pour réaliser le dosage des ARNm, tous les instruments sont nettoyés lors des prélèvements avec du RNase Remover (Bioassay, Hayward, Etats-Unis), ce qui permet d'éliminer autant que possible les RNase qui risquent de dégrader l'ARN. L'extraction

d'ARN est réalisée sur des morceaux de cœur d'environ 50 mg avec 1 ml de TRI-Reagent® T942 (Sigma-Aldrich) et le broyage s'effectue avec l'homogénéisateur de tissu Precellys (Ozyme), ce qui permet une extraction homogène de tous les tissus en même temps. L'extraction de l'ARN se fait ensuite grâce à plusieurs étapes qui permettent de l'isoler des protéines avec du chloroforme et de l'ADN avec du 2-propanol. L'ARN est ensuite précipité avec de l'éthanol puis la pelote est re-solubilisée dans l'eau. La concentration d'ARN ainsi que sa pureté sont analysées au spectrophotomètre (SmartSpec Plus, Bio Rad, Marne la coquette, France). La reverse transcriptase PCR (RT-PCR) est réalisée à l'aide d'iScript Ready-to-Use cDNA Supermix (Bio Rad). Les ADNc obtenus après la RT-PCR sont conservés à -80°C en vue des PCR quantitatives. Les différents gènes testés ensuite pour la PCR quantitative sont amplifiés avec le même cycle sur le thermocycleur (30 sec à 95°C, 5 sec à 95°C et 10 sec à 58°C, cela répété 40 fois) (C1000™ Thermal Cycler couplé à un CFX96 Real-Time System, Bio-Rad, Marne la coquette, France). Les amorces associées aux 3 gènes testés sont résumées dans le tableau 5. Les résultats sont rapportés à un gène de référence, ici *Rn18s*.

Gènes	Amorces	
ET-1	forward	5'-AAGGAAGGAAACTACGAAGGTTGGA-3'
	reverse	5'-TCTGTAGTCAATGTGCTCGGTTGTG-3'
HIF-1	forward	5'-ACGATGAACATCAAGTCAGCAACG-3'
	reverse	5'-TCACAAATCAGCACCAAGCACG-3'
FNA	forward	5'-TCAAGAACCTGCTAGACCACCTGG-3'
	reverse	5'-CCCTGCTTCCTCAGTCTGCTCA-3'
Rn18s	forward	5'-GGAAGAATAACTTCAGACCGCCC-3'
	reverse	5'-TGCAGCGGACAGTGTCTTGTTT-3'

Tableau 5. Résumé des amorces utilisées pour la PCR quantitative

VI. Analyses statistiques

Les données expérimentales sont présentées sous forme de moyenne \pm erreur standard de la moyenne (SEM). Les données ont été comparées soit par des analyses de variance à 2 voies (ANOVA) associées à des tests post-hoc de Bonferroni soit par des tests de Mann-Whitney à l'aide du logiciel SigmaStat (San Jose, Californie, USA). Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

RESULTATS

Partie I

Etude de l'implication du facteur de transcription HIF-1 et de l'endothéline dans le remodelage vasculaire induit par l'hypoxie intermittente.

I. Article I : “HIF-1 and endothelin promote the inflammatory vascular remodeling induced by chronic intermittent hypoxia”

Soumis à **Sleep** (en révision)

Dans cette première étude, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de l'impact vasculaire de l'hypoxie intermittente. Nous avons ainsi exposé à l'HI des souris *HIF1α*^{+/-}, génétiquement modifiées pour le gène de la sous-unité α de HIF-1, ainsi que des souris traitées avec du bosentan, un antagoniste mixte des récepteurs ET-A et ET-B de l'endothéline. Après 14 jours de normoxie ou d'HI, nous avons quantifié l'inflammation systémique par la mesure de la capacité de prolifération et de migration des splénocytes. L'inflammation aortique locale a également été évaluée par mesure de l'activité de NF-κB, mais aussi par la quantification des cytokines présentes dans la paroi. Enfin, nous avons estimé le remodelage vasculaire via la mesure de l'épaisseur intima-média aortique.

Les résultats de cette étude montrent que l'HI induit une inflammation systémique après seulement 14 jours et que cette inflammation est abolie chez les souris *HIF1α*^{+/-} ou par le traitement au bosentan. L'activité de NF-κB et l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans la paroi aortique sont également amplifiées par l'HI. L'augmentation de l'activité de NF-κB n'est plus retrouvée chez les souris *HIF1α*^{+/-} et celles traitées au bosentan. Le bosentan abolit également l'augmentation de MCP-5 ou TNF-α dans la paroi aortique. Pour terminer, le remodelage vasculaire induit par l'HI est également absent chez les souris *HIF1α*^{+/-} et après traitement par bosentan.

Cette étude nous permet donc de conclure que HIF-1 et l'endothéline sont impliqués dans l'inflammation systémique et locale et le remodelage vasculaire associé induits par l'HI.

HIF-1 and endothelin promote the inflammatory vascular remodeling induced by chronic intermittent hypoxia

Emmanuelle Gras^{1,2}, Elise Belaidi^{1,2}, Claire Arnaud^{1,2}, Anne Briançon-Marjollet^{1,2}, Peter Carmeliet^{4,5}, Jean-Louis Pépin^{1,2,3} and Diane Godin-Ribuot^{1,2}

¹ Université Grenoble Alpes, Laboratoire HP2, Grenoble, F-38042 France

² INSERM, U1042, Grenoble, F-38042 France

³ CHU de Grenoble, Grenoble, F-38042 France

⁴ Laboratory of Angiogenesis and Neurovascular link, Vesalius Research Center, Department of Oncology, University of Leuven, Leuven, B-3000 Belgium

⁵ Laboratory of Angiogenesis and Neurovascular link, Vesalius Research Center, VIB, Leuven, B-3000 Belgium

Short title: HIF-1 and ET-1 in inflammation and vascular remodeling

Financial support: grant from APMC Foundation (D. Godin-Ribuot).

Off-label or investigational drug use: None.

Conflicts of interest for each author: None.

Corresponding author:

Diane Godin-Ribuot, Ph.D.

Laboratoire HP2, Inserm U1042

Institut Jean Roget

Faculté de Médecine de Grenoble, BP 170

38042 Grenoble Cedex 9, France

Phone: +33 476 63 75 63

Fax: +33 476 63 71 78

Email: diane.ribuot@ujf-grenoble.fr

ABSTRACT

OBJECTIVES: Obstructive sleep apnea (OSA) is a major risk factor for cardiovascular mortality and apnea-induced intermittent hypoxia (IH) is known to promote various cardiovascular alterations such as vascular remodeling. However, underlying mechanisms remain incompletely investigated. We have shown that the HIF-1 transcription factor and its target gene, endothelin (ET-1), are involved in hypertension and increased myocardial infarction following IH. The objective of the present study was thus to investigate their role in the development of vascular remodeling.

INTERVENTIONS: Mice partially deficient for the *Hif1a* gene (HIF-1 α ^{+/-}) or treated with bosentan, a mixed endothelin receptor antagonist, were exposed to IH or to normoxia for 2 weeks 8 hours/day. Splenocyte proliferation and migration as well as aortic NF- κ B activity, cytokine expression and intima-media thickness (IMT) were measured.

RESULTS: IH induced a systemic and aortic inflammation shown by increased splenocyte proliferation/migration and NF- κ B activity. These modifications were absent in HIF-1 α ^{+/-} or bosentan-treated mice. Finally, the IH-induced aortic remodeling characterized by an increased IMT was also abolished by partial HIF-1 α deficiency and bosentan treatment.

CONCLUSION: The results of this study suggest that HIF-1 and endothelin-1 are major contributors to the vascular inflammatory remodeling induced by OSA-related intermittent hypoxia.

KEYWORDS: Intermittent hypoxia; HIF-1; endothelin; inflammation; vascular remodeling

INTRODUCTION

Obstructive sleep apnea (OSA) syndrome is a common sleep-related breathing disorder, characterized by repetitive upper airway collapses during sleep resulting in intermittent hypoxia (IH), sleep fragmentation and obstructed respiratory efforts¹. OSA represents a substantial public health problem since it affects up to 10% of the general population² and is recognized as an important and independent risk factor for cardiovascular disease³. Accumulating evidence from OSA patients and animal models suggests that chronic intermittent hypoxia (IH) is probably the most important OSA-related stimulus in terms of cardiovascular morbidity and mortality. Indeed both OSA and experimental IH promote hypertension, stroke and coronary artery disease^{1,4}.

OSA is now considered an independent risk factor for atherosclerosis in apneic patients, evidenced by increased intima-media thickness (IMT) and atherosclerotic plaque occurrence⁵. IH seems to play a major role in this OSA-associated vascular remodeling, since it is correlated with the severity of nocturnal oxygen desaturation^{6,7} and reversed by continuous positive airway pressure (CPAP), the standard treatment of obstructive apneas⁸. Furthermore, experimental studies in mice exposed to IH show that IH induces both early vascular remodeling⁹ and atherosclerosis^{10,11}. Several mechanisms have been proposed to explain OSA-related vascular alterations, including hemodynamic, metabolic, oxidative and inflammatory disturbances. Among them, we have focused on inflammation since, as atherosclerosis, OSA is considered a chronic low-grade inflammatory disease⁵. Hence, OSA patients present with increased plasma levels of inflammatory markers, i.e. cytokines, chemokines and adhesion molecules, in correlation with both oxygen desaturation and carotid IMT⁷. Furthermore, we have confirmed the major role of inflammation in IH-induced vascular remodeling by showing that it is involved in both early vascular remodeling⁹ and atherosclerosis¹⁰ in our murine model of IH.

Among the other cardiovascular alterations induced by IH, others and we have shown that activation of the endothelin system plays an important role in the development of hypertension and in the increase in infarct size following IH^{12, 13}. Like many other genes that have an impact on the cardiovascular system (such as the VEGF, iNOS or EPO genes), the endothelin-1 (ET-1) gene is upregulated under the control of the Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)¹⁴. Using chromatin immunoprecipitation we have demonstrated that HIF-1 was bound to the endothelin gene promoter in rats exposed to IH¹³. The fact that we observed HIF-1 binding of the ET-1 gene several hours after the end of IH exposure is consistent with experimental evidence showing that intermittent hypoxia is a much more potent stimulus for HIF-1 stabilization, transcription and activity than continuous hypoxia¹⁵.

The deleterious impact of the ET-1 peptide on the cardiovascular system, through its vasoconstrictive, pro-inflammatory and cell proliferating properties, is well recognized (for a review see¹⁶). In accordance, several studies have reported elevated plasma ET-1 levels in patients with coronary artery diseases such as angina¹⁷ or myocardial infarction¹⁸. The HIF-1 transcription factor is also known to play a role in the development of atherogenic vascular disease (for a review see¹⁹). Moreover, HIF-1 protein expression is stimulated by pro-atherogenic factors, such as oxidized-LDL, making it a key actor in the cellular events that result in atherosclerotic lesions²⁰.

In view of the established interaction between HIF-1 and ET-1 on the development of cardiovascular alterations in response to IH¹³ and based on the clinical data showing high tissue levels of HIF-1²¹ and increased plasma ET-1 levels²² in OSA patients, we investigated the role of HIF-1 and ET-1 in the vascular remodeling induced by IH. To this end we studied the effects of IH in two murine models: mice partially deficient for *Hif1a* gene, encoding for the oxygen sensitive α subunit of HIF-1, and mice treated with bosentan, a mixed endothelin receptor antagonist.

The results of the present study demonstrate the involvement of the HIF-1/endothelin system in the systemic and aortic inflammation leading to the vascular remodeling induced by chronic exposure to intermittent hypoxia.

METHODS

Experimental groups

HIF-1 α knockout

Seven- to nine-week-old male mice (50% Swiss/50% 129SvJ background) partially deficient for the gene encoding for *Hif1 α* (HIF-1 $\alpha^{+/-}$) and their control wild-type (WT) littermates were investigated in this study.

Bosentan treatment

Seven- to nine-week-old male C57BL/6J mice (Janvier, Laval, France) treated or not with bosentan (Bos) were also investigated. Bosentan (RO470203), graciously provided by Actelion (Basel, Switzerland), was added to the food (100mg/kg/day) during the whole IH protocol.

The groups described above were all submitted to normoxia and IH, making it a total of eight experimental groups. All experiments were conducted in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes (Council of Europe, European Treaties ETS 123, Strasbourg, 18 March 1986), and to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) and were approved by an Institutional Animal Care and Use Committee.

Intermittent hypoxia protocol

Animals were exposed to intermittent hypoxia (IH) or normoxia (N) as previously described ⁴. Briefly, animals were exposed, in their cages and during their daytime sleeping period, to 8 consecutive hours of 1-min IH cycles (alternating 30s of 21% and 30s of 5% FiO₂, 60 cycles/h) for 14 consecutive days. FiO₂ was monitored throughout experiments with a gas analyzer (ML206, ADInstruments, Oxford, United Kingdom). Control normoxic (N) animals were exposed to similar 1-min air-air cycles in order to reproduce the noise and air

turbulences of the IH stimulus. After 14 days of exposure mice were anesthetized with ketamine and xylazine (100 mg/kg–10 mg/kg) or pentobarbital (180 mg/kg). Blood was obtained by cardiac puncture and collected in EDTA tubes (K2E, BD Microtainer®, Pont de Claix, France) for hematocrit assessment. Thoracic aorta were removed and OCT-embedded or immediately frozen in liquid nitrogen and samples were stored at -80°C until analysis. Spleens were removed and placed in PBS for proliferation and migration tests.

Splenocyte proliferation and migration

Splenocytes were isolated and cultured in 96-well plates at a concentration of 5×10^6 cells/ml in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 25 mM HEPES buffer, 2 mM l-glutamine, 100 U/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin. Cells were stimulated in triplicates with graded concentrations of the mitogenic factor concanavalin-A (Sigma, Saint-Quentin-Falavier, France) and cell proliferation was determined 48 hours later using a non-radioactive MTS cell proliferation assay (Promega, Charbonnières-les-Bains, France).

Isolated splenocytes were also incubated at a concentration of 10^5 cells/ml in RPMI without serum, and 100 μ L were deposited in the upper part of a Transwell® (8 μ m pores, Corning, NY, USA). MCP-1 (1nM) was added in the lower chamber. After 1 hour of incubation at 37°C, transwells were retrieved and the splenocytes that had migrated through the membrane were counted in the bottom of the wells.

Aortic NF- κ B p50 activity

Nuclear proteins were extracted from frozen aortas using a commercial kit (Nuclear Extract Kit, Active Motif Europe, Rixensart, Belgium). Activity of the p50 subunit of NF- κ B was quantified on nuclear protein extracts using a DNA-binding Assay (TransAM, Active

Motif Europe, Rixensart, Belgium). This assay is based on the fixation of activated NF- κ B on its consensus binding site containing the 5'-GGGACTTTCC-3' nucleotide sequence.

Aortic cytokine assay

Cytokine quantification was done using a commercial kit (AAM-CYT-2-4, RayBiotech, Inc, Norcross, USA) according to the manufacturer's instructions. One membrane was used for each of the four groups of the bosentan study (N, IH, N+Bos and IH+Bos). In order to attain more representative results, we pooled 125 μ g of protein extract from two different animals so that a total of 250 μ g of protein was loaded on each membrane. Briefly, membranes were blocked with blocking buffer for 30 minutes at room temperature (RT). Samples were incubated overnight at 4°C with 1ml of diluted sample (250 μ g/ml). Each membrane was washed and incubated with a biotinylated antibody cocktail for 2 hours at RT. After a second wash, HRP-streptavidin incubation was performed for 2 hours at RT. After a third wash, chemiluminescence was detected using the Chemidoc™ XRS+ (Biorad, Marne-la-coquette, France) and the kit's detection buffer. Analysis was performed with the ImageLab™ software (Biorad, Marne-la-Coquette, France) and the results were expressed relative to the normalised values of the normoxic group.

Intima media thickness

OCT-embedded 8- μ m aortic sections (Tissue tek®-OCT, Sakura, Leiden, Netherlands) were stained with hematoxylin-eosin. Measurements were carried out under light microscopy (Nikon Eclipse 80i, Champigny-sur-Marne, France) using the NIS-Element AR 3.10 analysis software. Morphometric analysis was performed on 8 to 10 aortic sections per animal (up to 10 measurements per section).

Statistical analysis

Experimental data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Data were analyzed using 2-way analyses of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-hoc comparisons or Mann-Whitney U tests with the SigmaStat Software (San Jose, California, USA). A 2-sided p value <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Effect of IH on hematocrit

In the HIF-1 α knockout study, while the hematocrit was significantly increased after 14 days of IH in WT mice (50.4 ± 0.5 vs. 48.2 ± 0.8 % after normoxia), this increase was attenuated in HIF-1 α ^{+/-} mice (51.0 ± 0.5 vs. 49.3 ± 0.7 % after normoxia, $p=0.07$) (Figure 1A). IH exposure significantly increased hematocrit in both bosentan-treated (50.3 ± 0.6 vs. 47.7 ± 0.6 % after normoxia) and untreated (50.2 ± 0.5 vs. 47.7 ± 0.5 % after normoxia) mice (Figure 1B).

Effect of IH on inflammation markers

Systemic inflammation

Mice exposed to 14 days of IH displayed a systemic inflammation, as shown by an increase in splenocyte proliferation in both control groups (WT and untreated mice) (Figure 2A and 2C). This was abolished by partial HIF-1 α knockout (Figure 2B) as well as by bosentan treatment (Figure 2D). Moreover, migration of splenocytes from WT mice exposed to IH was higher than that of splenocytes from normoxic mice (Figure 2E). This effect was also prevented by partial HIF-1 α knockout (Figure 2F).

Local inflammation in aorta

Notably, IH exposure induced an important and significant increase in the activity of NF- κ B, the principal transcription factor of inflammation, in the aortic wall. Aortic NF- κ B activity was significantly increased following IH in both WT (302.1 ± 120.1 % relative to normoxic group values) and untreated C57BL/6J (125.2 ± 5.6 % relative to normoxic group values) mice (Figure 3A and 3B). Here again, this effect was completely abolished by partial HIF-1 α knockout and by bosentan treatment (Figure 3A and 3B). Cytokine microarrays revealed that various cytokines were increased by IH in the aortic wall (fig. 4). In the case of some

cytokines, such as granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interleukins (IL) 2, 6 and 13, leptin, thymus- and activation-regulated chemokine (TARC) and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1), this effect was little or not affected by bosentan treatment (fig. 4a). However, bosentan treatment reduced or abolished the IH-related increase in monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), tumor necrosis factor alpha (TNF α), thrombopoietin (THPO) and cutaneous T-cell attracting chemokine (CTACK).

Effect of IH on aortic intima-media thickness

Histological examination of the aortic wall revealed that IH resulted in a disorganization of elastic fibers in WT (Figure 5A) and untreated C57BL/6J mice only, since this effect was absent in mice with partial HIF-1 α deletion or bosentan treatment (data not shown). Intima-media thickness was also significantly increased by IH exposure in both WT (34.6 ± 1.8 vs. 28.5 ± 0.6 μ m after normoxia), and untreated C57BL/6J (27.8 ± 0.8 vs. 21.7 ± 0.6 μ m after normoxia) mice but not in HIF-1 α ^{+/-} and bosentan-treated C57BL/6J mice (Figure 5B and 5C). The variations in intima-media thickness could not be explained by changes in elastin or collagen content. Indeed, aortic desmosine and hydroxyproline levels were not significantly altered by IH exposure, partial HIF-1 α or bosentan treatment (Table 1).

DISCUSSION

This study provides novel mechanisms behind the pre-atherogenic vascular remodeling induced by intermittent hypoxia in mice. We here demonstrate that the HIF-1 transcription factor and its target gene endothelin-1 are responsible for systemic and vascular pro-inflammatory effects of IH leading to aortic remodeling. Indeed, partial deletion of the HIF-1 α subunit and endothelin receptor inhibition completely abolished the various pro-inflammatory and vascular effects of IH.

The increase in hematocrit seen in all animals subjected to IH, including those treated with bosentan, is in agreement with various observations from our laboratory. The increase in mice is generally modest^{9, 23} compared to that observed in rats²⁴, but it is statistically significant and a good indicator not only of adequate exposure to IH but also of the involvement of the hypoxia inducible factors in the adaptation to our IH stimulus. Indeed, we observed that, although statistical difference was lost, the hematocrit values of HIF-1 α ^{+/-} mice remained elevated following IH compared to their wild-type counterparts. This could be due to the fact that the HIF-2 transcription factor is principally the one responsible for EPO production and therefore of hematocrit levels²⁵, and is mainly expressed over HIF-1 by EPO producing kidney cells²⁶.

HIF-1 appears however to be the principal hypoxia sensitive transcription factor regarding the systemic and vascular inflammatory response to IH. This is in agreement with a recent study showing that, contrary to HIF-1, endothelial HIF-2 exerts anti-inflammatory properties²⁷. Indeed, we observed that partial HIF-1 α deletion was sufficient to completely prevent the IH-induced splenocyte proliferation and migration, vascular NF- κ B activity and aortic remodeling. We investigated HIF-1 α ^{+/-} mice since complete HIF-1 α deficiency results in developmental arrest and lethality at mid-gestation because of neural tube defects, abnormal neural crest migration and cardiovascular malformations²⁸. We were unable to

assay HIF-1 activity in addition to NF- κ B in our aortic extracts because of the limited amount of tissue. However, according to the literature, basal HIF-1 protein levels are decreased by half in HIF-1 α +/- mice and do not increase in response to IH in contrast to their WT counterparts²⁹. In accordance, partially deficient HIF-1 α +/- mice do not develop pulmonary hypertension in response to sustained hypoxia³⁰ or systemic hypertension in response to IH²⁹.

Regarding NF- κ B, HIF-1 is known to closely interact, in a cross-talk fashion, with this key transcription factor of pro-inflammatory genes³¹. Hence, inactivation of NF- κ B by I κ - κ B deletion leads to a reduced expression of HIF-1 α in mice exposed to hypoxia³². Thus, the lack of NF- κ B activity observed in our HIF-1 α ^{+/-} mice exposed to IH might have contributed to further decrease HIF-1 activity in a feed-forward mechanism. Moreover, NF- κ B activation upon IH, and its abolition by partial HIF-1 α deletion, can also explain our results regarding systemic inflammation since the NF- κ B pathway has been shown to promote splenocyte proliferation via I- κ B kinase β (IKK β) activity^{33, 34}. Finally, there is mounting evidence that HIF-1 *per se* is a key regulator of intrinsic immune and inflammatory responses³¹.

The increase in intima-media thickness that we observe following 14 days of IH is indicative of an early vascular remodeling. We have previously shown that it is not due to smooth muscle cell proliferation and is associated with increased infiltration of T cells and with mucoid deposits between the vascular wall elastic fibers⁹. In the present study, we also observed a disorganization of the elastic fibers and we assayed desmosine, an elastin biomarker, in order to identify additional mechanisms to explain the IH-induced increase in aortic wall thickness. Hydroxyproline, a collagen biomarker, was also assayed since collagen prolyl 4-hydroxylase type 1, the enzyme responsible for the formation of vascular collagen, is up-regulated by HIF-1 upon hypoxia³⁵. We were however unable to observe significant effects of IH on aortic hydroxyproline and desmosine content (Table 1). This confirms our

previous observation that local inflammatory processes, enhanced by a systemic inflammation, are responsible for the IH-induced vascular remodeling⁹.

Another key result of this study is that the systemic and vascular inflammation and remodeling induced by HIF-1 are mediated through an activation of the endothelin system. We have previously demonstrated the role of ET-1 in the increase in infarct size promoted by IH exposure in rats¹³. Its involvement in the development of hypertension in response to IH is also well documented^{12, 13}. In the present study, treatment with bosentan, a mixed ET-1 receptor antagonist, throughout IH exposure abolished systemic and local inflammatory responses and prevented aortic remodeling. The mechanism behind the vascular remodeling induced by ET-1 in mice exposed to IH has been shown to involve nuclear factor of activated T cells isoform 3 (NFATc3)³⁶. Our results are in favor of a mechanism also involving NF- κ B since its activation upon IH was abolished in bosentan-treated mice. Both observations are of particular relevance and warrant further investigation at the vascular level in view of the established cross talk between the two transcription factors in cardiac hypertrophy and remodeling³⁷.

The complete abolition of aortic NF- κ B activation by bosentan in IH-exposed mice can be explained by the well-known ability of ET-1 to promote NF- κ B activity through monocyte TNF α release¹⁶. Accordingly, we observed that bosentan treatment reduced aortic TNF α expression in response to IH. Bosentan also prevented the expression of MCP-5 and CTAK, likewise involved in atherosclerotic plaque progression^{38, 39}.

Finally, thrombopoietin (THPO) was also among the cytokines increased by IH and normalized by bosentan. THPO is a glycoprotein regulating the production of platelets by the liver, kidney, and bone marrow. It is increased in pro-inflammatory states primarily through TNF α stimulation⁴⁰. The preventing effect of bosentan on IH-induced THPO increase could thus be explained by its ability to reduce TNF α production¹⁶. This is an additional

observation in support for the use of endothelin receptor antagonists in OSA patients. Indeed, mean platelet volume, which reflects platelet production and is an indicator of cardiovascular disease-related platelet activation/aggregation, is increased in OSA patients⁴¹. In various aspects, the results of the present study are clinically relevant since OSA patients present increased tissue HIF-1²¹ and plasma endothelin levels⁴². Moreover, apneic patients exhibit lymphocyte activation⁴³ and increased plasma CRP, cytokine and chemokine levels. This is associated with a significant vascular remodeling⁷ and corrected by CPAP treatment^{7,44,45}.

In conclusion, the intermittent hypoxia-induced thickening of the aortic wall is associated with pro-inflammatory effects that appear to be principally caused by the HIF-1 transcription factor and its subsequent activation of the endothelin system. Indeed, partial HIF-1 α deletion and endothelin receptor antagonism were sufficient to completely reverse the inflammatory systemic and vascular effects of intermittent hypoxia as well as the associated vascular remodeling (all findings are summarized in Figure 6). These arguments are in favor of a therapeutic approach targeting the endothelin system in OSA patients at risk for vascular disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to acknowledge the help provided by Pr. Barry Starcher, University of Texas, and Dr. Jean-Pierre Andrieu, IBS Grenoble, for desmosine and hydroxyproline assays, respectively.

DISCLOSURE STATEMENT

This was not an industry-supported study. Funding was provided by a grant from the Agir pour les Maladies Chroniques Foundation. The work of Peter Carmeliet is funded by « Long-term structural Methusalem funding by the Flemish Government », the fund for Scientific Research by the Flemish Government (FWO), the Belgian Science Policy (IUAP-P7/03), Leducq Transatlantic Network Artemis, AXA Research Fund. The authors have indicated no financial conflicts of interest.

REFERENCES

1. Levy P, Tamisier R, Arnaud C, et al. Sleep deprivation, sleep apnea and cardiovascular diseases. *Front Biosci (Elite Ed)* 2012;4:2007-21.
2. Young T, Finn L, Peppard PE, et al. Sleep disordered breathing and mortality: eighteen-year follow-up of the Wisconsin sleep cohort. *Sleep* 2008;31:1071-8.
3. Somers VK, White DP, Amin R, et al. Sleep apnea and cardiovascular disease: an American Heart Association/American College Of Cardiology Foundation Scientific Statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on Clinical Cardiology, Stroke Council, and Council On Cardiovascular Nursing. In collaboration with the National Heart, Lung, and Blood Institute National Center on Sleep Disorders Research (National Institutes of Health). *Circulation* 2008;118:1080-111.
4. Dematteis M, Godin-Ribuot D, Arnaud C, et al. Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding the human disease. *ILAR J* 2009;50:262-81.
5. Arnaud C, Dematteis M, Pepin JL, Baguet JP, Levy P. Obstructive sleep apnea, immuno-inflammation, and atherosclerosis. *Semin Immunopathol* 2009;31:113-25.
6. Baguet JP, Hammer L, Levy P, et al. The severity of oxygen desaturation is predictive of carotid wall thickening and plaque occurrence. *Chest* 2005;128:3407-12.
7. Minoguchi K, Yokoe T, Tazaki T, et al. Increased carotid intima-media thickness and serum inflammatory markers in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:625-30.
8. Drager LF, Bortolotto LA, Figueiredo AC, Krieger EM, Lorenzi GF. Effects of continuous positive airway pressure on early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:706-12.
9. Arnaud C, Beguin PC, Lantuejoul S, et al. The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184:724-31.
10. Arnaud C, Poulain L, Levy P, Dematteis M. Inflammation contributes to the atherogenic role of intermittent hypoxia in apolipoprotein-E knock out mice. *Atherosclerosis* 2011;219:425-31.
11. Jun J, Reinke C, Bedja D, et al. Effect of intermittent hypoxia on atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 2010;209:381-6.
12. Kanagy NL, Walker BR, Nelin LD. Role of endothelin in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension* 2001;37:511-5.
13. Belaidi E, Joyeux-Faure M, Ribuot C, Launois SH, Levy P, Godin-Ribuot D. Major role for hypoxia inducible factor-1 and the endothelin system in promoting myocardial infarction and hypertension in an animal model of obstructive sleep apnea. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:1309-17.
14. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 2005;105:659-69.
15. Semenza GL. Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Semin Cancer Biol* 2009;19:12-6.
16. Agapitov AV, Haynes WG. Role of endothelin in cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2002;3:1-15.

17. Matsuyama K, Yasue H, Okumura K, et al. Increased plasma level of endothelin-1-like immunoreactivity during coronary spasm in patients with coronary spastic angina. *Am J Cardiol* 1991;68:991-5.
18. Miyauchi T, Yanagisawa M, Tomizawa T, et al. Increased plasma concentrations of endothelin-1 and big endothelin-1 in acute myocardial infarction. *Lancet* 1989;2:53-4.
19. Lim CS, Kiriakidis S, Sandison A, Paleolog EM, Davies AH. Hypoxia-inducible factor pathway and diseases of the vascular wall. *J Vasc Surg* 2013;58:219-30.
20. Jiang G, Li T, Qiu Y, Rui Y, Chen W, Lou Y. RNA interference for HIF-1alpha inhibits foam cells formation in vitro. *Eur J Pharmacol* 2007;562:183-90.
21. Kaczmarek E, Bakker JP, Clarke DN, et al. Molecular biomarkers of vascular dysfunction in obstructive sleep apnea. *PLoS One* 2013;8:e70559.
22. Karkoulas K, Lykouras D, Sampsonas F, et al. The role of Endothelin-1 in obstructive sleep apnea syndrome and pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and Endothelin-1 antagonists. *Curr Med Chem* 2010;17:1059-66.
23. Dematteis M, Julien C, Guillermet C, et al. Intermittent hypoxia induces early functional cardiovascular remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:227-35.
24. Totoson P, Fhayli W, Fauray G, et al. Atorvastatin protects against deleterious cardiovascular consequences induced by chronic intermittent hypoxia. *Exp Biol Med (Maywood)* 2013;238:223-32.
25. Kapitsinou PP, Liu Q, Unger TL, et al. Hepatic HIF-2 regulates erythropoietic responses to hypoxia in renal anemia. *Blood* 2010;116:3039-48.
26. Rosenberger C, Mandriota S, Jurgensen JS, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in hypoxic and ischemic rat kidneys. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:1721-32.
27. Kapitsinou PP, Sano H, Michael M, et al. Endothelial HIF-2 mediates protection and recovery from ischemic kidney injury. *J Clin Invest* 2014;124:2396-409.
28. Compennolle V, Brusselmans K, Franco D, et al. Cardia bifida, defective heart development and abnormal neural crest migration in embryos lacking hypoxia-inducible factor-1alpha. *Cardiovasc Res* 2003;60:569-79.
29. Peng YJ, Yuan G, Ramakrishnan D, et al. Heterozygous HIF-1alpha deficiency impairs carotid body-mediated systemic responses and reactive oxygen species generation in mice exposed to intermittent hypoxia. *J Physiol* 2006;577:705-16.
30. Yu AY, Shimoda LA, Iyer NV, et al. Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1alpha. *J Clin Invest* 1999;103:691-6.
31. Nizet V, Johnson RS. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009;9:609-17.
32. Rius J, Guma M, Schachtrup C, et al. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature* 2008;453:807-11.
33. Li ZW, Omori SA, Labuda T, Karin M, Rickert RC. IKK beta is required for peripheral B cell survival and proliferation. *J Immunol* 2003;170:4630-7.
34. Ren H, Schmalstieg A, Yuan D, Gaynor RB. I-kappa B kinase beta is critical for B cell proliferation and antibody response. *J Immunol* 2002;168:577-87.
35. Aro E, Khatri R, Gerard-O'Riley R, Mangiavini L, Myllyharju J, Schipani E. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) but not HIF-2 is essential for hypoxic induction of collagen prolyl 4-hydroxylases in primary newborn mouse epiphyseal growth plate chondrocytes. *J Biol Chem* 2012;287:37134-44.

36. de Frutos S, Caldwell E, Nitta CH, et al. NFATc3 contributes to intermittent hypoxia-induced arterial remodeling in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;299:H356-63.
37. Liu Q, Chen Y, Auger-Messier M, Molkentin JD. Interaction between NFkappaB and NFAT coordinates cardiac hypertrophy and pathological remodeling. *Circ Res* 2012;110:1077-86.
38. Lutgens E, Faber B, Schapira K, et al. Gene profiling in atherosclerosis reveals a key role for small inducible cytokines: validation using a novel monocyte chemoattractant protein monoclonal antibody. *Circulation* 2005;111:3443-52.
39. Schiro A, Wilkinson F, Weston R, et al. 179 The Role Of Microparticles in Carotid Disease. *Heart* 2014;100:A101.
40. Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest* 2005;115:3339-47.
41. Kanbay A, Tutar N, Kaya E, et al. Mean platelet volume in patients with obstructive sleep apnea syndrome and its relationship with cardiovascular diseases. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2013;24:532-6.
42. Gjorup PH, Sadauskiene L, Wessels J, Nyvad O, Strunge B, Pedersen EB. Abnormally increased endothelin-1 in plasma during the night in obstructive sleep apnea: relation to blood pressure and severity of disease. *Am J Hypertens* 2007;20:44-52.
43. Dyugovskaya L, Lavie P, Lavie L. Lymphocyte activation as a possible measure of atherosclerotic risk in patients with sleep apnea. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1051:340-50.
44. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation* 2005;112:2660-7.
45. Yokoe T, Minoguchi K, Matsuo H, et al. Elevated levels of C-reactive protein and interleukin-6 in patients with obstructive sleep apnea syndrome are decreased by nasal continuous positive airway pressure. *Circulation* 2003;107:1129-34.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Increase in hematocrit in response to a 2-week exposure to intermittent hypoxia (IH) compared to normoxia (N). Effects of (A) Partial *Hif1a* knockout and (B) Oral bosentan treatment (100mg/kg/day) throughout IH exposure. n= 8 to 15 animals per group. Data are presented as mean \pm SEM. *p < 0.05 *versus* normoxic group values.

Figure 2. Partial *Hif1a* knockout or bosentan treatment abolished the intermittent hypoxia (IH)-induced systemic inflammation. Left side: splenocyte proliferation (delta *versus* unstimulated cell values) upon increasing doses of concanavalin A (Con-A) in (A) WT, (B) HIF-1 $\alpha^{+/-}$, (C) Untreated and (D) Bosentan-treated mice. Right side: splenocyte migration (% of normoxic group values) in response to MCP-1 in (E) WT and (F) HIF-1 $\alpha^{+/-}$ mice. n= 9 to 13 animals per group. Data are presented as mean \pm SEM. *p<0.05 *versus* normoxic (N) group values.

Figure 3. Increase in p50 NF- κ B activity in thoracic aorta in response to a 2-week exposure to intermittent hypoxia (IH) compared to normoxia (N). Effects of (A) Partial *Hif1a* knockout and (B) Oral bosentan treatment. Results are expressed in % of normoxic control values. n= 6 to 15 animals per group. Data are presented as mean \pm SEM. *p < 0.05 *versus* normoxic group values.

Figure 4. Bosentan treatment partially abolished the intermittent hypoxia (IH)-induced cytokine expression in the aortic wall. (A) Cytokines increased by IH and little or not affected by bosentan (Bos); (B) Cytokines increased by IH and decreased by bosentan. Measurements performed on one membrane per condition with pooled aortic extracts from two animals. All

the other cytokines tested did not vary in response to IH or treatment. Results are expressed relative to normoxic (N) group values. G-CSF: granulocyte macrophage colony-stimulating factor; GM-CSF: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor; IL: interleukin; TARC: thymus and activation regulated chemokine; TIMP-1: tissue inhibitor of metalloproteinases; MCP-5: monocyte chemotactic protein; TNF α : tumor necrosis factor alpha; THPO: thrombopoietin; CTACK: cutaneous T-cell attracting chemokine.

Figure 5. Partial *Hif1a* knockout and bosentan treatment abolished the intermittent hypoxia (IH)-induced structural aortic remodeling. (A) Representative photographs of hematoxylin-eosin stained aortic sections (10x10 magnification) from each group exposed for 2 weeks to normoxia (N) or intermittent hypoxia (IH). Histomorphometric analysis of aortic intima-media thickness (IMT): (B) Effect of partial *Hif1a* knockout; (C) Effect of bosentan treatment. n= 4 to 13 animals per group. Data are presented as mean \pm SEM. *p < 0.05 versus normoxic group values.

Figure 6. Summary of the central role of HIF-1 and ET-1, which are part of the essential mechanisms induced by IH and leading to vascular remodeling via systemic and local inflammation.

Table 1. Aortic level of hydroxyproline and desmosine, markers of collagen and elastin content respectively, in mice exposed to intermittent hypoxia (IH) or normoxia (N). Values are expressed relative to vessel length (mm). Assays were performed on WT, HIF1 α ^{+/-}, untreated and bosentan treated mice. n= 6-14 animals per group. Results are expressed as mean \pm SEM.

Figure 1.

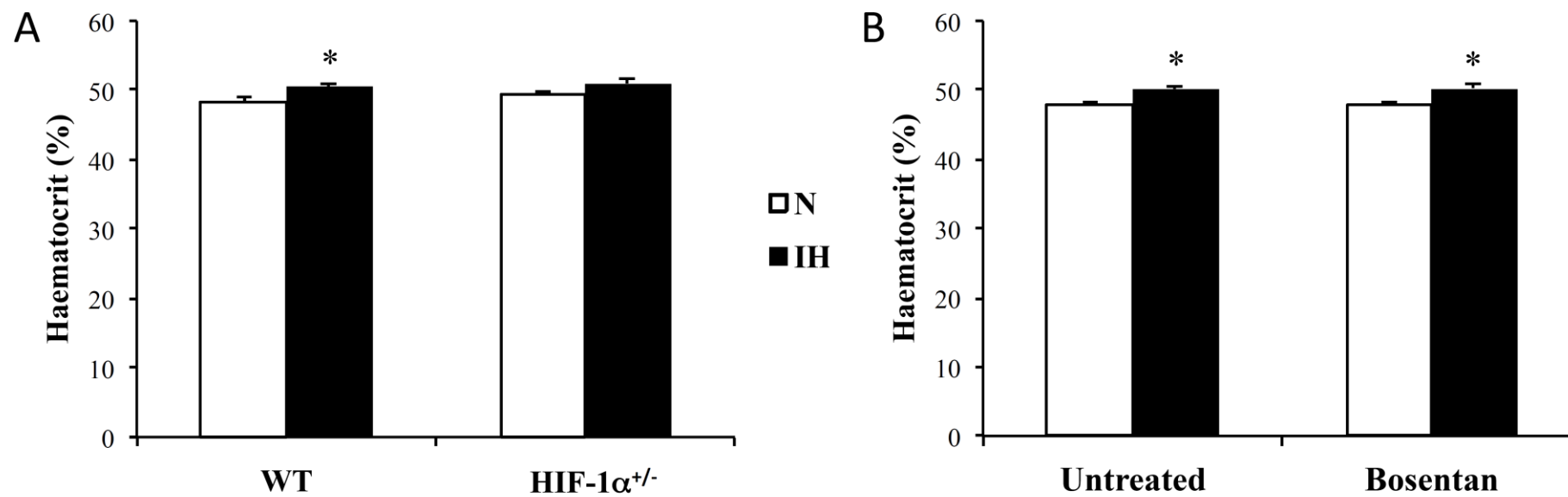


Figure 2.

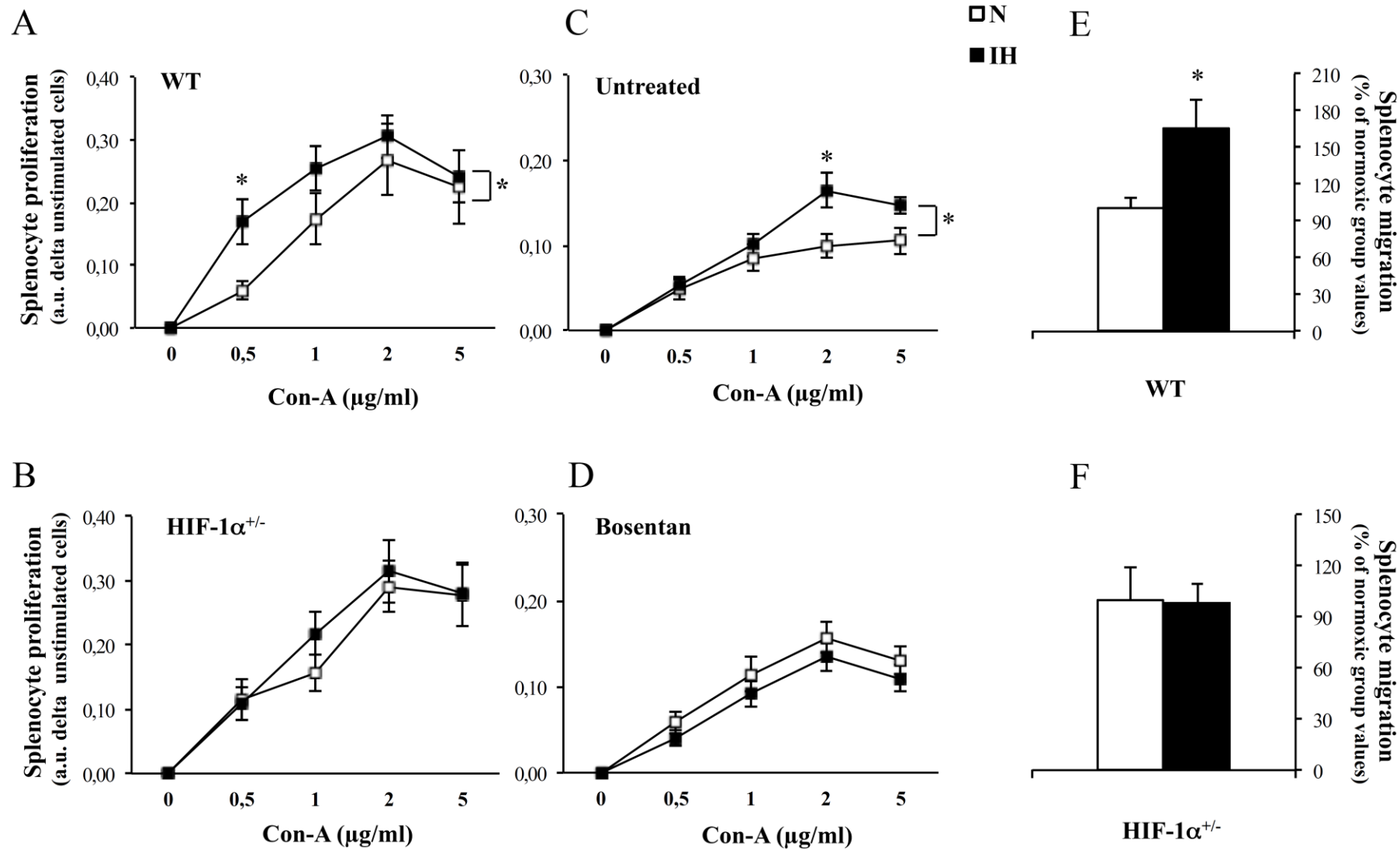


Figure 3.

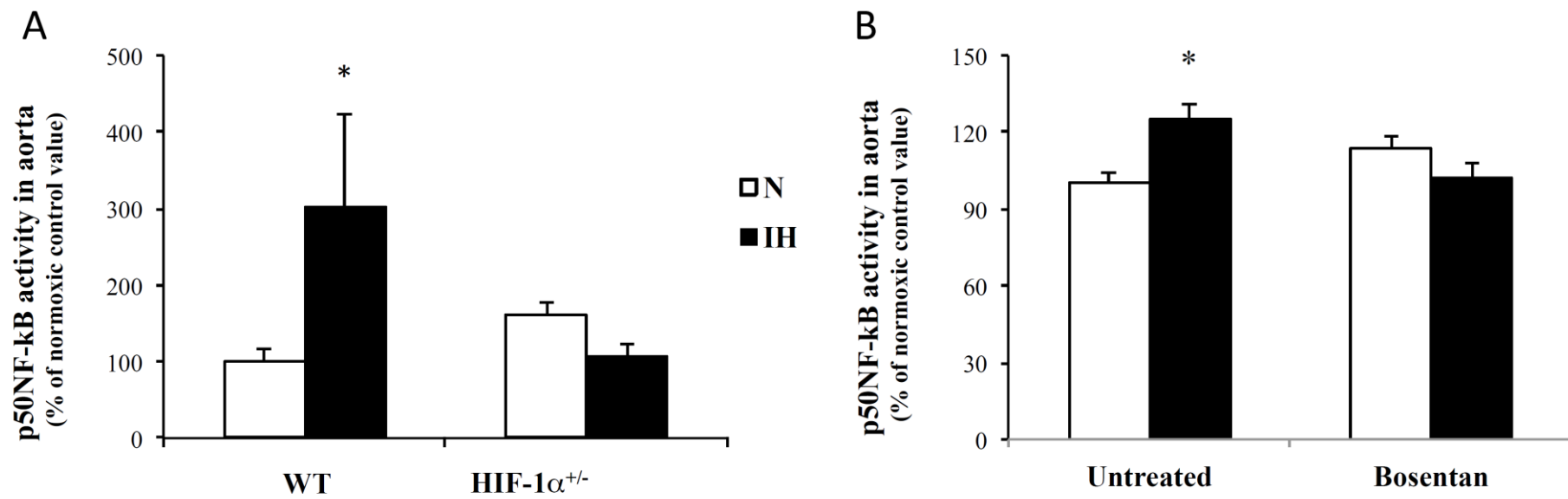


Figure 4.

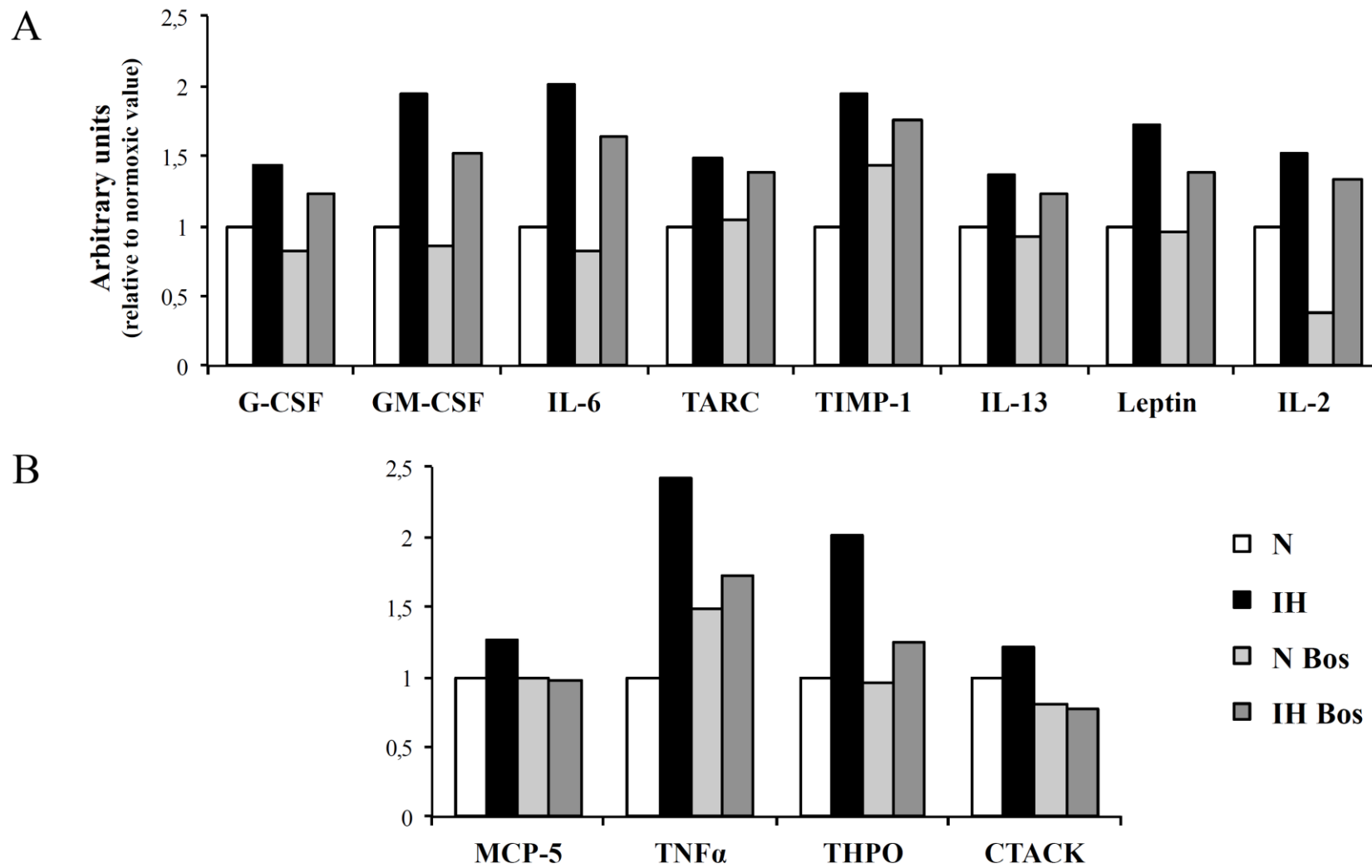


Figure 5.

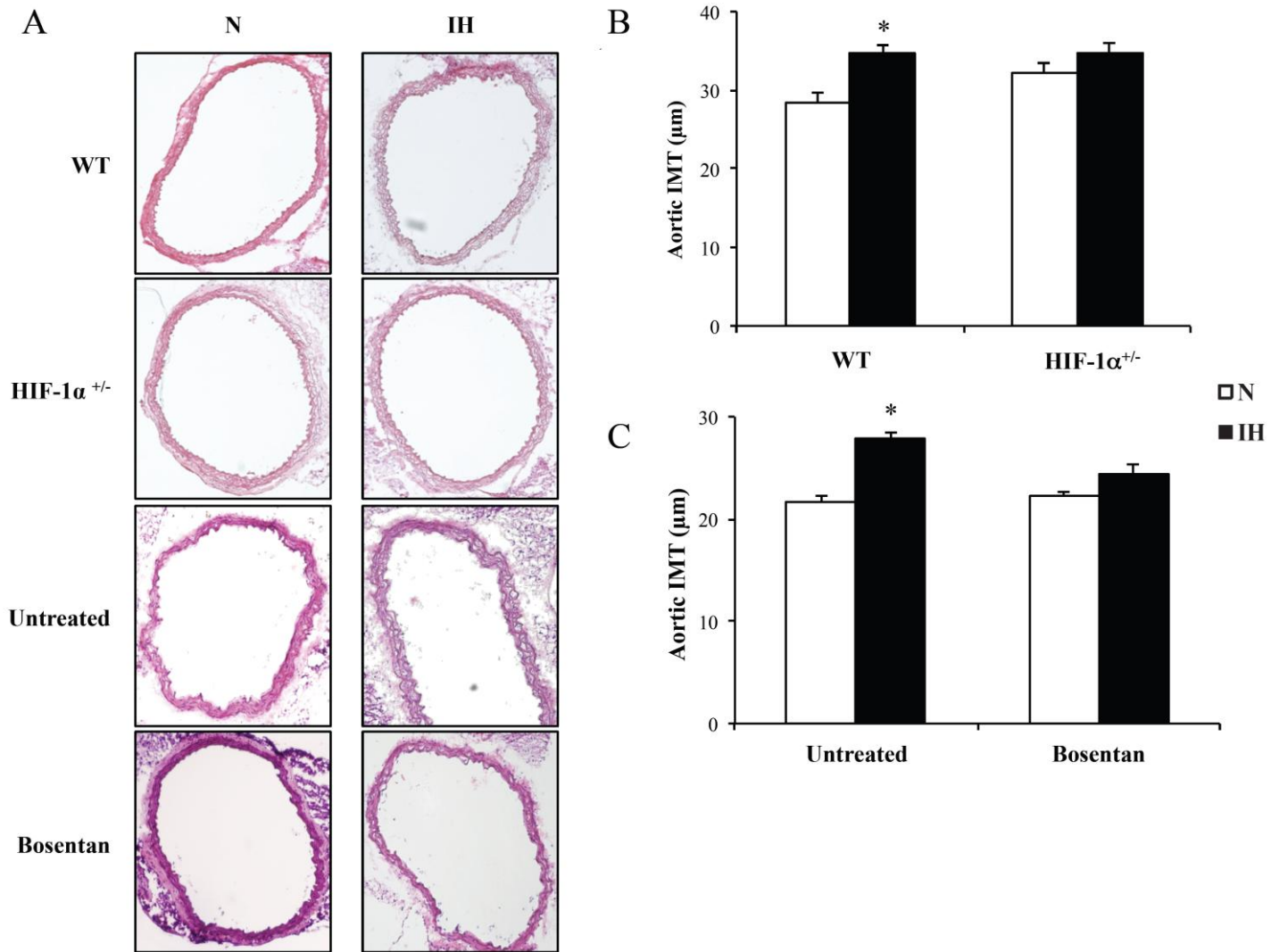


Figure 6.

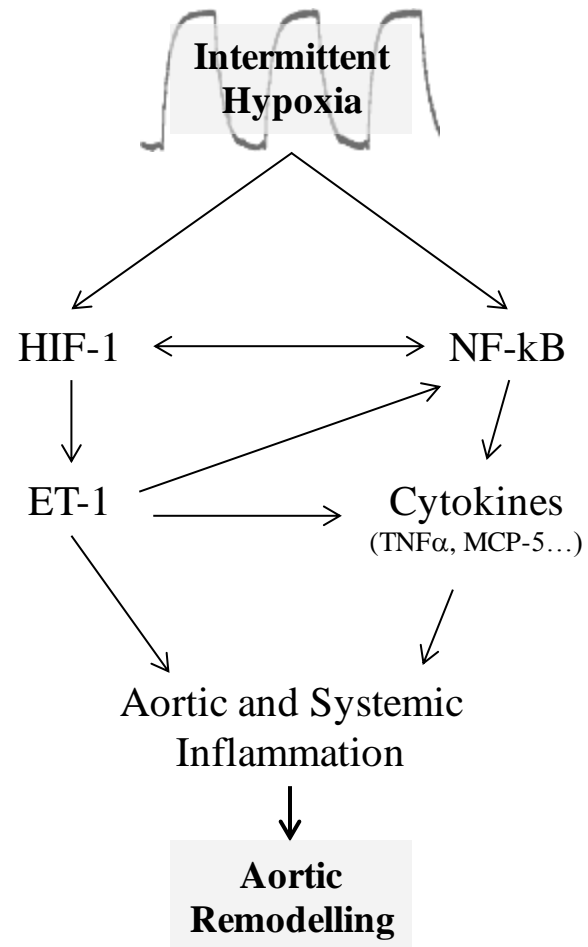


Table 1

	WT		HIF-1α^{+/-}		Untreated		Bosentan	
	N	IH	N	IH	N	IH	N	IH
Hydroxyproline (pmoles/mm)	4948 \pm 319	5211 \pm 268	5053 \pm 331	4557 \pm 400	4803 \pm 201	4627 \pm 248	4607 \pm 405	4117 \pm 429
Desmosine (pmoles/mm)	164 \pm 10	187 \pm 16	162 \pm 13	183 \pm 23	119 \pm 22	135 \pm 15	119 \pm 19	131 \pm 12

II. Résultats complémentaires de l'article I et interprétation

La section suivante a pour but de présenter les résultats complémentaires à ceux exposés dans la partie I, qui n'ont pas été inclus dans l'article mais qui relèvent tout de même de ce travail.

1. Dosage d'ICAM dans la paroi aortique

Afin de mieux comprendre le phénomène pré-athérosclérotique, nous avons choisi de doser ICAM-1, marqueur d'évolution de la plaque d'athérosclérose, par Western-Blot dans la paroi aortique des souris *HIF1 α ^{+/-}* et leurs contrôles, soumises ou non à l'HI.

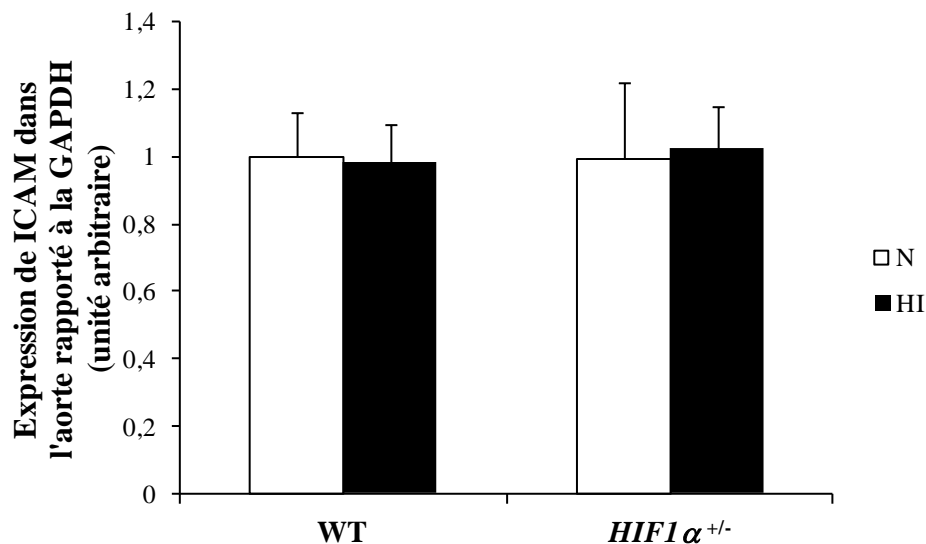


Figure 18. Induction d'ICAM-1 par l'hypoxie intermittente dans l'aorte. Mesures effectuées par Western Blot sur des animaux WT et *HIF1 α ^{+/-}* exposés à la normoxie (N) ou à l'HI pendant deux semaines. n= 3 animaux par groupe. Les résultats sont rapportés à la valeur du groupe contrôle exposé à la normoxie et exprimés en moyenne \pm écart de la moyenne. (ICAM: InterCellular Adhesion Molecule; GAPDH: Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase)

Comme le montre la Figure 18, nous n'observons aucune modification de l'expression d'ICAM-1 dans l'aorte après HI. La délétion partielle d'*HIF1 α* n'affecte pas non plus cette expression. Or, sans forcément attendre un effet de la délétion, nous pensions observer une augmentation en réponse par l'HI, tel que retrouvé précédemment au laboratoire (Arnaud et al. 2011). Ce résultat négatif pourrait s'expliquer par une différence de souche de souris

(C57Bl/6J dans l'étude de Arnaud et al. et Swiss/Sv129 dans notre cas). En effet, il a été démontré que la variation de la réponse inflammatoire entre différentes espèces de souris était 2 à 3 fois plus importante que celle entre individus d'une même espèce (Orozco et al. 2012).

2. Mesure de l'épaisseur intima-média chez les souris *PHD1*

Le remodelage vasculaire, par la mesure de l'épaisseur intima-média (EIM), a aussi été analysé chez les souris invalidées *PHD1* afin de pouvoir comparer la réponse par rapport aux souris *HIF1 α* .

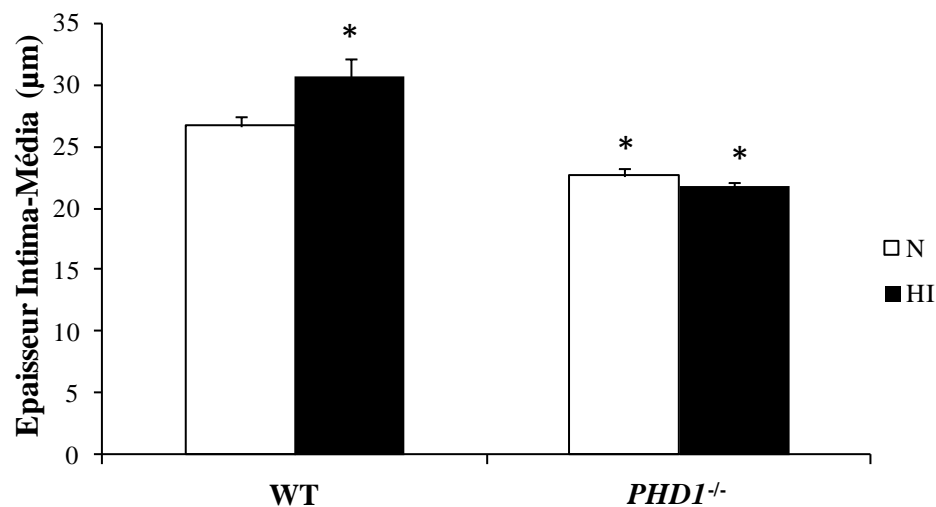


Figure 19. Effet de la délétion de *PHD1* sur le remodelage vasculaire induit par l'hypoxie intermittente (HI). Analyse histomorphométrique de l'épaisseur intima-média après 2 semaines de normoxie (N) ou d'HI sur des souris WT ou *PHD1*^{-/-}. n= 6 à 8 animaux par groupe. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type de la moyenne. * p < 0.05 vs. le groupe WT normoxique.

Nous observons sur la Figure 19, que l'HI entraîne une augmentation significative de l'EIM chez les souris WT, tel que retrouvé couramment au laboratoire. En ce qui concerne les souris *PHD1*^{-/-}, on observe à l'état basal une diminution de l'EIM (WT : 26,7 \pm 0,7 μm vs. *PHD1*^{-/-} : 22,7 \pm 1,1 μm). Nous notons également qu'il n'y a plus d'augmentation d'EIM en réponse à l'HI chez les souris *PHD1*^{-/-} (N : 22,7 \pm 1,1 μm vs. HI : 21,8 \pm 0,4 μm). La délétion de *PHD1* semble avoir un effet protecteur sur le remodelage vasculaire. Ceci pourrait s'expliquer par un effet indépendant de HIF-1. En effet, l'inhibition pharmacologique de l'activité prolyl-hydroxylase de *PHD1* et *PHD2* limite la prolifération des cellules

musculaires lisses vasculaires en conditions basales ou suite à un stimulus prolifératif (Schultz et al. 2009).

3. Dosage d'hydroxyproline et de desmosine dans la paroi aortique

Comme mentionné dans l'article I, nous avons dosé des dérivés du collagène (hydroxyproline) et de l'élastine (desmosine) pour tenter d'expliquer l'augmentation de l'EIM.

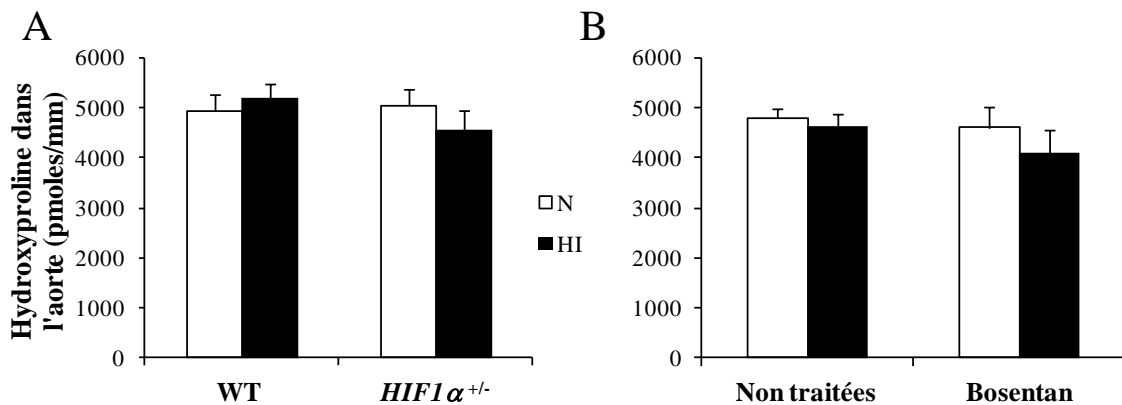


Figure 20. Variation du taux d'hydroxyproline dans la paroi aortique de souris après hypoxie intermittente (HI) ou normoxie (N). Dosage effectué sur (A) les souris WT et *HIF1α*^{+/-} (B) les souris traitées ou non avec du bosentan. n=5 à 14 animaux par groupe. Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type de la moyenne.

Quel que soit le groupe étudié, la quantité aortique d'hydroxyproline ne varie pas en réponse à l'HI (Figure 20). Ceci témoigne d'une absence de modification de la quantité de collagène vasculaire.

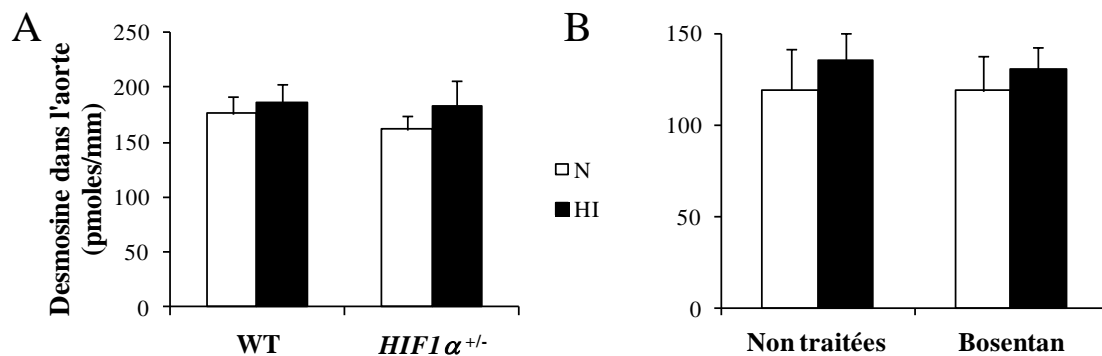


Figure 21. Variation du taux de desmosine dans la paroi aortique de souris après hypoxie intermittente (HI) ou normoxie (N). Dosage effectué sur (A) les souris WT et *HIF1α*^{+/-} (B) les souris traitées ou non avec du bosentan. n=6 à 14 animaux par groupe. Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type de la moyenne.

La Figure 21 montre qu'il n'y a pas non plus de modification de la quantité de desmosine vasculaire.

En ce qui concerne l'élastine, les résultats sont en accord avec ce que nous observons sur les coupes d'aorte puisque la quantité de lames élastiques semble inchangée après HI. L'espacement entre les lames semble plus important mais ceci ne peut être expliqué par une augmentation de la quantité de collagène tel que démontré à la Figure 20. Les cellules musculaires lisses pourraient également participer au remodelage aortique en augmentant en nombre ou en taille. Arnaud et al. (Arnaud et al. 2011) n'ont pas observé d'augmentation du nombre de noyaux dans la paroi aortique des animaux hypoxiques mais n'ont pas toutefois mesuré la taille des cellules musculaires lisses.

Partie II

Etude de l'implication du facteur de transcription HIF-1 et de l'endothéline dans le remodelage cardiaque induit par l'hypoxie intermittente.

I. Article II : “HIF-1 regulates myocardial function and remodeling in response to chronic exposure to intermittent hypoxia”

Soumis à **Journal of Applied Physiology** (en révision)

Dans cette deuxième étude, nous avons abordé le rôle de l'axe HIF-1/endothéline dans le remodelage structural et fonctionnel du cœur droit et gauche induit par l'hypoxie intermittente (HI). Pour cela, nous avons utilisé plusieurs modèles permettant de moduler la voie HIF-1/ET-1 : souris WT ou *HIF1 α* ^{+/-}, *PHD1*^{-/-}, *PHD2*^{+/-} et traitées ou non par bosentan. Ces groupes ont été exposés à des durées variables de normoxie ou d'HI (2 à 24 semaines). L'échographie transthoracique nous a permis d'évaluer le flux de l'artère pulmonaire avant et après exposition. L'indice de Fulton (VD/VG+S), marqueur d'hypertrophie ventriculaire droite, a été calculé. Enfin les pressions du VG ont été mesurées par sonde Millar.

Les résultats indiquent que les souris contrôles exposées à l'HI développent rapidement (dès 2 semaines) une hypertrophie du VD qui s'atténue avec le temps. Ceci peut s'expliquer par une hypertension pulmonaire puisque le rapport entre le temps d'accélération du flux pulmonaire sur le temps d'éjection ventriculaire droit est réduit après 2 semaines d'HI. L'impact de l'HI sur le cœur droit est aboli chez les souris *HIF1 α* ^{+/-}. Le traitement par bosentan prévient également le développement de l'hypertrophie du VD en réponse à l'HI. En revanche, les souris *PHD1*^{-/-} et *PHD2*^{+/-} présentent une hypertrophie du VD en conditions basales sans toutefois développer de remodelage supplémentaire avec l'HI. Au niveau du VG, la pression et le dP/dtmax augmentent traduisant un effet inotrope positif. Ceci n'est plus trouvé chez les souris *HIF1 α* ^{+/-}.

Cette étude démontre que l'activation de l'axe HIF-1/ET-1 semble également responsable d'un remodelage cardiaque tant structurel que fonctionnel.

HIF-1 regulates myocardial function and remodeling in response to chronic exposure to intermittent hypoxia

Emmanuelle Gras^{1,2}, Hélène Thibault³, Elise Belaidi^{1,2}, Emeline Lemari e^{1,2}, Peter Carmeliet^{4,5}, Geneviève Desrumaux³ and Diane Godin-Ribuot^{1,2}

¹ Université Grenoble Alpes, Laboratoire HP2, Grenoble, F-38042 France

² INSERM, U1042, Grenoble, F-38042 France

³ INSERM UMR-1060, CarMeN Laboratory, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

⁴ Laboratory of Angiogenesis and Neurovascular link, Vesalius Research Center, VIB, Leuven, B-3000 Belgium

⁵ Laboratory of Angiogenesis and neurovascular link, Department of Oncology, Leuven, Belgium

Running title: HIF-1 in cardiac remodeling induced by IH

Corresponding author at:

38042 Grenoble Cedex 9, France.

Tel: +33 476 63 75 63

Fax: +33 476 63 71 78

Email address: diane.ribuot@ujf-grenoble.fr

ABSTRACT

Obstructive sleep apnea (OSA) is an important risk factor for cardiovascular morbidity and mortality such as heart failure. Chronic intermittent hypoxia (IH), a major component of OSA, is thought to be responsible for most of its associated cardiovascular complications, but the underlying mechanisms remain to be determined. The objective of the present study was to investigate the role of HIF-1 in the myocardial functional and morphological alterations induced by IH.

For this, we investigated wild type (WT) and transgenic mice with reduced (HIF1 α +/-) or enhanced (PHD1 -/- and PHD2 +/-) HIF-1 activity. An additional group was treated with bosentan, an endothelin receptor antagonist (100mg/kg/day), throughout IH exposure. Mice were exposed, 8 hours per day for 2 to 12 weeks, to 1-minute cycles of IH (30 sec at 5% FiO₂ followed by 30 sec at room air) or normoxia (similar air-air cycles). Cardiac remodeling was assessed in all groups. Pulmonary flow and left ventricular (LV) function were measured in WT and HIF1 α +/- mice by echocardiography and conductance catheter, respectively.

Exposure to IH induced pulmonary hypertension, right ventricular (RV) hypertrophy and increased LV contractility in WT but not in HIF1 α +/- mice. RV hypertrophy was present at baseline in PHD1 -/- and PHD2 +/- but not in WT mice. Finally, RV hypertrophy was prevented by bosentan treatment.

Thus, HIF-1 activation and endothelin gene expression in response to chronic IH induce a structural and functional cardiac remodeling that could potentially lead to heart failure in the long term.

KEYWORDS (5): Intermittent Hypoxia; HIF-1; Endothelin; Myocardial remodeling and function

INTRODUCTION

Obstructive sleep apnea (OSA), characterized by repetitive upper airway occlusions during sleep, is a serious public health problem since it affects at least 10% of the general population (59) and is recognized as an important and independent risk factor for cardiovascular diseases (37). Hence, OSA patients exhibit increased cardiovascular morbidity and mortality, including systemic hypertension, coronary heart disease, arrhythmias, sudden death and heart failure (6, 10, 21, 33). OSA is associated with remodeling of the left ventricle (LV) (47) and, to a lesser degree, of the right ventricle (RV) (22). Mild pulmonary hypertension (PH) (mean pulmonary artery pressure between 25 and 40 mmHg) is indeed observed in 10% of OSA patients without other pulmonary diseases (27). This remodeling is associated with a deterioration of LV as well as RV function (6, 18, 43). Consequently, OSA-induced myocardial damage is associated with progression of heart failure or increased mortality in patients with heart failure (49).

The diverse mechanisms by which OSA may contribute to myocardial dysfunction are intermittent hypoxia (IH), sleep fragmentation and obstructed respiratory efforts resulting from the repetitive upper airway collapses during sleep (34). Among these, IH is now recognized as the main cause of the cardiovascular consequences of OSA (11, 17). Accordingly, animals exposed to IH develop cardiovascular alterations similar those encountered in OSA patients such as hypertension, vascular remodeling, atherosclerosis and increased infarction (4, 5, 8, 17, 20, 28).

Rodents subjected to IH also experience various structural and functional myocardial alterations. Thus, IH causes cardiac hypertrophy in rats (62) and in particular RV hypertrophy along with PH and altered pulmonary vascular function (52). On the other hand, a 4-week

exposure to IH did not affect LV mass but induced an increase in LV contractility in mice (39). However, longer IH exposures result in LV dysfunction in rats (14, 15) and in mice (42).

HIF-1 is the most important hypoxia sensitive transcription factor (46, 54). In normoxia, the cytosolic alpha subunit of HIF-1 (HIF-1 α) is hydroxylated at specific proline residues by prolyl-hydroxylase domain (PHD) enzymes leading to recognition by the von Hippel-Lindau complex, polyubiquitination and proteasomal degradation (12). Three PHD (PHD1, PHD2 and PHD3) have been identified. They all contribute to HIF-1 α regulation but their tissue expression is different and, while PHD1 is constitutively expressed, PHD2 and PHD3 expression can be induced by hypoxia (3, 57). In hypoxic conditions, HIF-1 α hydroxylation and subsequent degradation are nevertheless reduced because of substrate (O₂) limitation so that HIF-1 α translocates to the nucleus to bind HIF-1 β and activate transcription of various genes. Some of these genes have a considerable impact on the cardiovascular system such as the erythropoietin, inducible and endothelial nitric oxide synthases, VEGF and endothelin (ET-1) genes (45).

Intermittent hypoxia is a much more potent stimulus than sustained hypoxia for HIF-1 activation mainly because of the oxidative stress produced by the repetitive oxygenation-desaturation sequences that strongly inhibits PHD activity (61). Indeed, we have observed a strong and sustained HIF-1 activity in the heart of animals subjected to IH (8). Moreover, others and we have shown that the resulting activation of the endothelin gene plays an important role in the development of some of the cardiovascular alterations induced by IH, such as hypertension and increased infarct size (8, 30). This is of clinical relevance since OSA patients present increased tissue HIF-1 (29) and plasma ET-1 (44) levels. Likewise, myocardial HIF-1 expression is increased (23) and plasma pro-ET-1 is considered a predictive factor of mortality at 12 months (25) in patients with chronic heart failure.

Thus, the purpose of the present study was to investigate the involvement of HIF-1 and ET-1 in the myocardial morphological and functional alterations induced by chronic IH. To this end we investigated the effects of IH in various transgenic mice models with reduced (*HIF1 α* ^{+/-}) or increased (*PHD1*^{-/-} and *PHD2*^{+/-}) HIF-1 activity. In addition, we investigated mice treated during IH with bosentan, a mixed endothelin receptor antagonist.

MATERIALS & METHODS

Experimental groups

The time-course of the cardiac effects of IH was investigated in 8-week old male C57/BL6J mice (Janvier, Laval, France) exposed to normoxia or IH for 1, 2, 6 or 12 weeks.

The involvement of HIF-1 was investigated in 8-week old male mice carrying targeted disruptions in genes encoding for the HIF-1 α subunit of the HIF-1 complex (heterozygous *HIF1 α* ^{+/-} mice), prolyl-hydroxylase type 1 enzyme (homozygous *PHD1*^{-/-} mice), prolyl-hydroxylase type 2 enzyme (heterozygous *PHD2*^{+/-} mice) and their control littermates (WT). The genetic background for *HIF1 α* and *PHD1* transgenic mice was 50% Swiss/50% 129SvJ while that for *PHD2* transgenic mice was C57/BL6J.

The role of endothelin was investigated in 8-week old male C57/BL6J mice treated with bosentan, a mixed inhibitor of endothelin receptors graciously provided by Actelion (Basel, Switzerland), added to the food (100mg/kg/day).

All experiments were conducted in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes (Council of Europe, European Treaties ETS 123, Strasbourg, 18 March 1986) as well as with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) and were approved by an Institutional Animal Care and Use Committee.

Intermittent hypoxia exposure

Animals were exposed to intermittent hypoxia (IH) or normoxia (N) as previously described (17). Briefly, animals were exposed daily in their cages, during their sleeping period, to 8 consecutive hours of 1-min IH cycles (alternating 30s of 21% and 30s of 5% FiO₂, 60 cycles/h) for periods ranging from 1 to 12 weeks. FiO₂ was monitored throughout

experiments with a gas analyzer (ML206, ADInstruments, Oxford, United Kingdom). Control normoxic (N) animals were exposed to similar 1-min air-air cycles in order to reproduce the noise and air turbulences of the IH stimulus. At the end of IH exposure, all mice were anesthetized with pentobarbital (180 mg/kg) for blood and tissue collection.

Hematocrit and cardiac remodeling

Blood was rapidly collected on EDTA by cardiac puncture and centrifuged at 12,000 rpm for 10 minutes for hematocrit measurement. After removal of the atria and large vessels, the right ventricular (RV) free wall and left ventricular free wall plus septum (LV+S) were dissected and weighed and the Fulton index (RV/LV+S) was calculated.

Echocardiography

Transthoracic closed-chest echocardiography under light anesthesia (ketamine 50 mg/kg ip) was performed before and 2 weeks after exposure to normoxia or HI. A mechanical transducer centered on 13 MHz was used (Vivid 7, GE Medical Systems). As previously described (51), pulsed-wave Doppler recording (sweep speed: 200 mm/sec) of pulmonary blood flow was obtained from 2D images of the pulmonary infundibulum on the parasternal short axis view at the level of the aortic valve. Measurements were performed offline by one reader blinded to the condition or genotype of the mice. The following variables were measured: pulmonary acceleration time (AT), defined as the time from the onset of flow to peak velocity by pulsed-wave Doppler recording, and right ventricular ejection time (ET), the time from the onset to the termination of pulmonary flow. All measurements were averaged on 5 cardiac cycles. Finally, the AT/ET ratio, which inversely correlates with right ventricular systolic pressure and pulmonary pressure (51), was calculated as a percentage of AT over ET.

Left ventricular function

Closed-chest measurement of left ventricular function was performed in anesthetized mice. Anesthesia was induced in a gas chamber (5% isoflurane) and sustained by a mask (2% isoflurane) while tracheal intubation was performed through a small neck incision. Ventilation (150 breaths/min, 350 μ l tidal volume) with 1.5% isoflurane was then initiated and a Millar probe (SPR-839) was inserted into the right carotid artery and advanced into the left ventricle. Body temperature was controlled and kept at 37° C throughout the experiments (TCAT-2LV controller, Physitemp, NewJersey, USA). The following left ventricular function parameters were recorded and analyzed in real time by the LabChart software (AdInstruments, Oxford, UK): LV end-systolic pressure (LVESP), LV end-diastolic pressure (LVEDP), LV developed pressure and maximal rates of LV pressure rise (dP/dt max) and decrease (dP/dt min).

Statistical analysis

Experimental data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Data were analyzed using 2-way analyses of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-hoc comparisons or Mann-Whitney U tests with the SigmaStat Software (San Jose, California, USA). Paired t tests were used to compare pre- and post-IH echography measurements within the same groups. A 2-sided *P* value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Time course of the response to chronic intermittent hypoxia: hematocrit and cardiac remodeling

In C57/BL6J mice, the hematocrit was significantly increased by IH at all times although values recorded after 12 and 24 weeks of exposure were significantly lower than those observed after 2 weeks (Fig. 1A). The Fulton index, an index of RV hypertrophy, was also significantly increased by IH at all times ($P = 0.024$ for all IH groups vs. all N groups). The most important increase was observed after 2 weeks of IH exposure (0.32 ± 0.01 in IH vs. 0.28 ± 0.01 in N groups, $P = 0.044$) (Fig. 1B). Thereafter, the effect gradually faded with continued exposure, noticeably after 12 and 24 weeks.

Role of HIF-1 in the development of right ventricular hypertrophy in response to chronic intermittent hypoxia

In control WT mice, the Fulton index was significantly increased by 2 weeks of IH exposure (Fig. 2, A, B and C). Heterozygous *HIF1 α* ^{+/-} mice did not develop right ventricular hypertrophy in response to IH (Fulton index: 0.27 ± 0.01 in IH vs. 0.28 ± 0.01 in N groups) (Fig. 2A). Moreover, *PHD1*^{-/-} and *PHD2*^{+/-} mice exposed to normoxia or IH displayed significantly higher Fulton index values than their WT counterparts (Figs. 2B and 2C, respectively). However, IH did not further increase right ventricular hypertrophy in these groups.

Role of HIF-1 in the development of pulmonary hypertension in response to chronic intermittent hypoxia

In control WT mice, intermittent hypoxia resulted in pulmonary hypertension, calculated from echocardiographic recordings, as shown by a significant decrease in the AT/ET ratio compared to baseline (27.2 ± 2.4 % after vs. 23.0 ± 1.4 % respectively, $P = 0.016$) (Fig. 3, A and B). This was not seen in heterozygous *HIF1 α ^{+/-}* mice (Fig. 3B).

Involvement of the endothelin system in the development of right ventricular hypertrophy in response to chronic intermittent hypoxia

Bosentan treatment of C57/BL6J mice exposed for 2 weeks to IH did not affect the IH-induced increase in hematocrit but completely prevented the development of RV hypertrophy (Fig 1, A and B).

Effect of intermittent hypoxia on left ventricular function: role of HIF-1

Intermittent hypoxia did not affect heart rate (data not shown) or LVEDP (Fig. 4A) in wild type WT and heterozygous *HIF1 α ^{+/-}* mice. LVESP was significantly increased by IH in WT (106.6 ± 7.8 vs. 78.4 ± 7.9 mmHg in IH and N groups, respectively $P = 0.037$) but not in *HIF1 α ^{+/-}* mice (Fig. 4A). Accordingly, LV developed pressure (Fig. 4B), dP/dt max (Fig. 4C) and dP/dt min (Fig. 4D) were also significantly increased by IH in WT but not in *HIF1 α ^{+/-}* mice.

DISCUSSION

This study confirms that exposure to chronic intermittent hypoxia, such as that encountered in severe OSA patients, has a rapid and deleterious impact on the right heart. Indeed, pulmonary artery hypertension and right ventricular hypertrophy developed after only 2 weeks of IH exposure. RV hypertrophy was still present after 6 weeks of exposure but tended to decrease with longer durations. This time course has also been reported for other cardiovascular parameters such as blood pressure, which is significantly increased in rats after 2 weeks (53) but not after 5 weeks (28) of IH. Similarly, Park and Suzuki showed that infarct size was increased in mice after 1 and 2 weeks but not after 4 weeks of IH exposure (28). This is clinically relevant since in OSA patients, mortality from cardiovascular events decreases with age (31).

Right ventricular hypertrophy has been reported in other studies investigating animals exposed to IH (19, 36) as well as in patients with severe OSA (9, 22). Our study is also in accordance with others demonstrating that chronic IH induces PH in mice (19, 41). Indeed, the pulmonary AT/ET ratio, measured on closed-chest pulse Doppler recordings of pulmonary flow in mice, is inversely correlated with invasively measured RV systolic pressure (51) and with pulmonary artery pressure. We observed a decrease in this ratio in WT mice after IH exposure compared with baseline measurements. The increase in pulmonary artery pressure by IH could be explained by the well-known effect of hypoxia on the pulmonary circulation (50). Although the prevalence of PH in OSA patients is low (27), a recent study detected the presence of OSA in more than half of patients with WHO group 1 pulmonary arterial hypertension confirming the deleterious impact of OSA on the pulmonary circulation (38).

Our study is the first to demonstrate the role of HIF-1 and endothelin in the onset of RV hypertrophy in response to IH. Indeed, partial HIF-1 α deficiency abolished the

development of pulmonary hypertension and RV hypertrophy while dual inhibition of endothelin receptors by bosentan treatment throughout exposure completely prevented the IH-induced increase in Fulton index. Thus intermittent hypoxia, at a degree similar to that encountered in severe OSA patients, appears to trigger the same adaptive response than sustained hypoxia, which also induces pulmonary hypertension and RV hypertrophy through the HIF-1/endothelin axis (55, 60). The mechanisms whereby ET-1 promotes RV remodeling in response to IH are probably similar to those reported for sustained hypoxia namely, hypoxic pulmonary hypertension with increased proliferation-contraction of pulmonary arterial smooth muscle (35, 56) and direct proliferative effect on the myocardium through the GSk3 β /Akt pathway (26). In accordance, intermittent hypoxia has been shown to increase the vasoconstrictive effects of ET-1 through an up-regulation of ET-A receptors (2, 32). There is also experimental evidence that the myocardial Akt pathway is activated in IH-exposed mice (58).

We further investigated the role of HIF-1 on myocardial remodeling using mice with complete (*PHD1*^{-/-}) or partial (*PHD2*^{+/-}) deficiency of 2 prolyl hydroxylases involved in the cytosolic degradation of HIF-1 α . Indeed, PHD1 and PHD2 knockout has been shown to increase myocardial HIF-1 α protein content and HIF-1 activity (1, 24, 40). In accordance with a role for HIF-1 in myocardial remodeling, we observed that *PHD1*^{-/-} and *PHD2*^{+/-} mice presented with RV hypertrophy at baseline prior to IH exposure. Nevertheless, the response to IH was not enhanced in these mice suggesting that either HIF-1 activation or RV remodeling are saturable processes. Another observation suggesting that HIF-1 activation cannot exceed a critical threshold is that *PHD1*^{-/-} mice exhibited significantly increased baseline hematocrit levels that were not further enhanced by IH exposure (data not presented).

The kinetics of the effects of IH on the LV and RV appears to be different since we did not observe any LV hypertrophy after 2 weeks of IH. On the other hand, LV function was

enhanced as evidenced by a significant increase in LVESP, developed pressure and contractility. Similar results were obtained in mice after 1 and 4 weeks of IH (39, 42) but longer exposure (8 weeks) resulted in LV dysfunction characterized by reduced stroke volume and ejection fraction (42). In rats, LV dysfunction and hypertrophy seem to develop more rapidly since they were reported after 5 weeks of IH exposure (14, 15). Thus, the increase in LV contractility appears to be a transitory adaptation to IH-induced systemic hypertension in order to maintain ventriculo-arterial coupling and then gradually leading to LV dysfunction and potentially to heart failure with further longer exposure. Our data demonstrate that HIF-1 is involved in this early LV functional adaptation since partial invalidation of the HIF-1 α gene abolished the increase in LV pressure and contractility. This positive inotropic effect of HIF-1 activation can be explained by its up-regulation of the ET-1 gene but also of the Na⁺/H⁺ exchanger 1 (NHE1) gene. Indeed, NHE1 is a HIF-1 target gene (48) and its activity is stimulated by ET-1 (26). The resulting rise in intracellular Na⁺ facilitates reverse-mode activity of Na⁺/Ca⁺⁺ exchanger 1 (NCX1) and increases intracellular Ca⁺⁺ concentration with positive inotropic effects. However long-term NCX1 activation is deleterious since cardiac selective deletion of NCX1 prevents the LV hypertrophy and dysfunction in mice exposed to IH for 8 weeks (16).

Although this remains to be confirmed, these data and experimental evidence suggest that *HIF1 α* ^{+/-} mice would not develop LV dysfunction and heart failure in the long term. Indeed, HIF-1 is well known for its ambivalent effects on the myocardium. Hence, we have shown that acute IH exposure confers a HIF-1-mediated myocardial protection against ischemia-reperfusion injury (7). Similarly HIF-1 is necessary for the acute phase of cardiac preconditioning (13). However, sustained HIF-1 activity upon chronic IH has deleterious consequences such as enhanced infarction (8). Furthermore, chronic myocardial HIF-1 stabilization results in cardiomyopathy and development of heart failure over time (23). The

increased myocardial HIF-1 level in patients with end-stage dilated cardiomyopathy is also another observation in support for a link between chronic HIF-1 activation and cardiomyopathy.

In conclusion, this study demonstrates that HIF-1 activation upon chronic intermittent hypoxia, such as that observed in OSA syndrome, has harmful consequences on the myocardium, promoting pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy through ET-1 gene expression. Moreover, HIF-1 also appears to be involved in the early increase in LV function known to lead to cardiac dysfunction with further IH exposure. Along with the observations that HIF-1 and endothelin are increased in OSA patients and in patients with heart failure, our findings suggest that reducing HIF-1 activity and endothelin receptor antagonism could represent valuable therapeutic strategies for OSA patients at risk for or with cardiac dysfunction.

Funding

This study was funded by a grant from the Agir pour les Maladies Chroniques Foundation. The work of Peter Carmeliet is funded by: « Long-term structural Methusalem funding by the Flemish Government », the fund for Scientific Research by the Flemish Government (FWO), the Belgian Science Policy (IUAP-P7/03), Leducq Transatlantic Network Artemis, AXA Research Fund.

REFERENCES

1. **Adluri RS, Thirunavukkarasu M, Dunna NR, Zhan L, Oriowo B, Takeda K, Sanchez JA, Otani H, Maulik G, Fong GH, and Maulik N.** Disruption of hypoxia-inducible transcription factor-prolyl hydroxylase domain-1 (PHD-1^{-/-}) attenuates ex vivo myocardial ischemia/reperfusion injury through hypoxia-inducible factor-1 α transcription factor and its target genes in mice. *Antioxid Redox Signal* 15: 1789-1797, 2011.
2. **Allahdadi KJ, Walker BR, and Kanagy NL.** Augmented endothelin vasoconstriction in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension* 45: 705-709, 2005.
3. **Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, and Gleadle JM.** Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* 279: 38458-38465, 2004.
4. **Arnaud C, Beguin PC, Lantuejoul S, Pepin JL, Guillermet C, Pelli G, Burger F, Buatois V, Ribuot C, Baguet JP, Mach F, Levy P, and Dematteis M.** The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition. *Am J Respir Crit Care Med* 184: 724-731, 2011.
5. **Arnaud C, Poulain L, Levy P, and Dematteis M.** Inflammation contributes to the atherogenic role of intermittent hypoxia in apolipoprotein-E knock out mice. *Atherosclerosis* 219: 425-431, 2011.
6. **Baguet JP, Barone-Rochette G, Tamisier R, Levy P, and Pepin JL.** Mechanisms of cardiac dysfunction in obstructive sleep apnea. *Nat Rev Cardiol* 9: 679-688, 2012.
7. **Belaidi E, Beguin PC, Levy P, Ribuot C, and Godin-Ribuot D.** Prevention of HIF-1 activation and iNOS gene targeting by low-dose cadmium results in loss of myocardial hypoxic preconditioning in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H901-908, 2008.
8. **Belaidi E, Joyeux-Faure M, Ribuot C, Launois SH, Levy P, and Godin-Ribuot D.** Major role for hypoxia inducible factor-1 and the endothelin system in promoting myocardial infarction and hypertension in an animal model of obstructive sleep apnea. *J Am Coll Cardiol* 53: 1309-1317, 2009.
9. **Berman EJ, DiBenedetto RJ, Causey DE, Mims T, Conneff M, Goodman LS, and Rollings RC.** Right ventricular hypertrophy detected by echocardiography in patients with newly diagnosed obstructive sleep apnea. *Chest* 100: 347-350, 1991.
10. **Bradley TD, and Floras JS.** Sleep apnea and heart failure: Part I: obstructive sleep apnea. *Circulation* 107: 1671-1678, 2003.
11. **Brooks D, Horner RL, Kimoff RJ, Kozar LF, Render-Teixeira CL, and Phillipson EA.** Effect of obstructive sleep apnea versus sleep fragmentation on responses to airway occlusion. *Am J Respir Crit Care Med* 155: 1609-1617, 1997.
12. **Bruick RK, and McKnight SL.** A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294: 1337-1340, 2001.
13. **Cai Z, Zhong H, Bosch-Marce M, Fox-Talbot K, Wang L, Wei C, Trush MA, and Semenza GL.** Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 α . *Cardiovasc Res* 77: 463-470, 2008.
14. **Chen L, Einbinder E, Zhang Q, Hasday J, Balke CW, and Scharf SM.** Oxidative stress and left ventricular function with chronic intermittent hypoxia in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 172: 915-920, 2005.
15. **Chen L, Zhang J, Gan TX, Chen-Izu Y, Hasday JD, Karmazyn M, Balke CW, and Scharf SM.** Left ventricular dysfunction and associated cellular injury in rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol (1985)* 104: 218-223, 2008.
16. **Chen L, Zhang J, Hu X, Philipson KD, and Scharf SM.** The Na⁺/Ca²⁺ exchanger-1 mediates left ventricular dysfunction in mice with chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol (1985)* 109: 1675-1685, 2010.
17. **Dematteis M, Godin-Ribuot D, Arnaud C, Ribuot C, Stanke-Labesque F, Pepin JL, and Levy P.** Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding the human disease. *ILAR J* 50: 262-281, 2009.

18. **Dursunoglu N, Dursunoglu D, and Kilic M.** Impact of obstructive sleep apnea on right ventricular global function: sleep apnea and myocardial performance index. *Respiration* 72: 278-284, 2005.
19. **Fagan KA.** Selected Contribution: Pulmonary hypertension in mice following intermittent hypoxia. *J Appl Physiol (1985)* 90: 2502-2507, 2001.
20. **Fletcher EC, Lesske J, Qian W, Miller CC, 3rd, and Unger T.** Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats. *Hypertension* 19: 555-561, 1992.
21. **Gami AS, Olson EJ, Shen WK, Wright RS, Ballman KV, Hodge DO, Herges RM, Howard DE, and Somers VK.** Obstructive sleep apnea and the risk of sudden cardiac death: a longitudinal study of 10,701 adults. *J Am Coll Cardiol* 62: 610-616, 2013.
22. **Guidry UC, Mendes LA, Evans JC, Levy D, O'Connor GT, Larson MG, Gottlieb DJ, and Benjamin EJ.** Echocardiographic features of the right heart in sleep-disordered breathing: the Framingham Heart Study. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 933-938, 2001.
23. **Holscher M, Schafer K, Krull S, Farhat K, Hesse A, Silter M, Lin Y, Pichler BJ, Thistlethwaite P, El-Armouche A, Maier LS, Katschinski DM, and Ziesenis A.** Unfavourable consequences of chronic cardiac HIF-1 α stabilization. *Cardiovasc Res* 94: 77-86, 2012.
24. **Holscher M, Silter M, Krull S, von Ahlen M, Hesse A, Schwartz P, Wielockx B, Breier G, Katschinski DM, and Ziesenis A.** Cardiomyocyte-specific prolyl-4-hydroxylase domain 2 knock out protects from acute myocardial ischemic injury. *J Biol Chem* 286: 11185-11194, 2011.
25. **Jankowska EA, Filippatos GS, von Haehling S, Papassotiriou J, Morgenthaler NG, Ciccoira M, Schefold JC, Rozentryt P, Ponikowska B, Doehner W, Banasiak W, Hartmann O, Struck J, Bergmann A, Anker SD, and Ponikowski P.** Identification of chronic heart failure patients with a high 12-month mortality risk using biomarkers including plasma C-terminal pro-endothelin-1. *PLoS One* 6: e14506, 2011.
26. **Javadov S, Rajapurohitam V, Kilic A, Zeidan A, Choi A, and Karmazyn M.** Anti-hypertrophic effect of NHE-1 inhibition involves GSK-3 β -dependent attenuation of mitochondrial dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 46: 998-1007, 2009.
27. **Javaheri S, Javaheri S, and Javaheri A.** Sleep apnea, heart failure, and pulmonary hypertension. *Curr Heart Fail Rep* 10: 315-320, 2013.
28. **Joyeux-Faure M, Stanke-Labesque F, Lefebvre B, Beguin P, Godin-Ribuot D, Ribuot C, Launois SH, Bessard G, and Levy P.** Chronic intermittent hypoxia increases infarction in the isolated rat heart. *J Appl Physiol (1985)* 98: 1691-1696, 2005.
29. **Kaczmarek E, Bakker JP, Clarke DN, Cszimadia E, Kocher O, Veves A, Tecilazich F, O'Donnell CP, Ferran C, and Malhotra A.** Molecular biomarkers of vascular dysfunction in obstructive sleep apnea. *PLoS One* 8: e70559, 2013.
30. **Kanagy NL, Walker BR, and Nelin LD.** Role of endothelin in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension* 37: 511-515, 2001.
31. **Lavie P, Lavie L, and Herer P.** All-cause mortality in males with sleep apnoea syndrome: declining mortality rates with age. *Eur Respir J* 25: 514-520, 2005.
32. **Lefebvre B, Godin-Ribuot D, Joyeux-Faure M, Caron F, Bessard G, Levy P, and Stanke-Labesque F.** Functional assessment of vascular reactivity after chronic intermittent hypoxia in the rat. *Respir Physiol Neurobiol* 150: 278-286, 2006.
33. **Levy P, Pepin JL, Arnaud C, Baguet JP, Dematteis M, and Mach F.** Obstructive sleep apnea and atherosclerosis. *Prog Cardiovasc Dis* 51: 400-410, 2009.
34. **Levy P, Tamisier R, Arnaud C, Monneret D, Baguet JP, Stanke-Labesque F, Dematteis M, Godin-Ribuot D, Ribuot C, and Pepin JL.** Sleep deprivation, sleep apnea and cardiovascular diseases. *Front Biosci (Elite Ed)* 4: 2007-2021, 2012.
35. **Liu Q, Sham JS, Shimoda LA, and Sylvester JT.** Hypoxic constriction of porcine distal pulmonary arteries: endothelium and endothelin dependence. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L856-865, 2001.
36. **McGuire M, and Bradford A.** Chronic intermittent hypoxia increases haematocrit and causes right ventricular hypertrophy in the rat. *Respir Physiol* 117: 53-58, 1999.

37. **McNicholas WT, and Bonsignore MR.** Sleep apnoea as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence, basic mechanisms and research priorities. *Eur Respir J* 29: 156-178, 2007.
38. **Minic M, Granton JT, and Ryan CM.** Sleep disordered breathing in group 1 pulmonary arterial hypertension. *J Clin Sleep Med* 10: 277-283, 2014.
39. **Naghshin J, McGaffin KR, Witham WG, Mathier MA, Romano LC, Smith SH, Janczewski AM, Kirk JA, Shroff SG, and O'Donnell CP.** Chronic intermittent hypoxia increases left ventricular contractility in C57BL/6J mice. *J Appl Physiol (1985)* 107: 787-793, 2009.
40. **Natarajan R, Salloum FN, Fisher BJ, Kukreja RC, and Fowler AA, 3rd.** Hypoxia inducible factor-1 activation by prolyl 4-hydroxylase-2 gene silencing attenuates myocardial ischemia reperfusion injury. *Circ Res* 98: 133-140, 2006.
41. **Nisbet RE, Graves AS, Kleinhenz DJ, Rupnow HL, Reed AL, Fan TH, Mitchell PO, Sutliff RL, and Hart CM.** The role of NADPH oxidase in chronic intermittent hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40: 601-609, 2009.
42. **Rodriguez R, Bickta J, and O'Donnell CP.** The Effects Of Acute And Chronic Intermittent Hypoxia Exposure On Left Ventricular Function And Cardiac Glycolytic Metabolism In Lean C57BL/6J Mice. *Am J Respir Crit Care Med* 189: A2215, 2014.
43. **Romero-Corral A, Somers VK, Pellikka PA, Olson EJ, Bailey KR, Korinek J, Orban M, Sierra-Johnson J, Kato M, Amin RS, and Lopez-Jimenez F.** Decreased right and left ventricular myocardial performance in obstructive sleep apnea. *Chest* 132: 1863-1870, 2007.
44. **Saarelainen S, Seppala E, Laasonen K, and Hasan J.** Circulating endothelin-1 in obstructive sleep apnea. *Endothelium* 5: 115-118, 1997.
45. **Semenza GL.** Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 551-578, 1999.
46. **Semenza GL, and Wang GL.** A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 12: 5447-5454, 1992.
47. **Shah RV, Abbasi SA, Heydari B, Farhad H, Dodson JA, Bakker JP, John RM, Veves A, Malhotra A, Blankstein R, Jerosch-Herold M, Kwong RY, and Neilan TG.** Obesity and sleep apnea are independently associated with adverse left ventricular remodeling and clinical outcome in patients with atrial fibrillation and preserved ventricular function. *Am Heart J* 167: 620-626, 2014.
48. **Shimoda LA, Fallon M, Pisarcik S, Wang J, and Semenza GL.** HIF-1 regulates hypoxic induction of NHE1 expression and alkalization of intracellular pH in pulmonary arterial myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291: L941-949, 2006.
49. **Somers VK, White DP, Amin R, Abraham WT, Costa F, Culebras A, Daniels S, Floras JS, Hunt CE, Olson LJ, Pickering TG, Russell R, Woo M, and Young T.** Sleep apnea and cardiovascular disease: an American Heart Association/American College of Cardiology Foundation Scientific Statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on Clinical Cardiology, Stroke Council, and Council on Cardiovascular Nursing. *J Am Coll Cardiol* 52: 686-717, 2008.
50. **Sommer N, Dietrich A, Schermuly RT, Ghofrani HA, Gudermann T, Schulz R, Seeger W, Grimminger F, and Weissmann N.** Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms. *Eur Respir J* 32: 1639-1651, 2008.
51. **Thibault HB, Kurtz B, Raheer MJ, Shaik RS, Waxman A, Derumeaux G, Halpern EF, Bloch KD, and Scherrer-Crosbie M.** Noninvasive assessment of murine pulmonary arterial pressure: validation and application to models of pulmonary hypertension. *Circ Cardiovasc Imaging* 3: 157-163, 2010.
52. **Thomas BJ, and Wanstall JC.** Alterations in pulmonary vascular function in rats exposed to intermittent hypoxia. *Eur J Pharmacol* 477: 153-161, 2003.
53. **Totoson P, Fhayli W, Fauray G, Korichneva I, Cachot S, Baldazza M, Ribouot C, Pepin JL, Levy P, and Joyeux-Faure M.** Atorvastatin protects against deleterious cardiovascular consequences induced by chronic intermittent hypoxia. *Exp Biol Med (Maywood)* 238: 223-232, 2013.

54. **Wang GL, Jiang BH, Rue EA, and Semenza GL.** Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 5510-5514, 1995.
55. **Weigand L, Sylvester JT, and Shimoda LA.** Mechanisms of endothelin-1-induced contraction in pulmonary arteries from chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L284-290, 2006.
56. **Whitman EM, Pisarcik S, Luke T, Fallon M, Wang J, Sylvester JT, Semenza GL, and Shimoda LA.** Endothelin-1 mediates hypoxia-induced inhibition of voltage-gated K⁺ channel expression in pulmonary arterial myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294: L309-318, 2008.
57. **William C, Maxwell PH, Nichols L, Lygate C, Tian YM, Bernhardt W, Wiesener M, Ratcliffe PJ, Eckardt KU, and Pugh CW.** HIF prolyl hydroxylases in the rat; organ distribution and changes in expression following hypoxia and coronary artery ligation. *J Mol Cell Cardiol* 41: 68-77, 2006.
58. **Wu Y, Wang H, Brautigan DL, and Liu Z.** Activation of glycogen synthase in myocardium induced by intermittent hypoxia is much lower in fasted than in fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E469-475, 2007.
59. **Young T, Peppard PE, and Gottlieb DJ.** Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 1217-1239, 2002.
60. **Yu AY, Shimoda LA, Iyer NV, Huso DL, Sun X, McWilliams R, Beaty T, Sham JS, Wiener CM, Sylvester JT, and Semenza GL.** Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1alpha. *J Clin Invest* 103: 691-696, 1999.
61. **Yuan G, Nanduri J, Khan S, Semenza GL, and Prabhakar NR.** Induction of HIF-1alpha expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca²⁺ signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR. *J Cell Physiol* 217: 674-685, 2008.
62. **Yuan X, Deng Y, Guo X, Shang J, Zhu D, and Liu H.** Atorvastatin attenuates myocardial remodeling induced by chronic intermittent hypoxia in rats: partly involvement of TLR-4/MYD88 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 446: 292-297, 2014.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Time course of the response to chronic intermittent hypoxia (IH) in C57BL/6J mice exposed to normoxia (N) or IH for 2, 6, 12 or 24 weeks and for 2 weeks with bosentan treatment (100mg/kg/day). A: Hematocrit. B: Right ventricular remodeling quantified by the Fulton index (right ventricle/left ventricle+septum). n = 3 to 10 mice per group. *P < 0.05 vs. N; ‡P < 0.05 vs. 2 weeks of exposure. The Fulton values of mice exposed to IH for 2 to 24 weeks without bosentan treatment were significantly higher globally than those of mice exposed to N (P=0.024).

Fig. 2. Effect of targeted deletion of A: HIF-1 α , B: PHD1 and C: PHD2 on the right ventricular remodeling (quantified by the Fulton index) induced by a 2-week exposure to normoxia (N) or intermittent hypoxia (IH). n = 6 to 21 mice per group (*P < 0.05 vs. N; ‡P < 0.05 vs. corresponding wild type group).

Fig. 3. Effect of targeted HIF-1 α deletion on the increase in pulmonary pressure (decrease in AT/ET ratio) induced by a 2-week exposure to normoxia (N) or intermittent hypoxia (IH). A: Representative pulsed-wave Doppler recordings of pulmonary flow in wild-type (WT) (left panel) and HIF1 α +/- (right panel) mice exposed to IH. B: AT/ET ratios at baseline and after IH exposure in WT mice. C: AT/ET ratios at baseline and after IH exposure in HIF1 α +/- mice. AT: pulmonary acceleration time, ET: pulmonary ejection time. n = 5 per group (*P < 0.05 vs. baseline).

Fig. 4. Effect of targeted HIF-1 α deletion on left ventricular (LV) function following 2 weeks of normoxia (N) or intermittent hypoxia (IH). *A*: LV end-systolic (LVESP) and end-diastolic (LVEDP) pressure. *B*: LV developed pressure. *C*: LV dP/dt max. *D*: LV dP/dt min. n = 6 to 10 per group (* $P < 0.05$ vs. N).

Fig. 1

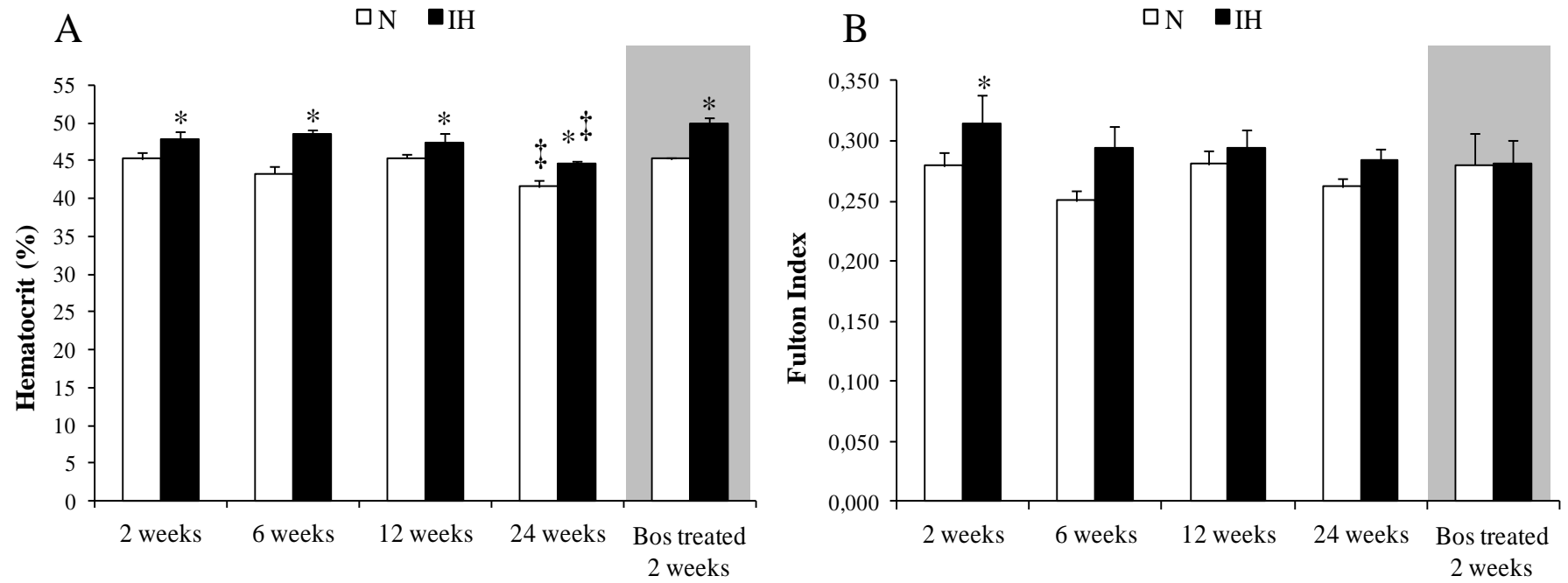


Fig.2

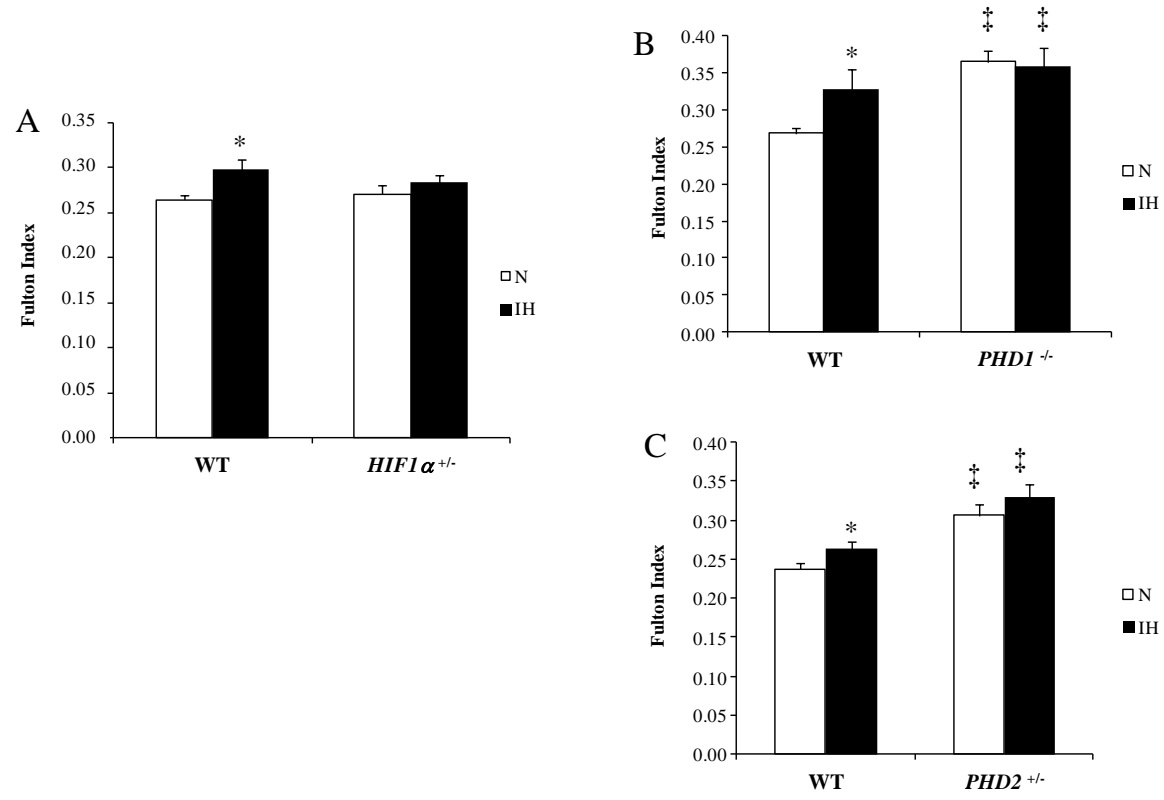


Fig.3

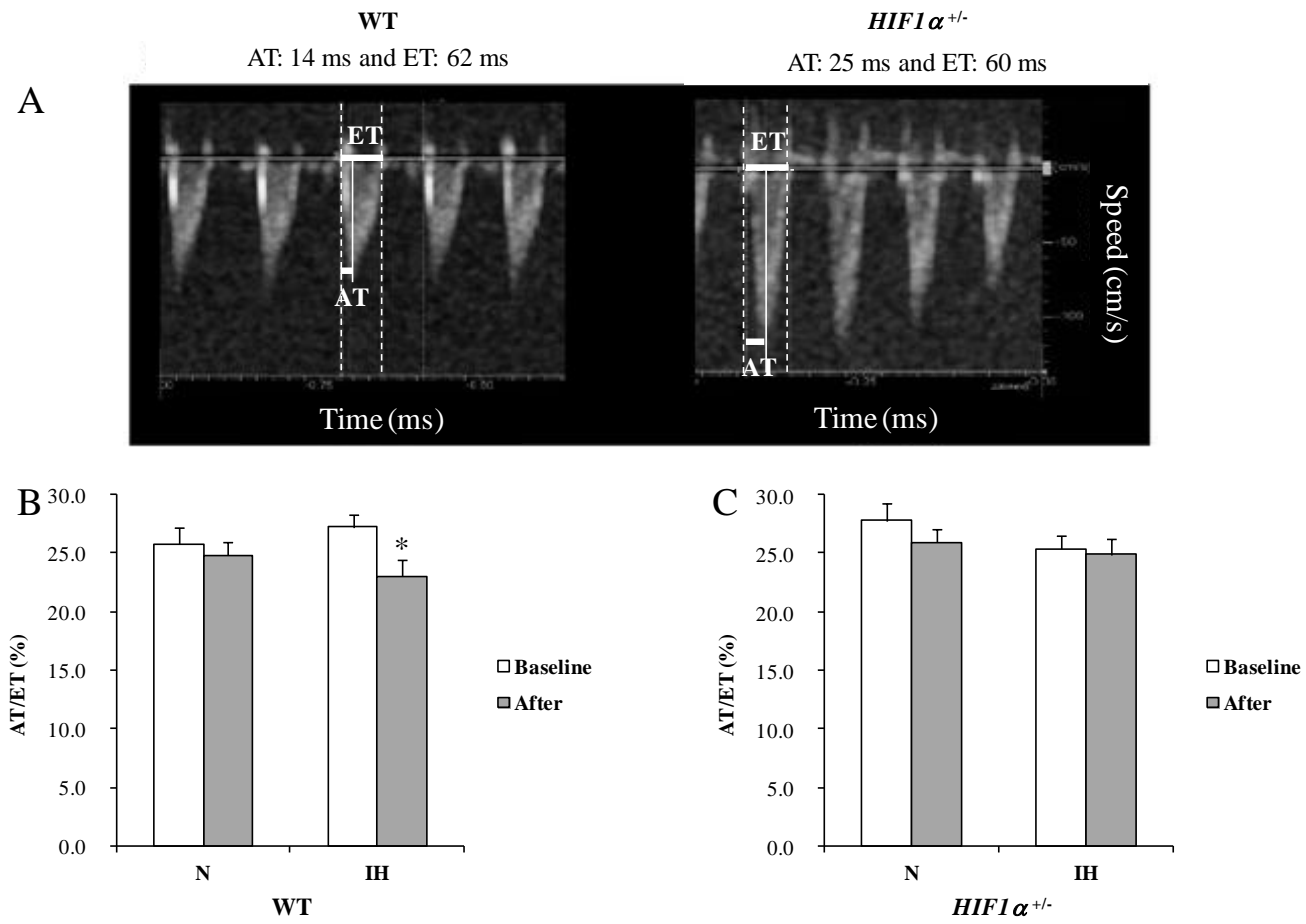
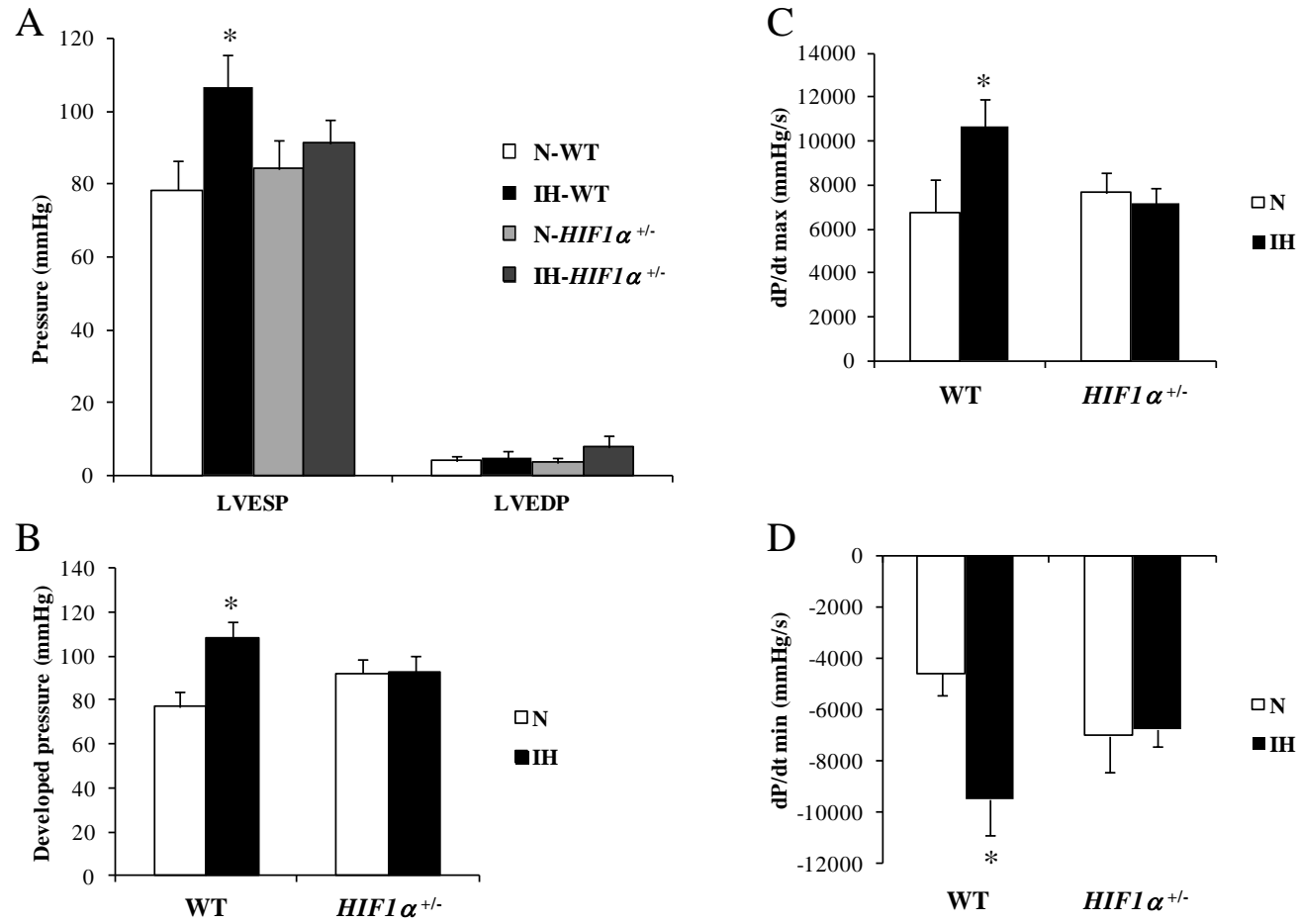


Fig.4



II. Résultats complémentaires de l'article II et interprétation

1. Masse du ventricule droit et du ventricule gauche en fonction de la durée d'exposition à l'HI

Le tableau 6 présente les valeurs de Fulton et des masses du VG et du VD (rapportées au poids corporel des animaux) après différents temps d'exposition. On observe que la masse du ventricule gauche + septum (VG+S) est significativement plus importante après 12 semaines qu'après 2 semaines d'HI. On remarque également que l'HI a un effet par rapport à la normoxie sur la masse du VD, toutes durées confondues. Ces résultats nous montrent que l'augmentation du Fulton par l'HI est bien due à une hypertrophie du VD. La légère fonte du VG observée à 2 semaines d'HI n'est pas statistiquement significative contrairement à l'accroissement observé après 12 semaines.

		2 semaines	6 semaines	12 semaines	24 semaines
Indice de Fulton	N	0,28 ± 0,01	0,25 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,26 ± 0,02
	HI	0,32 ± 0,01	0,30 ± 0,02	0,30 ± 0,02	0,28 ± 0,02
VG+S/PC (mg/g)	N	3,40 ± 0,08	3,65 ± 0,18	3,59 ± 0,18	3,60 ± 0,11
	HI	3,27 ± 0,10	3,39 ± 0,07	3,77 ± 0,07 ‡	3,57 ± 0,09
VD/PC (mg/g)	N	0,95 ± 0,03	0,93 ± 0,06	1,00 ± 0,04	0,94 ± 0,03
	HI *	1,01 ± 0,5	1,00 ± 0,07	1,11 ± 0,06	1,04 ± 0,05

Tableau 6. Effet de la durée d'exposition à l'HI sur le remodelage cardiaque. Indice de Fulton, masse du VG +S et du VD rapportés au poids corporel (PC). Mesures effectuées chez des souris C57Bl/6J exposées durant 2, 6, 12 ou 24 semaines. n = 5 à 10 souris par groupe. Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type de la moyenne. * p= 0,016 vs. N de façon générale quelle que soit la durée d'exposition. ‡ p≤ 0,05 vs. valeur après 2 semaines d'HI.

2. Hypertension pulmonaire et remodelage du ventricule droit chez les souris bosentan

Afin de compléter les résultats de l'article II, nous avons effectué des mesures échographiques de flux pulmonaire avant et après exposition chez les souris traitées ou non par bosentan. La Figure 22 montre que, contrairement à ce que nous avons observé chez les

souris WT, l'exposition pendant 2 semaines à l'HI n'a pas induit d'hypertension pulmonaire (pas de changement du rapport TA/TE) chez les souris contrôles. Le traitement par bosentan n'a pas d'effet en soi.

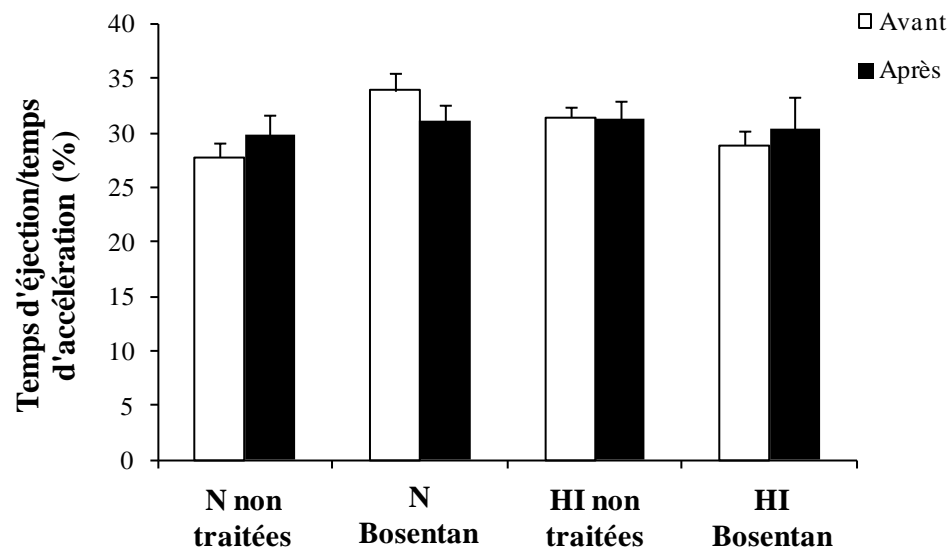


Figure 22. Effet du traitement par bosentan durant l'hypoxie intermittente (HI) sur le rapport TA/TE. Mesures réalisées avant et après 2 semaines d'HI ou de normoxie (N). TA: temps d'accélération du flux pulmonaire; TE: temps d'éjection ventriculaire droit. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type de la moyenne. n = 5 à 6 animaux par groupe.

Parallèlement, nous n'avons observé d'augmentation de l'indice de Fulton en réponse à l'HI chez les souris contrôles ni d'effet du bosentan sur ce paramètre comme le montre la Figure 23.

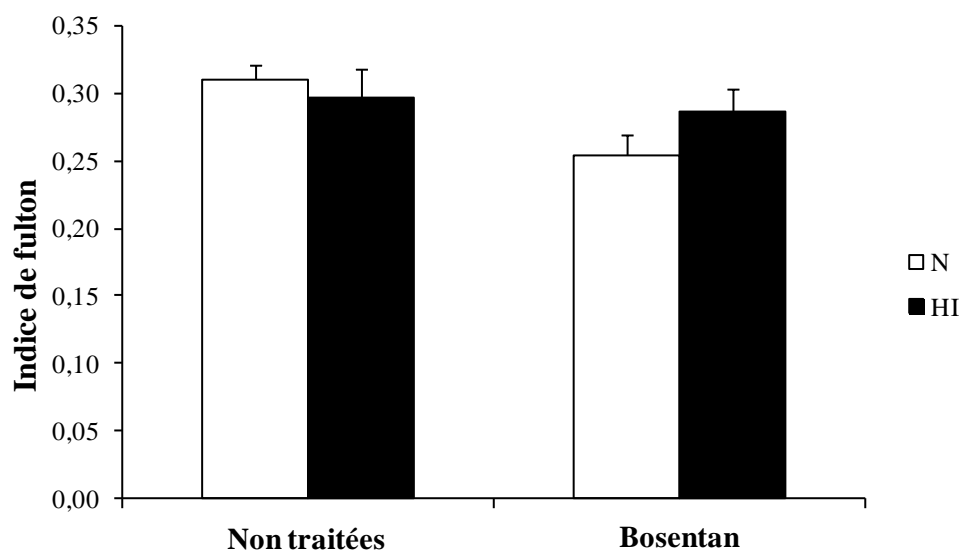


Figure 23. Effet du traitement par bosentan durant l’hypoxie intermittente (HI) sur l’indice de Fulton (VD/VG+S). Mesures effectuées après 2 semaines d’HI ou de normoxie (N). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type de la moyenne. n=3 animaux par groupe.

Les résultats de l’indice de Fulton ne sont pas en accord avec ce que nous avons observé chez les souris contrôles présentées dans l’article II et avec ce qui a été rapporté chez le rat au laboratoire (thèse de Julia Tonini) et dans la littérature (Snow et al. 2008). Une hypothèse permettant d’expliquer ce résultat paradoxal concerne une modification que nous avons apportée aux cages du dispositif à cette époque et que nous avons abandonnée depuis. Nous avons en effet enrichi les cages en ajoutant du coton avec lequel les animaux pouvaient former des nids. En plus de modifier le volume d’air de la cage, ces nids permettaient aux animaux de s’isoler des flux gazeux générés par l’automate. Il est par conséquent possible que les souris n’aient pas été exposées de façon adéquate au stimulus hypoxique.

Les résultats obtenus ne nous permettent donc pas de conclure à une implication de l’endothéline dans le développement de l’hypertension pulmonaire induite par l’HI. Cependant, compte tenu de son rôle dans le développement de l’hypertension pulmonaire en réponse à l’hypoxie soutenue (Liu et al. 2001)}, nous pouvons supposer qu’il en est de même dans le cas de l’HI.

3. Courbes pression/volumes chez les souris *HIF1 α*

Lors de la mesure de la fonction du ventricule gauche, nous avons tenté de réaliser des courbes pressions/volumes avec la sonde Millar mais nous n’avons pas pu exploiter les données de façon systématique. En effet, pour des raisons techniques, nous n’avons pas toujours pu effectuer le recueil de sang nécessaire à la calibration de la sonde à la fin des

expériences. L'absence de ces données est à regretter car elles auraient permis une analyse beaucoup plus approfondie des effets de l'HI et de HIF-1 sur la fonction cardiaque.

4. Dosage myocardique de HIF-1

Nous avons précédemment observé une augmentation de l'activité de HIF-1 dans des extraits nucléaires myocardiques de rats (Belaidi et al. 2008) et de souris (thèse d'Elise Belaidi) exposés à l'HI. Nous n'avons pas pu effectuer ce dosage dans le cadre de cette thèse car les kits ELISA n'étaient plus commercialisés. Nous avons donc essayé de mettre en évidence les effets de l'HI ou de la délétion *HIF1 α* par Western blot et qPCR. Comme le montrent les Figure 24 et 25, les quantités cytosoliques et nucléaires de la protéine HIF-1 α , de même que les quantités d'ARNm de *HIF1 α* ne varient pas significativement en réponse à l'HI ou à la délétion. Il semblerait donc que les dosages de la protéine HIF-1 α et de son ARNm soient moins représentatifs que celui de son activité.

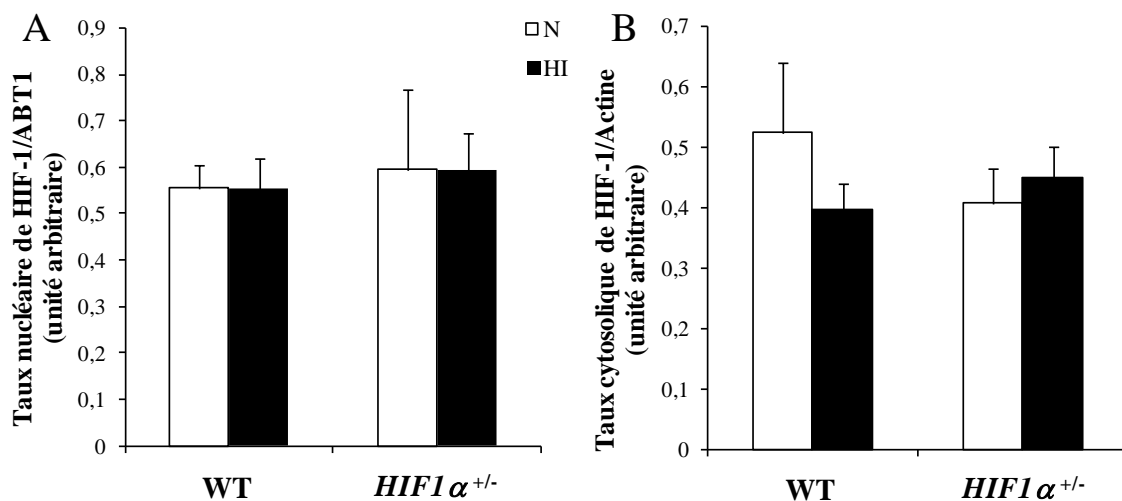


Figure 24. Dosage de HIF-1 myocardique dans les fractions nucléaires et cytosoliques. Dosages effectués chez des souris WT et *HIF1 α ^{+/-}* après 2 semaines d'hypoxie intermittente (HI) ou de normoxie (N). (A) Dosage sur extraits nucléaires, quantifié par rapport à ABT1. (B) Dosage sur extraits cytosoliques, quantifié par rapport à l'actine. ABT1 : Activator of Basal Transcription 1. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type de la moyenne. n= 6 à 9 animaux par groupe.

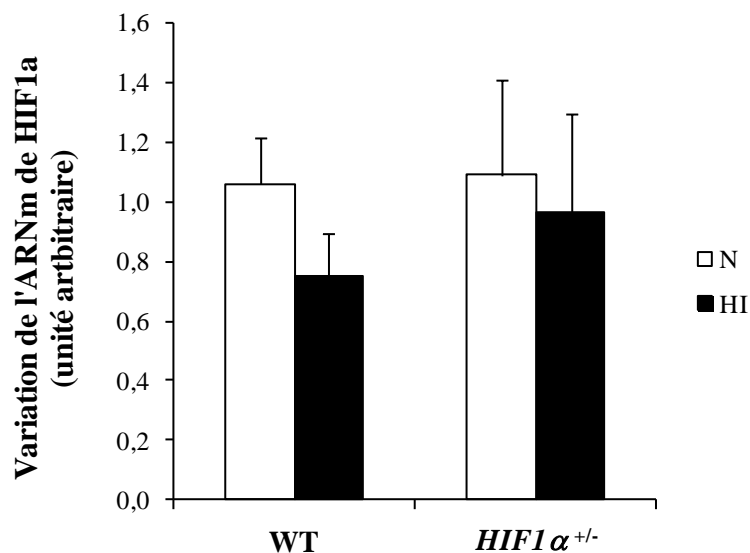


Figure 25. Dosage de l'ARNm de HIF-1 α myocardique après exposition à l'hypoxie intermittente (HI) ou la normoxie (N). Dosages effectués chez des souris WT ou *HIF1 α ^{+/-}*. L'expression de l'ARNm d'*HIF1 α* est rapportée à celle de *Rn18s*. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type de la moyenne. n=5 à 8 animaux par groupe.

5. Dosage myocardique de l'endothéline et du facteur natriurétique auriculaire

Dans une étude précédente, nous avons démontré par ELISA une augmentation de la quantité myocardique d'ET-1 et de big-ET-1 en réponse à l'HI chez le rat (Belaidi et al. 2009). Pour des raisons techniques, nous n'avons pas pu effectuer ce dosage lors de cette thèse. Nous avons donc essayé de quantifier l'endothéline myocardique en mesurant l'ARNm de son précurseur, la pré-pro-endothéline-1.

Nous avons également essayé de quantifier l'expression du facteur natriurétique auriculaire en tant que marqueur du processus d'hypertrophie myocardique.

Comme le montre la Figure 26, les résultats obtenus sont très hétérogènes, notamment dans les extraits de souris WT normoxiques, et aucune différence n'est observée entre les groupes. Ceci ne nous a donc pas permis de conclure quant à l'activation myocardique du système endothéline ou à l'expression de marqueurs moléculaires d'hypertrophie.

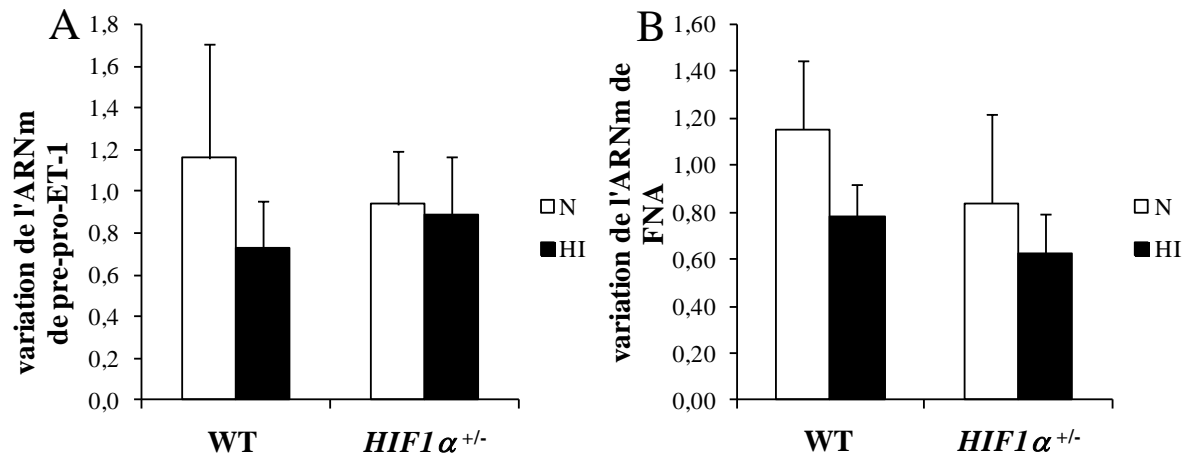


Figure 26. Effet de la délétion partielle de *HIF1α* sur la transcription de pré-pro-ET-1 et de FNA après deux semaines d'hypoxie intermittente (HI) ou en condition normoxique (N). L'expression de l'ARNm est rapportée à celle de l'ARNm de *Rn18s*. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type à la moyenne. $n=5$ à 8 animaux par groupe. (FNA : Facteur Natriurétique Auriculaire ; ET-1 : Endothéline-1).

Il est important de mentionner pour conclure que le manque de significativité des résultats présentés ci-dessus peut être dû à la grande hétérogénéité des valeurs des groupes WT et *HIF1α*^{+/-}. La forte variabilité individuelle de cette souche peut s'expliquer par sa non consanguinité et par son double fond génétique.

DISCUSSION

I. Hypoxie intermittente et inflammation / remodelage vasculaire

La littérature décrit un remodelage des vaisseaux de gros diamètre se traduisant par une augmentation de l'épaisseur intima-média chez l'animal (Dematteis et al. 2008) mais également chez le patient (Szaboova et al. 2007; Nadeem et al. 2013). L'inflammation systémique et vasculaire a également été décrite puisqu'un modèle d'HI sur des cellules endothéliales montre une activation de NF- κ B. Les auteurs ajoutent d'ailleurs qu'une inhibition de NF- κ B à l'aide d'un petit ARN interférent, diminue la production de cytokines associées à l'HI (Han et al. 2013). A l'échelle de l'organisme, l'inflammation se retrouve au niveau local avec une augmentation de macrophages dans la paroi du vaisseau (Arnaud et al. 2011), mais aussi au niveau systémique avec une augmentation de cytokines pro-inflammatoires circulantes (Song et al. 2012). Chez le patient apnéique, les marqueurs de l'inflammation se retrouvent au niveau systémique et sont même corrélés avec l'épaisseur intima-média carotidienne (Monneret et al. 2010). Toutes ces observations sont des indicateurs d'un remodelage inflammatoire précoce pouvant mener à l'athérosclérose telle que retrouvée chez le patient SAOS (Levy et al. 2009; Weinreich et al. 2013).

Les travaux présentés dans la partie 1 des résultats (article I) de cette thèse ont permis de confirmer les effets délétères de l'hypoxie intermittente au niveau vasculaire décrits dans la littérature. De plus, ils ont mis en évidence l'implication importante de HIF-1 et de l'endothéline dans les mécanismes pré-athérosclérotiques induit par l'HI.

1. Rôle de HIF-1 dans le remodelage vasculaire

Nous avons vu que l'inflammation, qu'elle soit systémique ou locale, semble essentielle au développement du remodelage aortique induit par l'HI. Les résultats montrent bien que la délétion partielle de HIF-1 permet d'inhiber la survenue de cette inflammation. De nombreuses données de la littérature impliquent HIF-1 dans les phénomènes inflammatoires. Ainsi, comme nous l'avons déjà vu, HIF-1 possède une interaction avec NF- κ B (Eltzschig et Carmeliet 2011) ce qui pourrait expliquer en partie les résultats obtenus. De même, une équipe a démontré qu'une délétion de HIF-1 dans les neutrophiles entraînait une diminution de NF- κ B (Walmsley et al. 2005). De plus, un modèle de souris invalidées pour HIF-1 au niveau des cellules myéloïdes ne développe plus d'inflammation cutanée ou d'arthrite chimiquement induite (Cramer et al. 2003), démontrant ainsi le rôle pro-inflammatoire de

HIF-1. Il est aussi responsable d'une augmentation de production de cytokines pro-inflammatoires comme TNF- α ou IL-8 dans la microglie, en réponse à l'hypoxie (Yang et al. 2014). Chez l'homme, HIF-1 se trouve co-localisé avec les macrophages dans la paroi du vaisseau athérosclérotique (Sluimer et al. 2008). Son expression est également augmentée dans les macrophages activés dans la plaque d'athérosclérose (Vink et al. 2007). Au vu des travaux réalisés dans cette thèse ainsi que des données de la littérature, HIF-1 semble donc, en plus de son interaction avec NF- κ B, contribuer directement aux phénomènes inflammatoires et au développement du remodelage vasculaire.

2. Rôle de l'ET-1 dans le remodelage vasculaire

L'administration de bosentan, un antagoniste mixte des récepteurs de l'endothéline, a les mêmes effets que la délétion partielle de HIF-1. Nous avons ainsi observé une abolition de l'inflammation systémique et locale, qui aboutit à l'absence de remodelage au niveau de la paroi aortique après HI. Le rôle pro-inflammatoire de l'ET-1 est relativement bien décrit. En effet, nous pouvons noter que différents facteurs de transcription pro-inflammatoires vont induire la transcription de l'endothéline. Nous avons déjà vu que HIF-1 en faisait partie, mais il faut également ajouter NF- κ B qui, lui aussi, reconnaît une séquence consensus dans le promoteur du gène de l'endothéline (Stow et al. 2011). De plus, ET-1 peut activer directement la production de TNF- α par les monocytes (Cunningham et al. 1997) et donc, par cette voie, NF- κ B (Hohmann et al. 1990). Comme pour HIF-1, il existe donc également une interaction positive entre ET-1 et NF- κ B.

A un niveau plus local, l'ET-1 favorise également l'inflammation. Par exemple des souris transgéniques surexprimant la pré-pro-ET-1 dans leurs cellules endothéliales présentent des signes d'inflammation vasculaire en absence d'inflammation systémique, démontrant ainsi le rôle pro-inflammatoire direct de l'endothéline sur la paroi vasculaire (Amiri et al. 2008). ET-1 entraîne aussi l'adhésion des neutrophiles sur les cellules endothéliales en augmentant l'expression de molécules d'adhésion cellulaire par ces cellules (Zouki et al. 1999). En ce qui concerne la pathologie athérosclérotique elle-même, l'ET-1 est également présente et active au sein des plaques. En effet, l'ET-1 est retrouvée dans les différents stades de progression de la plaque et principalement dans les cellules présentant une inflammation chronique (Ihling et al. 2001). Enfin chez le patient, une étude prospective très récente a réalisé un suivi de 20 ans sur des personnes sans atteintes cardiovasculaires au début de l'étude, et a montré qu'un fort taux d'ET-1 plasmatique ($>2,7$ pg/mL) est un facteur prédictif

d'athérosclérose préclinique à risque pour des évènements cérébrovasculaires ou cardiovasculaires (Novo et al. 2014).

Nous observons que le remodelage vasculaire pré-athérosclérotique induit par l'HI ne s'accompagne pas d'une prolifération cellulaire. Cependant, nous pouvons penser que les propriétés prolifératives de l'ET-1 sur les cellules musculaires lisses vasculaires (Kawanabe et al. 2002) puissent avoir un impact sur la progression de la plaque athéromateuse puisque ce phénomène fait parti des étapes de développement de la pathologie.

L'endothéline a aussi des propriétés vasoconstrictives qui peuvent être également impliquées dans le développement de l'athérosclérose. En conditions physiologiques, il est maintenant reconnu que la vasoconstriction induite par l'endothéline est principalement due à son action via ses récepteurs ET-A. La situation est un peu différente dans un contexte athérosclérotique. La présence de cellules spumeuses et de lymphocytes T au sein de la plaque participe à l'accumulation de récepteurs ET-B à ce niveau (Iwasa et al. 1999). Or, il semble que les ET-B prennent une part plus importante dans le processus de vasoconstriction en situation d'athérosclérose. Une étude montre que les inhibiteurs mixtes ET-A et ET-B ont un effet vasodilatateur plus puissant sur des artères athéromateuses que les inhibiteurs ET-A sélectifs. En revanche ceci n'est pas retrouvé sur les artères de sujets contrôles (Bohm et al. 2002). Cela montre bien que les ET-B participent à la vasoconstriction en situation d'athérosclérose et est un argument en faveur de l'utilisation thérapeutique d'antagonistes mixtes des récepteurs de l'endothéline, tel que le bosentan.

3. Impact du SAOS sur l'apparition de l'athérosclérose.

Comme nous l'avons vu précédemment dans l'introduction, les marqueurs d'athérosclérose sont augmentés chez le patient SAOS. Par exemple l'épaisseur intima-média carotidienne est directement corrélée avec l'IAH, montrant ainsi le rôle de l'HI dans le développement précoce de l'athérosclérose (Monneret et al. 2010). Dans le même sens, la présence de plaques est corrélée avec le niveau de désaturation nocturne et cela, indépendamment de la présence ou non d'hypertension (Baguet et al. 2005).

Nous savons que les facteurs promouvant la survenue de l'athérosclérose sont l'inflammation, le stress oxydant ainsi que le taux de cholestérol. Tous ces processus sont favorisés par le SAOS. Ainsi une méta-analyse confirme que des marqueurs pro-

inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-6 ou la CRP sont significativement plus élevés chez les apnéiques que chez les sujets contrôles, attestant ainsi une inflammation systémique liée au SAOS (Nadeem et al. 2013).

De nombreuses études montrent l'augmentation du stress oxydant chez l'apnéique. Par exemple, il y a un taux accru de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine urinaire, marqueur du stress oxydant, en association avec la sévérité du SAOS (Yamauchi et al. 2005). Une étude sur une population sans comorbidités ou autres conditions pro-oxydantes, décrit également que le stress oxydant est majoré durant la nuit chez le patient apnéique contrairement au sujet control (Ntalapascha et al. 2013). Ces études confirment donc bien le lien direct entre SAOS et stress oxydant. En ce qui concerne les taux lipidiques, il semble qu'ils soient également associés à l'IAH. Une grande étude transversale évalue que l'hypoxie intermittente nocturne ainsi que la sévérité du SAOS sont associées à une élévation des triglycérides ainsi qu'à une diminution des HDL et ce après ajustement pour les facteurs confondants (Trzepizur et al. 2013).

Etant donné les conséquences délétères du développement des plaques d'athérosclérose sur le risque accru d'infarctus du myocarde ou d'accidents vasculaires cérébraux, il devient primordial de développer des thérapeutiques efficaces, en complément ou en remplacement de la PPC, pour limiter les évènements cardiovasculaires associés au SAOS. En effet, comme nous l'avons vu dans l'introduction, la PPC n'est pas toujours efficace et elle est souvent mal tolérée ou mal utilisée par le patient (Lo Bue et al. 2014).

4. Critiques et perspectives de la partie I

Nous n'avons pas étudié les effets délétères du duo HIF-1/ET-1 sur la réactivité vasculaire. Il aurait été intéressant de le faire étant donné les effets de l'HI sur ce paramètre. Les conséquences délétères de l'HI sur la fonction vasculaire des vaisseaux de gros (Lefebvre et al. 2006; Totson et al. 2013) et de petits (Allahdadi et al. 2007) diamètre ont été démontrées à plusieurs reprises. En particulier, une surexpression des récepteurs ET-A et une vasoconstriction accrue en réponse à l'endothéline ont été observées (Allahdadi et al. 2005). Ceci suggère que l'endothéline, et donc peut-être HIF-1, participeraient également à l'altération de la réactivité vasculaire. Montrer une dysfonction endothéliale, éventuellement corrigée par la délétion partielle de HIF-1 ou par le traitement au bosentan, permettrait d'affirmer encore plus le rôle de ses deux protagonistes dans le développement accru de

l'athérosclérose induit par l'HI. D'autant qu'il y a des preuves qui encouragent ce raisonnement. En effet, une étude chez la souris exposée à l'HI montre une dysfonction vasculaire qui est significativement améliorée par l'administration locale d'un inhibiteur des récepteurs ET-A (Capone et al. 2012).

Finalement notre modèle animal ne nous a pas permis d'étudier l'implication de HIF-1 et de l'ET-1 dans la formation des lésions athérosclérotiques. En effet, comme la souris ne développe pas d'athérosclérose de façon spontanée, nous n'avons pu observer que des lésions pré-athérosclérotiques. Il serait donc intéressant d'administrer du bosentan à des souris ApoE^{-/-} qui sont elles susceptibles de développer de l'athérosclérose afin d'observer ou non la survenue de lésions induites par l'HI.

Enfin, une perspective essentielle concerne l'étude du rôle du stress oxydant dans le remodelage vasculaire induit par l'hypoxie intermittente (Peng et al. 2003; Xu et al. 2004). Les ERO sont connus pour participer au remodelage vasculaire et au développement de l'athérosclérose (Cushing et al. 1990; Fortuno et al. 2005). Il existe un lien étroit entre HI, stress oxydant, HIF-1 et endothéline. L'HI active HIF-1 de façon plus importante que l'hypoxie continue à travers la production d'anions superoxyde par la NADPH oxydase. Ces ERO favorisent la stabilisation de HIF-1 en inhibant l'activité des prolyl hydroxylases et augmentent sa synthèse via la voie PKC-mTOR (Yuan et al. 2008). Le tempol, un mimétique de la superoxyde dismutase, abolit l'augmentation d'ET-1 plasmatique et l'élévation de pression artérielle induits par l'HI (Troncoso Brindeiro et al. 2007; Ramond et al. 2013). Au vu du rôle de l'axe HIF-1/ET-1 dans le remodelage inflammatoire, il serait donc intéressant de regarder les effets du tempol à ce niveau.

II. Hypoxie intermittente et fonction/remodelage myocardique.

Les effets de l'HI sur le myocarde ont fait l'objet de plusieurs études. On retrouve notamment une augmentation de la susceptibilité du cœur à l'ischémie/reperfusion suite à l'HI chez le rat (Belaidi et al. 2009; Ramond et al. 2013) et chez la souris (Park et Suzuki 2007). L'hypertension artérielle pulmonaire et l'hypertrophie ventriculaire droite ont également été observées chez le rat soumis à l'HI (Nattie et al. 1978; Snow et al. 2008). Parmi les effets fonctionnels, une augmentation de la pression développée et de la pression téléstolique du VG a été décrite chez la souris exposées à 1 et 4 semaines d'HI (Naghshin et al. 2009; Rodriguez R 2014). Les résultats présentés dans la deuxième partie de ce manuscrit (article II) sont donc en accord avec ceux obtenus par d'autres équipes.

Nous n'avons pas pu, pour des raisons techniques, mesurer la fonction ventriculaire droite à l'aide de la sonde Millar. Toutefois, nous observons une élévation de la vitesse du flux sanguin pulmonaire chez les souris exposées à l'HI, signe d'une contractilité ventriculaire droite augmentée. L'effet inotrope positif de l'HI est donc observé sur les deux ventricules mais l'impact n'est pas le même puisque qu'une exposition de 2 semaines entraîne un remodelage du VD mais pas du VG. Ceci pourrait s'expliquer par une différence de susceptibilité en fonction de la masse ventriculaire, le ventricule le plus mince étant affecté en premier. Ainsi une équipe a observé, chez des patients souffrant d'un SAOS léger à modéré ne présentant d'altérations cliniques des deux ventricules, que la PPC avait un impact bénéfique sur le volume du VD sans modifier celui du VG (Magalang et al. 2009). Une autre possibilité, qui reste à confirmer, est que l'hypertension artérielle pulmonaire se développe plus rapidement que l'hypertension systémique avec comme conséquence un remodelage précoce du VD qui serait probablement suivi d'un remodelage ventriculaire gauche pour des durées d'HI plus importantes. Dans ce sens nous avons observé, sur une petite série d'animaux, que le poids du VG augmentait graduellement entre 2 et 12 semaines d'exposition.

Le temps d'exposition semble en effet jouer un rôle important dans le remodelage cardiaque induit par l'HI. Nous avons ainsi observé que l'hypertrophie ventriculaire droite régressait à partir de 12 semaines d'exposition. Il en est de même pour l'augmentation de la pression artérielle qui est plus importante chez le rat après 14 jours qu'après 35 jours d'exposition à l'HI (Joyeux-Faure et al. 2005; Belaidi et al. 2009) et pour les lésions myocardiques induites par l'ischémie-reperfusion qui sont moins importantes après 4

semaines qu'après 2 semaines d'HI (Park et Suzuki 2007). Nous retrouvons également cette cinétique chez le patient apnéique puisque la sévérité des complications cardiovasculaires liées au SAOS diminue avec l'âge (Bixler et al. 1998).

1. Rôle de HIF-1 dans les altérations myocardiques induites par l'HI.

a. Impact sur le ventricule droit

Nous avons observé que les souris partiellement invalidées pour HIF-1 α ne présentaient plus d'altération du flux pulmonaire ni d'hypertrophie ventriculaire droite après 2 semaines d'HI et que les souris PHD-1 -/- et PHD-2 +/-, qui ont une moindre capacité à dégrader HIF-1 α , présentaient une hypertrophie du VD à l'état basal. Semenza et collaborateurs rapportent que la délétion partielle de HIF-1 α prévient le développement de l'hypertension pulmonaire (Yu et al. 1999) ainsi que la dépolarisation membranaire, la surcharge calcique et le remodelage des cellules musculaire lisses (CML) pulmonaires (Shimoda et al. 2001) en réponse à une exposition de 3 semaines à l'hypoxie continue (10% O₂). De même, l'expression de HIF-1 est augmentée dans les artères pulmonaires de patients présentant une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) (Tuder et al. 2001). Toutes ces observations confirment le rôle important de HIF-1 sur la circulation pulmonaire et par conséquent sur le remodelage ventriculaire droit.

b. Impact sur le ventricule gauche

Au niveau de VG, la délétion partielle de HIF-1 α abolit l'effet inotrope positif induit par l'exposition à l'HI ce qui suggère que HIF-1 est à l'origine de mécanismes promouvant la contractilité myocardique. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer l'activation du système endothéline mais également celle du système nerveux sympathique (SNS) associée une expression de HIF-1 dans les corps carotidiens (Peng et al. 2006; Liu et al. 2013). Le SNS, comme l'endothéline (voir section suivante), ont des effets inotropes directs sur le myocarde qui permettraient d'expliquer l'augmentation de contractilité que nous observons. De plus, elle a des propriétés vasoconstrictrices qui participent à l'élévation de la pression artérielle en réponse à l'HI (Dematteis et al. 2008; Belaidi et al. 2009). L'élévation de la post-charge qui en résulte peut donc également contribuer à augmenter la fonction contractile du VG. Au vu du rôle majeur de HIF-1 dans la réponse neurohormonale à l'HI, il est donc logique que des souris sous-exprimant *Hif-1a* ne présentent pas d'augmentation de la contractilité après HI contrairement à leurs contrôles.

A l'opposé, nous pouvons nous demander quels seraient les effets myocardiques d'une activation chronique de HIF-1. En conditions aiguës, HIF-1 semble nécessaire au processus de cardioprotection puisque les souris *Hif-1a* +/- ne répondent plus au préconditionnement ischémique (Cai et al. 2008). Toutefois, à long terme, les voies activées semblent avoir des effets négatifs. Des souris surexprimant HIF-1 au niveau myocardique développent une IC avec l'âge par rapport aux souris contrôles (Holscher et al. 2012) (Bekeredjian et al. 2010). Ceci s'explique par une dysrégulation de nombreux gènes, en particulier celui de la protéine SERCA qui est diminuée de 92% ce qui entraîne un défaut de recapture du calcium cytoplasmique. Les gènes liés au métabolisme de la glycolyse sont augmentés alors que ceux du métabolisme oxydatif sont diminués. Cependant, lorsque le transgène est éteint, le retour à la normale se fait en 7 jours, montrant que les lésions ne sont pas irréversibles (Bekeredjian et al. 2010). Dans notre modèle, la surexpression de HIF-1 permet au cœur de s'adapter, dans un premier temps, aux altérations hémodynamiques induites par l'HI. Toutefois, une stabilisation de longue durée pourrait à long terme favoriser la décompensation cardiaque, tel qu'observé chez le rat à partir de 5 semaines d'HI (Chen et al. 2005; Chen et al. 2008) mais également chez la souris à partir de 8 semaines (Rodriguez R 2014).

2. Rôle de l'ET-1 dans les altérations myocardiques induites par l'HI.

a. Impact sur le ventricule droit

Contrairement au remodelage vasculaire, nous n'avons pas pu approfondir le rôle de l'ET-1 au niveau cardiaque. Nous avons toutefois observé un effet bénéfique du bosentan sur le remodelage ventriculaire droit puisque nous n'observons plus d'hypertrophie après 14 jours d'HI chez les souris traitées.

On peut cependant supposer que son action n'est pas uniquement liée au remodelage du VD. En effet, l'endothéline est connue pour contribuer au développement de l'hypertension pulmonaire. Ainsi, les effets de l'hypoxie sur les CML d'artères pulmonaires décrits dans la section précédente peuvent être dus à une activation par HIF-1 du gène de l'ET-1 puisque des CML traitées par de l'ET-1 durant 48h présentent une augmentation de calcium intracellulaire qui est abolie par l'administration simultanée d'un inhibiteur des récepteurs ET-A, le BQ123 (Whitman et al. 2008). Chez les patients avec HTAP les taux d'endothéline dans la circulation pulmonaire sont plus élevés au niveau veineux qu'au niveau artériel, suggérant une production d'endothéline ou une diminution de sa clairance par le poumon (Stewart et al. 1991). Le traitement de ces patients par le bosentan diminue les

résistances vasculaires pulmonaires et améliore la performance à la marche par rapport au groupe placebo (Galie et al. 2008). Une HTAP prolongée pouvant aboutir à l'insuffisance ventriculaire droite, plusieurs essais cliniques ont été réalisés avec des inhibiteurs des récepteurs de l'endothéline avec des résultats mitigés. Dans une étude comparant les effets du bosentan à ceux du sildenafil (un inhibiteur de la phosphodiesterase de type 5), les auteurs montrent que les effets des 2 produits sur l'HTAP sont équivalents mais que seul le sildenafil diminue la masse du ventricule droit (Wilkins et al. 2005). Ceci peut sembler en contradiction avec les données animales qui montrent une régression de l'hypertrophie ventriculaire droite chez la souris et le rat traités par bosentan. Il ne faut toutefois pas oublier que, dans notre modèle d'HI, l'hypertension pulmonaire observée est majoritairement liée à une libération d'ET-1. La physiopathologie de l'HTAP humaine est multicausale, ce qui ne permet pas de transposer notre modèle à l'homme. Le bénéfice clinique des inhibiteurs du système endothéline mérite toutefois une investigation plus poussée puisque l'impact de l'endothéline sur l'hypertension pulmonaire et l'hypertrophie ventriculaire droite semble clairement établi. C'est ainsi que de nouveaux inhibiteurs des récepteurs à l'endothéline, comme le macitentan, ont récemment été développés et sont en cours d'investigation chez l'homme. Une étude récente, publiée dans le *New England Journal of Medicine*, rapporte ainsi une diminution significative de la morbi-mortalité et une augmentation de l'index cardiaque chez des patients avec HTAP traités par macitentan (Pulido et al. 2013).

b. Impact sur le ventricule gauche

Bien que ceci n'ait pas été abordé dans le cadre de notre étude, plusieurs observations suggèrent que l'activation du système endothéline par l'HI pourrait contribuer à l'augmentation de la fonction contractile du VG observée. Ainsi, l'ET-1 a des effets inotropes directs, tant chez l'homme que chez le rongeur (Moravec et al. 1989), qui semblent liés à une activation de la NADPH oxydase et à une production accrue d'ERO (De Giusti et al. 2008). L'ET-1 participe également à la sensibilisation des corps carotidiens et à l'activation sympathique induits par l'HI (Liu et al. 2013).

Nous n'avons pas observé d'hypertrophie ventriculaire gauche après 14 jours d'exposition à l'HI car elle semble se développer plus tardivement. Comme mentionné dans le paragraphe précédent, une exposition à 5-6 semaines d'HI entraîne une dysfonction contractile chez le rat (Chen et al. 2005; Chen et al. 2008). Une activation soutenue du système endothéline, telle que celle observée avec l'HI, peut favoriser le développement

d'une hypertrophie cardiaque pathologique en activant la voie calcineurine-MAPK (Bernardo et al. 2010). De plus, l'ET-1 a un effet prolifératif direct sur les cardiomyocytes (Bogoyevitch et al. 1993; Bogoyevitch et al. 1994).

Chez le patient insuffisant cardiaque, les concentrations plasmatiques d'ET-1 et de big-ET-1 sont élevées (McMurray et al. 1992; Stewart et al. 1992) et le dosage de la partie C-terminale de la pré-pro-endothéline est un facteur prédictif de mortalité à 12 mois, quelque soit la gravité de la maladie (Jankowska et al. 2011). Toutefois, tout comme pour l'IC droite, le traitement de l'IC gauche par des inhibiteurs des récepteurs de l'endothéline n'a pas donné de résultats probants. Après des essais encourageants chez l'animal (Sakai et al. 1996; Fraccarollo et al. 1997; Merabet et al. 2012), une petite étude sur 36 patients a montré l'efficacité d'un traitement de 2 semaines avec du bosentan en plus du traitement habituel (Kiowski et al. 1995; Sutsch et al. 1998). Puis deux essais cliniques de plus grande ampleur, REACH (Research on Endothelin Antagonism in Chronic Heart failure) et ENABLE (ENdothelin Antagonist Bosentan for Lowering cardiac Events in heart failure) (Handoko et al. 2011), ont dû être arrêtés pour cause d'effets secondaires importants. Ces résultats sont décevants puisqu'encore récemment, une étude animale a montré qu'un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'endothéline diminuait la pré- et la post-charge et préservait le remodelage et la fonction ventriculaires gauches du VG gauche dans un modèle d'IC chronique (Merabet et al. 2012). Les résultats négatifs des études cliniques peuvent s'expliquer par un surdosage (REACH) ou un sous-dosage (ENABLE) et des doses intermédiaires de bosentan pourraient être évaluées. Des essais cliniques avec le macitentan (un inhibiteur mixte qui présente moins d'effets indésirables que le bosentan) et surtout avec des inhibiteurs ET-A sélectifs sont également à envisager. En effet, l'inhibition des récepteurs ET-B a des effets néfastes chez le patient insuffisant cardiaque puisqu'elle bloque leur action vasodilatatrice (Kohan et al. 2011), élève les taux circulants d'ET-1 (Weber et al. 1996) et favorise la rétention d'eau (Goddard et al. 2004).

3. SAOS et insuffisance cardiaque

L'obésité, souvent présente chez le patient apnéique, limite l'analyse de la fonction ventriculaire droite (Otto et al. 2007) mais le SAOS semble bien avoir un impact sur le VD puisque l'on retrouve une hypertrophie (Berman et al. 1991; Guidry et al. 2001) et une dysfonction ventriculaire droite (Dursunoglu et al. 2005) chez les patients apnéiques modérés

à sévères. De plus, une équipe a démontré, chez des patients souffrant d'un SAOS léger à modéré sans altérations cardiaques, que la PPC avait malgré tout un impact bénéfique sur le volume du VD (Magalang et al. 2009).

Bien que ce sujet soit controversé, l'hypertension pulmonaire est retrouvée chez le patient apnéique. Plusieurs auteurs pensent qu'elle n'est observée que chez les patients présentant d'autres pathologies respiratoires comme la broncho-pneumopathie chronique obstructive (Weitzenblum et Chaouat 2005). Cependant on observe une prévalence de 10 % d'hypertension pulmonaire modérée (pression artérielle pulmonaire moyenne entre 25 et 40 mmHg) chez des patients n'ayant aucune affection cardiopulmonaire en dehors du SAOS (Javaheri et Javaheri 2013). Parmi les mécanismes responsables du développement de l'hypertension pulmonaire chez les patients apnéiques, les variations de pression intrathoracique induites par les apnées associées à la vasoconstriction induite par l'hypoxie sont responsables des modifications de la pression artérielle pulmonaire. L'hypercapnie est également un facteur favorisant la vasoconstriction pulmonaire (Javaheri et Javaheri 2013). C'est ainsi que la pression systolique s'élève de 10 mmHg entre le début et la fin d'une apnée (Schafer et al. 1998). Le SAOS semble donc avoir un impact non négligeable sur la pression pulmonaire et le VD ce qui en fait un facteur de risque d'IC droite qu'il faut prendre en compte dans la prise en charge des patients.

De nombreuses études rapportent des modifications du cœur gauche associées au SAOS. Une étude très récente décrit une hypertrophie du ventricule gauche (Noda et al. 1995), de l'oreillette gauche, une dilatation ventriculaire en fin de diastole ainsi qu'une dysfonction diastolique. Toutes ces atteintes sont corrélées à la sévérité du SAOS (Chen et al. 2014), indépendamment de la présence ou non d'obésité (Otto et al. 2007), et sont associées à une augmentation de risque de survenue d'IC (Zile et Brutsaert 2002). En effet, les patients présentant un IAH > 30 ont 58% plus de risque de développer une insuffisance cardiaque que ceux qui ont un IAH < 5 (Gottlieb et al. 2010). Le SAOS est d'ailleurs considéré comme un facteur de risque indépendant pour le développement de l'IC (Shahar et al. 2001). Différentes causes peuvent expliquer l'augmentation du risque d'IC chez le patient apnéique. L'activation du système nerveux sympathique, et la vasoconstriction associée, entraînent une augmentation de la pression artérielle et donc de la post-charge et du travail cardiaque. Les pressions intrathoraciques négatives, engendrées par les efforts respiratoires sur voies aériennes fermées, créent des contraintes sur la paroi ventriculaire et augmentent le retour veineux et la pré-charge. Toutes ces perturbations hémodynamiques peuvent altérer la fonction cardiaque et

aboutir à la dysfonction. En plus de l'impact direct des apnées, d'autres altérations liées au SAOS peuvent également favoriser la survenue d'IC telle que la dysfonction endothéliale, qui est un facteur aggravant dans l'insuffisance cardiaque. Comme nous l'avons vu, le stress oxydant induit par l'hypoxie intermittente influence également directement la fonction cardiaque. Il faut aussi ajouter que l'adaptation neurohormonale qui a pour but initial de compenser l'IC est majorée chez le patient apnéique puisque les systèmes endothéline, sympathique et rénine-angiotensine sont suractivés par l'HI (Kohler et Stradling 2010).

La relation entre SAOS et insuffisance cardiaque est bidirectionnelle. En effet, plusieurs études montrent que la prévalence du SAOS chez les patients insuffisants cardiaques est importante avec des chiffres variant de 36% (Oldenburg et al. 2007) à 54% (Herrscher et al. 2011) selon les études. La rétention d'eau induite par l'IC semble jouer un rôle aggravant sur le SAOS. En effet, lors du passage à la position couchée, l'excès de liquide accumulé dans la partie basse du corps va se déplacer vers le haut, favorisant la formation d'un œdème péri-pharyngé et augmentant la résistance des voies aériennes supérieures et la survenue de collapsus pharyngés (Levy et al. 2013 ; Chen et al. 2014). Il existe ainsi une relation inverse exponentielle entre le volume liquidien des jambes et la circonférence du cou entre le début et la fin de la nuit chez les patients IC souffrant de SAOS. La diminution de liquide au niveau des jambes durant la nuit est directement corrélée avec l'augmentation de l'IAH, ce qui confirme l'impact de la rétention d'eau liée à l'IC sur la sévérité du SAOS (Yumino et al. 2010).

4. Critiques et perspectives

Une première remarque concerne notre modèle d'hypoxie intermittente. Bien que très performant car capable d'effectuer des cycles d'hypoxie extrêmement rapides (il faut seulement quelques secondes pour arriver à 5% et pour retourner ensuite à 21% de FiO_2) il ne semble pas reproduire entièrement la pathologie apnéique. En effet, lors des apnées le patient se trouve en hypoventilation, ce qui entraîne une hypercapnie et donc une acidose respiratoire. Les souris soumises à 5% de FiO_2 hyperventilent en réponse à l'hypoxie et se trouvent donc en hypocapnie et en alcalose respiratoire. Kanagy et collaborateurs utilisent un modèle d'HI où ils ajoutent 5% de CO_2 concomitamment à chaque cycle d'hypoxie (Kanagy et al. 2001). L'eucapnie qui en résulte n'entraîne pas les mêmes conséquences, notamment au niveau du remodelage du VD. En effet, dans une étude comparant les deux modèles d'HI (eucapnique vs hypocapnique), ils ont montré que l'hypertrophie du VD était moins importante en conditions

eucapniques (Snow et al. 2008). Il semblerait donc que l'ajout de CO₂ ait un effet protecteur sur la circulation pulmonaire et sur le VD. Ceci permettrait d'expliquer pourquoi l'hypertension pulmonaire et l'hypertrophie ventriculaire droite ne sont pas systématiquement observées chez les patients apnéiques. L'ajout de CO₂ dans l'air inspiré permettrait donc à notre modèle de reproduire plus fidèlement la pathologie humaine.

De plus, le niveau d'hypoxie atteint lors des cycles utilisés dans notre modèle provoque des désaturations importantes (SaO₂ entre 60 et 70%) (Dematteis et al. 2009) qui peuvent avoir un impact pulmonaire similaire à celui de l'hypoxie continue. Comme ce niveau de désaturation peut être atteint chez les patients avec un SAOS sévère, il serait donc intéressant de regarder si les patients apnéiques présentant des signes d'hypertension pulmonaire ont un SAOS plus sévère que les autres.

Pour compléter au mieux ce travail, nous pourrions également ajouter l'étude du remodelage des vaisseaux pulmonaires. Ceci nous permettrait de voir si les effets de HIF-1 et de l'ET-1 se résument à une simple vasoconstriction ou si un remodelage pathologique est également présent.

Nous n'avons malheureusement pas réussi à étudier en profondeur l'effet préventif du bosentan sur le remodelage myocardique. Tel qu'indiqué dans les résultats complémentaires, nous avons effectué des mesures de flux pulmonaire par échographie chez des souris traitées par bosentan, mais cette série de manipulations n'a pas fonctionné. Il aurait tout de même été extrêmement intéressant de valider nos hypothèses sur ce paramètre. Nous pouvons toutefois supposer qu'étant donné l'abolition de l'hypertrophie ventriculaire droite par le bosentan, nous n'aurions sans doute pas observé d'hypertension pulmonaire chez les souris traitées. La même remarque concerne la mesure de la fonction ventriculaire gauche qui n'a pas pu être réalisée chez les souris traitées au bosentan. Comme nous l'avons vu dans la discussion, les effets inotropes de l'endothéline participent sans doute à l'augmentation de contractilité que nous avons observée. Si nous considérons ces modifications comme préalables au développement d'une IC, nous pouvons penser que l'administration de bosentan aurait eu un effet bénéfique sur la fonction cardiaque.

La mesure de la pression artérielle systémique manque également à ce travail. Nous n'avons donc pas pu vérifier si le cœur gauche augmentait sa fonction en réponse à une augmentation de la post-charge. En effet, toutes nos tentatives de mesures de pression artérielle non pu aboutir à cause de problèmes techniques. Plusieurs études de notre

laboratoire et les données de la littérature montrent une augmentation de la pression artérielle systémique en réponse à l'HI tant chez le rat (Belaidi et al. 2009; Ramond et al. 2013) que chez la souris (Dematteis et al. 2008; Schulz et al. 2014). Nous pouvons donc penser que le cœur gauche répond à cette augmentation, que nous n'avons pu malheureusement pas mesurer.

Comme nous l'avons suggéré à plusieurs reprises dans la discussion de la partie II, la durée d'exposition à l'HI semble avoir une importance sur la réponse cardiaque. Il serait donc intéressant faire un suivi de la fonction contractile gauche avec des durées d'exposition croissantes, associée à des dosages de marqueurs spécifiques de l'IC, comme les facteurs natriurétiques A et B, la SERCA2 ou encore la chaîne lourde de myosine β , de façon à mettre en évidence la survenue d'une éventuelle décompensation. En cas de dysfonction, les effets préventifs du bosentan pourraient alors être étudiés.

Pour valider notre hypothèse sur l'impact du système endothéline, nous pourrions traiter des modèles animaux insuffisant cardiaque avec du bosentan durant la période d'exposition à l'HI.

Finalement, comme proposé dans la première partie de cette discussion, il serait intéressant d'étudier la contribution du stress oxydant associé à l'HI et ce, d'autant plus que les effets délétères directs des ERO au niveau du myocarde entraînent, à forte dose, de la fibrose et de la dysfonction cardiaque (Takimoto et Kass 2007).

III. Nouveaux traitements et perspectives générales

Le SAOS est un facteur majeur de risque de maladies cardiovasculaires. Comme nous avons pu le voir l'HI, une des composantes du SAOS, entraîne des altérations fonctionnelles et structurales aussi bien au niveau cardiaque que vasculaire. Il semble donc nécessaire de trouver des traitements spécifiques à la prise en charge des patients apnéiques en essayant d'intervenir le plus tôt possible avant le développement des complications cardiovasculaires. Comme nous l'avons vu lors de l'introduction, les effets et l'observance de la PPC, qui reste à l'heure actuelle le traitement de référence du SAOS, ne sont pas suffisants. De plus, la prise en charge médicamenteuse associée à la PPC se fait souvent de façon ciblée contre la pathologie développée et rarement contre ses causes. Il est vrai que les liens exacts

entre apnées du sommeil et pathologies cardiovasculaires ne sont pas encore complètement compris et connus. Cependant des cibles thérapeutiques potentielles semblent déjà bien identifiées. Comme nous l'avons vu, avec les deux pathologies étudiées au cours de ces travaux, une modulation de l'axe HIF-1/ET-1 semble être une bonne approche. Il en est de même pour le stress oxydant, une autre conséquence majeure des apnées et de l'HI, pour son rôle dans la survenue des maladies cardiovasculaires mais également pour son action promotrice sur l'axe HIF-1/ET-1. Il serait donc scientifiquement pertinent d'utiliser des inhibiteurs du stress oxydant, du système endothéline et pourquoi pas, de façon partielle et temporaire, de HIF-1 dans le traitement spécifique des pathologies cardiovasculaires associées au SAOS. La question de ces nouveaux traitements susceptibles d'être proposés en complément ou en remplacement de la PPC fait l'objet de la revue présentée à la section suivante.

IV. Article III : Targeting the ROS-HIF-1-endothelin axis as a therapeutic approach for the treatment of sleep apnea-related cardiovascular complications

Elise Belaidi ^{a,b#}, Emmanuelle Gras ^{a,b#}, Jean-Louis Pépin ^{a,b,c}, Diane Godin-Ribuot ^{a,b*}

^a *Université Grenoble Alpes -Laboratoire HP2 - Grenoble - F-38042 France*

^b *INSERM - U1042 - Grenoble - F-38042 France*

^c *CHU de Grenoble - Grenoble - F-38042 France*

These authors contributed equally to the work.

* Corresponding author at:

Laboratoire HP2, Institut Jean Roget,
Faculté de Médecine de Grenoble,
BP 170, 38042 Grenoble Cedex 9, France.
Tel: +33 476 63 75 56; fax: +33 476 63 71 78
E-mail address: diane.ribuot@ujf-grenoble.fr

Abstract

Obstructive sleep apnea (OSA) is now recognized as an independent and important risk factor for cardiovascular diseases such as hypertension, coronary heart disease, heart failure and stroke. Clinical and experimental data have confirmed that intermittent hypoxia is a major contributor to these deleterious consequences. The repetitive occurrence of hypoxia-reoxygenation sequences generates significant amounts of free radicals, which make OSA an oxidative stress disorder. Even more than hypoxia per se, reactive oxygen species (ROS) are potent inducers of the hypoxia-inducible transcription factor-1 (HIF-1) that promotes the transcription of numerous adaptive genes, some of which are deleterious for the cardiovascular system, such as the endothelin-1 gene. This review focuses on the involvement of the ROS-HIF-1-endothelin signalling pathway in OSA and intermittent hypoxia and discusses current and potential therapeutic approaches targeting this pathway to treat or prevent OSA-related cardiovascular complications.

Keywords (6 max)

Obstructive sleep apnea - Cardiovascular disease - Intermittent hypoxia - Oxidative stress-
Hypoxia-inducible factor-1 - Endothelin-1

Abbreviations

CamK, calcium-calmodulin kinase; CPAP, continuous positive airway pressure; ET-1, endothelin-1; ET-A, type A endothelin receptor; HIF-1, hypoxia-inducible factor-1; IH, intermittent hypoxia; IMT, intima-media thickness; LV, left ventricle; mTOR, mammalian target of rapamycin; miRNA, micro-ribonucleic acid; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NO, nitric oxide; OSA, obstructive sleep apnea syndrome; PHD-2, prolyl-hydroxylase-2; PKC, protein kinase C; PLC, phospholipase C; ROS, reactive oxygen species.

1. Introduction

Obstructive sleep apnea (OSA) is characterized by repetitive upper airway occlusions during sleep leading to intermittent hypoxia. Patients with OSA exhibit increased cardiovascular morbidity and mortality, including systemic hypertension, coronary heart disease, arrhythmias, stroke and sudden death (Levy et al. 2009; Baguet et al. 2012; Gami et al. 2013). Intermittent hypoxia (IH), the corollary of OSA, induces oxidative stress and consequently promotes low-grade inflammation, endothelial dysfunction and cardiometabolic co-morbidities. Thus, effective treatment of OSA is an important target for reducing cardiometabolic risk.

Continuous positive airway pressure (CPAP) is the first line therapy for OSA. CPAP treatment clearly improves quality of life, daytime sleepiness and daily functioning. However, it is still debated as to whether CPAP therapy alone can substantially reduce the rate of new cardiovascular events (Martinez-Garcia et al. 2013). One of the major barriers to CPAP treatment efficacy is adherence. 15% of OSA patients initially refuse treatment and 20% discontinue or use it irregularly or suboptimally. When patients do not use CPAP sufficiently, a reduction in clinical cardiovascular outcomes remains compromised. Moreover, the response to CPAP therapy, in terms of cardiovascular and metabolic outcomes, differs between non-obese and obese OSA patients. Thus, in obese OSA patients, CPAP alone has only a limited effect on blood pressure, insulin sensitivity and lipid profile compared to weight loss (Chirinos et al. 2014). The failure of CPAP to improve metabolic or inflammatory markers in obese OSA patients emphasizes the need to combine therapies (Pepin et al. 2012). Antihypertensive drugs are far more effective than CPAP in controlling blood pressure, although there is a beneficial effect when both treatments are combined, especially during the night (Pepin et al. 2010). There is a need to better define the best drug

strategy to counteract the key intermediary mechanisms responsible for OSA-related cardiovascular consequences, namely oxidative stress, sympathetic activation and inflammation.

Reactive oxygen species (ROS) are potent inducers of the hypoxia-inducible transcription factor-1 (HIF-1) that promotes the transcription of numerous adaptive genes some of which are deleterious for the cardiovascular system. The endothelin-1 (ET-1) gene plays a major role in this process. This review will focus on the involvement of the ROS-HIF-1-endothelin signalling pathway in the deleterious consequences of OSA and intermittent hypoxia (Fig. 1). We will discuss new therapeutic avenues targeting this pathway to treat or prevent the OSA-related cardiovascular complications. We present strong mechanistic hypotheses that might constitute the rationale for future clinical trials in the specific field of OSA.

2. Cardiovascular impact of OSA and intermittent hypoxia

2.1. Systemic hypertension

It is now well established that OSA causes hypertension (Pepin et al. 2014). The association between these two conditions was suggested as early as 1985 by Fletcher et al. (Fletcher et al. 1985), but the link was definitely established in 1997 by Young et al. who demonstrated that there was a linear relationship between the severity of sleep-disordered breathing, determined by the apnea hypopnea index (AHI), and blood pressure (BP) elevation, independent of confounding factors (Young et al. 1997).

In OSA, hypertension is mainly diastolic and nocturnal (with a lack of "dipping", a term referring to the normal reduction in BP during sleep) and it is frequently masked (clinic BP values are normal but elevated upon 24-h monitoring) (Baguet et al. 2005).

Intermittent hypoxia appears to be the main contributor to the development of hypertension in OSA. Indeed, rodents (Fletcher et al. 1992; Brooks et al. 1997; Dematteis et al. 2008; Capone et al. 2012) as well as healthy human volunteers (Tamisier et al. 2011) exposed exclusively to intermittent hypoxia rapidly develop elevated blood pressure.

2.2. Vascular remodelling, dysfunction and atherosclerosis

OSA, as well as intermittent hypoxia, also promotes endothelial dysfunction and atherosclerosis. Thus, a relationship between the severity of sleep apnea and vascular dysfunction has been established in OSA patients of all ages (Nieto et al. 2004; Yim-Yeh et al. 2010). In such patients, endothelial dysfunction is principally characterized by an impaired endothelium-dependent vasodilator response (Kohler et al. 2011; Feng et al. 2012; Kaczmarek et al. 2013). Accordingly, chronic exposure of rodents to IH is associated with a blunted vasodilator response to acetylcholine in various vascular beds, such as skeletal muscle, cerebral, aortic and mesenteric arteries (Phillips et al. 2004; Capone et al. 2012; Wang et al. 2013).

Several teams have shown that OSA severity is an independent predictor of the apparition of carotid wall hypertrophy, assessed by intima-media thickness (IMT), and plaque occurrence (Baguet et al. 2005; Drager et al. 2005; Minoguchi et al. 2005). Furthermore, experimental studies in mice have confirmed the role of IH since it induces an early increase in aortic IMT (Arnaud et al. 2011) and promotes vascular inflammation and atherosclerosis (Jun et al. 2010; Arnaud et al. 2011; Douglas et al. 2013).

2.3. Cardiac remodelling and dysfunction

An increased left ventricular mass has been described in OSA patients (Chami et al. 2008) and can occur even before the development of hypertension (Aslan et al. 2013). Moreover, left ventricular (LV) diastolic dysfunction is directly correlated with apnea severity both in adults (Baguet et al. 2010) and children (Villa et al. 2012). Finally, right ventricular hypertrophy has also been reported in patients with severe apnea (Berman et al. 1991; Noda et al. 1995) and appears to develop prior to overt cardiovascular disease and prior to LV dysfunction suggesting that the right of the heart is the first to undergo adverse remodelling (Magalang et al. 2009).

Cardiac remodelling is also induced by IH in rodent models. Early after IH exposure, the right ventricle is the first to be affected, along with the development of pulmonary hypertension in mice (Fagan 2001) as well as in rats (Snow et al. 2008). However, long-term exposure promotes eccentric LV hypertrophy (Chen et al. 2007) and dysfunction (Chen et al. 2005; Chen et al. 2008).

2.4. Myocardial infarction and stroke

A meta-analysis from Dong et al. recently confirmed that moderate to severe OSA significantly increases cardiovascular risk, in particular for coronary heart disease and stroke (Dong et al. 2013). Numerous clinical studies have established a strong link between OSA and cardiovascular death from coronary artery disease or stroke (Peker et al. 2006; Punjabi et al. 2009; Redline et al. 2010; Yeboah et al. 2011). In the case of stroke, Arzt et al. reported that OSA may precede the development of stroke and is a contributing factor (Arzt et al. 2005).

Regarding myocardial infarction, a very recent study on OSA patients has established that a high apnea-hypopnea index is independently associated with reduced myocardial salvage and a larger infarct size 3 months after an acute myocardial infarction (Buchner et al. 2014). Experimental studies showing an increase in myocardial infarct size following IH exposure in rodents suggest that IH is a major contributor to this deleterious effect (Joyeux-Faure et al. 2005; Park et Suzuki 2007; Belaidi et al. 2009; Ramond et al. 2013; Totson et al. 2013).

3. The ROS-HIF-1-endothelin pathway in OSA and intermittent hypoxia and its role in cardiovascular alterations

The hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is a fundamental transcription factor in the molecular physiology of O₂ homeostasis. HIF-1 is a complex protein composed of 2 subunits, the cytosolic HIF-1 α (O₂-sensitive) subunit and the nuclear HIF-1 β subunit, that dimerize in the nucleus to form the functional HIF-1 transcription factor and activate gene transcription. The N-terminal portion of HIF-1 α and HIF-1 β contains bHLH (basic helix-loop-helix) and PAS (Per-ARNT-Sim homology) domains necessary for heterodimerization and DNA binding (Xia et al. 2012). The C-terminal portion contains two transactivation domains (TAD), called TAD-N and TAD-C separated by an inhibitory domain. Activation of transcription by HIF-1 requires various co-activators such as the CREB Binding Protein (CBP)/p300 co-activator. The O₂-sensitive region of HIF-1 α , called the oxygen degradation domain, is pivotal for the stabilization of this subunit under hypoxic conditions.

In well-oxygenated cells, proline hydroxylation of the HIF-1 α subunit by prolyl-hydroxylase enzymes (PHDs) leads to binding of the von Hippel-Lindau (VHL) protein, recruitment of an E3-ubiquitin protein ligase complex with subsequent ubiquitination and proteasomal degradation. In sustained hypoxic conditions, HIF-1 α hydroxylation and subsequent

degradation are reduced because of substrate (O_2) limitation so that HIF-1 α translocates to the nucleus to bind HIF-1 β and activate transcription of various genes. Upon return to normoxic conditions, cytosolic levels of HIF-1 α rapidly decline and the effects of HIF-1 decrease (Semenza 2009).

The situation is quite different in the context of intermittent hypoxia. Indeed, we have observed that chronic *in vivo* exposure to IH leads to a strong and sustained whole-body activation of HIF-1 and, most importantly, that this activation persists when the animals are back in normoxic conditions (Belaidi et al. 2008; Belaidi et al. 2009). This is in agreement with *in vitro* observations that intermittent hypoxia is a much more potent stimulus than sustained hypoxia for HIF-1 activation (Yuan et al. 2005) and that HIF-1 activity remains lastingly elevated following IH (Yuan et al. 2008). Accordingly, a recent clinical study has demonstrated significantly elevated HIF-1 protein levels in skin biopsies performed during daytime in OSA patients compared to controls (Kaczmarek et al. 2013).

The mechanism behind the persistent activation of HIF-1 induced by IH or OSA appears to be the oxidative stress produced by the repetitive oxygenation-desaturation sequences induced by both conditions. Indeed, OSA is now recognized as an oxidative stress disorder (Lavie et al. 2009; Badran et al. 2014). Others and we have confirmed that chronic IH induces significant oxidative stress in various tissues (Chen et al. 2005; Troncoso Brindeiro et al. 2007; Dopp et al. 2011; Norton et al. 2011; Capone et al. 2012; Peng et al. 2012; Ramond et al. 2013; Totoson et al. 2013; Friedman et al. 2014).

The role of reactive oxygen species (ROS) in regulating HIF-1 activity is at least as important as hypoxia per se, and is far more complex (Fig. 2). Briefly, apneas and intermittent hypoxia trigger nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase-dependent production of ROS, mostly superoxide anions, which in turn activate phospholipase C (PLC)

leading to calcium-calmodulin kinase (CamK) and protein kinase C (PKC) activation. PKC stimulates mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent synthesis of HIF-1 α and inhibits PHD-dependent HIF-1 α degradation (Prabhakar et Semenza 2012). CamK also promotes the interaction between HIF-1 α and its coactivator p300, thereby leading to increased transcriptional activation upon dimerization with HIF-1 β . In contrast to continuous hypoxia, in which HIF-1 α is rapidly degraded ($t_{1/2} < 5$ min) upon reoxygenation, HIF-1 α levels remain elevated following intermittent hypoxia due to the persistent activation of mTOR (Semenza 2009). This can explain the long lasting HIF-1 activity observed hours after termination of IH in experimental animals or of apneas in OSA patients.

Various HIF-1 target gene products have an impact on the cardiovascular system, such as erythropoietin, inducible and endothelial nitric oxide synthases, vascular endothelial growth factor and ET-1. We have identified ET-1 as a major gene of interest based on the fact that:

- Plasma endothelin levels are increased in OSA patients (Saarelainen et al. 1997; Phillips et al. 1999; Gjorup et al. 2007; Karkoulas et al. 2010; Zamarron et al. 2011).
- Many of the deleterious cardiovascular consequences of IH have been explained experimentally by an up-regulation of the ET-1 gene (Kanagy et al. 2001; Rey et al. 2006; Belaidi et al. 2009; de Frutos et al. 2010; Capone et al. 2012; Peng et al. 2012).
- Endothelin receptors, in particular ET-A receptors, are up-regulated by IH and the vascular response to ET-1 is increased (Allahdadi et al. 2005; Lefebvre et al. 2006; Rey et al. 2007; Belaidi et al. 2009; Pawar et al. 2009; Snow et al. 2011; Wang et al. 2013; Friedman et al. 2014).
- ET-1 activates NADPH oxidase, in part through its ET-A receptors (Li et al. 2003), thus further promoting superoxide production and HIF-1 activity in a feed-forward mechanism (Fig. 2).

The following section will present the clinical and experimental data in favour of the involvement of the ROS-HIF-1-endothelin axis in the various cardiovascular complications of OSA and IH. There is abundant evidence that HIF-1 activity is increased by hypoxia but because the assessment or pharmacological inhibition of its activity are technically difficult *in vivo*, researchers have mostly focused on the role of the other two components of the pathway, namely oxidative stress and ET-1.

3.1. Role in hypertension

Evidence for the implication of ROS and the endothelin system in the development of OSA and IH-related hypertension has mostly been obtained experimentally. Thus, numerous studies have confirmed that reduction in oxidative stress, either by NADPH oxidase 2 (NOX-2) inhibition or deficiency (Schulz et al. 2014) or antioxidant treatments (Hung et al. 2013; Ramond et al. 2013; Totoson et al. 2013) prevents the development of hypertension in response to intermittent hypoxia exposure. Endothelin receptor antagonists have also been shown to be very effective in preventing or reversing hypertension in rodents exposed to IH (Kanagy et al. 2001; Allahdadi et al. 2008; Belaidi et al. 2009; de Frutos et al. 2010).

3.2. Role in endothelial dysfunction, remodelling and in atherosclerosis

Oxidative stress markers, such as isoprostanes produced by peroxidation of arachidonic acid in membrane phospholipids, are increased in OSA patients (Carpagnano et al. 2003; Monneret et al. 2010) and their levels are correlated with sleep apnea severity (Monneret et al. 2010) and reversed by CPAP treatment (Jullian-Desayes et al. 2014). CPAP therapy also prevents apnea-induced intermittent hypoxia and improves endothelial dysfunction evidenced by restored endothelium-dependent relaxation (Lattimore et al.

2006; Kohler et al. 2013). However, endothelial dysfunction rapidly reappears upon CPAP withdrawal suggesting a high sensibility of endothelial cells to OSA-related oxidative stress and sympathetic activation (Ip et al. 2004; Kohler et al. 2011). Correspondingly, intravenous vitamin C or allopurinol (a xanthine oxidase inhibitor) treatment significantly improves flow-mediated dilation in OSA patients (El Solh et al. 2006; Grebe et al. 2006).

Among the mechanisms responsible for endothelial dysfunction due to oxidative stress, there is evidence that vascular nitric oxide (NO) bioavailability is decreased (Phillips et al. 2004) and this can be related to increased vascular superoxide levels (Li et al. 2003; Troncoso Brindeiro et al. 2007; Totoston et al. 2013). In fact, NO scavenging by superoxide not only decreases NO bioavailability but also enhances oxidative stress by generating peroxynitrite (ONOO^-), a highly reactive nitrogen species (Pacher et al. 2007).

Regarding vascular remodelling and atherosclerosis, lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1), an endothelial receptor for oxidized LDL and a major pro-atherosclerotic factor, is upregulated by various pro-inflammatory and pro-oxidative stimuli such as superoxide anions or ET-1 (Yoshimoto et al. 2011). In accordance, LOX-1 expression is increased in the endothelial cells of OSA patients and returns to normal under CPAP treatment (Akinnusi et al. 2011). Moreover, we have demonstrated that lipid peroxidation, carotid IMT and OSA severity are correlated, strengthening the role of oxidative stress in the early atherosclerotic process (Monneret et al. 2010). In rats exposed to intermittent hypoxia, allopurinol treatment (through its xanthine oxidase inhibiting property) attenuated the impairment in acetylcholine-mediated vasodilation (Dopp et al. 2011). Atorvastatin administration throughout IH exposure prevented endothelial dysfunction along with a reduction in NADPH oxidase expression and an improvement in antioxidant status (Totoston et al. 2013). In a very comprehensive study in mice, Capone et al. confirmed the role of both

oxidative stress and ET-1 in the impaired cerebrovascular endothelial-dependant relaxation induced by IH. Cerebrovascular dysfunction was thus abolished in mice lacking the NOX2 subunit of NADPH oxidase as well as by local perfusion with Mn(III)tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin (MnTBAP) chloride (a free radical scavenger) or BQ-123 (a selective ET-A receptor antagonist) (Capone et al. 2012).

Finally, regarding vascular remodelling, de Frutos et al. demonstrated in mice that IH-induced remodelling of mesenteric arteries could be prevented by the mixed endothelin receptor antagonist bosentan (de Frutos et al. 2010).

3.3. Role in myocardial remodelling and dysfunction

The involvement of oxidative stress in this deleterious consequence of OSA is supported by the positive correlation between 8-isoprostane levels in exhaled breath condensates and cardiac dysfunction in children with OSA (Biltagi et al. 2008). Also, CPAP therapy has proven effective in improving LV ejection fraction, systolic velocity and diastolic impairment in adult patients with moderate to severe OSA (Butt et al. 2012) as well as in decreasing the proportion of OSA patients with concentric LV hypertrophy (Koga et al. 2012).

In rats exposed to IH, treatment with allopurinol (a xanthine oxidase inhibitor and free radical scavenger) throughout exposure significantly improved LV dysfunction (Williams et al. 2010). Mice deficient for gp91phox (the membrane-bound catalytic subunit of NADPH oxidase) did not develop LV remodelling in response to IH (Hayashi et al. 2008). Furthermore, pitavastatin treatment during IH exposure significantly reduced NADPH oxidase-related superoxide production as well as LV remodelling in mice (Inamoto et al. 2010).

The role of ET-1 in the development of cardiac remodelling in response to IH has not been thoroughly investigated but there is ample evidence that activation of the endothelin system promotes cardiac hypertrophy (Ito et al. 1993; Correa et al. 2013; Rebic et al. 2014) and dysfunction (Kang et al. 2012). In accordance, the Na⁺/Ca²⁺ exchanger-1, which is stimulated by endothelin-1 (Kohan et al. 2011), has been shown to mediate LV ventricular dysfunction in mice submitted to chronic IH (Chen et al. 2010).

3.4. Role in myocardial infarction and stroke

There is experimental data in favour of a major role for oxidative stress and endothelin system activation in the increased susceptibility to myocardial infarction induced by chronic IH exposure in rodents. Thus, in mice, the increase in infarct size is associated with increased protein carbonylation and lipid peroxidation and decreased thioredoxin content (Park et Suzuki 2007). In rats, tempol, melatonin as well as atorvastatin treatment during IH exposure reduced myocardial free radical production and prevented the increase in infarct size (Ramond et al. 2013; Totoson et al. 2013).

Finally, we have demonstrated that the cardiac endothelin system is activated by HIF-1 in rats exposed to IH, resulting in increased tissue ET-1 levels, upregulation of coronary ET-A receptors and enhanced vasoconstriction. The deleterious impact of these effects on the myocardium is evidenced by the fact that the dual ET-1 receptor antagonist bosentan completely prevented the related increase in infarct size (Belaidi et al. 2009). Similar effects on the brain's susceptibility to ischemia remain to be demonstrated. However, Capone et al. have observed that alterations in cerebral circulation induced by chronic IH in mice were prevented by the selective ET-A receptor antagonist BQ123 (Capone et al. 2012).

Table 1 summarises the various experimental studies associating chronic IH to cardiovascular diseases described in this section as well the beneficial effects of targeting ROS or the endothelin system in this context.

4. Targeting the ROS-HIF-1-ET-1 axis as a novel therapeutic approach in OSA

The experimental evidence presented above clearly underscores the therapeutic potential of pharmacological interventions targeting this axis in the prevention/reduction of OSA-related cardiovascular consequences. While clinical studies addressing this issue specifically in OSA patients are still pending, antioxidant treatments and endothelin receptor antagonists have proven effective against the cardiovascular diseases classically encountered in OSA.

4.1. Antioxidant treatments

Treatments with antioxidant properties have been used in various cardiovascular pathologies. For instance, phosphodiesterase-5 inhibitors (i.e. Vardenafil, Tadalafil, Sildenafil), known to reduce oxidative stress markers, significantly reduce pulmonary vascular resistance and increase cardiac output, as well as systemic resistance and exercise capacity in patients with pulmonary hypertension (Galie et al. 2005; Galie et al. 2009; Fan et al. 2013). Antioxidants are also effective in arterial hypertension and vascular remodelling. Martina et al. have demonstrated that long-term administration of N-acetylcysteine and L-arginine (enhancers of NO availability and production) reduces endothelial activation, intima-media thickness and systolic blood pressure in hypertensive patients with type-2 diabetes (Martina et al. 2008). Vitamin E and C supplementation also significantly decrease oxidative stress markers as well as systolic and diastolic blood pressure (Rodrigo et al. 2008).

More generally, a meta-analysis concluded that treatment with allopurinol (a xanthine oxidase inhibitor) is associated with a small but significant reduction in systolic and diastolic blood pressure (Agarwal et al. 2013). Free radical scavengers, such as edavarone, also improve endothelial dysfunction in human coronary arteries. Coronary blood flow in response to acetylcholine was measured by quantitative coronary arteriography and the intracoronary Doppler technique before and after the administration of edaravone, in vivo (Oyama et al. 2010). In patients with hypercholesterolemia, vitamin E and slow-release vitamin C supplementation delays the progression of atherosclerosis (Salonen et al. 2003). More surprisingly, edavarone also appears to be effective in the context of myocardial ischemia-reperfusion injury. Thus, infarct size and reperfusion arrhythmias were significantly reduced when edavarone was administered just before reperfusion in patients with myocardial ischemia (Tsujita et al. 2006). Moreover, edavarone has been clinically approved in Japan for the treatment of stroke (Wang et Shuaib 2007).

4.2. Endothelin receptor antagonists

In arterial hypertension, dual antagonists or selective ET-A receptor antagonists have been proven effective. Thus, bosentan significantly decreases blood pressure in patients with essential hypertension (Krum et al. 1998). Darusentan is also effective and decreases both systolic and diastolic pressures (Nakov et al. 2002; Black et al. 2007). In patients with pulmonary hypertension, treatment with 62.5mg bosentan taken twice daily for 4 weeks and then after 125mg twice daily, the cardiac index was greater and the pulmonary vascular resistance was lower than at baseline (Channick et al. 2001). Moreover, a 2-week treatment with bosentan, in addition to diuretics, digoxin and ACE inhibitors, in patients with heart failure, shows an augmentation of cardiac output and a decrease in systemic and pulmonary

vascular resistance (Sutsch et al. 1998). Equally, in patients with type-2 diabetes and microalbuminuria, a 4-week administration of bosentan improved peripheral endothelial function (Rafnsson et al. 2012). In Eisenmenger syndrome patients, a 2-year bosentan treatment significantly improved pulmonary arterial hypertension and right ventricular function (Kaya et al. 2012).

Table 2 summarises the various clinical studies described in this section demonstrating the benefits of antioxidants and endothelin receptor antagonists in the treatment of cardiovascular disease.

4.3. HIF-1 inhibition

Concerning ROS production, the link between ROS and HIF-1 in the context of chronic IH was demonstrated in the way that chronic IH induces thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) production in wild-type mice but not in mice with partial HIF-1 α deletion (Peng et al. 2006). In vitro, Yuan et al. demonstrated that IH-induced HIF-1 α accumulation is due to increased generation of ROS by NADPH oxidase (Yuan et al. 2008). Thus, HIF-1 stabilization by OSA-induced ROS production may amplify a loop between chronic IH, ROS generation, HIF-1 and ET-1 or other deleterious genes. Moreover, ET-1 is known to be a ROS generator through NADPH oxidase activation, prone to amplify the loop via enhancement of oxidative stress, prolyl-hydroxylases degradation and consequently HIF-1 stabilization (Pisarcik et al. 2013) (Fig. 2). Hence, HIF-1 appears to be a pivotal target for strategies to reverse the deleterious cardiovascular consequences of chronic IH and OSA. Various novel molecular and pharmacological approaches to reduce HIF-1 expression or activity (Fig. 3)

have reached the phase of clinical trials in the field of cancer research and could potentially be investigated in OSA patients.

Genetic strategies to decrease HIF-1 α protein levels

MicroRNAs (miRNAs) are a class of single-stranded non-coding RNAs that negatively regulate gene expression. A novel O₂-dependent molecular HIF-1 regulation mechanism involving miR-RNA has been described by Ong & Hausenloy (Ong et Hausenloy 2012). miR-519 and miR-20b directly targeted the 3' untranslated region (3' UTR) of *Hif1 α* and increased miR-519 and miR-20b decreased HIF-1 α protein levels (Lei et al. 2009; Cha et al. 2010). These studies suggest a potential genetic therapy using miRNAs in OSA patients, particularly as miR-RNA sequences present numerous advantages such as specificity, ease of construction and vectorisation.

Small HIF-1 inhibitors

Various small molecule inhibitors of HIF-1 have been proposed (Xia et al. 2012). They act at different levels of HIF-1 α signalling from transcription to activation through translocation, hydroxylation, dimerisation and transactivation. The approach proposed by Melillo was to set up schematic screening in order to be more step-specific (Melillo 2007). Thus, EZN-2968 has been shown to be a specific, selective and durable HIF-1 RNA antagonist under both normoxia and hypoxia. In the context of cancer, a phase I clinical study in advanced malignancies revealed that EZN-2968 was well tolerated (Greenberger et al. 2008). Again, in cancer research, treatment with camptothecin (a quinoline alkaloid that inhibits DNA topoisomerase I involved in DNA replication) decreased HIF-1 α accumulation and was shown to be beneficial in phase I and II clinical studies (Rapisarda et al. 2004). Likewise, 2ME2 is a mitotic inhibitor that prevents HIF-1 translation and nuclear translocation

(Mabjeesh et al. 2003). It is well tolerated and has been investigated in phase II clinical trials (Harrison et al. 2011). Another potentially interesting molecule is trichostatin, an antifungal antibiotic that inhibits class I and II histone deacetylases. Indeed, it has recently been shown that HIF-1 α deacetylation by Sirt 1 prevents its transactivation by the p300/CBP co-activator complex (Lim et al. 2010).

Dimerisation inhibitors

Acriflavine, a cutaneous antibacterial and antiviral agent, appears to inhibit HIF-1 dimerization by binding to the PAS domain, without any effects on the transcription of other genes since it does not act on the Myc proto-oncogene (Lee et al. 2009), unlike other acridine family members.

DNA binding inhibitors

Echinomycin is an antibiotic that can bind DNA in a sequence-specific fashion. In particular, it has been shown to interfere with HIF-1-induced gene transcription by binding to hypoxia response elements in U251 glioma cells (Kong et al. 2005).

Natural inhibitors

Various natural substances have been demonstrated to have HIF-1 inhibitory activity. Moracin O comes from *Morus Alba*, also known as white mulberry. Its inhibitory effect on HIF-1 translocation and activity are due to its particular structure containing a 2-arylbenzofuran ring (Xia et al. 2011). Curcumin, a yellow spice from *Curcuma longa*, is known to inhibit HIF-1 activity via its action on HIF-1 β (Choi et al. 2006). And finally, Manassantin A, from the water plant *Saururuschinensis*, inhibits HIF-1 α nuclear translocation (Hossain et al. 2005).

5. Conclusion

Although continuous positive airway pressure treatment, the first line therapy for OSA, clearly improves quality of life and sleepiness, positive response to CPAP in terms of cardiovascular and metabolic outcome is hampered by poor patient adherence or suboptimal use. Moreover, in obese OSA patients, CPAP alone has only limited effects compared to weight loss. Novel therapeutic strategies are thus required to help counteract the key mechanisms responsible for OSA-related cardiovascular consequences.

This review supports a role for the ROS-HIF-1-endothelin axis in the deleterious cardiovascular consequences of the chronic intermittent hypoxia associated with OSA. It also stresses the importance to extend fundamental and clinical research around the pivotal role of the HIF-1 transcription factor in this context.

Conflicts of interest

None.

6. References

- Agarwal, V., Hans, N., & Messerli, F. H. (2013). Effect of allopurinol on blood pressure: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 15, 435-442.
- Akinnusi, M. E., Laporta, R., & El-Solh, A. A. (2011). Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 modulates endothelial apoptosis in obstructive sleep apnea. *Chest* 140, 1503-1510.
- Allahdadi, K. J., Cherng, T. W., Pai, H., Silva, A. Q., Walker, B. R., Nelin, L. D., et al. (2008). Endothelin type A receptor antagonist normalizes blood pressure in rats exposed to eucapnic intermittent hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295, H434-440.
- Allahdadi, K. J., Walker, B. R., & Kanagy, N. L. (2005). Augmented endothelin vasoconstriction in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension* 45, 705-709.
- Arnaud, C., Beguin, P. C., Lantuejoul, S., Pepin, J. L., Guillermet, C., Pelli, G., et al. (2011a). The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition. *Am J Respir Crit Care Med* 184, 724-731.
- Arnaud, C., Poulain, L., Levy, P., & Dematteis, M. (2011b). Inflammation contributes to the atherogenic role of intermittent hypoxia in apolipoprotein-E knock out mice. *Atherosclerosis* 219, 425-431.

- Arzt, M., Young, T., Finn, L., Skatrud, J. B., & Bradley, T. D. (2005). Association of sleep-disordered breathing and the occurrence of stroke. *Am J Respir Crit Care Med* 172, 1447-1451.
- Aslan, K., Deniz, A., Cayli, M., Bozdemir, H., Sarica, Y., & Seydaoglu, G. (2013). Early left ventricular functional alterations in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Cardiol J* 20, 519-525.
- Badran, M., Ayas, N., & Laher, I. (2014). Cardiovascular Complications of Sleep Apnea: Role of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev* 2014, 10.
- Baguet, J. P., Barone-Rochette, G., Levy, P., Vautrin, E., Pierre, H., Ormezzano, O., et al. (2010). Left ventricular diastolic dysfunction is linked to severity of obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 36, 1323-1329.
- Baguet, J. P., Barone-Rochette, G., Tamisier, R., Levy, P., & Pepin, J. L. (2012). Mechanisms of cardiac dysfunction in obstructive sleep apnea. *Nat Rev Cardiol* 9, 679-688.
- Baguet, J. P., Hammer, L., Levy, P., Pierre, H., Launois, S., Mallion, J. M., et al. (2005a). The severity of oxygen desaturation is predictive of carotid wall thickening and plaque occurrence. *Chest* 128, 3407-3412.
- Baguet, J. P., Hammer, L., Levy, P., Pierre, H., Rossini, E., Mouret, S., et al. (2005b). Night-time and diastolic hypertension are common and underestimated conditions in newly diagnosed apnoeic patients. *J Hypertens* 23, 521-527.
- Belaidi, E., Beguin, P. C., Levy, P., Ribuot, C., & Godin-Ribuot, D. (2008). Prevention of HIF-1 activation and iNOS gene targeting by low-dose cadmium results in loss of myocardial hypoxic preconditioning in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, H901-908.
- Belaidi, E., Joyeux-Faure, M., Ribuot, C., Launois, S. H., Levy, P., & Godin-Ribuot, D. (2009). Major role for hypoxia inducible factor-1 and the endothelin system in promoting myocardial infarction and hypertension in an animal model of obstructive sleep apnea. *J Am Coll Cardiol* 53, 1309-1317.
- Berman, E. J., DiBenedetto, R. J., Causey, D. E., Mims, T., Conneff, M., Goodman, L. S., et al. (1991). Right ventricular hypertrophy detected by echocardiography in patients with newly diagnosed obstructive sleep apnea. *Chest* 100, 347-350.
- Biltagi, M. A., Maguid, M. A., Ghafar, M. A., & Farid, E. (2008). Correlation of 8-isoprostane, interleukin-6 and cardiac functions with clinical score in childhood obstructive sleep apnoea. *Acta Paediatr* 97, 1397-1405.
- Black, H. R., Bakris, G. L., Weber, M. A., Weiss, R., Shahawy, M. E., Marple, R., et al. (2007). Efficacy and safety of darusentan in patients with resistant hypertension: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled dose-ranging study. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 9, 760-769.
- Brooks, D., Horner, R. L., Kozar, L. F., Render-Teixeira, C. L., & Phillipson, E. A. (1997). Obstructive sleep apnea as a cause of systemic hypertension. Evidence from a canine model. *J Clin Invest* 99, 106-109.
- Buchner, S., Satz, A., Debl, K., Hetzenecker, A., Luchner, A., Husser, O., et al. (2014). Impact of sleep-disordered breathing on myocardial salvage and infarct size in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 35, 192-199.
- Butt, M., Dwivedi, G., Shantsila, A., Khair, O. A., & Lip, G. Y. (2012). Left ventricular systolic and diastolic function in obstructive sleep apnea: impact of continuous positive airway pressure therapy. *Circ Heart Fail* 5, 226-233.

- Capone, C., Faraco, G., Coleman, C., Young, C. N., Pickel, V. M., Anrather, J., et al. (2012). Endothelin 1-dependent neurovascular dysfunction in chronic intermittent hypoxia. *Hypertension* 60, 106-113.
- Carpagnano, G. E., Kharitonov, S. A., Resta, O., Foschino-Barbaro, M. P., Gramiccioni, E., & Barnes, P. J. (2003). 8-Isoprostane, a marker of oxidative stress, is increased in exhaled breath condensate of patients with obstructive sleep apnea after night and is reduced by continuous positive airway pressure therapy. *Chest* 124, 1386-1392.
- Cha, S. T., Chen, P. S., Johansson, G., Chu, C. Y., Wang, M. Y., Jeng, Y. M., et al. (2010). MicroRNA-519c suppresses hypoxia-inducible factor-1 α expression and tumor angiogenesis. *Cancer Res* 70, 2675-2685.
- Chami, H. A., Devereux, R. B., Gottdiener, J. S., Mehra, R., Roman, M. J., Benjamin, E. J., et al. (2008). Left ventricular morphology and systolic function in sleep-disordered breathing: the Sleep Heart Health Study. *Circulation* 117, 2599-2607.
- Channick, R. N., Simonneau, G., Sitbon, O., Robbins, I. M., Frost, A., Tapson, V. F., et al. (2001). Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet* 358, 1119-1123.
- Chen, L., Einbinder, E., Zhang, Q., Hasday, J., Balke, C. W., & Scharf, S. M. (2005). Oxidative stress and left ventricular function with chronic intermittent hypoxia in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 172, 915-920.
- Chen, L., Zhang, J., Gan, T. X., Chen-Izu, Y., Hasday, J. D., Karmazyn, M., et al. (2008). Left ventricular dysfunction and associated cellular injury in rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol (1985)* 104, 218-223.
- Chen, L., Zhang, J., Hu, X., Philipson, K. D., & Scharf, S. M. (2010). The Na⁺/Ca²⁺ exchanger-1 mediates left ventricular dysfunction in mice with chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol (1985)* 109, 1675-1685.
- Chen, L. M., Kuo, W. W., Yang, J. J., Wang, S. G., Yeh, Y. L., Tsai, F. J., et al. (2007). Eccentric cardiac hypertrophy was induced by long-term intermittent hypoxia in rats. *Exp Physiol* 92, 409-416.
- Chirinos, J. A., Gurubhagavatula, I., Teff, K., Rader, D. J., Wadden, T. A., Townsend, R., et al. (2014). CPAP, weight loss, or both for obstructive sleep apnea. *N Engl J Med* 370, 2265-2275.
- Choi, H., Chun, Y. S., Kim, S. W., Kim, M. S., & Park, J. W. (2006). Curcumin inhibits hypoxia-inducible factor-1 by degrading aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator: a mechanism of tumor growth inhibition. *Mol Pharmacol* 70, 1664-1671.
- Correa, M. V., Nolly, M. B., Caldiz, C. I., de Cingolani, G. E., Cingolani, H. E., & Ennis, I. L. (2013). Endogenous endothelin 1 mediates angiotensin II-induced hypertrophy in electrically paced cardiac myocytes through EGFR transactivation, reactive oxygen species and NHE-1. *Pflugers Arch*.
- de Frutos, S., Caldwell, E., Nitta, C. H., Kanagy, N. L., Wang, J., Wang, W., et al. (2010). NFATc3 contributes to intermittent hypoxia-induced arterial remodeling in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299, H356-363.
- Dematteis, M., Julien, C., Guillermet, C., Sturm, N., Lantuejoul, S., Mallaret, M., et al. (2008). Intermittent Hypoxia Induces Early Functional Cardiovascular Remodeling in Mice. *Am J Respir Crit Care Med* 177, 227-235.
- Dong, J. Y., Zhang, Y. H., & Qin, L. Q. (2013). Obstructive sleep apnea and cardiovascular risk: meta-analysis of prospective cohort studies. *Atherosclerosis* 229, 489-495.

- Dopp, J. M., Philippi, N. R., Marcus, N. J., Olson, E. B., Bird, C. E., Moran, J. J., et al. (2011). Xanthine oxidase inhibition attenuates endothelial dysfunction caused by chronic intermittent hypoxia in rats. *Respiration* 82, 458-467.
- Douglas, R. M., Bowden, K., Pattison, J., Peterson, A. B., Juliano, J., Dalton, N. D., et al. (2013). Intermittent hypoxia and hypercapnia induce pulmonary artery atherosclerosis and ventricular dysfunction in low density lipoprotein receptor deficient mice. *J Appl Physiol* 115, 1694-1704.
- Drager, L. F., Bortolotto, L. A., Lorenzi, M. C., Figueiredo, A. C., Krieger, E. M., & Lorenzi-Filho, G. (2005). Early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 172, 613-618.
- El Solh, A. A., Saliba, R., Bosinski, T., Grant, B. J., Berbary, E., & Miller, N. (2006). Allopurinol improves endothelial function in sleep apnoea: a randomised controlled study. *Eur Respir J* 27, 997-1002.
- Fagan, K. A. (2001). Selected Contribution: Pulmonary hypertension in mice following intermittent hypoxia. *J Appl Physiol (1985)* 90, 2502-2507.
- Fan, Y. F., Zhang, R., Jiang, X., Wen, L., Wu, D. C., Liu, D., et al. (2013). The phosphodiesterase-5 inhibitor vardenafil reduces oxidative stress while reversing pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Res* 99, 395-403.
- Feng, J., Zhang, D., & Chen, B. (2012). Endothelial mechanisms of endothelial dysfunction in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep Breath* 16, 283-294.
- Fletcher, E. C., DeBehnke, R. D., Lovoi, M. S., & Gorin, A. B. (1985). Undiagnosed sleep apnea in patients with essential hypertension. *Ann Intern Med* 103, 190-195.
- Fletcher, E. C., Leske, J., Qian, W., Miller, C. C., 3rd, & Unger, T. (1992). Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats. *Hypertension* 19, 555-561.
- Friedman, J. K., Nitta, C. H., Henderson, K. M., Codianni, S. J., Sanchez, L., Ramiro-Diaz, J. M., et al. (2014). Intermittent hypoxia-induced increases in reactive oxygen species activate NFATc3 increasing endothelin-1 vasoconstrictor reactivity. *Vascul Pharmacol* 60, 17-24.
- Galie, N., Brundage, B. H., Ghofrani, H. A., Oudiz, R. J., Simonneau, G., Safdar, Z., et al. (2009). Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 119, 2894-2903.
- Galie, N., Ghofrani, H. A., Torbicki, A., Barst, R. J., Rubin, L. J., Badesch, D., et al. (2005). Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 353, 2148-2157.
- Gami, A. S., Olson, E. J., Shen, W. K., Wright, R. S., Ballman, K. V., Hodge, D. O., et al. (2013). Obstructive sleep apnea and the risk of sudden cardiac death: a longitudinal study of 10,701 adults. *J Am Coll Cardiol* 62, 610-616.
- Gjorup, P. H., Sadauskiene, L., Wessels, J., Nyvad, O., Strunge, B., & Pedersen, E. B. (2007). Abnormally increased endothelin-1 in plasma during the night in obstructive sleep apnea: relation to blood pressure and severity of disease. *Am J Hypertens* 20, 44-52.
- Grebe, M., Eisele, H. J., Weissmann, N., Schaefer, C., Tillmanns, H., Seeger, W., et al. (2006). Antioxidant vitamin C improves endothelial function in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 173, 897-901.
- Greenberger, L. M., Horak, I. D., Filpula, D., Sapra, P., Westergaard, M., Frydenlund, H. F., et al. (2008). A RNA antagonist of hypoxia-inducible factor-1alpha, EZN-2968, inhibits tumor cell growth. *Mol Cancer Ther* 7, 3598-3608.

- Harrison, M. R., Hahn, N. M., Pili, R., Oh, W. K., Hammers, H., Sweeney, C., et al. (2011). A phase II study of 2-methoxyestradiol (2ME2) NanoCrystal(R) dispersion (NCD) in patients with taxane-refractory, metastatic castrate-resistant prostate cancer (CRPC). *Invest New Drugs* 29, 1465-1474.
- Hayashi, T., Yamashita, C., Matsumoto, C., Kwak, C. J., Fujii, K., Hirata, T., et al. (2008). Role of gp91phox-containing NADPH oxidase in left ventricular remodeling induced by intermittent hypoxic stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, H2197-2203.
- Hossain, C. F., Kim, Y. P., Baerson, S. R., Zhang, L., Bruick, R. K., Mohammed, K. A., et al. (2005). Saururus cernuus lignans--potent small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor-1. *Biochem Biophys Res Commun* 333, 1026-1033.
- Hung, M. W., Kravtsov, G. M., Lau, C. F., Poon, A. M., Tipoe, G. L., & Fung, M. L. (2013). Melatonin ameliorates endothelial dysfunction, vascular inflammation, and systemic hypertension in rats with chronic intermittent hypoxia. *J Pineal Res* 55, 247-256.
- Inamoto, S., Yoshioka, T., Yamashita, C., Miyamura, M., Mori, T., Ukimura, A., et al. (2010). Pitavastatin reduces oxidative stress and attenuates intermittent hypoxia-induced left ventricular remodeling in lean mice. *Hypertens Res* 33, 579-586.
- Ip, M. S., Tse, H. F., Lam, B., Tsang, K. W., & Lam, W. K. (2004). Endothelial function in obstructive sleep apnea and response to treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 169, 348-353.
- Ito, H., Hirata, Y., Adachi, S., Tanaka, M., Tsujino, M., Koike, A., et al. (1993). Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest* 92, 398-403.
- Joyeux-Faure, M., Stanke-Labesque, F., Lefebvre, B., Beguin, P., Godin-Ribuot, D., Ribuot, C., et al. (2005). Chronic intermittent hypoxia increases infarction in the isolated rat heart. *J Appl Physiol (1985)* 98, 1691-1696.
- Jullian-Desayes, I., Joyeux-Faure, M., Tamisier, R., Launois, S., Borel, A.-L., Levy, P., et al. (2014). Impact of obstructive sleep apnea treatment by continuous positive airway pressure on cardiometabolic biomarkers: A systematic review from sham CPAP randomized controlled trials. *Sleep Med Rev*.
- Jun, J., Reinke, C., Bedja, D., Berkowitz, D., Bevans-Fonti, S., Li, J., et al. (2010). Effect of intermittent hypoxia on atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 209, 381-386.
- Kaczmarek, E., Bakker, J. P., Clarke, D. N., Csizmadia, E., Kocher, O., Veves, A., et al. (2013). Molecular biomarkers of vascular dysfunction in obstructive sleep apnea. *PLoS One* 8, e70559.
- Kanagy, N. L., Walker, B. R., & Nelin, L. D. (2001). Role of endothelin in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension* 37, 511-515.
- Kang, M., Walker, J. W., & Chung, K. Y. (2012). Endothelin receptor overexpression alters diastolic function in cultured rat ventricular myocytes. *Biomol Ther (Seoul)* 20, 386-392.
- Karkoulas, K., Lykouras, D., Sampsonas, F., Drakatos, P., Canova, S., Tsoukalas, G., et al. (2010). The role of Endothelin-1 in obstructive sleep apnea syndrome and pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and Endothelin-1 antagonists. *Curr Med Chem* 17, 1059-1066.
- Kaya, M. G., Lam, Y. Y., Erer, B., Ayhan, S., Vatankulu, M. A., Nurkalem, Z., et al. (2012). Long-term effect of bosentan therapy on cardiac function and symptomatic benefits in adult patients with Eisenmenger syndrome. *J Card Fail* 18, 379-384.

- Koga, S., Ikeda, S., Nakata, T., Yasunaga, T., & Maemura, K. (2012). Effects of nasal continuous positive airway pressure on left ventricular concentric hypertrophy in obstructive sleep apnea syndrome. *Intern Med* 51, 2863-2868.
- Kohan, D. E., Rossi, N. F., Inscho, E. W., & Pollock, D. M. (2011). Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. *Physiol Rev* 91, 1-77.
- Kohler, M., Craig, S., Pepperell, J. C., Nicoll, D., Bratton, D. J., Nunn, A. J., et al. (2013). CPAP improves endothelial function in patients with minimally symptomatic OSA: results from a subset study of the MOSAIC trial. *Chest* 144, 896-902.
- Kohler, M., Stoewhas, A. C., Ayers, L., Senn, O., Bloch, K. E., Russi, E. W., et al. (2011). Effects of continuous positive airway pressure therapy withdrawal in patients with obstructive sleep apnea: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 184, 1192-1199.
- Kong, D., Park, E. J., Stephen, A. G., Calvani, M., Cardellina, J. H., Monks, A., et al. (2005). Echinomycin, a small-molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity. *Cancer Res* 65, 9047-9055.
- Krum, H., Viskoper, R. J., Lacourciere, Y., Budde, M., & Charlon, V. (1998). The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. Bosentan Hypertension Investigators. *N Engl J Med* 338, 784-790.
- Lattimore, J. L., Wilcox, I., Skilton, M., Langenfeld, M., & Celermajer, D. S. (2006). Treatment of obstructive sleep apnoea leads to improved microvascular endothelial function in the systemic circulation. *Thorax* 61, 491-495.
- Lavie, L., & Lavie, P. (2009). Molecular mechanisms of cardiovascular disease in OSAHS: the oxidative stress link. *Eur Respir J* 33, 1467-1484.
- Lee, K., Zhang, H., Qian, D. Z., Rey, S., Liu, J. O., & Semenza, G. L. (2009). Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 17910-17915.
- Lefebvre, B., Godin-Ribuot, D., Joyeux-Faure, M., Caron, F., Bessard, G., Levy, P., et al. (2006). Functional assessment of vascular reactivity after chronic intermittent hypoxia in the rat. *Respir Physiol Neurobiol* 150, 278-286.
- Lei, Z., Li, B., Yang, Z., Fang, H., Zhang, G. M., Feng, Z. H., et al. (2009). Regulation of HIF-1 α and VEGF by miR-20b tunes tumor cells to adapt to the alteration of oxygen concentration. *PLoS One* 4, e7629.
- Levy, P., Pepin, J. L., Arnaud, C., Baguet, J. P., Dematteis, M., & Mach, F. (2009). Obstructive sleep apnea and atherosclerosis. *Prog Cardiovasc Dis* 51, 400-410.
- Li, L., Fink, G. D., Watts, S. W., Northcott, C. A., Galligan, J. J., Pagano, P. J., et al. (2003). Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin(A)-NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension. *Circulation* 107, 1053-1058.
- Lim, J. H., Lee, Y. M., Chun, Y. S., Chen, J., Kim, J. E., & Park, J. W. (2010). Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1 α . *Mol Cell* 38, 864-878.
- Mabjeesh, N. J., Escuin, D., LaVallee, T. M., Pribluda, V. S., Swartz, G. M., Johnson, M. S., et al. (2003). 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer Cell* 3, 363-375.
- Magalang, U. J., Richards, K., McCarthy, B., Fathala, A., Khan, M., Parinandi, N., et al. (2009). Continuous positive airway pressure therapy reduces right ventricular volume in

- patients with obstructive sleep apnea: a cardiovascular magnetic resonance study. *J Clin Sleep Med* 5, 110-114.
- Martina, V., Masha, A., Gigliardi, V. R., Brocato, L., Manzato, E., Berchio, A., et al. (2008). Long-term N-acetylcysteine and L-arginine administration reduces endothelial activation and systolic blood pressure in hypertensive patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 31, 940-944.
- Martinez-Garcia, M. A., Capote, F., Campos-Rodriguez, F., Lloberes, P., Diaz de Atauri, M. J., Somoza, M., et al. (2013). Effect of CPAP on blood pressure in patients with obstructive sleep apnea and resistant hypertension: the HIPARCO randomized clinical trial. *JAMA* 310, 2407-2415.
- Melillo, G. (2007). Hypoxia-inducible factor 1 inhibitors. *Methods Enzymol* 435, 385-402.
- Minoguchi, K., Yokoe, T., Tazaki, T., Minoguchi, H., Tanaka, A., Oda, N., et al. (2005). Increased carotid intima-media thickness and serum inflammatory markers in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 172, 625-630.
- Monneret, D., Pepin, J. L., Godin-Ribuot, D., Ducros, V., Baguet, J. P., Levy, P., et al. (2010). Association of urinary 15-F2t-isoprostane level with oxygen desaturation and carotid intima-media thickness in nonobese sleep apnea patients. *Free Radic Biol Med* 48, 619-625.
- Nakov, R., Pfarr, E., & Eberle, S. (2002). Darusentan: an effective endothelinA receptor antagonist for treatment of hypertension. *Am J Hypertens* 15, 583-589.
- Nieto, F. J., Herrington, D. M., Redline, S., Benjamin, E. J., & Robbins, J. A. (2004). Sleep apnea and markers of vascular endothelial function in a large community sample of older adults. *Am J Respir Crit Care Med* 169, 354-360.
- Noda, A., Okada, T., Yasuma, F., Nakashima, N., & Yokota, M. (1995). Cardiac hypertrophy in obstructive sleep apnea syndrome. *Chest* 107, 1538-1544.
- Norton, C. E., Jernigan, N. L., Kanagy, N. L., Walker, B. R., & Resta, T. C. (2011). Intermittent hypoxia augments pulmonary vascular smooth muscle reactivity to NO: regulation by reactive oxygen species. *J Appl Physiol* (1985) 111, 980-988.
- Ong, S. G., & Hausenloy, D. J. (2012). Hypoxia-inducible factor as a therapeutic target for cardioprotection. *Pharmacol Ther* 136, 69-81.
- Oyama, J., Satoh, S., Suematsu, N., Kadokami, T., Maeda, T., Sugano, M., et al. (2010). Scavenging free radicals improves endothelial dysfunction in human coronary arteries in vivo. *Heart Vessels* 25, 379-385.
- Pacher, P., Beckman, J. S., & Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87, 315-424.
- Park, A. M., & Suzuki, Y. J. (2007). Effects of intermittent hypoxia on oxidative stress-induced myocardial damage in mice. *J Appl Physiol* (1985) 102, 1806-1814.
- Pawar, A., Nanduri, J., Yuan, G., Khan, S. A., Wang, N., Kumar, G. K., et al. (2009). Reactive oxygen species-dependent endothelin signaling is required for augmented hypoxic sensory response of the neonatal carotid body by intermittent hypoxia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296, R735-742.
- Peker, Y., Carlson, J., & Hedner, J. (2006). Increased incidence of coronary artery disease in sleep apnoea: a long-term follow-up. *Eur Respir J* 28, 596-602.
- Peng, Y. J., Nanduri, J., Zhang, X., Wang, N., Raghuraman, G., Seagard, J., et al. (2012). Endothelin-1 mediates attenuated carotid baroreceptor activity by intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* (1985) 112, 187-196.

- Peng, Y. J., Yuan, G., Ramakrishnan, D., Sharma, S. D., Bosch-Marce, M., Kumar, G. K., et al. (2006). Heterozygous HIF-1 α deficiency impairs carotid body-mediated systemic responses and reactive oxygen species generation in mice exposed to intermittent hypoxia. *J Physiol* 577, 705-716.
- Pepin, J. L., Borel, A. L., Tamisier, R., Baguet, J. P., Levy, P., & Dauvilliers, Y. (2014). Hypertension and sleep: Overview of a tight relationship. *Sleep Med Rev*.
- Pepin, J. L., Tamisier, R., Barone-Rochette, G., Launois, S. H., Levy, P., & Baguet, J. P. (2010). Comparison of continuous positive airway pressure and valsartan in hypertensive patients with sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 182, 954-960.
- Pepin, J. L., Tamisier, R., & Levy, P. (2012). Obstructive sleep apnoea and metabolic syndrome: put CPAP efficacy in a more realistic perspective. *Thorax* 67, 1025-1027.
- Phillips, B. G., Narkiewicz, K., Pesek, C. A., Haynes, W. G., Dyken, M. E., & Somers, V. K. (1999). Effects of obstructive sleep apnea on endothelin-1 and blood pressure. *J Hypertens* 17, 61-66.
- Phillips, S. A., Olson, E. B., Morgan, B. J., & Lombard, J. H. (2004). Chronic intermittent hypoxia impairs endothelium-dependent dilation in rat cerebral and skeletal muscle resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286, H388-393.
- Pisarcik, S., Maylor, J., Lu, W., Yun, X., Udem, C., Sylvester, J. T., et al. (2013). Activation of hypoxia-inducible factor-1 in pulmonary arterial smooth muscle cells by endothelin-1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 304, L549-561.
- Prabhakar, N. R., & Semenza, G. L. (2012). Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiol Rev* 92, 967-1003.
- Punjabi, N. M., Caffo, B. S., Goodwin, J. L., Gottlieb, D. J., Newman, A. B., O'Connor, G. T., et al. (2009). Sleep-disordered breathing and mortality: a prospective cohort study. *PLoS Med* 6, e1000132.
- Rafnsson, A., Bohm, F., Settergren, M., Gonon, A., Brismar, K., & Pernow, J. (2012). The endothelin receptor antagonist bosentan improves peripheral endothelial function in patients with type 2 diabetes mellitus and microalbuminuria: a randomised trial. *Diabetologia* 55, 600-607.
- Ramond, A., Godin-Ribuot, D., Ribouot, C., Totoston, P., Koritchneva, I., Cachot, S., et al. (2013). Oxidative stress mediates cardiac infarction aggravation induced by intermittent hypoxia. *Fundam Clin Pharmacol* 27, 252-261.
- Rapisarda, A., Uranchimeg, B., Sordet, O., Pommier, Y., Shoemaker, R. H., & Melillo, G. (2004). Topoisomerase I-mediated inhibition of hypoxia-inducible factor 1: mechanism and therapeutic implications. *Cancer Res* 64, 1475-1482.
- Rebic, D., Rasic, S., & Rebic, V. (2014). Influence of endothelin-1 and nitric oxide on left ventricular remodelling in patients on peritoneal dialysis. *Ren Fail* 36, 232-236.
- Redline, S., Yenokyan, G., Gottlieb, D. J., Shahar, E., O'Connor, G. T., Resnick, H. E., et al. (2010). Obstructive sleep apnea-hypopnea and incident stroke: the sleep heart health study. *Am J Respir Crit Care Med* 182, 269-277.
- Rey, S., Corthorn, J., Chacon, C., & Iturriaga, R. (2007). Expression and immunolocalization of endothelin peptides and its receptors, ETA and ETB, in the carotid body exposed to chronic intermittent hypoxia. *J Histochem Cytochem* 55, 167-174.
- Rey, S., Del Rio, R., & Iturriaga, R. (2006). Role of endothelin-1 on the enhanced carotid body activity induced by chronic intermittent hypoxia. *Adv Exp Med Biol* 580, 345-350; discussion 351-349.

- Rodrigo, R., Prat, H., Passalacqua, W., Araya, J., & Bachler, J. P. (2008). Decrease in oxidative stress through supplementation of vitamins C and E is associated with a reduction in blood pressure in patients with essential hypertension. *Clin Sci (Lond)* 114, 625-634.
- Saarelainen, S., Seppala, E., Laasonen, K., & Hasan, J. (1997). Circulating endothelin-1 in obstructive sleep apnea. *Endothelium* 5, 115-118.
- Salonen, R. M., Nyyssonen, K., Kaikkonen, J., Porkkala-Sarataho, E., Voutilainen, S., Rissanen, T. H., et al. (2003). Six-year effect of combined vitamin C and E supplementation on atherosclerotic progression: the Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention (ASAP) Study. *Circulation* 107, 947-953.
- Schulz, R., Murzabekova, G., Egemnazarov, B., Kraut, S., Eisele, H. J., Dumitrascu, R., et al. (2014). Arterial hypertension in a murine model of sleep apnea: role of NADPH oxidase 2. *J Hypertens* 32, 300-305.
- Semenza, G. L. (2009). Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology (Bethesda)* 24, 97-106.
- Snow, J. B., Gonzalez Bosc, L. V., Kanagy, N. L., Walker, B. R., & Resta, T. C. (2011). Role for PKCbeta in enhanced endothelin-1-induced pulmonary vasoconstrictor reactivity following intermittent hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 301, L745-754.
- Snow, J. B., Kitzis, V., Norton, C. E., Torres, S. N., Johnson, K. D., Kanagy, N. L., et al. (2008). Differential effects of chronic hypoxia and intermittent hypocapnic and eucapnic hypoxia on pulmonary vasoreactivity. *J Appl Physiol (1985)* 104, 110-118.
- Sutsch, G., Kiowski, W., Yan, X. W., Hunziker, P., Christen, S., Strobel, W., et al. (1998). Short-term oral endothelin-receptor antagonist therapy in conventionally treated patients with symptomatic severe chronic heart failure. *Circulation* 98, 2262-2268.
- Tamisier, R., Pepin, J. L., Remy, J., Baguet, J. P., Taylor, J. A., Weiss, J. W., et al. (2011). 14 nights of intermittent hypoxia elevate daytime blood pressure and sympathetic activity in healthy humans. *Eur Respir J* 37, 119-128.
- Totoson, P., Fhayli, W., Faury, G., Korichneva, I., Cachot, S., Baldazza, M., et al. (2013). Atorvastatin protects against deleterious cardiovascular consequences induced by chronic intermittent hypoxia. *Exp Biol Med (Maywood)* 238, 223-232.
- Troncoso Brindeiro, C. M., da Silva, A. Q., Allahdadi, K. J., Youngblood, V., & Kanagy, N. L. (2007). Reactive oxygen species contribute to sleep apnea-induced hypertension in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293, H2971-2976.
- Tsujita, K., Shimomura, H., Kaikita, K., Kawano, H., Hokamaki, J., Nagayoshi, Y., et al. (2006). Long-term efficacy of edaravone in patients with acute myocardial infarction. *Circ J* 70, 832-837.
- Villa, M. P., Ianniello, F., Tocci, G., Evangelisti, M., Miano, S., Ferrucci, A., et al. (2012). Early cardiac abnormalities and increased C-reactive protein levels in a cohort of children with sleep disordered breathing. *Sleep Breath* 16, 101-110.
- Wang, B., Yan, B., Song, D., Ye, X., & Liu, S. F. (2013). Chronic intermittent hypoxia down-regulates endothelial nitric oxide synthase expression by an NF-kappaB-dependent mechanism. *Sleep Med* 14, 165-171.
- Wang, C. X., & Shuaib, A. (2007). Neuroprotective effects of free radical scavengers in stroke. *Drugs Aging* 24, 537-546.
- Wang, Z., Li, A. Y., Guo, Q. H., Zhang, J. P., An, Q., Guo, Y. J., et al. (2013). Effects of cyclic intermittent hypoxia on ET-1 responsiveness and endothelial dysfunction of pulmonary arteries in rats. *PLoS One* 8, e58078.

- Williams, A. L., Chen, L., & Scharf, S. M. (2010). Effects of allopurinol on cardiac function and oxidant stress in chronic intermittent hypoxia. *Sleep Breath* 14, 51-57.
- Xia, Y., Choi, H. K., & Lee, K. (2012). Recent advances in hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitors. *Eur J Med Chem* 49, 24-40.
- Xia, Y., Jin, Y., Kaur, N., Choi, Y., & Lee, K. (2011). HIF-1 α inhibitors: synthesis and biological evaluation of novel moracin O and P analogues. *Eur J Med Chem* 46, 2386-2396.
- Yeboah, J., Redline, S., Johnson, C., Tracy, R., Ouyang, P., Blumenthal, R. S., et al. (2011). Association between sleep apnea, snoring, incident cardiovascular events and all-cause mortality in an adult population: MESA. *Atherosclerosis* 219, 963-968.
- Yim-Yeh, S., Rahangdale, S., Nguyen, A. T., Jordan, A. S., Novack, V., Veves, A., et al. (2010). Obstructive sleep apnea and aging effects on macrovascular and microcirculatory function. *Sleep* 33, 1177-1183.
- Yoshimoto, R., Fujita, Y., Kakino, A., Iwamoto, S., Takaya, T., & Sawamura, T. (2011). The discovery of LOX-1, its ligands and clinical significance. *Cardiovasc Drugs Ther* 25, 379-391.
- Young, T., Peppard, P., Palta, M., Hla, K. M., Finn, L., Morgan, B., et al. (1997). Population-based study of sleep-disordered breathing as a risk factor for hypertension. *Arch Intern Med* 157, 1746-1752.
- Yuan, G., Nanduri, J., Bhasker, C. R., Semenza, G. L., & Prabhakar, N. R. (2005). Ca²⁺/calmodulin kinase-dependent activation of hypoxia inducible factor 1 transcriptional activity in cells subjected to intermittent hypoxia. *J Biol Chem* 280, 4321-4328.
- Yuan, G., Nanduri, J., Khan, S., Semenza, G. L., & Prabhakar, N. R. (2008). Induction of HIF-1 α expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca²⁺ signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR. *J Cell Physiol* 217, 674-685.
- Zamarron, C., Riveiro, A., & Gude, F. (2011). Circulating levels of vascular endothelial markers in obstructive sleep apnoea syndrome. Effects of nasal continuous positive airway pressure. *Arch Med Sci* 7, 1023-1028.

Cardiovascular disease	IH model	Target	Treatment	References
Systemic hypertension	Rat	ET-1	PD145065 (1-1000 nmol/kg)	(Kanagy et al. 2001)
	Rat	ET-1	Bosentan (100 mg/kg/day)	(Belaidi et al. 2009)
	Mouse	ET-1	Bosentan (30 mg/kg/day)	(de Frutos et al. 2010)
	Rat	ROS	Tempol (1 mM in water)	(Troncoso Brindeiro et al. 2007; Ramond et al. 2013)
	Rat	ROS	Melatonin (100 mg/L in water)	(Ramond et al. 2013)
Endothelial dysfunction	Rat	ROS	Allopurinol (65 mg/kg/day)	(Dopp et al. 2011)
	Mouse	ROS	Mn(III)tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin chloride (100 µmol/L superfusion)	(Capone et al. 2012)
	Rat	ROS	Atorvastatin (10 mg/kg/day)	(Totoson et al. 2013)
	Mouse	ET-1	BQ123 (1 µmol/L superfusion)	(Capone et al. 2012)
Vascular remodelling	Mouse	ET-1	Bosentan (30 mg/kg/day)	(de Frutos et al. 2010)
Cardiac dysfunction	Rat	ROS	Allopurinol (1% in water)	(Williams et al. 2010)
Cardiac remodelling	Mouse	ROS	Pitavastatin (3 mg/kg/day)	(Inamoto et al. 2010)
Increased infarct size	Rat	ET-1	Bosentan (100mg/kg/day)	(Belaidi et al. 2009)
	Rat	ROS	Melatonin (100mg/L in water)	(Ramond et al. 2013)
	Rat	ROS	Tempol (1 mM in water)	(Ramond et al. 2013)

Table 1. Summary of experimental studies demonstrating the beneficial effects of targeting reactive oxygen species (ROS) and endothelin-1 (ET-1) system in animal models of cardiovascular complications associated with intermittent hypoxia (IH).

Antioxydant treatment

Vitamins E and C	Peroxy radical scavengers	↓ Atherosclerosis ↓ SBP, DBP	(Salonen et al. 2003) (Rodrigo et al. 2008)
Edavarone	Free radical scavenger	↓ Infarct size and reperfusion arrhythmias ↓ Coronary endothelial dysfunction	(Tsujita et al. 2006) (Oyama et al. 2010)
N-Acetylcysteine	↑ glutathione content	↓ SBP, DBP ↓ IMT	(Martina et al. 2008)
Vardenafil	Phosphodiesterase-5 inhibitor	↓ Pulmonary vascular resistance ↑ Cardiac index	(Fan et al. 2013)
Allopurinol	Xanthine oxidase inhibitor	↓ SBP, DBP	(Agarwal et al. 2013)

Endothelin receptor antagonism

Bosentan	Dual ET-A/ET-B antagonist	↓ SBP, DBP	(Krum et al. 1998)
		↓ Pulmonary vascular resistance	(Channick et al. 2001)
		↑ Cardiac index	
		↑ 6-MWD	
		↑ Cardiac output	(Sutsch et al. 1998)
		↓ Pulmonary vascular resistance	
		↓ Systemic vascular resistance	
Darusentan	Selective ET-A antagonist	↓ Endothelial dysfunction	(Rafnsson et al. 2012)
		↓ PAH	(Kaya et al. 2012)
		↑ RV function	
		↓ SBP, DBP	(Nakov et al. 2002; Black et al. 2007)

Table 2. Summary of clinical studies demonstrating the beneficial effects of targeting reactive oxygen species (ROS) and the endothelin-1 (ET-1) system in the treatment of cardiovascular disease. SBP, systolic arterial blood pressure; DBP, diastolic arterial blood pressure; IMT, intima-media thickness; 6-MWD, 6-min walk test; PAH, pulmonary artery hypertension; RV, right ventricle.

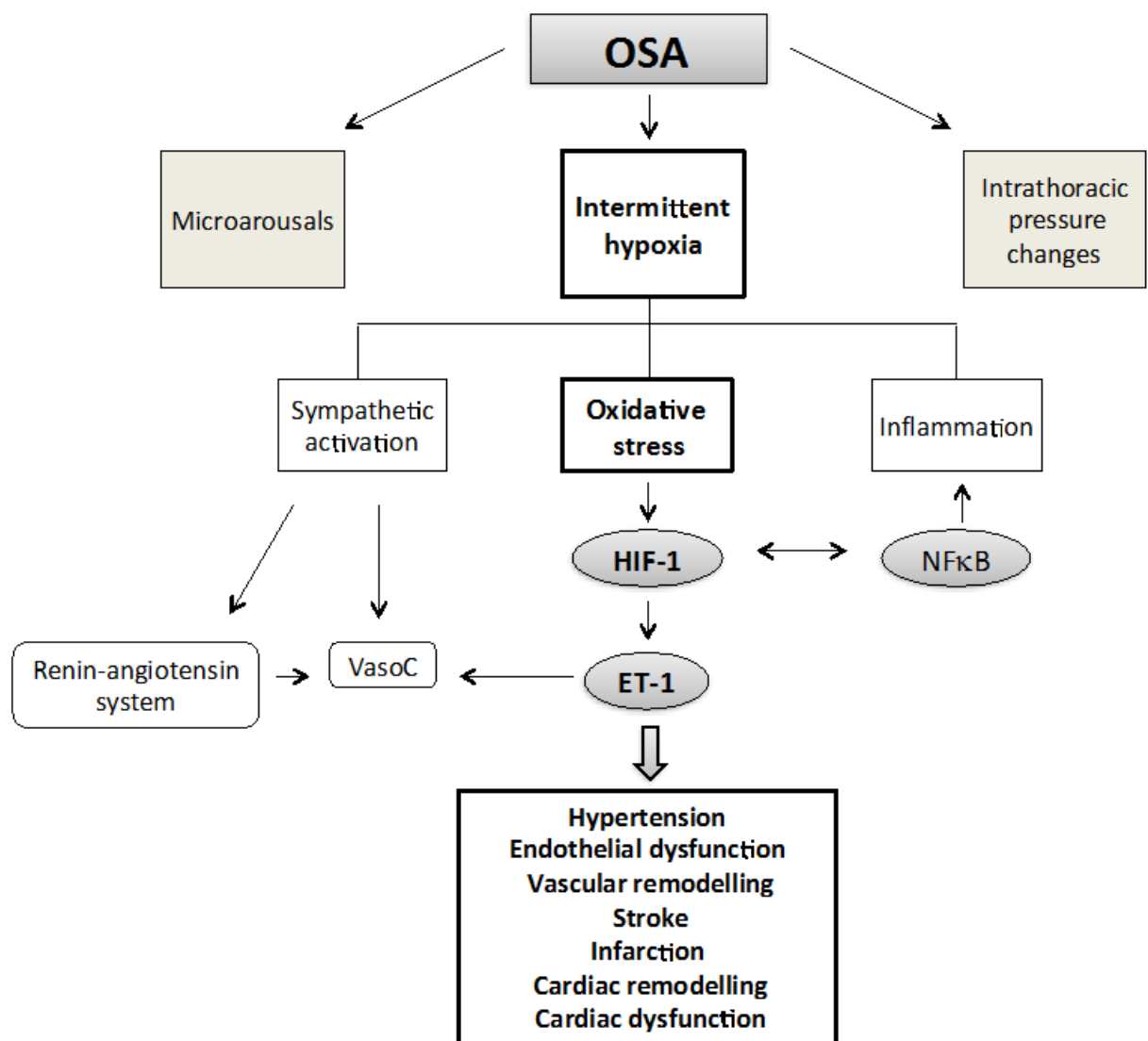


Fig. 1. Among the consequences of obstructive sleep apnea (OSA), intermittent hypoxia plays a major role in the development of associated cardiovascular pathologies. More specifically, intermittent hypoxia is well recognised as inducing oxidative stress with subsequent activation of the hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) transcription factor and upregulation of genes deleterious to the cardiovascular system such as the endothelin-1 (ET-1) gene. NFκB, nuclear factor kappa B; VasoC, vasoconstriction.

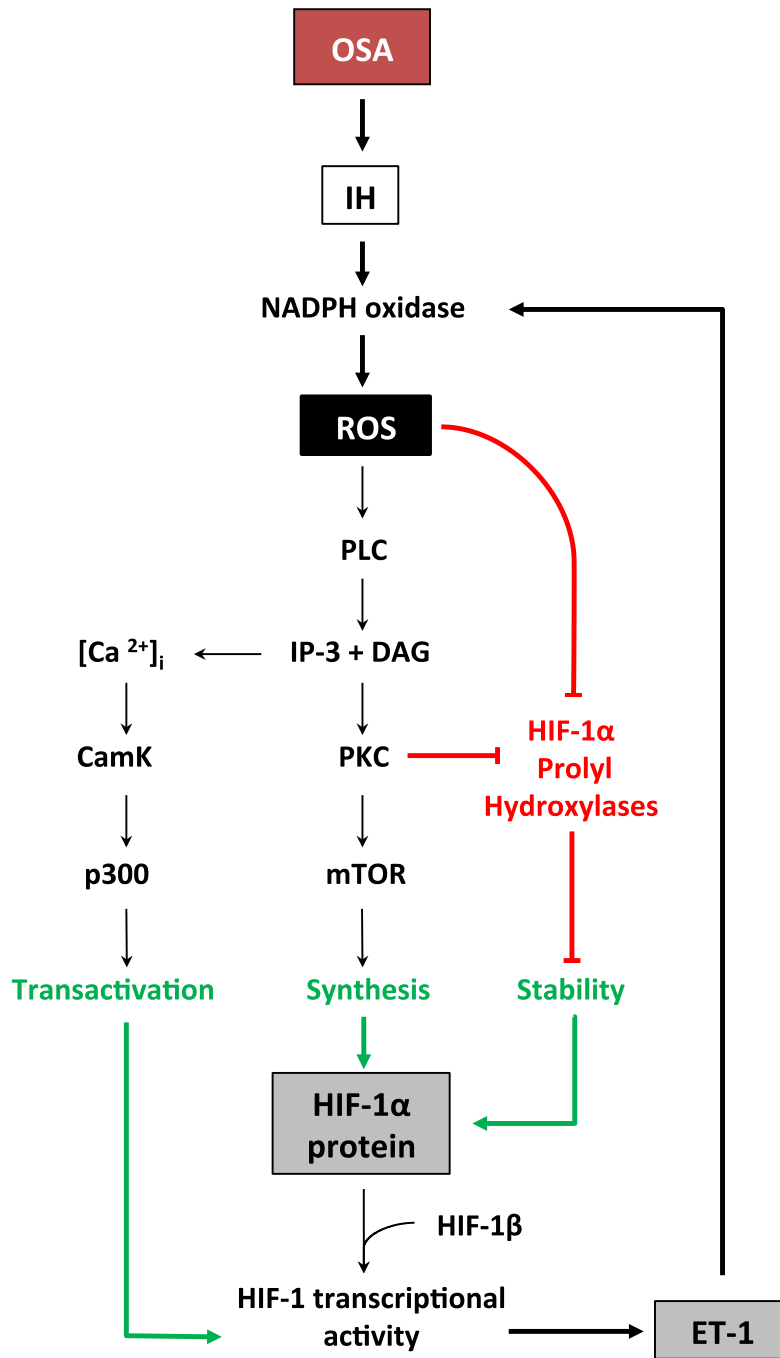


Fig. 2. Signal transduction pathways by which obstructive sleep apnea (OSA), intermittent hypoxia (IH) and reactive oxygen species (ROS) induce HIF-1 α protein stability, synthesis and transactivation and the promoting effect of endothelin-1 (ET-1) (adapted with permission from (Semenza)). See text for detailed description and additional abbreviations.

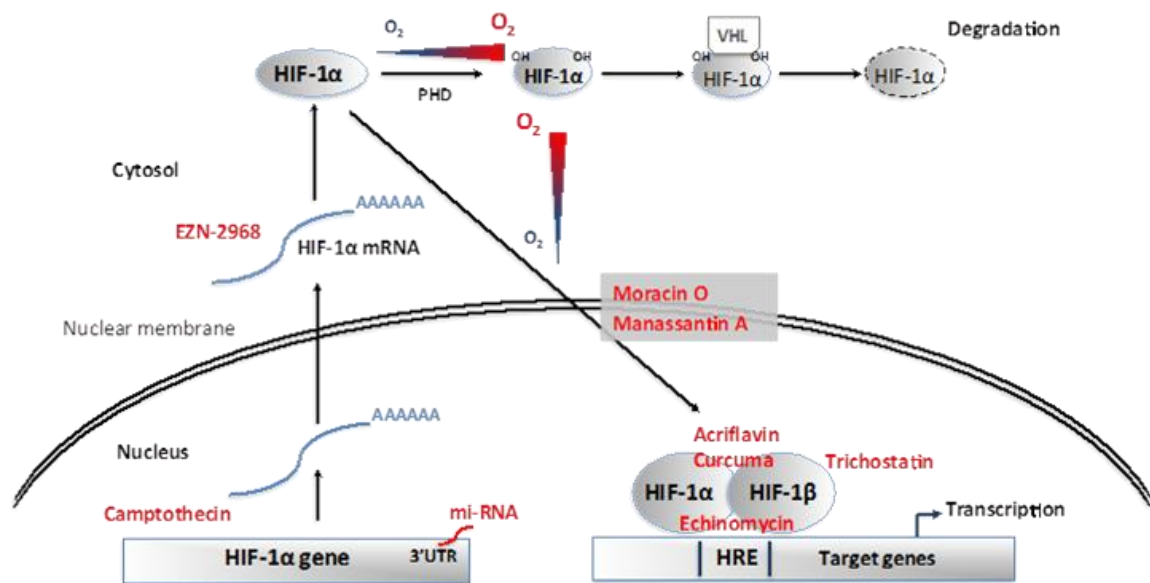


Fig. 3. Stabilisation of the O₂-sensitive cytosolic alpha subunit of the hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) transcription factor is determinant for HIF-1 activity. In normoxia, proline hydroxylation (OH) of HIF-1 α leads to its recognition by the Von Hippel Lindau (VHL) ubiquitylation complex and subsequent proteasomal degradation. Intermittent hypoxia, by inhibiting prolyl-hydroxylase (PHD) activity, induces HIF-1 α stabilisation followed by translocation to the nucleus, dimerisation with HIF-1 β to form HIF-1, transactivation and binding to hypoxia response elements (HRE) in the promoter of target genes.

HIF-1 content and transcriptional activity can be reduced by various therapeutic strategies: mi-RNA and Camptothecin inhibit its traduction; EZN-2968 inhibits its transcription; Moracin O and Manassantin A inhibit its translocation to the nucleus; Acriflavin and Curcuma prevent its dimerisation with HIF-1 β ; Echinomycin prevents its binding to HRE; Trichostatin prevents its transactivation.

CONCLUSION

En conclusion, nous avons par ces travaux pu mettre en évidence plusieurs modifications du système cardiovasculaire en réponse à l'HI. Parmi celles-ci, nous avons d'abord observé une inflammation, autant systémique que locale, ainsi qu'un remodelage vasculaire se traduisant par une augmentation de l'épaisseur intima-média. Toutes ces altérations sont abolies chez les souris *HIF1α*^{+/-} ou traitées avec du bosentan. Au niveau cardiaque, nous avons constaté une hypertension pulmonaire associée à une hypertrophie ventriculaire droite après seulement 2 semaines d'exposition à l'HI. En ce qui concerne le ventricule gauche, nous n'avons pas observé de modifications morphologiques, en revanche nous avons pu remarquer une augmentation de la contractilité. De plus, les souris partiellement invalidées ne présentent plus ces perturbations cardiaques. Ces résultats suggèrent donc une forte implication du facteur de transcription HIF-1 et de l'endothéline dans le remodelage vasculaire et cardiaque induit par l'HI. Cette conclusion est résumée dans la Figure 27 qui prend également en compte le rôle du stress oxydant, comme décrit dans la revue présentée à la fin de la discussion.

Cette figure montre bien l'intérêt thérapeutique de cibler l'axe HIF-1/endothéline chez le patient apnéique en complément ou remplacement de la PPC. En effet, une démarche pharmacologique visant à réduire l'activité de HIF-1 et/ou du système endothéline représente une approche spécifique vis-à-vis des mécanismes induits par les apnées. Ceci peut permettre d'intervenir en amont du développement des altérations cardiovasculaires et s'avérer plus efficace que les traitements actuellement proposés aux patients.

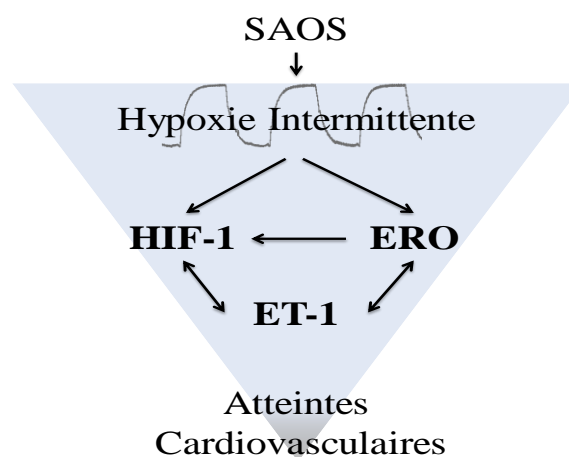


Figure 27. Figure résumant les conséquences de l'hypoxie intermittente (HI) induite par le SAOS sur les atteintes cardiovasculaires. On observe ainsi l'activation de HIF-1 par l'HI elle-même mais aussi par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) produites par l'HI. HIF-1 et les ERO activent le système endothéline qui, par un mécanisme de rétrocontrôle, potentialise les effets de l'HI. Ce système de feed-back positif contribue à accélérer le développement des atteintes cardiovasculaires.

BIBLIOGRAPHIE

- Adluri, R. S., M. Thirunavukkarasu, N. R. Dunna, L. Zhan, B. Oriowo, K. Takeda, J. A. Sanchez, H. Otani, G. Maulik, G. H. Fong and N. Maulik (2011). "Disruption of hypoxia-inducible transcription factor-prolyl hydroxylase domain-1 (PHD-1^{-/-}) attenuates ex vivo myocardial ischemia/reperfusion injury through hypoxia-inducible factor-1 α transcription factor and its target genes in mice." *Antioxid Redox Signal* **15**(7): 1789-97.
- Agapitov, A. V. and W. G. Haynes (2002). "Role of endothelin in cardiovascular disease." *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* **3**(1): 1-15.
- Agarwal, V., N. Hans and F. H. Messerli (2013). "Effect of allopurinol on blood pressure: a systematic review and meta-analysis." *J Clin Hypertens (Greenwich)* **15**(6): 435-42.
- Akinnusi, M. E., R. Laporta and A. A. El-Solh (2011). "Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 modulates endothelial apoptosis in obstructive sleep apnea." *Chest* **140**(6): 1503-10.
- Allahdadi, K. J., T. W. Cherng, H. Pai, A. Q. Silva, B. R. Walker, L. D. Nelin and N. L. Kanagy (2008). "Endothelin type A receptor antagonist normalizes blood pressure in rats exposed to eucapnic intermittent hypoxia." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**(1): H434-40.
- Allahdadi, K. J., B. R. Walker and N. L. Kanagy (2005). "Augmented endothelin vasoconstriction in intermittent hypoxia-induced hypertension." *Hypertension* **45**(4): 705-9.
- Allahdadi, K. J., B. R. Walker and N. L. Kanagy (2007). "ROK contribution to endothelin-mediated contraction in aorta and mesenteric arteries following intermittent hypoxia/hypercapnia in rats." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**(5): H2911-8.
- Alonso-Fernandez, A., F. Garcia-Rio, M. A. Arias, A. Hernanz, M. de la Pena, J. Pierola, A. Barcelo, E. Lopez-Collazo and A. Agusti (2009). "Effects of CPAP on oxidative stress and nitrate efficiency in sleep apnoea: a randomised trial." *Thorax* **64**(7): 581-6.
- Amiri, F., P. Paradis, T. L. Reudelhuber and E. L. Schiffrin (2008). "Vascular inflammation in absence of blood pressure elevation in transgenic murine model overexpressing endothelin-1 in endothelial cells." *J Hypertens* **26**(6): 1102-9.
- Anand, I., J. McMurray, J. N. Cohn, M. A. Konstam, T. Notter, K. Quitzau, F. Ruschitzka and T. F. Luscher (2004). "Long-term effects of darusentan on left-ventricular remodelling and clinical outcomes in the EndothelinA Receptor Antagonist Trial in Heart Failure (EARTH): randomised, double-blind, placebo-controlled trial." *Lancet* **364**(9431): 347-54.
- Appelhoff, R. J., Y. M. Tian, R. R. Raval, H. Turley, A. L. Harris, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe and J. M. Gleadle (2004). "Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor." *J Biol Chem* **279**(37): 38458-65.
- Arnaud, C., P. C. Beguin, S. Lantuejoul, J. L. Pepin, C. Guillermet, G. Pelli, F. Burger, V. Buatois, C. Ribuot, J. P. Baguet, F. Mach, P. Levy and M. Dematteis (2011). "The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition." *Am J Respir Crit Care Med* **184**(6): 724-31.
- Arnaud, C., M. Dematteis, J. L. Pepin, J. P. Baguet and P. Levy (2009). "Obstructive sleep apnea, immuno-inflammation, and atherosclerosis." *Semin Immunopathol* **31**(1): 113-25.
- Arnaud, C., L. Poulain, P. Levy and M. Dematteis (2011). "Inflammation contributes to the atherogenic role of intermittent hypoxia in apolipoprotein-E knock out mice." *Atherosclerosis* **219**(2): 425-31.
- Aro, E., R. Khatri, R. Gerard-O'Riley, L. Mangiavini, J. Myllyharju and E. Schipani (2012). "Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) but not HIF-2 is essential for hypoxic induction of collagen prolyl 4-hydroxylases in primary newborn mouse epiphyseal growth plate chondrocytes." *J Biol Chem* **287**(44): 37134-44.
- Arzt, M., T. Young, L. Finn, J. B. Skatrud and T. D. Bradley (2005). "Association of sleep-disordered breathing and the occurrence of stroke." *Am J Respir Crit Care Med* **172**(11): 1447-51.
- Aslan, K., A. Deniz, M. Cayli, H. Bozdemir, Y. Sarica and G. Seydaoglu (2013). "Early left ventricular functional alterations in patients with obstructive sleep apnea syndrome." *Cardiol J* **20**(5): 519-25.

- Badran, M., N. Ayas and I. Laher (2014). "Cardiovascular Complications of Sleep Apnea: Role of Oxidative Stress." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2014**: 10.
- Baguet, J. P., G. Barone-Rochette, P. Levy, E. Vautrin, H. Pierre, O. Ormezzano and J. L. Pepin (2010). "Left ventricular diastolic dysfunction is linked to severity of obstructive sleep apnoea." *Eur Respir J* **36**(6): 1323-9.
- Baguet, J. P., G. Barone-Rochette, R. Tamisier, P. Levy and J. L. Pepin (2012). "Mechanisms of cardiac dysfunction in obstructive sleep apnea." *Nat Rev Cardiol* **9**(12): 679-88.
- Baguet, J. P., L. Hammer, P. Levy, H. Pierre, S. Launois, J. M. Mallion and J. L. Pepin (2005). "The severity of oxygen desaturation is predictive of carotid wall thickening and plaque occurrence." *Chest* **128**(5): 3407-12.
- Baguet, J. P., L. Hammer, P. Levy, H. Pierre, E. Rossini, S. Mouret, O. Ormezzano, J. M. Mallion and J. L. Pepin (2005). "Night-time and diastolic hypertension are common and underestimated conditions in newly diagnosed apnoeic patients." *J Hypertens* **23**(3): 521-7.
- Barbe, F., L. R. Mayoralas, J. Duran, J. F. Masa, A. Maimo, J. M. Montserrat, C. Monasterio, M. Bosch, A. Ladaría, M. Rubio, R. Rubio, M. Medinas, L. Hernandez, S. Vidal, N. J. Douglas and A. G. Agusti (2001). "Treatment with continuous positive airway pressure is not effective in patients with sleep apnea but no daytime sleepiness. a randomized, controlled trial." *Ann Intern Med* **134**(11): 1015-23.
- Barcelo, A., F. Barbe, M. de la Pena, M. Vila, G. Perez, J. Pierola, J. Duran and A. G. Agusti (2006). "Antioxidant status in patients with sleep apnoea and impact of continuous positive airway pressure treatment." *Eur Respir J* **27**(4): 756-60.
- Barcelo, A., C. Miralles, F. Barbe, M. Vila, S. Pons and A. G. Agusti (2000). "Abnormal lipid peroxidation in patients with sleep apnoea." *Eur Respir J* **16**(4): 644-7.
- Bauersachs, J. and J. D. Widder (2008). "Endothelial dysfunction in heart failure." *Pharmacol Rep* **60**(1): 119-26.
- Bekeredjian, R., C. B. Walton, K. A. MacCannell, J. Ecker, F. Kruse, J. T. Outten, D. Sutcliffe, R. D. Gerard, R. K. Bruick and R. V. Shohet (2010). "Conditional HIF-1 α expression produces a reversible cardiomyopathy." *PLoS One* **5**(7): e11693.
- Belaidi, E., P. C. Beguin, P. Levy, C. Ribuot and D. Godin-Ribuot (2008). "Prevention of HIF-1 activation and iNOS gene targeting by low-dose cadmium results in loss of myocardial hypoxic preconditioning in the rat." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**(2): H901-8.
- Belaidi, E. and D. Godin-Ribuot (2010). "[The endothelin system: its involvement in the cardiovascular system]." *Rev Med Interne* **31**(11): 792-4.
- Belaidi, E., M. Joyeux-Faure, C. Ribuot, S. H. Launois, P. Levy and D. Godin-Ribuot (2009). "Major role for hypoxia inducible factor-1 and the endothelin system in promoting myocardial infarction and hypertension in an animal model of obstructive sleep apnea." *J Am Coll Cardiol* **53**(15): 1309-17.
- Belch, J. J., A. B. Bridges, N. Scott and M. Chopra (1991). "Oxygen free radicals and congestive heart failure." *Br Heart J* **65**(5): 245-8.
- Bergler-Klein, J., R. Pacher, R. Berger, A. Bojic and B. Stanek (2004). "Neurohumoral and hemodynamic effects of the selective endothelin antagonist darusentan in advanced chronic heart failure." *J Heart Lung Transplant* **23**(1): 20-7.
- Berman, E. J., R. J. DiBenedetto, D. E. Causey, T. Mims, M. Conneff, L. S. Goodman and R. C. Rollings (1991). "Right ventricular hypertrophy detected by echocardiography in patients with newly diagnosed obstructive sleep apnea." *Chest* **100**(2): 347-50.
- Bernardo, B. C., K. L. Weeks, L. Pretorius and J. R. McMullen (2010). "Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies." *Pharmacol Ther* **128**(1): 191-227.
- Biltagi, M. A., M. A. Maguid, M. A. Ghafar and E. Farid (2008). "Correlation of 8-isoprostane, interleukin-6 and cardiac functions with clinical score in childhood obstructive sleep apnoea." *Acta Paediatr* **97**(10): 1397-405.

- Bitto, A., G. De Caridi, F. Polito, M. Calo, N. Irrera, D. Altavilla, F. Spinelli and F. Squadrito (2010). "Evidence for markers of hypoxia and apoptosis in explanted human carotid atherosclerotic plaques." *J Vasc Surg* **52**(4): 1015-21.
- Bixler, E. O., A. N. Vgontzas, H. M. Lin, T. Ten Have, J. Rein, A. Vela-Bueno and A. Kales (2001). "Prevalence of sleep-disordered breathing in women: effects of gender." *Am J Respir Crit Care Med* **163**(3 Pt 1): 608-13.
- Bixler, E. O., A. N. Vgontzas, T. Ten Have, K. Tyson and A. Kales (1998). "Effects of age on sleep apnea in men: I. Prevalence and severity." *Am J Respir Crit Care Med* **157**(1): 144-8.
- Black, H. R., G. L. Bakris, M. A. Weber, R. Weiss, M. E. Shahawy, R. Marple, G. Tannoury, S. Linas, B. L. Wiens, J. V. Linseman, R. Roden and M. J. Gerber (2007). "Efficacy and safety of darusentan in patients with resistant hypertension: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled dose-ranging study." *J Clin Hypertens (Greenwich)* **9**(10): 760-9.
- Blinderman, C. D., P. Homel, J. A. Billings, R. K. Portenoy and S. L. Tennstedt (2008). "Symptom distress and quality of life in patients with advanced congestive heart failure." *J Pain Symptom Manage* **35**(6): 594-603.
- Bochkov, V. N. (2007). "Inflammatory profile of oxidized phospholipids." *Thromb Haemost* **97**(3): 348-54.
- Bogoyevitch, M. A., P. E. Glennon, M. B. Andersson, A. Clerk, A. Lazou, C. J. Marshall, P. J. Parker and P. H. Sugden (1994). "Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes. The potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy." *J Biol Chem* **269**(2): 1110-9.
- Bogoyevitch, M. A., P. E. Glennon and P. H. Sugden (1993). "Endothelin-1, phorbol esters and phenylephrine stimulate MAP kinase activities in ventricular cardiomyocytes." *FEBS Lett* **317**(3): 271-5.
- Bohm, F., G. Ahlborg, B. L. Johansson, L. O. Hansson and J. Pernow (2002). "Combined endothelin receptor blockade evokes enhanced vasodilatation in patients with atherosclerosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**(4): 674-9.
- Boring, L., J. Gosling, M. Cleary and I. F. Charo (1998). "Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis." *Nature* **394**(6696): 894-7.
- Boulanger, C. M., F. C. Tanner, M. L. Bea, A. W. Hahn, A. Werner and T. F. Luscher (1992). "Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium." *Circ Res* **70**(6): 1191-7.
- Bradley, T. D. and J. S. Floras (2003). "Sleep apnea and heart failure: Part I: obstructive sleep apnea." *Circulation* **107**(12): 1671-8.
- Brilla, C. G., B. Maisch and K. T. Weber (1992). "Myocardial collagen matrix remodelling in arterial hypertension." *Eur Heart J* **13 Suppl D**: 24-32.
- Brooks, D., R. L. Horner, R. J. Kimoff, L. F. Kozar, C. L. Render-Teixeira and E. A. Phillipson (1997). "Effect of obstructive sleep apnea versus sleep fragmentation on responses to airway occlusion." *Am J Respir Crit Care Med* **155**(5): 1609-17.
- Brooks, D., R. L. Horner, L. F. Kozar, C. L. Render-Teixeira and E. A. Phillipson (1997). "Obstructive sleep apnea as a cause of systemic hypertension. Evidence from a canine model." *J Clin Invest* **99**(1): 106-9.
- Bruick, R. K. and S. L. McKnight (2001). "A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF." *Science* **294**(5545): 1337-40.
- Brunelle, J. K., E. L. Bell, N. M. Quesada, K. Vercauteren, V. Tiranti, M. Zeviani, R. C. Scarpulla and N. S. Chandel (2005). "Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation." *Cell Metab* **1**(6): 409-14.
- Buchner, S., A. Satz, K. Debl, A. Hetzenecker, A. Luchner, O. Husser, O. W. Hamer, F. Poschenrieder, C. Fellner, F. Zeman, G. A. Riegger, M. Pfeifer and M. Arzt (2014). "Impact of sleep-disordered breathing on myocardial salvage and infarct size in patients with acute myocardial infarction." *Eur Heart J* **35**(3): 192-9.

- Budhiraja, R., S. Parthasarathy and S. F. Quan (2007). "Endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea." *J Clin Sleep Med* **3**(4): 409-15.
- Butt, M., G. Dwivedi, A. Shantsila, O. A. Khair and G. Y. Lip (2012). "Left ventricular systolic and diastolic function in obstructive sleep apnea: impact of continuous positive airway pressure therapy." *Circ Heart Fail* **5**(2): 226-33.
- Cai, Z., H. Zhong, M. Bosch-Marce, K. Fox-Talbot, L. Wang, C. Wei, M. A. Trush and G. L. Semenza (2008). "Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 alpha." *Cardiovasc Res* **77**(3): 463-70.
- Capone, C., G. Faraco, C. Coleman, C. N. Young, V. M. Pickel, J. Anrather, R. L. Davisson and C. Iadecola (2012). "Endothelin 1-dependent neurovascular dysfunction in chronic intermittent hypoxia." *Hypertension* **60**(1): 106-13.
- Carmeliet, P. (2000). "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis." *Nat Med* **6**(4): 389-95.
- Carpagnano, G. E., S. A. Kharitonov, O. Resta, M. P. Foschino-Barbaro, E. Gramiccioni and P. J. Barnes (2003). "8-Isoprostane, a marker of oxidative stress, is increased in exhaled breath condensate of patients with obstructive sleep apnea after night and is reduced by continuous positive airway pressure therapy." *Chest* **124**(4): 1386-92.
- Cha, S. T., P. S. Chen, G. Johansson, C. Y. Chu, M. Y. Wang, Y. M. Jeng, S. L. Yu, J. S. Chen, K. J. Chang, S. H. Jee, C. T. Tan, M. T. Lin and M. L. Kuo (2010). "MicroRNA-519c suppresses hypoxia-inducible factor-1alpha expression and tumor angiogenesis." *Cancer Res* **70**(7): 2675-85.
- Chami, H. A., R. B. Devereux, J. S. Gottdiener, R. Mehra, M. J. Roman, E. J. Benjamin and D. J. Gottlieb (2008). "Left ventricular morphology and systolic function in sleep-disordered breathing: the Sleep Heart Health Study." *Circulation* **117**(20): 2599-607.
- Chan, D. A., P. D. Sutphin, S. E. Yen and A. J. Giaccia (2005). "Coordinate regulation of the oxygen-dependent degradation domains of hypoxia-inducible factor 1 alpha." *Mol Cell Biol* **25**(15): 6415-26.
- Channick, R. N., G. Simonneau, O. Sitbon, I. M. Robbins, A. Frost, V. F. Tapson, D. B. Badesch, S. Roux, M. Rainisio, F. Bodin and L. J. Rubin (2001). "Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study." *Lancet* **358**(9288): 1119-23.
- Chen, J., L. He, B. Dinger and S. Fidone (2000). "Cellular mechanisms involved in rabbit carotid body excitation elicited by endothelin peptides." *Respir Physiol* **121**(1): 13-23.
- Chen, L., E. Einbinder, Q. Zhang, J. Hasday, C. W. Balke and S. M. Scharf (2005). "Oxidative stress and left ventricular function with chronic intermittent hypoxia in rats." *Am J Respir Crit Care Med* **172**(7): 915-20.
- Chen, L., J. Zhang, T. X. Gan, Y. Chen-Izu, J. D. Hasday, M. Karmazyn, C. W. Balke and S. M. Scharf (2008). "Left ventricular dysfunction and associated cellular injury in rats exposed to chronic intermittent hypoxia." *J Appl Physiol (1985)* **104**(1): 218-23.
- Chen, L., J. Zhang, X. Hu, K. D. Philipson and S. M. Scharf (2010). "The Na⁺/Ca²⁺ exchanger-1 mediates left ventricular dysfunction in mice with chronic intermittent hypoxia." *J Appl Physiol (1985)* **109**(6): 1675-85.
- Chen, L. M., W. W. Kuo, J. J. Yang, S. G. Wang, Y. L. Yeh, F. J. Tsai, Y. J. Ho, M. H. Chang, C. Y. Huang and S. D. Lee (2007). "Eccentric cardiac hypertrophy was induced by long-term intermittent hypoxia in rats." *Exp Physiol* **92**(2): 409-16.
- Chen, Y. L., M. C. Su, W. H. Liu, C. C. Wang, M. C. Lin and M. C. Chen (2014). "Influence and predicting variables of obstructive sleep apnea on cardiac function and remodeling in patients without congestive heart failure." *J Clin Sleep Med* **10**(1): 57-64.
- Chirinos, J. A., I. Gurubhagavatula, K. Teff, D. J. Rader, T. A. Wadden, R. Townsend, G. D. Foster, G. Maislin, H. Saif, P. Broderick, J. Chittams, A. L. Hanlon and A. I. Pack (2014). "CPAP, weight loss, or both for obstructive sleep apnea." *N Engl J Med* **370**(24): 2265-75.
- Choi, H., Y. S. Chun, S. W. Kim, M. S. Kim and J. W. Park (2006). "Curcumin inhibits hypoxia-inducible factor-1 by degrading aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator: a mechanism of tumor growth inhibition." *Mol Pharmacol* **70**(5): 1664-71.

- Chua, Y. L., E. Dufour, E. P. Dassa, P. Rustin, H. T. Jacobs, C. T. Taylor and T. Hagen (2010). "Stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha protein in hypoxia occurs independently of mitochondrial reactive oxygen species production." *J Biol Chem* **285**(41): 31277-84.
- Ciccone, M. M., P. Scicchitano, G. Mitacchione, A. Zito, M. Gesualdo, P. Caputo, M. F. Damiani, M. Sassara, S. Favale, O. Resta and P. Carratu (2012). "Is there a correlation between OSAS duration/severity and carotid intima-media thickness?" *Respir Med* **106**(5): 740-6.
- Ciccone, M. M., P. Scicchitano, A. Zito, F. Cortese, B. Boninfante, V. A. Falcone, V. N. Quaranta, V. A. Ventura, A. Zucano, F. Di Serio, M. F. Damiani and O. Resta (2014). "Correlation between inflammatory markers of atherosclerosis and carotid intima-media thickness in Obstructive Sleep Apnea." *Molecules* **19**(2): 1651-62.
- Clark, G. T., J. W. Sohn and C. N. Hong (2000). "Treating obstructive sleep apnea and snoring: assessment of an anterior mandibular positioning device." *J Am Dent Assoc* **131**(6): 765-71.
- Collins, R. G., R. Velji, N. V. Guevara, M. J. Hicks, L. Chan and A. L. Beaudet (2000). "P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." *J Exp Med* **191**(1): 189-94.
- Correa, M. V., M. B. Nolly, C. I. Caldiz, G. E. de Cingolani, H. E. Cingolani and I. L. Ennis (2013). "Endogenous endothelin 1 mediates angiotensin II-induced hypertrophy in electrically paced cardiac myocytes through EGFR transactivation, reactive oxygen species and NHE-1." *Pflugers Arch*.
- Cramer, T., Y. Yamanishi, B. E. Clausen, I. Forster, R. Pawlinski, N. Mackman, V. H. Haase, R. Jaenisch, M. Corr, V. Nizet, G. S. Firestein, H. P. Gerber, N. Ferrara and R. S. Johnson (2003). "HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation." *Cell* **112**(5): 645-57.
- Cunningham, M. E., M. Huribal, R. J. Bala and M. A. McMillen (1997). "Endothelin-1 and endothelin-4 stimulate monocyte production of cytokines." *Crit Care Med* **25**(6): 958-64.
- Cushing, S. D., J. A. Berliner, A. J. Valente, M. C. Territo, M. Navab, F. Parhami, R. Gerrity, C. J. Schwartz and A. M. Fogelman (1990). "Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(13): 5134-8.
- Cyrus, T., J. L. Witztum, D. J. Rader, R. Tangirala, S. Fazio, M. F. Linton and C. D. Funk (1999). "Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice." *J Clin Invest* **103**(11): 1597-604.
- D'Angelo, D. D., Y. Sakata, J. N. Lorenz, G. P. Boivin, R. A. Walsh, S. B. Liggett and G. W. Dorn, 2nd (1997). "Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(15): 8121-6.
- Dai, G., M. R. Kaazempur-Mofrad, S. Natarajan, Y. Zhang, S. Vaughn, B. R. Blackman, R. D. Kamm, G. Garcia-Cardena and M. A. Gimbrone, Jr. (2004). "Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(41): 14871-6.
- Davies, M., F. Hobbs, R. Davis, J. Kenkre, A. K. Roalfe, R. Hare, D. Wosornu and R. J. Lancashire (2001). "Prevalence of left-ventricular systolic dysfunction and heart failure in the Echocardiographic Heart of England Screening study: a population based study." *Lancet* **358**(9280): 439-44.
- de Frutos, S., E. Caldwell, C. H. Nitta, N. L. Kanagy, J. Wang, W. Wang, M. K. Walker and L. V. Gonzalez Bosc (2010). "NFATc3 contributes to intermittent hypoxia-induced arterial remodeling in mice." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **299**(2): H356-63.
- De Giusti, V. C., M. V. Correa, M. C. Villa-Abrille, C. Beltrano, A. M. Yeves, G. E. de Cingolani, H. E. Cingolani and E. A. Aiello (2008). "The positive inotropic effect of endothelin-1 is mediated by mitochondrial reactive oxygen species." *Life Sci* **83**(7-8): 264-71.
- de Jong, J. W., R. G. Schoemaker, R. de Jonge, P. Bernocchi, E. Keijzer, R. Harrison, H. S. Sharma and C. Ceconi (2000). "Enhanced expression and activity of xanthine oxidoreductase in the failing heart." *J Mol Cell Cardiol* **32**(11): 2083-9.

- Del Ben, M., M. Fabiani, L. Loffredo, L. Polimeni, R. Carnevale, F. Baratta, M. Brunori, F. Albanese, T. Augelletti, F. Violi and F. Angelico (2012). "Oxidative stress mediated arterial dysfunction in patients with obstructive sleep apnoea and the effect of continuous positive airway pressure treatment." *BMC Pulm Med* **12**: 36.
- Dematteis, M., D. Godin-Ribuot, C. Arnaud, C. Ribuot, F. Stanke-Labesque, J. L. Pepin and P. Levy (2009). "Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding the human disease." *ILAR J* **50**(3): 262-81.
- Dematteis, M., C. Julien, C. Guillermet, N. Sturm, S. Lantuejoul, M. Mallaret, P. Levy and E. Gozal (2008). "Intermittent hypoxia induces early functional cardiovascular remodeling in mice." *Am J Respir Crit Care Med* **177**(2): 227-35.
- Dematteis, M., C. Julien, C. Guillermet, N. Sturm, S. Lantuejoul, M. Mallaret, P. Lévy and E. Gozal (2008). "Intermittent Hypoxia Induces Early Functional Cardiovascular Remodeling in Mice." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **177**(2): 227-235.
- Dong, J. Y., Y. H. Zhang and L. Q. Qin (2013). "Obstructive sleep apnea and cardiovascular risk: meta-analysis of prospective cohort studies." *Atherosclerosis* **229**(2): 489-95.
- Dopp, J. M., N. R. Philippi, N. J. Marcus, E. B. Olson, C. E. Bird, J. J. Moran, S. W. Mueller and B. J. Morgan (2011). "Xanthine oxidase inhibition attenuates endothelial dysfunction caused by chronic intermittent hypoxia in rats." *Respiration* **82**(5): 458-67.
- Douglas, R. M., K. Bowden, J. Pattison, A. B. Peterson, J. Juliano, N. D. Dalton, Y. Gu, E. Alvarez, T. Imamura, K. L. Peterson, J. L. Witztum, G. G. Haddad and A. C. Li (2013). "Intermittent hypoxia and hypercapnia induce pulmonary artery atherosclerosis and ventricular dysfunction in low density lipoprotein receptor deficient mice." *J Appl Physiol* **115**(11): 1694-704.
- Drager, L. F., L. A. Bortolotto, A. C. Figueiredo, E. M. Krieger and G. F. Lorenzi (2007). "Effects of continuous positive airway pressure on early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea." *Am J Respir Crit Care Med* **176**(7): 706-12.
- Drager, L. F., L. A. Bortolotto, M. C. Lorenzi, A. C. Figueiredo, E. M. Krieger and G. Lorenzi-Filho (2005). "Early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea." *Am J Respir Crit Care Med* **172**(5): 613-8.
- Dursunoglu, N., D. Dursunoglu and M. Kilic (2005). "Impact of obstructive sleep apnea on right ventricular global function: sleep apnea and myocardial performance index." *Respiration* **72**(3): 278-84.
- El Solh, A. A., M. E. Akinnusi, F. H. Baddoura and C. R. Mankowski (2007). "Endothelial cell apoptosis in obstructive sleep apnea: a link to endothelial dysfunction." *Am J Respir Crit Care Med* **175**(11): 1186-91.
- El Solh, A. A., R. Saliba, T. Bosinski, B. J. Grant, E. Berbarry and N. Miller (2006). "Allopurinol improves endothelial function in sleep apnoea: a randomised controlled study." *Eur Respir J* **27**(5): 997-1002.
- Eltzschig, H. K. and P. Carmeliet (2011). "Hypoxia and inflammation." *N Engl J Med* **364**(7): 656-65.
- Eriksson, E. E., X. Xie, J. Werr, P. Thoren and L. Lindbom (2001). "Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo." *J Exp Med* **194**(2): 205-18.
- Fagan, K. A. (2001). "Selected Contribution: Pulmonary hypertension in mice following intermittent hypoxia." *J Appl Physiol (1985)* **90**(6): 2502-7.
- Fan, Y. F., R. Zhang, X. Jiang, L. Wen, D. C. Wu, D. Liu, P. Yuan, Y. L. Wang and Z. C. Jing (2013). "The phosphodiesterase-5 inhibitor vardenafil reduces oxidative stress while reversing pulmonary arterial hypertension." *Cardiovasc Res* **99**(3): 395-403.
- Feng, J., D. Zhang and B. Chen (2012). "Endothelial mechanisms of endothelial dysfunction in patients with obstructive sleep apnea." *Sleep Breath* **16**(2): 283-94.

- Fischer, D., S. Rossa, U. Landmesser, S. Spiekermann, N. Engberding, B. Hornig and H. Drexler (2005). "Endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure is independently associated with increased incidence of hospitalization, cardiac transplantation, or death." *Eur Heart J* **26**(1): 65-9.
- Fletcher, E. C., R. D. DeBehnke, M. S. Lovoi and A. B. Gorin (1985). "Undiagnosed sleep apnea in patients with essential hypertension." *Ann Intern Med* **103**(2): 190-5.
- Fletcher, E. C., J. Lesske, J. Culman, C. C. Miller and T. Unger (1992). "Sympathetic denervation blocks blood pressure elevation in episodic hypoxia." *Hypertension* **20**(5): 612-9.
- Fletcher, E. C., J. Lesske, W. Qian, C. C. Miller, 3rd and T. Unger (1992). "Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats." *Hypertension* **19**(6 Pt 1): 555-61.
- Fortuno, A., G. San Jose, M. U. Moreno, J. Diez and G. Zalba (2005). "Oxidative stress and vascular remodelling." *Exp Physiol* **90**(4): 457-62.
- Fraccarollo, D., K. Hu, P. Galuppo, P. Gaudron and G. Ertl (1997). "Chronic endothelin receptor blockade attenuates progressive ventricular dilation and improves cardiac function in rats with myocardial infarction: possible involvement of myocardial endothelin system in ventricular remodeling." *Circulation* **96**(11): 3963-73.
- Friedman, J. K., C. H. Nitta, K. M. Henderson, S. J. Codianni, L. Sanchez, J. M. Ramiro-Diaz, T. A. Howard, W. Giermakowska, N. L. Kanagy and L. V. Gonzalez Bosc (2014). "Intermittent hypoxia-induced increases in reactive oxygen species activate NFATc3 increasing endothelin-1 vasoconstrictor reactivity." *Vascul Pharmacol* **60**(1): 17-24.
- Friehs, I., R. Barillas, N. V. Vasilyev, N. Roy, F. X. McGowan and P. J. del Nido (2006). "Vascular endothelial growth factor prevents apoptosis and preserves contractile function in hypertrophied infant heart." *Circulation* **114**(1 Suppl): I290-5.
- Gale, N. W. and G. D. Yancopoulos (1999). "Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development." *Genes Dev* **13**(9): 1055-66.
- Galie, N., B. H. Brundage, H. A. Ghofrani, R. J. Oudiz, G. Simonneau, Z. Safdar, S. Shapiro, R. J. White, M. Chan, A. Beardsworth, L. Frumkin and R. J. Barst (2009). "Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension." *Circulation* **119**(22): 2894-903.
- Galie, N., H. A. Ghofrani, A. Torbicki, R. J. Barst, L. J. Rubin, D. Badesch, T. Fleming, T. Parpia, G. Burgess, A. Branzi, F. Grimminger, M. Kurzyna and G. Simonneau (2005). "Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension." *N Engl J Med* **353**(20): 2148-57.
- Galie, N., L. Rubin, M. Hoeper, P. Jansa, H. Al-Hiti, G. Meyer, E. Chiossi, A. Kusic-Pajic and G. Simonneau (2008). "Treatment of patients with mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension with bosentan (EARLY study): a double-blind, randomised controlled trial." *Lancet* **371**(9630): 2093-100.
- Gami, A. S., E. J. Olson, W. K. Shen, R. S. Wright, K. V. Ballman, D. O. Hodge, R. M. Herges, D. E. Howard and V. K. Somers (2013). "Obstructive sleep apnea and the risk of sudden cardiac death: a longitudinal study of 10,701 adults." *J Am Coll Cardiol* **62**(7): 610-6.
- Gawaz, M., F. J. Neumann, T. Dickfeld, W. Koch, K. L. Laugwitz, H. Adelsberger, K. Langenbrink, S. Page, D. Neumeier, A. Schomig and K. Brand (1998). "Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells." *Circulation* **98**(12): 1164-71.
- Geng, Y. J., Y. Ishikawa, D. E. Vatner, T. E. Wagner, S. P. Bishop, S. F. Vatner and C. J. Homcy (1999). "Apoptosis of cardiac myocytes in Galpha transgenic mice." *Circ Res* **84**(1): 34-42.
- Gimbrone, M. A., Jr. (1999). "Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis." *Am J Pathol* **155**(1): 1-5.
- Gjorup, P. H., L. Sadauskienė, J. Wessels, O. Nyvad, B. Strunge and E. B. Pedersen (2007). "Abnormally increased endothelin-1 in plasma during the night in obstructive sleep apnea: relation to blood pressure and severity of disease." *Am J Hypertens* **20**(1): 44-52.

- Goddard, J., C. Eckhart, N. R. Johnston, A. D. Cumming, A. J. Rankin and D. J. Webb (2004). "Endothelin A receptor antagonism and angiotensin-converting enzyme inhibition are synergistic via an endothelin B receptor-mediated and nitric oxide-dependent mechanism." *J Am Soc Nephrol* **15**(10): 2601-10.
- Gonzalez-Martin, M. C., V. Vega-Agapito, J. Prieto-Lloret, M. T. Agapito, J. Castaneda and C. Gonzalez (2009). "Effects of intermittent hypoxia on blood gases plasma catecholamine and blood pressure." *Adv Exp Med Biol* **648**: 319-28.
- Gottlieb, D. J., G. Yenokyan, A. B. Newman, G. T. O'Connor, N. M. Punjabi, S. F. Quan, S. Redline, H. E. Resnick, E. K. Tong, M. Diener-West and E. Shahar (2010). "Prospective study of obstructive sleep apnea and incident coronary heart disease and heart failure: the sleep heart health study." *Circulation* **122**(4): 352-60.
- Grainger, D. J., P. R. Kemp, A. C. Liu, R. M. Lawn and J. C. Metcalfe (1994). "Activation of transforming growth factor-beta is inhibited in transgenic apolipoprotein(a) mice." *Nature* **370**(6489): 460-2.
- Grebe, M., H. J. Eisele, N. Weissmann, C. Schaefer, H. Tillmanns, W. Seeger and R. Schulz (2006). "Antioxidant vitamin C improves endothelial function in obstructive sleep apnea." *Am J Respir Crit Care Med* **173**(8): 897-901.
- Greenberger, L. M., I. D. Horak, D. Filipula, P. Sapra, M. Westergaard, H. F. Frydenlund, C. Albaek, H. Schroder and H. Orum (2008). "A RNA antagonist of hypoxia-inducible factor-1alpha, EZN-2968, inhibits tumor cell growth." *Mol Cancer Ther* **7**(11): 3598-608.
- Griendling, K. K., C. A. Minieri, J. D. Ollerenshaw and R. W. Alexander (1994). "Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells." *Circ Res* **74**(6): 1141-8.
- Gu, L., Y. Okada, S. K. Clinton, C. Gerard, G. K. Sukhova, P. Libby and B. J. Rollins (1998). "Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice." *Mol Cell* **2**(2): 275-81.
- Guidry, U. C., L. A. Mendes, J. C. Evans, D. Levy, G. T. O'Connor, M. G. Larson, D. J. Gottlieb and E. J. Benjamin (2001). "Echocardiographic features of the right heart in sleep-disordered breathing: the Framingham Heart Study." *Am J Respir Crit Care Med* **164**(6): 933-8.
- Haentjens, P., A. Van Meerhaeghe, A. Moscariello, S. De Weerd, K. Poppe, A. Dupont and B. Velkeniers (2007). "The impact of continuous positive airway pressure on blood pressure in patients with obstructive sleep apnea syndrome: evidence from a meta-analysis of placebo-controlled randomized trials." *Arch Intern Med* **167**(8): 757-64.
- Han, Q., S. C. Yeung, M. S. Ip and J. C. Mak (2013). "Intermittent hypoxia-induced NF-kappaB and HO-1 regulation in human endothelial EA.hy926 cells." *Cell Biochem Biophys* **66**(3): 431-41.
- Handoko, M. L., F. S. de Man and A. Vonk-Noordegraaf (2011). "The rise and fall of endothelin receptor antagonists in congestive heart failure." *Eur Respir J* **37**(3): 484-5.
- Hansson, G. K. (2005). "Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease." *N Engl J Med* **352**(16): 1685-95.
- Hansson, G. K., A. K. Robertson and C. Soderberg-Naucler (2006). "Inflammation and atherosclerosis." *Annu Rev Pathol* **1**: 297-329.
- Harrison, D. G., J. Widder, I. Grumbach, W. Chen, M. Weber and C. Searles (2006). "Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation." *J Intern Med* **259**(4): 351-63.
- Harrison, M. R., N. M. Hahn, R. Pili, W. K. Oh, H. Hammers, C. Sweeney, K. Kim, S. Perlman, J. Arnott, C. Sidor, G. Wilding and G. Liu (2011). "A phase II study of 2-methoxyestradiol (2ME2) NanoCrystal(R) dispersion (NCD) in patients with taxane-refractory, metastatic castrate-resistant prostate cancer (CRPC)." *Invest New Drugs* **29**(6): 1465-74.
- Hayashi, T., C. Yamashita, C. Matsumoto, C. J. Kwak, K. Fujii, T. Hirata, M. Miyamura, T. Mori, A. Ukimura, Y. Okada, Y. Matsumura and Y. Kitaura (2008). "Role of gp91phox-containing NADPH oxidase in left ventricular remodeling induced by intermittent hypoxic stress." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**(5): H2197-203.

- Herbst, U., M. Toborek, S. Kaiser, M. P. Mattson and B. Hennig (1999). "4-Hydroxynonenal induces dysfunction and apoptosis of cultured endothelial cells." *J Cell Physiol* **181**(2): 295-303.
- Herrscher, T. E., H. Akre, B. Overland, L. Sandvik and A. S. Westheim (2011). "High prevalence of sleep apnea in heart failure outpatients: even in patients with preserved systolic function." *J Card Fail* **17**(5): 420-5.
- Higashida, T., H. Kanno, M. Nakano, K. Funakoshi and I. Yamamoto (2008). "Expression of hypoxia-inducible angiogenic proteins (hypoxia-inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor, and E26 transformation-specific-1) and plaque hemorrhage in human carotid atherosclerosis." *J Neurosurg* **109**(1): 83-91.
- Hohmann, H. P., R. Remy, B. Poschl and A. P. van Loon (1990). "Tumor necrosis factors- α and - β bind to the same two types of tumor necrosis factor receptors and maximally activate the transcription factor NF- κ B at low receptor occupancy and within minutes after receptor binding." *J Biol Chem* **265**(25): 15183-8.
- Holscher, M., K. Schafer, S. Krull, K. Farhat, A. Hesse, M. Silter, Y. Lin, B. J. Pichler, P. Thistlethwaite, A. El-Armouche, L. S. Maier, D. M. Katschinski and A. Ziesenis (2012). "Unfavourable consequences of chronic cardiac HIF-1 α stabilization." *Cardiovasc Res* **94**(1): 77-86.
- Holscher, M., M. Silter, S. Krull, M. von Ahlen, A. Hesse, P. Schwartz, B. Wielockx, G. Breier, D. M. Katschinski and A. Ziesenis (2011). "Cardiomyocyte-specific prolyl-4-hydroxylase domain 2 knock out protects from acute myocardial ischemic injury." *J Biol Chem* **286**(13): 11185-94.
- Hoshijima, M. (2006). "Mechanical stress-strain sensors embedded in cardiac cytoskeleton: Z disk, titin, and associated structures." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**(4): H1313-25.
- Hossain, C. F., Y. P. Kim, S. R. Baerson, L. Zhang, R. K. Bruick, K. A. Mohammed, A. K. Agarwal, D. G. Nagle and Y. D. Zhou (2005). "Saururus cernuus lignans--potent small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor-1." *Biochem Biophys Res Commun* **333**(3): 1026-33.
- Hung, M. W., G. M. Kravtsov, C. F. Lau, A. M. Poon, G. L. Tipoe and M. L. Fung (2013). "Melatonin ameliorates endothelial dysfunction, vascular inflammation, and systemic hypertension in rats with chronic intermittent hypoxia." *J Pineal Res* **55**(3): 247-56.
- Iemitsu, M., T. Miyauchi, S. Maeda, S. Sakai, T. Kobayashi, N. Fujii, H. Miyazaki, M. Matsuda and I. Yamaguchi (2001). "Physiological and pathological cardiac hypertrophy induce different molecular phenotypes in the rat." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **281**(6): R2029-36.
- Ihling, C., T. Szombathy, B. Bohrmann, M. Brockhaus, H. E. Schaefer and B. M. Loeffler (2001). "Coexpression of endothelin-converting enzyme-1 and endothelin-1 in different stages of human atherosclerosis." *Circulation* **104**(8): 864-9.
- Inamoto, S., T. Yoshioka, C. Yamashita, M. Miyamura, T. Mori, A. Ukimura, C. Matsumoto, Y. Matsumura, Y. Kitaura and T. Hayashi (2010). "Pitavastatin reduces oxidative stress and attenuates intermittent hypoxia-induced left ventricular remodeling in lean mice." *Hypertens Res* **33**(6): 579-86.
- Ip, M. S., B. Lam, L. Y. Chan, L. Zheng, K. W. Tsang, P. C. Fung and W. K. Lam (2000). "Circulating nitric oxide is suppressed in obstructive sleep apnea and is reversed by nasal continuous positive airway pressure." *Am J Respir Crit Care Med* **162**(6): 2166-71.
- Ip, M. S., H. F. Tse, B. Lam, K. W. Tsang and W. K. Lam (2004). "Endothelial function in obstructive sleep apnea and response to treatment." *Am J Respir Crit Care Med* **169**(3): 348-53.
- Ishibashi, S., T. Inaba, H. Shimano, K. Harada, I. Inoue, H. Mokuno, N. Mori, T. Gotoda, F. Takaku and N. Yamada (1990). "Monocyte colony-stimulating factor enhances uptake and degradation of acetylated low density lipoproteins and cholesterol esterification in human monocyte-derived macrophages." *J Biol Chem* **265**(24): 14109-17.
- Ito, H., Y. Hirata, S. Adachi, M. Tanaka, M. Tsujino, A. Koike, A. Nogami, F. Murumo and M. Hiroe (1993). "Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes." *J Clin Invest* **92**(1): 398-403.
- Ito, K., X. Yan, X. Feng, W. J. Manning, W. H. Dillmann and B. H. Lorell (2001). "Transgenic expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+) atpase modifies the transition from hypertrophy to early heart failure." *Circ Res* **89**(5): 422-9.

- Iwasa, S., J. Fan, T. Shimokama, M. Nagata and T. Watanabe (1999). "Increased immunoreactivity of endothelin-1 and endothelin B receptor in human atherosclerotic lesions. A possible role in atherogenesis." *Atherosclerosis* **146**(1): 93-100.
- Izumiya, Y., I. Shiojima, K. Sato, D. B. Sawyer, W. S. Colucci and K. Walsh (2006). "Vascular endothelial growth factor blockade promotes the transition from compensatory cardiac hypertrophy to failure in response to pressure overload." *Hypertension* **47**(5): 887-93.
- Jankowska, E. A., G. S. Filippatos, S. von Haehling, J. Papassotiriou, N. G. Morgenthaler, M. Ciccoira, J. C. Schefold, P. Rozentryt, B. Ponikowska, W. Doehner, W. Banasiak, O. Hartmann, J. Struck, A. Bergmann, S. D. Anker and P. Ponikowski (2011). "Identification of chronic heart failure patients with a high 12-month mortality risk using biomarkers including plasma C-terminal pro-endothelin-1." *PLoS One* **6**(1): e14506.
- Javadov, S., V. Rajapurohitam, A. Kilic, A. Zeidan, A. Choi and M. Karmazyn (2009). "Anti-hypertrophic effect of NHE-1 inhibition involves GSK-3beta-dependent attenuation of mitochondrial dysfunction." *J Mol Cell Cardiol* **46**(6): 998-1007.
- Javaheri, S. and A. Javaheri (2013). "Sleep apnea, heart failure, and pulmonary hypertension." *Curr Heart Fail Rep* **10**(4): 315-20.
- Javaheri, S., S. Javaheri and A. Javaheri (2013). "Sleep apnea, heart failure, and pulmonary hypertension." *Curr Heart Fail Rep* **10**(4): 315-20.
- Javaheri, S., T. J. Parker, J. D. Liming, W. S. Corbett, H. Nishiyama, L. Wexler and G. A. Roselle (1998). "Sleep apnea in 81 ambulatory male patients with stable heart failure. Types and their prevalences, consequences, and presentations." *Circulation* **97**(21): 2154-9.
- Jelic, S., M. Padeletti, S. M. Kawut, C. Higgins, S. M. Canfield, D. Onat, P. C. Colombo, R. C. Basner, P. Factor and T. H. LeJemtel (2008). "Inflammation, oxidative stress, and repair capacity of the vascular endothelium in obstructive sleep apnea." *Circulation* **117**(17): 2270-8.
- Jiang, G., T. Li, Y. Qiu, Y. Rui, W. Chen and Y. Lou (2007). "RNA interference for HIF-1alpha inhibits foam cells formation in vitro." *Eur J Pharmacol* **562**(3): 183-90.
- Jordan, W., A. Reinbacher, S. Cohrs, R. W. Grunewald, G. Mayer, E. Ruther and A. Rodenbeck (2005). "Obstructive sleep apnea: Plasma endothelin-1 precursor but not endothelin-1 levels are elevated and decline with nasal continuous positive airway pressure." *Peptides* **26**(9): 1654-60.
- Joyeux-Faure, M., F. Stanke-Labesque, B. Lefebvre, P. Beguin, D. Godin-Ribuot, C. Ribuot, S. H. Launois, G. Bessard and P. Levy (2005). "Chronic intermittent hypoxia increases infarction in the isolated rat heart." *J Appl Physiol* (1985) **98**(5): 1691-6.
- Jullian-Desayes, I., M. Joyeux-Faure, R. Tamisier, S. Launois, A.-L. Borel, P. Levy and J.-L. Pepin (2014). "Impact of obstructive sleep apnea treatment by continuous positive airway pressure on cardiometabolic biomarkers: A systematic review from sham CPAP randomized controlled trials." *Sleep Med Rev*(in press).
- Jun, J., C. Reinke, D. Bedja, D. Berkowitz, S. Bevans-Fonti, J. Li, L. A. Barouch, K. Gabrielson and V. Y. Polotsky (2010). "Effect of intermittent hypoxia on atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." *Atherosclerosis* **209**(2): 381-6.
- Kaczmarek, E., J. P. Bakker, D. N. Clarke, E. Cszimadia, O. Kocher, A. Veves, F. Tecilazich, C. P. O'Donnell, C. Ferran and A. Malhotra (2013). "Molecular biomarkers of vascular dysfunction in obstructive sleep apnea." *PLoS One* **8**(7): e70559.
- Kamura, T., S. Sato, K. Iwai, M. Czyzyk-Krzaska, R. C. Conaway and J. W. Conaway (2000). "Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(19): 10430-5.
- Kanagy, N. L., B. R. Walker and L. D. Nelin (2001). "Role of endothelin in intermittent hypoxia-induced hypertension." *Hypertension* **37**(2 Pt 2): 511-5.
- Kanbay, A., N. Tutar, E. Kaya, H. Buyukoglan, N. Ozdogan, F. S. Oymak, I. Gulmez and R. Demir (2013). "Mean platelet volume in patients with obstructive sleep apnea syndrome and its relationship with cardiovascular diseases." *Blood Coagul Fibrinolysis* **24**(5): 532-6.

- Kang, M., J. W. Walker and K. Y. Chung (2012). "Endothelin receptor overexpression alters diastolic function in cultured rat ventricular myocytes." *Biomol Ther (Seoul)* **20**(4): 386-92.
- Kang, P. M., P. Yue, Z. Liu, O. Tarnavski, N. Bodyak and S. Izumo (2004). "Alterations in apoptosis regulatory factors during hypertrophy and heart failure." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**(1): H72-80.
- Kapitsinou, P. P., Q. Liu, T. L. Unger, J. Rha, O. Davidoff, B. Keith, J. A. Epstein, S. L. Moores, C. L. Erickson-Miller and V. H. Haase (2010). "Hepatic HIF-2 regulates erythropoietic responses to hypoxia in renal anemia." *Blood* **116**(16): 3039-48.
- Kapitsinou, P. P., H. Sano, M. Michael, H. Kobayashi, O. Davidoff, A. Bian, B. Yao, M. Z. Zhang, R. C. Harris, K. J. Duffy, C. L. Erickson-Miller, T. A. Sutton and V. H. Haase (2014). "Endothelial HIF-2 mediates protection and recovery from ischemic kidney injury." *J Clin Invest* **124**(6): 2396-409.
- Karch, R., F. Neumann, R. Ullrich, J. Neumuller, B. K. Podesser, M. Neumann and W. Schreiner (2005). "The spatial pattern of coronary capillaries in patients with dilated, ischemic, or inflammatory cardiomyopathy." *Cardiovasc Pathol* **14**(3): 135-44.
- Karkoulis, K., D. Lykouras, F. Sampsonas, P. Drakatos, S. Canova, G. Tsoukalas and K. Spiropoulos (2010). "The role of Endothelin-1 in obstructive sleep apnea syndrome and pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and Endothelin-1 antagonists." *Curr Med Chem* **17**(11): 1059-66.
- Katakami, N., H. Kaneto and I. Shimomura (2014). "Carotid ultrasonography: A potent tool for better clinical practice in diagnosis of atherosclerosis in diabetic patients." *J Diabetes Investig* **5**(1): 3-13.
- Kato, M., P. Roberts-Thomson, B. G. Phillips, W. G. Haynes, M. Winnicki, V. Accurso and V. K. Somers (2000). "Impairment of endothelium-dependent vasodilation of resistance vessels in patients with obstructive sleep apnea." *Circulation* **102**(21): 2607-10.
- Katz, S. D., K. Hryniewicz, I. Hriljac, K. Balidemaj, C. Dimayuga, A. Hudaihed and A. Yasskiy (2005). "Vascular endothelial dysfunction and mortality risk in patients with chronic heart failure." *Circulation* **111**(3): 310-4.
- Kaushansky, K. (2005). "The molecular mechanisms that control thrombopoiesis." *J Clin Invest* **115**(12): 3339-47.
- Kawanabe, Y., N. Hashimoto and T. Masaki (2002). "Extracellular Ca²⁺ influx and endothelin-1-induced intracellular mitogenic cascades in rabbit internal carotid artery vascular smooth muscle cells." *J Cardiovasc Pharmacol* **40**(2): 307-14.
- Kaya, M. G., Y. Y. Lam, B. Erer, S. Ayhan, M. A. Vatankulu, Z. Nurkalem, M. Meric, M. Eren and N. K. Eryol (2012). "Long-term effect of bosentan therapy on cardiac function and symptomatic benefits in adult patients with Eisenmenger syndrome." *J Card Fail* **18**(5): 379-84.
- Kemi, O. J., M. Ceci, U. Wisloff, S. Grimaldi, P. Gallo, G. L. Smith, G. Condorelli and O. Ellingsen (2008). "Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy." *J Cell Physiol* **214**(2): 316-21.
- Kiely, J. L. and W. T. McNicholas (2000). "Cardiovascular risk factors in patients with obstructive sleep apnoea syndrome." *Eur Respir J* **16**(1): 128-33.
- Kiowski, W., G. Sutsch, P. Hunziker, P. Muller, J. Kim, E. Oechslin, R. Schmitt, R. Jones and O. Bertel (1995). "Evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure." *Lancet* **346**(8977): 732-6.
- Koga, S., S. Ikeda, T. Nakata, T. Yasunaga and K. Maemura (2012). "Effects of nasal continuous positive airway pressure on left ventricular concentric hypertrophy in obstructive sleep apnea syndrome." *Intern Med* **51**(20): 2863-8.
- Kohan, D. E., N. F. Rossi, E. W. Inscho and D. M. Pollock (2011). "Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin." *Physiol Rev* **91**(1): 1-77.

- Kohler, M., L. Ayers, J. C. Pepperell, K. L. Packwood, B. Ferry, N. Crosthwaite, S. Craig, M. M. Siccoli, R. J. Davies and J. R. Stradling (2009). "Effects of continuous positive airway pressure on systemic inflammation in patients with moderate to severe obstructive sleep apnoea: a randomised controlled trial." *Thorax* **64**(1): 67-73.
- Kohler, M., S. Craig, J. C. Pepperell, D. Nicoll, D. J. Bratton, A. J. Nunn, P. Leeson and J. R. Stradling (2013). "CPAP improves endothelial function in patients with minimally symptomatic OSA: results from a subset study of the MOSAIC trial." *Chest* **144**(3): 896-902.
- Kohler, M., A. C. Stoewhas, L. Ayers, O. Senn, K. E. Bloch, E. W. Russi and J. R. Stradling (2011). "Effects of continuous positive airway pressure therapy withdrawal in patients with obstructive sleep apnea: a randomized controlled trial." *Am J Respir Crit Care Med* **184**(10): 1192-9.
- Kohler, M. and J. R. Stradling (2010). "Mechanisms of vascular damage in obstructive sleep apnea." *Nat Rev Cardiol* **7**(12): 677-85.
- Kong, D., E. J. Park, A. G. Stephen, M. Calvani, J. H. Cardellina, A. Monks, R. J. Fisher, R. H. Shoemaker and G. Melillo (2005). "Echinomycin, a small-molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity." *Cancer Res* **65**(19): 9047-55.
- Korcarz, C. E., A. D. Gepner, P. E. Peppard, T. B. Young and J. H. Stein (2010). "The effects of sleep-disordered breathing on arterial stiffness are modulated by age." *Sleep* **33**(8): 1081-5.
- Krum, H., R. J. Viskoper, Y. Lacourciere, M. Budde and V. Charlon (1998). "The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. Bosentan Hypertension Investigators." *N Engl J Med* **338**(12): 784-90.
- Lando, D., D. J. Peet, D. A. Whelan, J. J. Gorman and M. L. Whitelaw (2002). "Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch." *Science* **295**(5556): 858-61.
- Lattimore, J. L., I. Wilcox, M. Skilton, M. Langenfeld and D. S. Celermajer (2006). "Treatment of obstructive sleep apnoea leads to improved microvascular endothelial function in the systemic circulation." *Thorax* **61**(6): 491-5.
- Lavie, L. and P. Lavie (2009). "Molecular mechanisms of cardiovascular disease in OSAHS: the oxidative stress link." *Eur Respir J* **33**(6): 1467-84.
- Lavie, P., L. Lavie and P. Herer (2005). "All-cause mortality in males with sleep apnoea syndrome: declining mortality rates with age." *Eur Respir J* **25**(3): 514-20.
- Lavie, L. (2014). "Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia - Revisited - The bad ugly and good: Implications to the heart and brain" *Sleep Med Rev* **24**: S1087-0792
- Lee, K., H. Zhang, D. Z. Qian, S. Rey, J. O. Liu and G. L. Semenza (2009). "Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(42): 17910-5.
- Lefebvre, B., D. Godin-Ribuot, M. Joyeux-Faure, F. Caron, G. Bessard, P. Levy and F. Stanke-Labesque (2006). "Functional assessment of vascular reactivity after chronic intermittent hypoxia in the rat." *Respir Physiol Neurobiol* **150**(2-3): 278-86.
- Lei, Z., B. Li, Z. Yang, H. Fang, G. M. Zhang, Z. H. Feng and B. Huang (2009). "Regulation of HIF-1 α and VEGF by miR-20b tunes tumor cells to adapt to the alteration of oxygen concentration." *PLoS One* **4**(10): e7629.
- Lesske, J., E. C. Fletcher, G. Bao and T. Unger (1997). "Hypertension caused by chronic intermittent hypoxia--influence of chemoreceptors and sympathetic nervous system." *J Hypertens* **15**(12 Pt 2): 1593-603.
- Levy, P., J. L. Pepin, C. Arnaud, J. P. Baguet, M. Dematteis and F. Mach (2009). "Obstructive sleep apnea and atherosclerosis." *Prog Cardiovasc Dis* **51**(5): 400-10.
- Levy, P., S. Ryan, O. Oldenburg and G. Parati (2013). "Sleep apnoea and the heart." *Eur Respir Rev* **22**(129): 333-52.
- Levy, P., R. Tamisier, C. Arnaud, D. Monneret, J. P. Baguet, F. Stanke-Labesque, M. Dematteis, D. Godin-Ribuot, C. Ribuot and J. L. Pepin (2012). "Sleep deprivation, sleep apnea and cardiovascular diseases." *Front Biosci (Elite Ed)* **4**: 2007-21.

- Li, A. M., M. H. Chan, J. Yin, H. K. So, S. K. Ng, I. H. Chan, C. W. Lam, Y. K. Wing and P. C. Ng (2008). "C-reactive protein in children with obstructive sleep apnea and the effects of treatment." *Pediatr Pulmonol* **43**(1): 34-40.
- Li, L., G. D. Fink, S. W. Watts, C. A. Northcott, J. J. Galligan, P. J. Pagano and A. F. Chen (2003). "Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin(A)-NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension." *Circulation* **107**(7): 1053-8.
- Li, M. W., M. O. Mian, T. Barhoumi, A. Rehman, K. Mann, P. Paradis and E. L. Schiffrin (2013). "Endothelin-1 overexpression exacerbates atherosclerosis and induces aortic aneurysms in apolipoprotein E knockout mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**(10): 2306-15.
- Li, Y. L., Y. F. Li, D. Liu, K. G. Cornish, K. P. Patel, I. H. Zucker, K. M. Channon and H. D. Schultz (2005). "Gene transfer of neuronal nitric oxide synthase to carotid body reverses enhanced chemoreceptor function in heart failure rabbits." *Circ Res* **97**(3): 260-7.
- Li, Y. L., X. H. Xia, H. Zheng, L. Gao, Y. F. Li, D. Liu, K. P. Patel, W. Wang and H. D. Schultz (2006). "Angiotensin II enhances carotid body chemoreflex control of sympathetic outflow in chronic heart failure rabbits." *Cardiovasc Res* **71**(1): 129-38.
- Li, Z. W., S. A. Omori, T. Labuda, M. Karin and R. C. Rickert (2003). "IKK beta is required for peripheral B cell survival and proliferation." *J Immunol* **170**(9): 4630-7.
- Libby, P. (2000). "Changing concepts of atherogenesis." *J Intern Med* **247**(3): 349-58.
- Lim, C. S., S. Kiriakidis, A. Sandison, E. M. Paleolog and A. H. Davies (2013). "Hypoxia-inducible factor pathway and diseases of the vascular wall." *J Vasc Surg* **58**(1): 219-30.
- Lim, J., T. J. Lasserson, J. Fleetham and J. Wright (2006). "Oral appliances for obstructive sleep apnoea." *Cochrane Database Syst Rev*(1): CD004435.
- Lim, J. H., Y. M. Lee, Y. S. Chun, J. Chen, J. E. Kim and J. W. Park (2010). "Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha." *Mol Cell* **38**(6): 864-78.
- Lin, S. W., N. H. Chen, H. Y. Li, T. J. Fang, C. C. Huang, Y. H. Tsai and C. H. Lee (2006). "A comparison of the long-term outcome and effects of surgery or continuous positive airway pressure on patients with obstructive sleep apnea syndrome." *Laryngoscope* **116**(6): 1012-6.
- Lindberg, E., N. Carter, T. Gislason and C. Janson (2001). "Role of snoring and daytime sleepiness in occupational accidents." *Am J Respir Crit Care Med* **164**(11): 2031-5.
- Liu, Q., Y. Chen, M. Auger-Messier and J. D. Molkentin (2012). "Interaction between NFkappaB and NFAT coordinates cardiac hypertrophy and pathological remodeling." *Circ Res* **110**(8): 1077-86.
- Liu, Q., J. S. Sham, L. A. Shimoda and J. T. Sylvester (2001). "Hypoxic constriction of porcine distal pulmonary arteries: endothelium and endothelin dependence." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **280**(5): L856-65.
- Liu, X., Y. Deng, J. Shang, X. H. Yang, K. Liu, H. G. Liu and Y. J. Xu (2013). "Effect of NADPH oxidase inhibitor apocynin on the expression of hypoxia-induced factor-1alpha and endothelin-1 in rat carotid body exposed to chronic intermittent hypoxia." *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* **33**(2): 178-84.
- Lo Bue, A., A. Salvaggio, S. I. Isidoro, S. Romano, O. Marrone and G. Insalaco (2014). "Usefulness of reinforcing interventions on continuous positive airway pressure compliance." *BMC Pulm Med* **14**: 78.
- Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." *Nature* **407**(6801): 233-41.
- Lutgens, E., B. Faber, K. Schapira, C. T. Evelo, R. van Haften, S. Heeneman, K. B. Cleutjens, A. P. Bijnens, L. Beckers, J. G. Porter, C. R. Mackay, P. Rennert, V. Bailly, M. Jarpe, B. Dolinski, V. Koteliansky, T. de Fougerolles and M. J. Daemen (2005). "Gene profiling in atherosclerosis reveals a key role for small inducible cytokines: validation using a novel monocyte chemoattractant protein monoclonal antibody." *Circulation* **111**(25): 3443-52.
- Mabjeesh, N. J., D. Escuin, T. M. LaVallee, V. S. Pribluda, G. M. Swartz, M. S. Johnson, M. T. Willard, H. Zhong, J. W. Simons and P. Giannakakou (2003). "2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF." *Cancer Cell* **3**(4): 363-75.

- Magalang, U. J., K. Richards, B. McCarthy, A. Fathala, M. Khan, N. Parinandi and S. V. Raman (2009). "Continuous positive airway pressure therapy reduces right ventricular volume in patients with obstructive sleep apnea: a cardiovascular magnetic resonance study." *J Clin Sleep Med* **5**(2): 110-4.
- Magder, S. A., S. Lichtenstein and A. G. Adelman (1983). "Effect of negative pleural pressure on left ventricular hemodynamics." *Am J Cardiol* **52**(5): 588-93.
- Manalo, D. J., A. Rowan, T. Lavoie, L. Natarajan, B. D. Kelly, S. Q. Ye, J. G. Garcia and G. L. Semenza (2005). "Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1." *Blood* **105**(2): 659-69.
- Marin, J. M., S. J. Carrizo, E. Vicente and A. G. Agusti (2005). "Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study." *Lancet* **365**(9464): 1046-53.
- Martina, V., A. Masha, V. R. Gigliardi, L. Brocato, E. Manzato, A. Berchio, P. Massarenti, F. Settanni, L. Della Casa, S. Bergamini and A. Iannone (2008). "Long-term N-acetylcysteine and L-arginine administration reduces endothelial activation and systolic blood pressure in hypertensive patients with type 2 diabetes." *Diabetes Care* **31**(5): 940-4.
- Martinez-Garcia, M. A., F. Capote, F. Campos-Rodriguez, P. Lloberes, M. J. Diaz de Atauri, M. Somoza, J. F. Masa, M. Gonzalez, L. Sacristan, F. Barbe, J. Duran-Cantolla, F. Aizpuru, E. Manas, B. Barreiro, M. Mosteiro, J. J. Cebrian, M. de la Pena, F. Garcia-Rio, A. Maimo, J. Zapater, C. Hernandez, N. Grau SanMarti, J. M. Montserrat and N. Spanish Sleep (2013). "Effect of CPAP on blood pressure in patients with obstructive sleep apnea and resistant hypertension: the HIPARCO randomized clinical trial." *JAMA* **310**(22): 2407-15.
- Masaki, T., J. R. Vane and P. M. Vanhoutte (1994). "International Union of Pharmacology nomenclature of endothelin receptors." *Pharmacol Rev* **46**(2): 137-42.
- Massberg, S., K. Brand, S. Gruner, S. Page, E. Muller, I. Muller, W. Bergmeier, T. Richter, M. Lorenz, I. Konrad, B. Nieswandt and M. Gawaz (2002). "A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation." *J Exp Med* **196**(7): 887-96.
- Matsuyama, K., H. Yasue, K. Okumura, Y. Saito, K. Nakao, G. Shirakami and H. Imura (1991). "Increased plasma level of endothelin-1-like immunoreactivity during coronary spasm in patients with coronary spastic angina." *Am J Cardiol* **68**(10): 991-5.
- McGuire, M. and A. Bradford (1999). "Chronic intermittent hypoxia increases haematocrit and causes right ventricular hypertrophy in the rat." *Respir Physiol* **117**(1): 53-8.
- McMullen, J. R., T. Shioi, W. Y. Huang, L. Zhang, O. Tarnavski, E. Bisping, M. Schinke, S. Kong, M. C. Sherwood, J. Brown, L. Riggi, P. M. Kang and S. Izumo (2004). "The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) pathway." *J Biol Chem* **279**(6): 4782-93.
- McMurray, J. J., S. G. Ray, I. Abdullah, H. J. Dargie and J. J. Morton (1992). "Plasma endothelin in chronic heart failure." *Circulation* **85**(4): 1374-9.
- McNicholas, W. T. and M. R. Bonsignore (2007). "Sleep apnoea as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence, basic mechanisms and research priorities." *Eur Respir J* **29**(1): 156-78.
- Melillo, G. (2007). "Hypoxia-inducible factor 1 inhibitors." *Methods Enzymol* **435**: 385-402.
- Merabet, N., A. L. Hassouna, L. Nicol, J. P. Henry, F. Lallemand, C. Thuillez and P. Mulder (2012). Beneficial Cardiac Effects of Endothelin Converting Enzyme Inhibition in Experimental Heart Failure Circulation. A. h. Association. **96**: 1976-82.
- Meslier, N., S. Vol, B. Balkau, F. Gagnadoux, M. Cailleau, A. Petrella, J. L. Racineux and J. Tichet (2007). "[Prevalence of symptoms of sleep apnea syndrome. Study of a French middle-aged population]." *Rev Mal Respir* **24**(3 Pt 1): 305-13.
- Metzen, E., D. P. Stiehl, K. Doege, J. H. Marxsen, T. Hellwig-Burgel and W. Jelkmann (2005). "Regulation of the prolyl hydroxylase domain protein 2 (phd2/egln-1) gene: identification of a functional hypoxia-responsive element." *Biochem J* **387**(Pt 3): 711-7.

- Minic, M., J. T. Granton and C. M. Ryan (2014). "Sleep disordered breathing in group 1 pulmonary arterial hypertension." *J Clin Sleep Med* **10**(3): 277-83.
- Minoguchi, K., T. Yokoe, T. Tazaki, H. Minoguchi, A. Tanaka, N. Oda, S. Okada, S. Ohta, H. Naito and M. Adachi (2005). "Increased carotid intima-media thickness and serum inflammatory markers in obstructive sleep apnea." *Am J Respir Crit Care Med* **172**(5): 625-30.
- Mitler, M. M., A. Dawson, S. J. Henriksen, M. Sobers and F. E. Bloom (1988). "Bedtime ethanol increases resistance of upper airways and produces sleep apneas in asymptomatic snorers." *Alcohol Clin Exp Res* **12**(6): 801-5.
- Miyachi, M., H. Yazawa, M. Furukawa, K. Tsuboi, M. Ohtake, T. Nishizawa, K. Hashimoto, T. Yokoi, T. Kojima, T. Murate, M. Yokota, T. Murohara, Y. Koike and K. Nagata (2009). "Exercise training alters left ventricular geometry and attenuates heart failure in dahl salt-sensitive hypertensive rats." *Hypertension* **53**(4): 701-7.
- Miyauchi, T., M. Yanagisawa, T. Tomizawa, Y. Sugishita, N. Suzuki, M. Fujino, R. Ajisaka, K. Goto and T. Masaki (1989). "Increased plasma concentrations of endothelin-1 and big endothelin-1 in acute myocardial infarction." *Lancet* **2**(8653): 53-4.
- Mohri, M., K. Egashira, T. Tagawa, T. Kuga, H. Tagawa, Y. Harasawa, H. Shimokawa and A. Takeshita (1997). "Basal release of nitric oxide is decreased in the coronary circulation in patients with heart failure." *Hypertension* **30**(1 Pt 1): 50-6.
- Monahan, K., A. Storfer-Isser, R. Mehra, E. Shahar, M. Mittleman, J. Rottman, N. Punjabi, M. Sanders, S. F. Quan, H. Resnick and S. Redline (2009). "Triggering of nocturnal arrhythmias by sleep-disordered breathing events." *J Am Coll Cardiol* **54**(19): 1797-804.
- Monneret, D., J. L. Pepin, D. Godin-Ribuot, V. Ducros, J. P. Baguet, P. Levy and P. Faure (2010). "Association of urinary 15-F2t-isoprostane level with oxygen desaturation and carotid intima-media thickness in nonobese sleep apnea patients." *Free Radic Biol Med* **48**(4): 619-25.
- Moravec, C. S., E. E. Reynolds, R. W. Stewart and M. Bond (1989). "Endothelin is a positive inotropic agent in human and rat heart in vitro." *Biochem Biophys Res Commun* **159**(1): 14-8.
- Morgan, B. J., D. C. Crabtree, D. S. Puleo, M. S. Badr, F. Toiber and J. B. Skatrud (1996). "Neurocirculatory consequences of abrupt change in sleep state in humans." *J Appl Physiol* (1985) **80**(5): 1627-36.
- Morimoto, S. (2008). "Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies." *Cardiovasc Res* **77**(4): 659-66.
- Muller, O. J., M. Lange, H. Rattunde, H. P. Lorenzen, M. Muller, N. Frey, C. Bittner, W. Simonides, H. A. Katus and W. M. Franz (2003). "Transgenic rat hearts overexpressing SERCA2a show improved contractility under baseline conditions and pressure overload." *Cardiovasc Res* **59**(2): 380-9.
- Na, T. Y., H. J. Lee, H. J. Oh, S. Huh, I. K. Lee and M. O. Lee (2011). "Positive cross-talk between hypoxia inducible factor-1alpha and liver X receptor alpha induces formation of triglyceride-loaded foam cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**(12): 2949-56.
- Nadeem, R., M. Harvey, M. Singh, A. A. Khan, M. Albustani, A. Baessler, E. M. Madbouly, H. Sajid, M. Khan and N. Navid (2013). "Patients with obstructive sleep apnea display increased carotid intima media: a meta-analysis." *Int J Vasc Med* **2013**: 839582.
- Nadeem, R., J. Molnar, E. M. Madbouly, M. Nida, S. Aggarwal, H. Sajid, J. Naseem and R. Loomba (2013). "Serum inflammatory markers in obstructive sleep apnea: a meta-analysis." *J Clin Sleep Med* **9**(10): 1003-12.
- Naghshin, J., K. R. McGaffin, W. G. Witham, M. A. Mathier, L. C. Romano, S. H. Smith, A. M. Janczewski, J. A. Kirk, S. G. Shroff and C. P. O'Donnell (2009). "Chronic intermittent hypoxia increases left ventricular contractility in C57BL/6J mice." *J Appl Physiol* (1985) **107**(3): 787-93.
- Nakagawa, M., K. Hamaoka, T. Hattori and T. Sawada (1988). "Postnatal DNA synthesis in hearts of mice: autoradiographic and cytofluorometric investigations." *Cardiovasc Res* **22**(8): 575-83.
- Nakov, R., E. Pfarr and S. Eberle (2002). "Darusentan: an effective endothelinA receptor antagonist for treatment of hypertension." *Am J Hypertens* **15**(7 Pt 1): 583-9.

- Narkiewicz, K., C. A. Pesek, P. J. van de Borne, M. Kato and V. K. Somers (1999). "Enhanced sympathetic and ventilatory responses to central chemoreflex activation in heart failure." *Circulation* **100**(3): 262-7.
- Narkiewicz, K., P. J. van de Borne, N. Montano, M. E. Dyken, B. G. Phillips and V. K. Somers (1998). "Contribution of tonic chemoreflex activation to sympathetic activity and blood pressure in patients with obstructive sleep apnea." *Circulation* **97**(10): 943-5.
- Natarajan, R., F. N. Salloum, B. J. Fisher, R. C. Kukreja and A. A. Fowler, 3rd (2006). "Hypoxia inducible factor-1 activation by prolyl 4-hydroxylase-2 gene silencing attenuates myocardial ischemia reperfusion injury." *Circ Res* **98**(1): 133-40.
- Nattie, E. E., D. Bartlett, Jr. and K. Johnson (1978). "Pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy caused by intermittent hypoxia and hypercapnia in the rat." *Am Rev Respir Dis* **118**(4): 653-8.
- Neri Serneri, G. G., M. Boddi, P. A. Modesti, I. Cecioni, M. Coppo, L. Padeletti, A. Michelucci, A. Colella and G. Galanti (2001). "Increased cardiac sympathetic activity and insulin-like growth factor-I formation are associated with physiological hypertrophy in athletes." *Circ Res* **89**(11): 977-82.
- Neubauer, S. (2007). "The failing heart--an engine out of fuel." *N Engl J Med* **356**(11): 1140-51.
- Nieto, F. J., D. M. Herrington, S. Redline, E. J. Benjamin and J. A. Robbins (2004). "Sleep apnea and markers of vascular endothelial function in a large community sample of older adults." *Am J Respir Crit Care Med* **169**(3): 354-60.
- Nisbet, R. E., A. S. Graves, D. J. Kleinhenz, H. L. Rupnow, A. L. Reed, T. H. Fan, P. O. Mitchell, R. L. Sutliff and C. M. Hart (2009). "The role of NADPH oxidase in chronic intermittent hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice." *Am J Respir Cell Mol Biol* **40**(5): 601-9.
- Nizet, V. and R. S. Johnson (2009). "Interdependence of hypoxic and innate immune responses." *Nat Rev Immunol* **9**(9): 609-17.
- Noda, A., T. Okada, F. Yasuma, N. Nakashima and M. Yokota (1995). "Cardiac hypertrophy in obstructive sleep apnea syndrome." *Chest* **107**(6): 1538-44.
- Norton, C. E., N. L. Jernigan, N. L. Kanagy, B. R. Walker and T. C. Resta (2011). "Intermittent hypoxia augments pulmonary vascular smooth muscle reactivity to NO: regulation by reactive oxygen species." *J Appl Physiol (1985)* **111**(4): 980-8.
- Novo, G., A. Sansone, M. Rizzo, F. P. Guarneri, C. Pernice and S. Novo (2014). "High plasma levels of endothelin-1 enhance the predictive value of preclinical atherosclerosis for future cerebrovascular and cardiovascular events: a 20-year prospective study." *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*.
- Ntalapascha, M., D. Makris, A. Kyparos, I. Tsilioni, K. Kostikas, K. Gourgoulidis, D. Kouretas and E. Zakyntinos (2013). "Oxidative stress in patients with obstructive sleep apnea syndrome." *Sleep Breath* **17**(2): 549-55.
- Nural, S., E. Gunay, B. Halici, S. Celik and M. Unlu (2013). "Inflammatory processes and effects of continuous positive airway pressure (CPAP) in overlap syndrome." *Inflammation* **36**(1): 66-74.
- O'Driscoll, D. M., R. S. Horne, M. J. Davey, S. A. Hope, V. Anderson, J. Trinder, A. M. Walker and G. M. Nixon (2011). "Increased sympathetic activity in children with obstructive sleep apnea: cardiovascular implications." *Sleep Med* **12**(5): 483-8.
- Oda, T., K. Hirota, K. Nishi, S. Takabuchi, S. Oda, H. Yamada, T. Arai, K. Fukuda, T. Kita, T. Adachi, G. L. Semenza and R. Nohara (2006). "Activation of hypoxia-inducible factor 1 during macrophage differentiation." *Am J Physiol Cell Physiol* **291**(1): C104-13.
- Ohga, E., T. Tomita, H. Wada, H. Yamamoto, T. Nagase and Y. Ouchi (2003). "Effects of obstructive sleep apnea on circulating ICAM-1, IL-8, and MCP-1." *J Appl Physiol (1985)* **94**(1): 179-84.
- Oka, T., H. Akazawa, A. T. Naito and I. Komuro (2014). "Angiogenesis and cardiac hypertrophy: maintenance of cardiac function and causative roles in heart failure." *Circ Res* **114**(3): 565-71.

- Oldenburg, O., B. Lamp, L. Faber, H. Teschler, D. Horstkotte and V. Topfer (2007). "Sleep-disordered breathing in patients with symptomatic heart failure: a contemporary study of prevalence and characteristics of 700 patients." *Eur J Heart Fail* **9**(3): 251-7.
- Ong, S. G. and D. J. Hausenloy (2012). "Hypoxia-inducible factor as a therapeutic target for cardioprotection." *Pharmacol Ther* **136**(1): 69-81.
- Orozco, L. D., B. J. Bennett, C. R. Farber, A. Ghazalpour, C. Pan, N. Che, P. Wen, H. X. Qi, A. Mutukulu, N. Siemers, I. Neuhaus, R. Yordanova, P. Gargalovic, M. Pellegrini, T. Kirchgessner and A. J. Lusis (2012). "Unraveling inflammatory responses using systems genetics and gene-environment interactions in macrophages." *Cell* **151**(3): 658-70.
- Otto, M. E., M. Belohlavek, A. Romero-Corral, A. S. Gami, G. Gilman, A. Svatikova, R. S. Amin, F. Lopez-Jimenez, B. K. Khandheria and V. K. Somers (2007). "Comparison of cardiac structural and functional changes in obese otherwise healthy adults with versus without obstructive sleep apnea." *Am J Cardiol* **99**(9): 1298-302.
- Oyama, J., S. Satoh, N. Suematsu, T. Kadokami, T. Maeda, M. Sugano and N. Makino (2010). "Scavenging free radicals improves endothelial dysfunction in human coronary arteries in vivo." *Heart Vessels* **25**(5): 379-85.
- Pacher, P., J. S. Beckman and L. Liaudet (2007). "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease." *Physiol Rev* **87**(1): 315-424.
- Panoutsopoulos, A., A. Kallianos, K. Kostopoulos, C. Seretis, E. Koufogiorga, A. Protogerou, G. Trakada, C. Kostopoulos, N. Zakopoulos and I. Nikolopoulos (2012). "Effect of CPAP treatment on endothelial function and plasma CRP levels in patients with sleep apnea." *Med Sci Monit* **18**(12): CR747-51.
- Park, A. M. and Y. J. Suzuki (2007). "Effects of intermittent hypoxia on oxidative stress-induced myocardial damage in mice." *J Appl Physiol (1985)* **102**(5): 1806-14.
- Pawar, A., J. Nanduri, G. Yuan, S. A. Khan, N. Wang, G. K. Kumar and N. R. Prabhakar (2009). "Reactive oxygen species-dependent endothelin signaling is required for augmented hypoxic sensory response of the neonatal carotid body by intermittent hypoxia." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **296**(3): R735-42.
- Peker, Y., J. Carlson and J. Hedner (2006). "Increased incidence of coronary artery disease in sleep apnoea: a long-term follow-up." *Eur Respir J* **28**(3): 596-602.
- Peker, Y., J. Hedner, J. Norum, H. Kraiczi and J. Carlson (2002). "Increased incidence of cardiovascular disease in middle-aged men with obstructive sleep apnea: a 7-year follow-up." *Am J Respir Crit Care Med* **166**(2): 159-65.
- Peng, Y., D. D. Kline, T. E. Dick and N. R. Prabhakar (2001). "Chronic intermittent hypoxia enhances carotid body chemoreceptor response to low oxygen." *Adv Exp Med Biol* **499**: 33-8.
- Peng, Y., G. Yuan, J. L. Overholt, G. K. Kumar and N. R. Prabhakar (2003). "Systemic and cellular responses to intermittent hypoxia: evidence for oxidative stress and mitochondrial dysfunction." *Adv Exp Med Biol* **536**: 559-64.
- Peng, Y. J., J. Nanduri, X. Zhang, N. Wang, G. Raghuraman, J. Seagard, G. K. Kumar and N. R. Prabhakar (2012). "Endothelin-1 mediates attenuated carotid baroreceptor activity by intermittent hypoxia." *J Appl Physiol (1985)* **112**(1): 187-96.
- Peng, Y. J. and N. R. Prabhakar (2003). "Reactive oxygen species in the plasticity of respiratory behavior elicited by chronic intermittent hypoxia." *J Appl Physiol (1985)* **94**(6): 2342-9.
- Peng, Y. J., G. Yuan, D. Ramakrishnan, S. D. Sharma, M. Bosch-Marce, G. K. Kumar, G. L. Semenza and N. R. Prabhakar (2006). "Heterozygous HIF-1 α deficiency impairs carotid body-mediated systemic responses and reactive oxygen species generation in mice exposed to intermittent hypoxia." *J Physiol* **577**(Pt 2): 705-16.
- Pepin, J. L., A. L. Borel, R. Tamisier, J. P. Baguet, P. Levy and Y. Dauvilliers (2014). "Hypertension and sleep: Overview of a tight relationship." *Sleep Med Rev*.
- Pepin, J. L., R. Tamisier, G. Barone-Rochette, S. H. Launois, P. Levy and J. P. Baguet (2010). "Comparison of continuous positive airway pressure and valsartan in hypertensive patients with sleep apnea." *Am J Respir Crit Care Med* **182**(7): 954-60.

- Pepin, J. L., R. Tamisier and P. Levy (2012). "Obstructive sleep apnoea and metabolic syndrome: put CPAP efficacy in a more realistic perspective." *Thorax* **67**(12): 1025-7.
- Peppard, P. E., T. Young, J. H. Barnett, M. Palta, E. W. Hagen and K. M. Hla (2013). "Increased prevalence of sleep-disordered breathing in adults." *Am J Epidemiol* **177**(9): 1006-14.
- Peppard, P. E., T. Young, M. Palta, J. Dempsey and J. Skatrud (2000). "Longitudinal study of moderate weight change and sleep-disordered breathing." *JAMA* **284**(23): 3015-21.
- Perrino, C., S. V. Naga Prasad, L. Mao, T. Noma, Z. Yan, H. S. Kim, O. Smithies and H. A. Rockman (2006). "Intermittent pressure overload triggers hypertrophy-independent cardiac dysfunction and vascular rarefaction." *J Clin Invest* **116**(6): 1547-60.
- Pescador, N., Y. Cuevas, S. Naranjo, M. Alcaide, D. Villar, M. O. Landazuri and L. Del Peso (2005). "Identification of a functional hypoxia-responsive element that regulates the expression of the egl nine homologue 3 (egln3/phd3) gene." *Biochem J* **390**(Pt 1): 189-97.
- Peters, J., M. K. Kindred and J. L. Robotham (1988). "Transient analysis of cardiopulmonary interactions. II. Systolic events." *J Appl Physiol* (1985) **64**(4): 1518-26.
- Pfeffer, M. A. and E. Braunwald (1990). "Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications." *Circulation* **81**(4): 1161-72.
- Phillips, B. G., K. Narkiewicz, C. A. Pesek, W. G. Haynes, M. E. Dyken and V. K. Somers (1999). "Effects of obstructive sleep apnea on endothelin-1 and blood pressure." *J Hypertens* **17**(1): 61-6.
- Phillips, S. A., E. B. Olson, B. J. Morgan and J. H. Lombard (2004). "Chronic intermittent hypoxia impairs endothelium-dependent dilation in rat cerebral and skeletal muscle resistance arteries." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**(1): H388-93.
- Pialoux, V., P. J. Hanly, G. E. Foster, J. V. Brugniaux, A. E. Beaudin, S. E. Hartmann, M. Pun, C. T. Duggan and M. J. Poulin (2009). "Effects of exposure to intermittent hypoxia on oxidative stress and acute hypoxic ventilatory response in humans." *Am J Respir Crit Care Med* **180**(10): 1002-9.
- Pidkova, N. A., O. A. Cherepanova, T. Yoshida, M. R. Alexander, R. A. Deaton, J. A. Thomas, N. Leitinger and G. K. Owens (2007). "Oxidized phospholipids induce phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro." *Circ Res* **101**(8): 792-801.
- Pinet, F. (2004). "[What is the role of endothelin system?]." *Med Sci (Paris)* **20**(3): 339-45.
- Pisarcik, S., J. Maylor, W. Lu, X. Yun, C. Udem, J. T. Sylvester, G. L. Semenza and L. A. Shimoda (2013). "Activation of hypoxia-inducible factor-1 in pulmonary arterial smooth muscle cells by endothelin-1." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **304**(8): L549-61.
- Podrez, E. A., T. V. Byzova, M. Febbraio, R. G. Salomon, Y. Ma, M. Valiyaveetil, E. Poliakov, M. Sun, P. J. Finton, B. R. Curtis, J. Chen, R. Zhang, R. L. Silverstein and S. L. Hazen (2007). "Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype." *Nat Med* **13**(9): 1086-95.
- Poulain, L., A. Thomas, J. Rieusset, L. Casteilla, P. Levy, C. Arnaud and M. Dematteis (2014). "Visceral white fat remodelling contributes to intermittent hypoxia-induced atherogenesis." *Eur Respir J* **43**(2): 513-22.
- Prabhakar, N. R. and G. L. Semenza (2012). "Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2." *Physiol Rev* **92**(3): 967-1003.
- Premkumar, D. R., R. R. Mishra, J. L. Overholt, M. S. Simonson, N. S. Cherniack and N. R. Prabhakar (2000). "L-type Ca(2+) channel activation regulates induction of c-fos transcription by hypoxia." *J Appl Physiol* (1985) **88**(5): 1898-906.
- Pulido, T., I. Adzerikho, R. N. Channick, M. Delcroix, N. Galie, H. A. Ghofrani, P. Jansa, Z. C. Jing, F. O. Le Brun, S. Mehta, C. M. Mittelholzer, L. Perchenet, B. K. Sastry, O. Sitbon, R. Souza, A. Torbicki, X. Zeng, L. J. Rubin and G. Simonneau (2013). "Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension." *N Engl J Med* **369**(9): 809-18.

- Punjabi, N. M., B. S. Caffo, J. L. Goodwin, D. J. Gottlieb, A. B. Newman, G. T. O'Connor, D. M. Rapoport, S. Redline, H. E. Resnick, J. A. Robbins, E. Shahar, M. L. Unruh and J. M. Samet (2009). "Sleep-disordered breathing and mortality: a prospective cohort study." *PLoS Med* **6**(8): e1000132.
- Rafnsson, A., F. Bohm, M. Settergren, A. Gonon, K. Brismar and J. Pernow (2012). "The endothelin receptor antagonist bosentan improves peripheral endothelial function in patients with type 2 diabetes mellitus and microalbuminuria: a randomised trial." *Diabetologia* **55**(3): 600-7.
- Rajagopalan, S., S. Kurz, T. Munzel, M. Tarpey, B. A. Freeman, K. K. Griendling and D. G. Harrison (1996). "Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone." *J Clin Invest* **97**(8): 1916-23.
- Ramond, A., D. Godin-Ribuot, C. Ribuot, P. Totoston, I. Koritchneva, S. Cachot, P. Levy and M. Joyeux-Faure (2013). "Oxidative stress mediates cardiac infarction aggravation induced by intermittent hypoxia." *Fundam Clin Pharmacol* **27**(3): 252-61.
- Rapisarda, A., B. Uranchimeg, O. Sordet, Y. Pommier, R. H. Shoemaker and G. Melillo (2004). "Topoisomerase I-mediated inhibition of hypoxia-inducible factor 1: mechanism and therapeutic implications." *Cancer Res* **64**(4): 1475-82.
- Rebic, D., S. Rasic and V. Rebic (2014). "Influence of endothelin-1 and nitric oxide on left ventricular remodelling in patients on peritoneal dialysis." *Ren Fail* **36**(2): 232-6.
- Redline, S., G. Yenokyan, D. J. Gottlieb, E. Shahar, G. T. O'Connor, H. E. Resnick, M. Diener-West, M. H. Sanders, P. A. Wolf, E. M. Geraghty, T. Ali, M. Lebowitz and N. M. Punjabi (2010). "Obstructive sleep apnea-hypopnea and incident stroke: the sleep heart health study." *Am J Respir Crit Care Med* **182**(2): 269-77.
- Ren, H., A. Schmalstieg, D. Yuan and R. B. Gaynor (2002). "I-kappa B kinase beta is critical for B cell proliferation and antibody response." *J Immunol* **168**(2): 577-87.
- Rey, S., J. Corthorn, C. Chacon and R. Iturriaga (2007). "Expression and immunolocalization of endothelin peptides and its receptors, ETA and ETB, in the carotid body exposed to chronic intermittent hypoxia." *J Histochem Cytochem* **55**(2): 167-74.
- Rey, S., R. Del Rio and R. Iturriaga (2006). "Contribution of endothelin-1 to the enhanced carotid body chemosensory responses induced by chronic intermittent hypoxia." *Brain Res* **1086**(1): 152-9.
- Rey, S., R. Del Rio and R. Iturriaga (2006). "Role of endothelin-1 on the enhanced carotid body activity induced by chronic intermittent hypoxia." *Adv Exp Med Biol* **580**: 345-50; discussion 351-9.
- Rius, J., M. Guma, C. Schachtrup, K. Akassoglou, A. S. Zinkernagel, V. Nizet, R. S. Johnson, G. G. Haddad and M. Karin (2008). "NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha." *Nature* **453**(7196): 807-11.
- Robinson, G. V., D. M. Smith, B. A. Langford, R. J. Davies and J. R. Stradling (2006). "Continuous positive airway pressure does not reduce blood pressure in nonsleepy hypertensive OSA patients." *Eur Respir J* **27**(6): 1229-35.
- Rodrigo, R., H. Prat, W. Passalacqua, J. Araya and J. P. Bachler (2008). "Decrease in oxidative stress through supplementation of vitamins C and E is associated with a reduction in blood pressure in patients with essential hypertension." *Clin Sci (Lond)* **114**(10): 625-34.
- Rodriguez, R., J. Bickta and C. P. O'Donnell (2014). "The Effects Of Acute And Chronic Intermittent Hypoxia Exposure On Left Ventricular Function And Cardiac Glycolytic Metabolism In Lean C57BL/6J Mice." *Am J Respir Crit Care Med* **189**: A2215.
- Rodriguez R, B. J., and O'Donnell CP (2014). "The Effects Of Acute And Chronic Intermittent Hypoxia Exposure On Left Ventricular Function And Cardiac Glycolytic Metabolism In Lean C57BL/6J Mice." *Am J Respir Crit Care Med* **189**(3): A2215.
- Romero-Corral, A., V. K. Somers, P. A. Pellikka, E. J. Olson, K. R. Bailey, J. Korinek, M. Orban, J. Sierra-Johnson, M. Kato, R. S. Amin and F. Lopez-Jimenez (2007). "Decreased right and left ventricular myocardial performance in obstructive sleep apnea." *Chest* **132**(6): 1863-70.

- Rosenberger, C., S. Mandriota, J. S. Jurgensen, M. S. Wiesener, J. H. Horstrup, U. Frei, P. J. Ratcliffe, P. H. Maxwell, S. Bachmann and K. U. Eckardt (2002). "Expression of hypoxia-inducible factor-1 α and -2 α in hypoxic and ischemic rat kidneys." *J Am Soc Nephrol* **13**(7): 1721-32.
- Rosenkranz, S. (2004). "TGF- β 1 and angiotensin networking in cardiac remodeling." *Cardiovasc Res* **63**(3): 423-32.
- Ryan, S., W. T. McNicholas and C. T. Taylor (2007). "A critical role for p38 map kinase in NF- κ B signaling during intermittent hypoxia/reoxygenation." *Biochem Biophys Res Commun* **355**(3): 728-33.
- Ryan, S., C. T. Taylor and W. T. McNicholas (2005). "Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome." *Circulation* **112**(17): 2660-7.
- Saarelainen, S., E. Seppala, K. Laasonen and J. Hasan (1997). "Circulating endothelin-1 in obstructive sleep apnea." *Endothelium* **5**(2): 115-8.
- Sadoshima, J., Y. Xu, H. S. Slayter and S. Izumo (1993). "Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro." *Cell* **75**(5): 977-84.
- Saijo, Y., M. Utsugi, E. Yoshioka, T. Fukui, F. Sata, N. Nakagawa, N. Hasebe, T. Yoshida and R. Kishi (2009). "Inflammation as a cardiovascular risk factor and pulse wave velocity as a marker of early-stage atherosclerosis in the Japanese population." *Environ Health Prev Med* **14**(3): 159-64.
- Sakai, S., T. Miyauchi, M. Kobayashi, I. Yamaguchi, K. Goto and Y. Sugishita (1996). "Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure." *Nature* **384**(6607): 353-5.
- Salonen, R. M., K. Nyyssonen, J. Kaikkonen, E. Porkkala-Sarataho, S. Voutilainen, T. H. Rissanen, T. P. Tuomainen, V. P. Valkonen, U. Ristonmaa, H. M. Lakka, M. Vanharanta, J. T. Salonen and H. E. Poulsen (2003). "Six-year effect of combined vitamin C and E supplementation on atherosclerotic progression: the Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention (ASAP) Study." *Circulation* **107**(7): 947-53.
- Sano, M., T. Minamino, H. Toko, H. Miyauchi, M. Orimo, Y. Qin, H. Akazawa, K. Tateno, Y. Kayama, M. Harada, I. Shimizu, T. Asahara, H. Hamada, S. Tomita, J. D. Molkentin, Y. Zou and I. Komuro (2007). "p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload." *Nature* **446**(7134): 444-8.
- Schafer, H., E. Hasper, S. Ewig, U. Koehler, J. Latzelsberger, S. Tasci and B. Luderitz (1998). "Pulmonary haemodynamics in obstructive sleep apnoea: time course and associated factors." *Eur Respir J* **12**(3): 679-84.
- Schaible, T. F. and J. Scheuer (1981). "Cardiac function in hypertrophied hearts from chronically exercised female rats." *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* **50**(6): 1140-5.
- Scheinowitz, M., G. Kessler-Icekson, S. Freimann, R. Zimmermann, W. Schaper, E. Golomb, N. Savion and M. Eldar (2003). "Short- and long-term swimming exercise training increases myocardial insulin-like growth factor-I gene expression." *Growth Horm IGF Res* **13**(1): 19-25.
- Schiro, A., F. Wilkinson, R. Weston, J. Smyth, A. J. Boulton, F. Serracino-Inglott and Y. M. Alexander (2014). "179 The Role Of Microparticles in Carotid Disease." *Heart* **100**(Suppl 3): A101.
- Schofield, C. J. and P. J. Ratcliffe (2004). "Oxygen sensing by HIF hydroxylases." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(5): 343-54.
- Schultz, H. D., Y. L. Li and Y. Ding (2007). "Arterial chemoreceptors and sympathetic nerve activity: implications for hypertension and heart failure." *Hypertension* **50**(1): 6-13.
- Schultz, H. D., N. J. Marcus and R. Del Rio (2013). "Role of the carotid body in the pathophysiology of heart failure." *Curr Hypertens Rep* **15**(4): 356-62.
- Schultz, K., V. Murthy, J. B. Tatro and D. Beasley (2009). "Prolyl hydroxylase 2 deficiency limits proliferation of vascular smooth muscle cells by hypoxia-inducible factor-1 α -dependent mechanisms." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **296**(6): L921-7.

- Schulz, R., S. Mahmoudi, K. Hattar, U. Sibelius, H. Olschewski, K. Mayer, W. Seeger and F. Grimminger (2000). "Enhanced release of superoxide from polymorphonuclear neutrophils in obstructive sleep apnea. Impact of continuous positive airway pressure therapy." *Am J Respir Crit Care Med* **162**(2 Pt 1): 566-70.
- Schulz, R., G. Murzabekova, B. Egemnazarov, S. Kraut, H. J. Eisele, R. Dumitrascu, J. Heitmann, M. Seimetz, M. Witzenrath, H. A. Ghofrani, R. T. Schermuly, F. Grimminger, W. Seeger and N. Weissmann (2014). "Arterial hypertension in a murine model of sleep apnea: role of NADPH oxidase 2." *J Hypertens* **32**(2): 300-5.
- Schulz, R., D. Schmidt, A. Blum, X. Lopes-Ribeiro, C. Lucke, K. Mayer, H. Olschewski, W. Seeger and F. Grimminger (2000). "Decreased plasma levels of nitric oxide derivatives in obstructive sleep apnoea: response to CPAP therapy." *Thorax* **55**(12): 1046-51.
- Schulz, R., W. Seeger, C. Fegbeutel, H. Husken, R. H. Bodeker, H. Tillmanns and M. Grebe (2005). "Changes in extracranial arteries in obstructive sleep apnoea." *Eur Respir J* **25**(1): 69-74.
- Seif, F., S. R. Patel, H. Walia, M. Rueschman, D. L. Bhatt, D. J. Gottlieb, E. F. Lewis, S. P. Patil, N. M. Punjabi, D. C. Babineau, S. Redline and R. Mehra (2013). "Association between obstructive sleep apnea severity and endothelial dysfunction in an increased background of cardiovascular burden." *J Sleep Res* **22**(4): 443-51.
- Semenza, G. L. (1999). "Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1." *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 551-78.
- Semenza, G. L. (2009). "Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1." *Semin Cancer Biol* **19**(1): 12-6.
- Semenza, G. L. (2009). "Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1." *Physiology (Bethesda)* **24**: 97-106.
- Semenza, G. L. and G. L. Wang (1992). "A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation." *Mol Cell Biol* **12**(12): 5447-54.
- Shah, R. V., S. A. Abbasi, B. Heydari, H. Farhad, J. A. Dodson, J. P. Bakker, R. M. John, A. Veves, A. Malhotra, R. Blankstein, M. Jerosch-Herold, R. Y. Kwong and T. G. Neilan (2014). "Obesity and sleep apnea are independently associated with adverse left ventricular remodeling and clinical outcome in patients with atrial fibrillation and preserved ventricular function." *Am Heart J* **167**(4): 620-6.
- Shahar, E., C. W. Whitney, S. Redline, E. T. Lee, A. B. Newman, F. J. Nieto, G. T. O'Connor, L. L. Boland, J. E. Schwartz and J. M. Samet (2001). "Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: cross-sectional results of the Sleep Heart Health Study." *Am J Respir Crit Care Med* **163**(1): 19-25.
- Shamsuzzaman, A. S., M. Winnicki, P. Lanfranchi, R. Wolk, T. Kara, V. Accurso and V. K. Somers (2002). "Elevated C-reactive protein in patients with obstructive sleep apnea." *Circulation* **105**(21): 2462-4.
- Shimoda, L. A., D. J. Manalo, J. S. Sham, G. L. Semenza and J. T. Sylvester (2001). "Partial HIF-1 α deficiency impairs pulmonary arterial myocyte electrophysiological responses to hypoxia." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**(1): L202-8.
- Shiojima, I., K. Sato, Y. Izumiya, S. Schiekofer, M. Ito, R. Liao, W. S. Colucci and K. Walsh (2005). "Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure." *J Clin Invest* **115**(8): 2108-18.
- Shiomi, T., C. Guilleminault, R. Stoohs and I. Schnittger (1991). "Leftward shift of the interventricular septum and pulsus paradoxus in obstructive sleep apnea syndrome." *Chest* **100**(4): 894-902.
- Sluimer, J. C., J. M. Gasc, J. L. van Wanroij, N. Kisters, M. Groeneweg, M. D. Sollewijn Gelpke, J. P. Cleutjens, L. H. van den Akker, P. Corvol, B. G. Wouters, M. J. Daemen and A. P. Bijnens (2008). "Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factor, and macrophages in human atherosclerotic plaques are correlated with intraplaque angiogenesis." *J Am Coll Cardiol* **51**(13): 1258-65.

- Smith, T. G., P. A. Robbins and P. J. Ratcliffe (2008). "The human side of hypoxia-inducible factor." *Br J Haematol* **141**(3): 325-34.
- Snow, J. B., L. V. Gonzalez Bosc, N. L. Kanagy, B. R. Walker and T. C. Resta (2011). "Role for PKC β in enhanced endothelin-1-induced pulmonary vasoconstrictor reactivity following intermittent hypoxia." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **301**(5): L745-54.
- Snow, J. B., V. Kitzis, C. E. Norton, S. N. Torres, K. D. Johnson, N. L. Kanagy, B. R. Walker and T. C. Resta (2008). "Differential effects of chronic hypoxia and intermittent hypocapnic and eucapnic hypoxia on pulmonary vasoreactivity." *J Appl Physiol (1985)* **104**(1): 110-8.
- Somers, V. K., M. E. Dyken and J. L. Skinner (1993). "Autonomic and hemodynamic responses and interactions during the Mueller maneuver in humans." *J Auton Nerv Syst* **44**(2-3): 253-9.
- Somers, V. K., D. P. White, R. Amin, W. T. Abraham, F. Costa, A. Culebras, S. Daniels, J. S. Floras, C. E. Hunt, L. J. Olson, T. G. Pickering, R. Russell, M. Woo and T. Young (2008). "Sleep apnea and cardiovascular disease: an American Heart Association/American College of Cardiology Foundation Scientific Statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on Clinical Cardiology, Stroke Council, and Council on Cardiovascular Nursing." *J Am Coll Cardiol* **52**(8): 686-717.
- Somers, V. K., D. P. White, R. Amin, W. T. Abraham, F. Costa, A. Culebras, S. Daniels, J. S. Floras, C. E. Hunt, L. J. Olson, T. G. Pickering, R. Russell, M. Woo and T. Young (2008). "Sleep apnea and cardiovascular disease: an American Heart Association/American College of Cardiology Foundation Scientific Statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on Clinical Cardiology, Stroke Council, and Council on Cardiovascular Nursing. In collaboration with the National Heart, Lung, and Blood Institute National Center on Sleep Disorders Research (National Institutes of Health)." *Circulation* **118**(10): 1080-111.
- Sommer, N., A. Dietrich, R. T. Schermuly, H. A. Ghofrani, T. Gudermann, R. Schulz, W. Seeger, F. Grimminger and N. Weissmann (2008). "Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms." *Eur Respir J* **32**(6): 1639-51.
- Song, D., G. Fang, S. Z. Mao, X. Ye, G. Liu, Y. Gong and S. F. Liu (2012). "Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis by NF- κ B-dependent mechanisms." *Biochim Biophys Acta* **1822**(11): 1650-9.
- Soonpaa, M. H., K. K. Kim, L. Pajak, M. Franklin and L. J. Field (1996). "Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development." *Am J Physiol* **271**(5 Pt 2): H2183-9.
- Starcher, B. and M. Conrad (1995). "A role for neutrophil elastase in solar elastosis." *Ciba Found Symp* **192**: 338-46; discussion 346-7.
- Stary, H. C., A. B. Chandler, R. E. Dinsmore, V. Fuster, S. Glagov, W. Insull, Jr., M. E. Rosenfeld, C. J. Schwartz, W. D. Wagner and R. W. Wissler (1995). "A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**(9): 1512-31.
- Stary, H. C., A. B. Chandler, S. Glagov, J. R. Guyton, W. Insull, Jr., M. E. Rosenfeld, S. A. Schaffer, C. J. Schwartz, W. D. Wagner and R. W. Wissler (1994). "A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." *Circulation* **89**(5): 2462-78.
- Stewart, D. J., P. Cernacek, K. B. Costello and J. L. Rouleau (1992). "Elevated endothelin-1 in heart failure and loss of normal response to postural change." *Circulation* **85**(2): 510-7.
- Stewart, D. J., R. D. Levy, P. Cernacek and D. Langleben (1991). "Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease?" *Ann Intern Med* **114**(6): 464-9.
- Stow, L. R., M. E. Jacobs, C. S. Wingo and B. D. Cain (2011). "Endothelin-1 gene regulation." *FASEB J* **25**(1): 16-28.
- Sun, S. Y., W. Wang, I. H. Zucker and H. D. Schultz (1999). "Enhanced activity of carotid body chemoreceptors in rabbits with heart failure: role of nitric oxide." *J Appl Physiol (1985)* **86**(4): 1273-82.

- Sutsch, G., W. Kiowski, X. W. Yan, P. Hunziker, S. Christen, W. Strobel, J. H. Kim, P. Rickenbacher and O. Bertel (1998). "Short-term oral endothelin-receptor antagonist therapy in conventionally treated patients with symptomatic severe chronic heart failure." *Circulation* **98**(21): 2262-8.
- Szaboova, E., Z. Tomori, V. Donic, J. Petrovicova and P. Szabo (2007). "Sleep apnoea inducing hypoxemia is associated with early signs of carotid atherosclerosis in males." *Respir Physiol Neurobiol* **155**(2): 121-7.
- Takimoto, E. and D. A. Kass (2007). "Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling." *Hypertension* **49**(2): 241-8.
- Tamisier, R., J. L. Pepin, J. Remy, J. P. Baguet, J. A. Taylor, J. W. Weiss and P. Levy (2011). "14 nights of intermittent hypoxia elevate daytime blood pressure and sympathetic activity in healthy humans." *Eur Respir J* **37**(1): 119-28.
- Teran-Santos, J., A. Jimenez-Gomez and J. Cordero-Guevara (1999). "The association between sleep apnea and the risk of traffic accidents. Cooperative Group Burgos-Santander." *N Engl J Med* **340**(11): 847-51.
- Thibault, H. B., B. Kurtz, M. J. Raheer, R. S. Shaik, A. Waxman, G. Derumeaux, E. F. Halpern, K. D. Bloch and M. Scherrer-Crosbie (2010). "Noninvasive assessment of murine pulmonary arterial pressure: validation and application to models of pulmonary hypertension." *Circ Cardiovasc Imaging* **3**(2): 157-63.
- Thomas, B. J. and J. C. Wanstall (2003). "Alterations in pulmonary vascular function in rats exposed to intermittent hypoxia." *Eur J Pharmacol* **477**(2): 153-61.
- Thorpy, M. J. (2012). "Classification of sleep disorders." *Neurotherapeutics* **9**(4): 687-701.
- Totoson, P., W. Fhayli, G. Faury, I. Korichneva, S. Cachot, M. Baldazza, C. Ribuoat, J. L. Pepin, P. Levy and M. Joyeux-Faure (2013). "Atorvastatin protects against deleterious cardiovascular consequences induced by chronic intermittent hypoxia." *Exp Biol Med (Maywood)* **238**(2): 223-32.
- Troncoso Brindeiro, C. M., A. Q. da Silva, K. J. Allahdadi, V. Youngblood and N. L. Kanagy (2007). "Reactive oxygen species contribute to sleep apnea-induced hypertension in rats." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**(5): H2971-6.
- Trzebski, A., M. Tafil, M. Zoltowski and J. Przybylski (1982). "Increased sensitivity of the arterial chemoreceptor drive in young men with mild hypertension." *Cardiovasc Res* **16**(3): 163-72.
- Trzepizur, W., M. Le Vaillant, N. Meslier, T. Pigeanne, P. Masson, M. P. Humeau, A. Bizieux-Thaminy, F. Goupil, S. Chollet, P. H. Ducluzeau and F. Gagnadoux (2013). "Independent association between nocturnal intermittent hypoxemia and metabolic dyslipidemia." *Chest* **143**(6): 1584-9.
- Tsujita, K., H. Shimomura, K. Kaikita, H. Kawano, J. Hokamaki, Y. Nagayoshi, T. Yamashita, M. Fukuda, Y. Nakamura, T. Sakamoto, M. Yoshimura and H. Ogawa (2006). "Long-term efficacy of edaravone in patients with acute myocardial infarction." *Circ J* **70**(7): 832-7.
- Tuder, R. M., M. Chacon, L. Alger, J. Wang, L. Taraseviciene-Stewart, Y. Kasahara, C. D. Cool, A. E. Bishop, M. Geraci, G. L. Semenza, M. Yacoub, J. M. Polak and N. F. Voelkel (2001). "Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis." *J Pathol* **195**(3): 367-74.
- van Berlo, J. H., M. Maillet and J. D. Molkentin (2013). "Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart." *J Clin Invest* **123**(1): 37-45.
- van der Wal, A. C., A. E. Becker, C. M. van der Loos and P. K. Das (1994). "Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology." *Circulation* **89**(1): 36-44.
- Vasan, R. S., M. G. Larson, E. J. Benjamin, J. C. Evans and D. Levy (1997). "Left ventricular dilatation and the risk of congestive heart failure in people without myocardial infarction." *N Engl J Med* **336**(19): 1350-5.
- Vgontzas, A. N., R. S. Legro, E. O. Bixler, A. Grayev, A. Kales and G. P. Chrousos (2001). "Polycystic ovary syndrome is associated with obstructive sleep apnea and daytime sleepiness: role of insulin resistance." *J Clin Endocrinol Metab* **86**(2): 517-20.

- Villa, M. P., F. Ianniello, G. Tocci, M. Evangelisti, S. Miano, A. Ferrucci, G. M. Ciavarella and M. Volpe (2012). "Early cardiac abnormalities and increased C-reactive protein levels in a cohort of children with sleep disordered breathing." *Sleep Breath* **16**(1): 101-10.
- Vink, A., A. H. Schoneveld, D. Lamers, A. J. Houben, P. van der Groep, P. J. van Diest and G. Pasterkamp (2007). "HIF-1 alpha expression is associated with an atheromatous inflammatory plaque phenotype and upregulated in activated macrophages." *Atherosclerosis* **195**(2): e69-75.
- Virolainen, J., M. Ventila, H. Turto and M. Kupari (1995). "Effect of negative intrathoracic pressure on left ventricular pressure dynamics and relaxation." *J Appl Physiol* (1985) **79**(2): 455-60.
- Virolainen, J., M. Ventila, H. Turto and M. Kupari (1995). "Influence of negative intrathoracic pressure on right atrial and systemic venous dynamics." *Eur Heart J* **16**(9): 1293-9.
- Vuurmans, T. J., P. Boer and H. A. Koomans (2003). "Effects of endothelin-1 and endothelin-1 receptor blockade on cardiac output, aortic pressure, and pulse wave velocity in humans." *Hypertension* **41**(6): 1253-8.
- Walmsley, S. R., C. Print, N. Farahi, C. Peyssonnaud, R. S. Johnson, T. Cramer, A. Sobolewski, A. M. Condliffe, A. S. Cowburn, N. Johnson and E. R. Chilvers (2005). "Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity." *J Exp Med* **201**(1): 105-15.
- Wang, B., B. Yan, D. Song, X. Ye and S. F. Liu (2013). "Chronic intermittent hypoxia down-regulates endothelial nitric oxide synthase expression by an NF-kappaB-dependent mechanism." *Sleep Med* **14**(2): 165-71.
- Wang, C. X. and A. Shuaib (2007). "Neuroprotective effects of free radical scavengers in stroke." *Drugs Aging* **24**(7): 537-46.
- Wang, G. L., B. H. Jiang, E. A. Rue and G. L. Semenza (1995). "Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(12): 5510-4.
- Wang, G. L. and G. L. Semenza (1995). "Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1." *J Biol Chem* **270**(3): 1230-7.
- Wang, Y., M. S. Simonson, J. Pouyssegur and M. J. Dunn (1992). "Endothelin rapidly stimulates mitogen-activated protein kinase activity in rat mesangial cells." *Biochem J* **287** (Pt 2): 589-94.
- Wang, Z., A. Y. Li, Q. H. Guo, J. P. Zhang, Q. An, Y. J. Guo, L. Chu, J. W. Weiss and E. S. Ji (2013). "Effects of cyclic intermittent hypoxia on ET-1 responsiveness and endothelial dysfunction of pulmonary arteries in rats." *PLoS One* **8**(3): e58078.
- Weaver, T. E. and R. R. Grunstein (2008). "Adherence to continuous positive airway pressure therapy: the challenge to effective treatment." *Proc Am Thorac Soc* **5**(2): 173-8.
- Weber, C., R. Schmitt, H. Birnboeck, G. Hopfgartner, S. P. van Marle, P. A. Peeters, J. H. Jonkman and C. R. Jones (1996). "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the endothelin-receptor antagonist bosentan in healthy human subjects." *Clin Pharmacol Ther* **60**(2): 124-37.
- Weeks, K. L. and J. R. McMullen (2011). "The athlete's heart vs. the failing heart: can signaling explain the two distinct outcomes?" *Physiology (Bethesda)* **26**(2): 97-105.
- Wei, C. M., A. Lerman, R. J. Rodeheffer, C. G. McGregor, R. R. Brandt, S. Wright, D. M. Heublein, P. C. Kao, W. D. Edwards and J. C. Burnett, Jr. (1994). "Endothelin in human congestive heart failure." *Circulation* **89**(4): 1580-6.
- Weigand, L., J. T. Sylvester and L. A. Shimoda (2006). "Mechanisms of endothelin-1-induced contraction in pulmonary arteries from chronically hypoxic rats." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **290**(2): L284-90.
- Weinreich, G., T. E. Wessendorf, T. Erdmann, S. Moebus, N. Dragano, N. Lehmann, A. Stang, U. Roggenbuck, M. Bauer, K. H. Jockel, R. Erbel, H. Teschler and S. Mohlenkamp (2013). "Association of obstructive sleep apnoea with subclinical coronary atherosclerosis." *Atherosclerosis* **231**(2): 191-7.

- Weitzenblum, E. and A. Chaouat (2005). "Obstructive sleep apnea syndrome and the pulmonary circulation." *Ital Heart J* **6**(10): 795-8.
- Wetter, D. W., T. B. Young, T. R. Bidwell, M. S. Badr and M. Palta (1994). "Smoking as a risk factor for sleep-disordered breathing." *Arch Intern Med* **154**(19): 2219-24.
- Whitman, E. M., S. Pisarcik, T. Luke, M. Fallon, J. Wang, J. T. Sylvester, G. L. Semenza and L. A. Shimoda (2008). "Endothelin-1 mediates hypoxia-induced inhibition of voltage-gated K⁺ channel expression in pulmonary arterial myocytes." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **294**(2): L309-18.
- Wilkins, M. R., G. A. Paul, J. W. Strange, N. Tunariu, W. Gin-Sing, W. A. Banya, M. A. Westwood, A. Stefanidis, L. L. Ng, D. J. Pennell, R. H. Mohiaddin, P. Nihoyannopoulos and J. S. Gibbs (2005). "Sildenafil versus Endothelin Receptor Antagonist for Pulmonary Hypertension (SERAPH) study." *Am J Respir Crit Care Med* **171**(11): 1292-7.
- Willam, C., P. H. Maxwell, L. Nichols, C. Lygate, Y. M. Tian, W. Bernhardt, M. Wiesener, P. J. Ratcliffe, K. U. Eckardt and C. W. Pugh (2006). "HIF prolyl hydroxylases in the rat; organ distribution and changes in expression following hypoxia and coronary artery ligation." *J Mol Cell Cardiol* **41**(1): 68-77.
- Williams, A. L., L. Chen and S. M. Scharf (2010). "Effects of allopurinol on cardiac function and oxidant stress in chronic intermittent hypoxia." *Sleep Breath* **14**(1): 51-7.
- Wu, Y., H. Wang, D. L. Brautigan and Z. Liu (2007). "Activation of glycogen synthase in myocardium induced by intermittent hypoxia is much lower in fasted than in fed rats." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**(2): E469-75.
- Xia, Y., H. K. Choi and K. Lee (2012). "Recent advances in hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitors." *Eur J Med Chem* **49**: 24-40.
- Xia, Y., Y. Jin, N. Kaur, Y. Choi and K. Lee (2011). "HIF-1 α inhibitors: synthesis and biological evaluation of novel moracin O and P analogues." *Eur J Med Chem* **46**(6): 2386-96.
- Xu, W., L. Chi, B. W. Row, R. Xu, Y. Ke, B. Xu, C. Luo, L. Kheirandish, D. Gozal and R. Liu (2004). "Increased oxidative stress is associated with chronic intermittent hypoxia-mediated brain cortical neuronal cell apoptosis in a mouse model of sleep apnea." *Neuroscience* **126**(2): 313-23.
- Yamashita, K., D. J. Discher, J. Hu, N. H. Bishopric and K. A. Webster (2001). "Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia. Contributions of hypoxia-inducible factor-1, activator protein-1, GATA-2, AND p300/CBP." *J Biol Chem* **276**(16): 12645-53.
- Yamauchi, M., H. Nakano, J. Maekawa, Y. Okamoto, Y. Ohnishi, T. Suzuki and H. Kimura (2005). "Oxidative stress in obstructive sleep apnea." *Chest* **127**(5): 1674-9.
- Yanagisawa, M., H. Kurihara, S. Kimura, Y. Tomobe, M. Kobayashi, Y. Mitsui, Y. Yazaki, K. Goto and T. Masaki (1988). "A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells." *Nature* **332**(6163): 411-5.
- Yang, Z., T. Z. Zhao, Y. J. Zou, J. H. Zhang and H. Feng (2014). "Hypoxia Induces autophagic cell death through hypoxia-inducible factor 1 α in microglia." *PLoS One* **9**(5): e96509.
- Yeboah, J., S. Redline, C. Johnson, R. Tracy, P. Ouyang, R. S. Blumenthal, G. L. Burke and D. M. Herrington (2011). "Association between sleep apnea, snoring, incident cardiovascular events and all-cause mortality in an adult population: MESA." *Atherosclerosis* **219**(2): 963-8.
- Yim-Yeh, S., S. Rahangdale, A. T. Nguyen, A. S. Jordan, V. Novack, A. Veves and A. Malhotra (2010). "Obstructive sleep apnea and aging effects on macrovascular and microcirculatory function." *Sleep* **33**(9): 1177-83.
- Yokoe, T., K. Minoguchi, H. Matsuo, N. Oda, H. Minoguchi, G. Yoshino, T. Hirano and M. Adachi (2003). "Elevated levels of C-reactive protein and interleukin-6 in patients with obstructive sleep apnea syndrome are decreased by nasal continuous positive airway pressure." *Circulation* **107**(8): 1129-34.
- Yoon, M. H., M. Reriani, G. Mario, C. Rihal, R. Gulati, R. Lennon, J. M. Tilford, L. O. Lerman and A. Lerman (2013). "Long-term endothelin receptor antagonism attenuates coronary plaque progression in patients with early atherosclerosis." *Int J Cardiol* **168**(2): 1316-21.

- Yoshimoto, R., Y. Fujita, A. Kakino, S. Iwamoto, T. Takaya and T. Sawamura (2011). "The discovery of LOX-1, its ligands and clinical significance." *Cardiovasc Drugs Ther* **25**(5): 379-91.
- Young, T., L. Evans, L. Finn and M. Palta (1997). "Estimation of the clinically diagnosed proportion of sleep apnea syndrome in middle-aged men and women." *Sleep* **20**(9): 705-6.
- Young, T., L. Finn, P. E. Peppard, M. Szklo-Coxe, D. Austin, F. J. Nieto, R. Stubbs and K. M. Hla (2008). "Sleep disordered breathing and mortality: eighteen-year follow-up of the Wisconsin sleep cohort." *Sleep* **31**(8): 1071-8.
- Young, T., M. Palta, J. Dempsey, J. Skatrud, S. Weber and S. Badr (1993). "The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults." *N Engl J Med* **328**(17): 1230-5.
- Young, T., P. Peppard, M. Palta, K. M. Hla, L. Finn, B. Morgan and J. Skatrud (1997). "Population-based study of sleep-disordered breathing as a risk factor for hypertension." *Arch Intern Med* **157**(15): 1746-52.
- Young, T., P. E. Peppard and D. J. Gottlieb (2002). "Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective." *Am J Respir Crit Care Med* **165**(9): 1217-39.
- Yu, A. Y., L. A. Shimoda, N. V. Iyer, D. L. Huso, X. Sun, R. McWilliams, T. Beaty, J. S. Sham, C. M. Wiener, J. T. Sylvester and G. L. Semenza (1999). "Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1alpha." *J Clin Invest* **103**(5): 691-6.
- Yuan, G., J. Nanduri, C. R. Bhasker, G. L. Semenza and N. R. Prabhakar (2005). "Ca²⁺/calmodulin kinase-dependent activation of hypoxia inducible factor 1 transcriptional activity in cells subjected to intermittent hypoxia." *J Biol Chem* **280**(6): 4321-8.
- Yuan, G., J. Nanduri, S. Khan, G. L. Semenza and N. R. Prabhakar (2008). "Induction of HIF-1alpha expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca²⁺ signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR." *J Cell Physiol* **217**(3): 674-85.
- Yuan, X., Y. Deng, X. Guo, J. Shang, D. Zhu and H. Liu (2014). "Atorvastatin attenuates myocardial remodeling induced by chronic intermittent hypoxia in rats: partly involvement of TLR-4/MYD88 pathway." *Biochem Biophys Res Commun* **446**(1): 292-7.
- Yumino, D., S. Redolfi, P. Ruttanaumpawan, M. C. Su, S. Smith, G. E. Newton, S. Mak and T. D. Bradley (2010). "Nocturnal rostral fluid shift: a unifying concept for the pathogenesis of obstructive and central sleep apnea in men with heart failure." *Circulation* **121**(14): 1598-605.
- Zamarron-Sanz, C., J. Ricoy-Galbaldon, F. Gude-Sampedro and A. Riveiro-Riveiro (2006). "Plasma levels of vascular endothelial markers in obstructive sleep apnea." *Arch Med Res* **37**(4): 552-5.
- Zamarron, C., A. Riveiro and F. Gude (2011). "Circulating levels of vascular endothelial markers in obstructive sleep apnoea syndrome. Effects of nasal continuous positive airway pressure." *Arch Med Sci* **7**(6): 1023-8.
- Zile, M. R. and D. L. Brutsaert (2002). "New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part II: causal mechanisms and treatment." *Circulation* **105**(12): 1503-8.
- Zouki, C., C. Baron, A. Fournier and J. G. Filep (1999). "Endothelin-1 enhances neutrophil adhesion to human coronary artery endothelial cells: role of ET(A) receptors and platelet-activating factor." *Br J Pharmacol* **127**(4): 969-79.



Emmanuelle GRAS

mobile: +(33)6 85 54 04 22

emmanuelle.gras85@gmail.com

28 mai 1985

16 ch.de la Viotte - 38 700 La Tronche- FRANCE

Formation universitaire

Oct 2010- Oct 2014	Doctorat , Université de Grenoble Laboratoire Hypoxie et Physiopathologie cardiovasculaires et respiratoires (Inserm U1042) Altérations cardiaques et vasculaires induite par l'hypoxie intermittente : Rôle de HIF-1 et de l'un de ses gènes cibles l'endothéline
2010	Obtention d'un contrant doctorale de l'Université de Grenoble
2009-2010	Master 2 "Régulations Cardiovasculaires, Métaboliques et Nutritionnelles", Université de Lyon (Mention Bien)
2008-2009	Master 1 "Physiologie et Neurosciences", Université de Lyon (Mention AB)
2005-2008	Licence "Biologie Générale", Université de Grenoble (Mention AB)

Articles scientifiques

En révision	" <i>HIF-1 ans endothelin promote the inflammatory vascular remodeling induced by chronic intermittent hypoxia</i> " à Sleep
En révision	" <i>HIF-1 regulates myocardial function and remodeling in response to chronic exposure to intermittent hypoxia</i> " à J Appl Physiol
En révision	" <i>Novel therapeutic strategies for the treatment of sleep apnea-related cardiovascular complications</i> " à Pharmacology & Therapeutics

Communications Orales

- Sept 2014 En collaboration avec "Service de Nutrition-Pôle Cardiométabolisme", Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris
ERS 2014, Munich
"Chronic intermittent hypoxia induces features of non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and modifies adipose tissue characteristics in lean mice"
- Mai 2011 **Printemps de la cardiologie (Lyon) et P2T (Grenoble)**
Mars 2011 *"Caractérisation de remodelage cardiaque induit par l'hypoxie intermittente chronique chez la souris: rôle du facteur de transcription HIF-1 et de l'endothéline-1"*
Récompensé par le **Prix de thèse** de la "Société Française de pharmacologie et thérapeutique"

Communications affichées

- Avril 2014 **Printemps de la cardiologie (Strasbourg) et P2T (Poitiers)**
"Role of HIF-1 in the cardiac remodeling and inotropic effects of chronic intermittent hypoxia"
- Avril 2013 **Printemps de la cardiologie (Marseille)**
"Rôle du facteur de transcription HIF-1 dans l'apparition d'un remodelage aortique et cardiaque induit par une exposition à l'hypoxie intermittente "
- Mai 2012 **2012 ATS International Conference (San Francisco)**
"Characterization Of Vascular Remodeling Induced By Chronic Intermittent Hypoxia In Mice: Involvement Of The HIF-1 Transcription Factor And Of Endothelin-1"
- Avril 2012 **Printemps de la cardiologie (Bordeaux) et P2T (Dijon)**
"Implication du facteur de transcription HIF-1 et de l'endothéline-1 dans l'apparition de l'inflammation systémique et du remodelage vasculaire induits par l'hypoxie intermittente chronique"

Techniques utilisées

- Expérimentation Animale **Niveau 1** en expérimentation animale
Techniques sur souris vigiles (prise de sang, gavage, injection intrapéritonéale), prélèvements d'organes divers, mesure de pression artérielle par plétysmographie, utilisation de sonde Millar intracardiaque, ischémie/reperfusion globale et régionale *in vitro*.

Biologie	Extraction de protéines (cytoplasmique et nucléaires) et d'ARN, western-blot, RT- qPCR,
Moléculaire - Biochimie	immunohistochimie.

Activités d'enseignement

2013-2014	Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche , Faculté de Pharmacie de Grenoble : 96h/an (mi-temps)
2010-2013	Doctorant Contractuel Enseignant , Faculté de Pharmacie de Grenoble : 64h/an Cours magistraux en physiologie ("Insuffisance cardiaque" pour L2 et "Ethique et expérimentation animale" pour des L3) Travaux dirigés en physiologie (Analyse d'articles scientifiques) (niveaux L2, L3 et M1) Travaux pratiques en physiologie (ECG, histologie (niveaux L2 et L3))
2012	Eveil aux sciences en école primaire avec le programme ASTEP "Apprentissages des 5 cinq sens" Construction de 5 ateliers de 2h

Stage de recherche

2009-2010	Stage 10 mois , Laboratoire HP2, Inserm U1042, Grenoble <i>"Implication du facteur de transcription HIF-1 dans le remodelage cardiaque induit par l'hypoxie intermittente"</i>
2009	Stage de 6 semaines , Laboratoire HP2, Inserm U1042, Grenoble <i>"Etude par immunofluorescence de l'expression des récepteurs à l'endothéline dans l'aorte de souris soumises à l'hypoxie intermittente"</i>
2008	Stage volontaire d'observation de 4 semaines , Laboratoire radiopharmaceutiques biocliniques, Inserm U877, Grenoble <i>Ce laboratoire s'attache à développer des radiopharmaceutiques</i>

Divers

Anglais scientifique
Permis B
Prévention et secourisme civique de niveau 1 (2013)
Course à pied