



HAL
open science

Syndrome d'apnées obstructives du sommeil et risque cardiovasculaire : rôle du tissu adipeux viscéral dans les troubles métaboliques et l'athérosclérose induits par l'hypoxie intermittente

Laureline Poulain

► **To cite this version:**

Laureline Poulain. Syndrome d'apnées obstructives du sommeil et risque cardiovasculaire : rôle du tissu adipeux viscéral dans les troubles métaboliques et l'athérosclérose induits par l'hypoxie intermittente. Physiologie [q-bio.TO]. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GRENV076 . tel-01555479

HAL Id: tel-01555479

<https://theses.hal.science/tel-01555479v1>

Submitted on 4 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

Laureline POULAIN

Thèse dirigée par le **Pr. Maurice DEMATTEIS**
codirigée par le **Dr. Claire ARNAUD**

préparée au sein du **Laboratoire HP2 – Inserm U1042**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Syndrome d'Apnées Obstructives du Sommeil et risque cardiovasculaire : rôle du tissu adipeux viscéral dans les troubles métaboliques et l'athérosclérose induits par l'hypoxie intermittente

Thèse soutenue publiquement le 17 décembre 2013
devant le jury composé de :

M Christophe Ribuot

PU, Université de Grenoble, Président

M Magnus Bäck

PU, Karolinska Institutet, Rapporteur

M Frédéric Roche

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

Mme Carmen Martinez

DR CNRS, UFR de Médecine, Université d'Angers, Examineur

Mme Claire Arnaud

CR Inserm, Université de Grenoble, Co-directrice

M Maurice Dematteis

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



Laboratoire Hypoxie-Physiopathologies cardiovasculaires et respiratoires (HP2)

INSERM U1042 / Université Joseph Fourier

Faculté de Médecine-Pharmacie

BP 170

38042 GRENOBLE Cedex 9

<http://hp2.ujf-grenoble.fr/>



Je tiens à remercier très sincèrement,

Monsieur le Professeur **Christophe Ribuot**, de m'avoir fait l'honneur de présider cette soutenance de thèse. Je le remercie également pour son accueil chaleureux au sein de l'équipe fondamentale du laboratoire HP2. *Cheers !*

Messieurs les Professeurs **Magnus Bäck** et **Frédéric Roche**, d'avoir accepté de juger ce manuscrit de thèse en qualité de rapporteurs. Je les remercie de leur regard éclairé et leurs remarques constructives apportés à mes résultats expérimentaux. Je leur adresse ma profonde considération.

Madame le Docteur **Carmen Martinez**, d'avoir apporté son expérience en jugeant également ces travaux de thèse. Je lui adresse ma profonde considération.

Monsieur le Professeur **Maurice Dematteis**, d'avoir initié et dirigé cette thèse. Je le remercie pour la pertinence et la richesse de ses idées scientifiques, qui ont largement contribué à l'originalité de ces travaux de thèse. Je le remercie pour l'ensemble des opportunités qu'il m'a offertes, en particulier les nombreuses collaborations qui ont rendu cette expérience très enrichissante.

Madame le Docteur **Claire Arnaud**, d'avoir encadré cette thèse durant ces années 4 (longues) années. Je la remercie de m'avoir accueillie dès mon Master 1, pour la confiance qu'elle m'a témoignée dès mon arrivée, et qui m'a convaincue de poursuivre encore un peu en Master 2, puis en Thèse... Je la remercie pour son soutien incontestable, l'autonomie qu'elle m'a accordée et l'expérience dont elle m'a fait bénéficier au cours de mes travaux de recherche. La rédaction du manuscrit a été un peu laborieuse, *but I dit it !* Merci pour ce bout de chemin parcouru ensemble (6 ans, quand même... !). Ca, c'est fait !

Mes remerciements vont également,

Aux différents collaborateurs avec qui j'ai eu l'honneur de travailler durant toutes ces années :

Madame le Docteur **Alexandra Malgoyre**, de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées, pour son aide et sa disponibilité lors de la mise au point de la technique de lipolyse *ex vivo*.

Mesdames le Docteur **Jennifer Rieusset** et **Annie Durand**, du laboratoire CarMeN à Lyon, pour le temps qu'elles m'ont accordé durant toutes les manip de RT-PCR.

Monsieur le Professeur **Louis Casteilla** et Madame **Emmanuelle Arnaud**, du laboratoire STROMALab à Toulouse, pour la grande pertinence de leur réflexion scientifique et leur aide pour les dosages en RT-PCR.

Madame le Docteur **Chantal Rémy** et Monsieur le Docteur **Hervé Mathieu**, de l'Institut des Neurosciences de Grenoble, pour m'avoir permise de réaliser des acquisitions en IRM chez mes souris.

Monsieur le Docteur **Vincent Richard** et Madame **Laetitia Guedin**, de l'unité Inserm U1096 à Rouen, pour m'avoir permise de bénéficier de souris *knock-out* pour le récepteur TLR-4.

A tous les membres du laboratoire HP2 :

Manue, Amandine, Marielle, Jessica, mes co-thésardes. Merci à toutes pour votre aide dans les manip, votre soutien dans les moments de « craquage » et pour cette bonne ambiance dans le bureau des étudiants. Les repas crêpes/de Noël/de fin d'année vont me manquer. Courage, le plus dur reste à faire !

Monique, co-thésarde aussi, mais paumée à Sud ! Heureusement que l'on se retrouvait lors des séminaires HP2. Bon courage pour la suite !

Mélanie, Sylvain, ce fut court mais fort sympathique. On se croiera bien un jour, même si c'est pour s'occuper du chat... Profitez bien de votre nouvelle vie à 3 !

Marion, je te souhaite tout le meilleur pour la suite. Plein d'épanouissement, à la fois professionnel et personnel. Profite bien de ta future nouvelle vie à 3 !

Sandrine, Emeline et Marie, merci pour votre précieuse aide technique et logistique. Toutes les manip réalisées au cours de cette thèse n'auraient pas été possibles sans vous. Je veux dire, elles n'auraient VRAIMENT pas été possibles sans vous...

Dominique, puis **Audrey**, merci pour votre aide et surtout votre patience lors des commandes de dernière minute... Comment ça, ya (déjà) plus d'sous ?!

Et tous les autres, qui participent à la bonne ambiance qui règne au sein de cette équipe. Ces années de thèse ont été très riches, à la fois sur le plan scientifique, mais également humain. C'est une page qui se tourne, non sans émotion...

A tous les membres de ma famille (et assimilés...) :

Clément, maintenant la quantification des volumes de tissu adipeux par IRM n'a plus de secret pour nous ! Je te dois aussi aussi le sommaire de ce manuscrit...

Amélie, même si la version définitive est (très) loin de celle que je t'ai soumise initialement, ta première relecture a été indispensable.

Camille, Papa, Maman, moi qui ne suis jamais très loquace sur mon travail, en voici un petit résumé... Bonne lecture !

Je vous remercie pour tous les bons moments que l'on passe ensemble. Malgré tout, il est plus facile d'écrire 200 pages sur les vaisseaux et le gras, que d'exprimer en quelques mots toute l'affection et le respect que l'on porte à ses proches.

A mes grands-parents.

RESUME

Syndrome d'Apnées Obstructives du Sommeil et risque cardiovasculaire : rôle du tissu adipeux viscéral dans les troubles métaboliques et l'athérosclérose induits par l'hypoxie intermittente

Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) est un problème de santé publique par sa prévalence dans la population générale (5-20%) et ses nombreuses complications métaboliques et cardiovasculaires. La répétition des apnées génère une hypoxie intermittente (HI) considérée comme le facteur principal responsable de cette morbidité cardiovasculaire dont l'athérosclérose. Cependant les mécanismes physiopathologiques sont peu connus. De nombreux arguments évoquent l'implication de la graisse blanche viscérale notamment *via* la sécrétion de médiateurs inflammatoires. Les objectifs de notre travail ont été d'étudier les altérations du tissu adipeux viscéral induites par l'HI, et leurs relations avec les atteintes métaboliques et vasculaires causées par l'HI à l'aide d'un modèle animal d'apnées du sommeil (modèle murin d'HI). Nos travaux confirment l'effet délétère de l'HI dans les atteintes métaboliques et vasculaires pré-athérosclérotique et athérosclérotique, notamment à travers une inflammation impliquant les récepteurs TLR-4. En dehors de toute obésité, l'HI entraîne des modifications majeures du tissu adipeux viscéral (remodelages morphologique et inflammatoire, redistribution territoriale) qui contribuent à l'inflammation et aux atteintes métaboliques et vasculaires causées par l'HI. Ainsi nos résultats précisent les mécanismes physiopathologiques des conséquences associées au SAOS, et suggèrent que la correction de l'inflammation pourrait constituer une approche thérapeutique supplémentaire pour les patients apnéiques.

Mots-clés : syndrome d'apnées obstructives du sommeil, hypoxie intermittente, athérosclérose, troubles métaboliques, tissu adipeux viscéral, inflammation

ABSTRACT

Obstructive Sleep Apnea Syndrome and cardiovascular risk: role of visceral adipose tissue in the IH-induced metabolic dysfunctions and atherosclerosis

Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) is a public health problem due to its frequency in general population (5 to 20%) and its numerous metabolic and cardiovascular complications. Repetitive apneas lead to intermittent hypoxia (IH), which is the determinant factor for the OSAS-related cardiovascular morbidity, including atherosclerosis. However the pathophysiology mechanisms are unclear. There are growing evidences suggesting a role for visceral white adipose tissue, in particular through the inflammatory mediator secretion. This project aimed to assess the IH-induced alterations of visceral adipose tissue, and to study the causal relationship of these fat alterations with the IH-induced metabolic dysfunctions and vascular remodeling thanks to an animal model of OSAS (murine model of IH). These results confirm the deleterious effects of IH on pre-atherosclerotic and atherosclerotic vascular remodeling, especially through inflammation involving TLR-4. Without any obesity, IH induces both important structural and functional changes of visceral adipose tissue that are, in part, involved in inflammation and in IH-related metabolic and vascular alterations. These results bring new insight into the pathophysiology of OSAS-associated consequences, and suggest that correcting visceral adipose tissue inflammation could provide further therapeutic options for OSA patients.

Key words: obstructive sleep apnea syndrome, intermittent hypoxia, atherosclerosis, metabolic dysfunctions, visceral adipose tissue, inflammation

Première partie : contexte bibliographique	12
1. LE SYNDROME D'APNEES OBSTRUCTIVES DU SOMMEIL OU SAOS	13
1.1. <i>Définition et physiopathologie du SAOS.....</i>	14
1.2. <i>Traitements actuels du SAOS.....</i>	19
▪ Pression Positive Continue (PPC) nocturne.....	19
▪ Mesures hygiéno-diététiques.....	19
▪ Traitements mécanique et chirurgical.....	20
▪ Traitements pharmacologiques du SAOS.....	21
1.3. <i>Morbidité et mortalité cardiovasculaire.....</i>	23
▪ SAOS et dysfonction endothéliale.....	23
▪ SAOS et hypertension artérielle.....	24
▪ SAOS et remodelage vasculaire.....	25
▪ SAOS et maladies coronariennes.....	26
▪ SAOS et dysfonctions cardiaques.....	27
2. MECANISMES DES CONSEQUENCES VASCULAIRES ASSOCIEES AU SAOS	29
2.1. <i>Processus athérogène</i>	30
▪ Remodelage précoce (pré-athérosclérose).....	30
▪ Remodelage tardif (athérosclérose).....	30
2.2. <i>Altérations hémodynamiques</i>	33
▪ Hypersensibilité des chémorécepteurs et hyperactivité sympathique.....	33
▪ Altération de la vasodilatation.....	34
▪ Altération de la vasoconstriction.....	35
▪ Troubles de l'hémostase et microparticules.....	36
2.3. <i>Inflammation de bas grade</i>	39
▪ Inflammation systémique.....	39
▪ Voie de l'acide arachidonique.....	41
▪ Inflammation vasculaire.....	42
2.4. <i>Altérations métaboliques</i>	44
▪ Dysfonctions du métabolisme glucidique.....	44
▪ Dysfonctions du métabolisme lipidique.....	49
3. TISSU ADIPEUX VISCERAL ET ALTERATIONS METABOLIQUES ET VASCULAIRES LIEES AU SAOS	53
3.1. <i>Le tissu adipeux.....</i>	54
▪ Tissu adipeux blanc.....	54
▪ Tissu adipeux brun.....	56
3.2. <i>Dysfonctions du tissu adipeux viscéral et altérations métaboliques et vasculaires ..</i>	59
▪ Tissu adipeux et équilibre glucido-lipidique.....	59
▪ Inflammation du tissu adipeux viscéral.....	60
▪ Dysfonctions du tissu adipeux viscéral et remodelage vasculaire.....	62
3.3. <i>Dysfonctions du tissu adipeux viscéral et conséquences métaboliques et vasculaires au cours du SAOS.....</i>	65
▪ Contribution relative de l'obésité et du SAOS dans la pathologie apnéique.....	65
▪ Hypoxie du tissu adipeux chez les patients apnéiques obèses : rôle de l'hypoxie intermittente.....	66
▪ Effet de l'hypoxie intermittente sur le tissu adipeux viscéral.....	67
▪ Implication du tissu adipeux viscéral dans l'athérosclérose associée à l'hypoxie intermittente.....	68

Deuxième partie : travaux de thèse	69
1. OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE	70
2. MATERIEL ET METHODES	73
2.1. <i>Souches de souris utilisées</i>	74
▪ Souris C57Bl6.....	74
▪ Souris ApoE ^{-/-}	75
▪ Souris TLR-4 ^{-/-}	75
2.2. <i>Modèle murin de SAOS</i>	76
2.3. <i>Effet de l'hypoxie intermittente sur le tissu adipeux blanc : approche IRM</i>	79
2.4. <i>Dysfonctions métaboliques associées à l'hypoxie intermittente</i>	81
▪ Métabolisme lipidique	81
▪ Métabolisme glucidique.....	82
2.5. <i>Inflammation systémique</i>	85
2.6. <i>Implication du tissu adipeux viscéral dans les atteintes métaboliques et vasculaires associées à l'hypoxie intermittente</i>	86
3. TRAVAUX EXPERIMENTAUX.....	87
3.1. <i>Rôle de l'inflammation dans le remodelage vasculaire associé à l'hypoxie intermittente</i>	88
▪ Publication n°1 : L'inflammation contribue à l'effet athérogène de l'hypoxie intermittente chez des souris ApoE ^{-/-}	88
3.2. <i>Implication du tissu adipeux viscéral dans le remodelage vasculaire associé à l'hypoxie intermittente</i>	98
▪ Publication n°2 : Le remodelage du tissu adipeux viscéral contribue à l'athérogenèse induite par l'hypoxie intermittente.....	98
▪ Effet de l'hypoxie intermittente sur le tissu adipeux sous-cutané	125
3.3. <i>Effet de l'hypoxie intermittente sur la distribution topographique du tissu adipeux blanc</i>	131
▪ Publication n°3 : Les modifications de l'homéostasie glucidique sont accompagnées de modifications de la répartition adipeuse après une exposition à l'hypoxie intermittente	131
3.4. <i>Travail n°4 : Rôle de la voie TLR-4/NFκB dans les altérations métaboliques et vasculaires induites par l'hypoxie intermittente</i>	153
4. DISCUSSION DES RESULTATS	173
4.1. <i>Pertinence du modèle au regard de la pathologie humaine</i>	175
4.2. <i>Résultats expérimentaux et liens physiopathologiques avec le SAOS</i>	179
▪ Remodelage vasculaire associé à l'hypoxie intermittente	179
▪ Hypoxie intermittente et remodelage du tissu adipeux viscéral	180
▪ Désordres métaboliques induits par l'hypoxie intermittente	184
▪ Rôle spécifique du tissu adipeux viscéral dans les altérations métaboliques et vasculaires associées à l'hypoxie intermittente.....	185
4.3. <i>Remodelage du tissu adipeux viscéral et perspectives thérapeutiques pour le patient SAOS</i>	188
▪ Morphologie et distribution du tissu adipeux viscéral.....	188
▪ Inflammation du tissu adipeux viscéral	190
5. CONCLUSION GENERALE	192
Références bibliographiques	194
ANNEXE (Curriculum Vitae détaillé)	219

LISTE DES ABREVIATIONS

AA	acide arachidonique	RANTES/CCL-5	<i>Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted / C-C Chemokine Ligand-5</i>
Angptl-4	<i>angiopoietin like-4</i>	RE	réticulum endoplasmique
BCA	<i>bicinchronic acid</i>	RLO	radicaux libres de l'oxygène
CCL-2	<i>C-C chemokine ligand-2</i>	RPLP-0	ribosomal protein, large, P0
CML	cellules musculaires lisses	SAOS	syndrome d'apnées obstructives du sommeil
COX	cyclooxygénase	SCD-1	stearoyl coenzyme A desaturase-1
CRP	<i>C-reactive protein</i>	SpO ₂	saturation en oxygène
FLAP	<i>5-lipoxygenase activating protein</i>	SREBP-1	<i>sterol regulatory element-binding proteins-1</i>
EIM	épaisseur intima-média	TBP	<i>tatabox binding protein</i>
ET-1	endothéline-1	TLR-4	<i>toll-like receptor-4</i>
FMD	<i>flow-mediated dilatation</i>	TNF- α	<i>tumor necrosis factor-α</i>
GLUT-4	<i>glucose transporter-4</i>	TZD	thiazolidinediones
HDL	<i>high density lipoprotein</i>	UCP-1	<i>uncoupling protein-1</i>
HI	hypoxie intermittente	VAS	voies aériennes supérieures
HIF-1 α	<i>hypoxia inductible factor-1α</i>	VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
HOMA-IR	<i>homeostasis model assessment for insulinoreistance</i>		
Hoxc-9	<i>homeobox c-9</i>		
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>		
HTA	hypertension artérielle		
IAII	index d'apnées-hypopnées		
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>		
IER	indice d'évènements respiratoires		
IL-6	interleukine-6		
IMC	indice de masse corporelle		
I ρ ITT	<i>intraperitoneal insulin tolerance test</i>		
IRM	imagerie par résonance magnétique		
IRS	<i>insulin receptor substrat</i>		
LDL	<i>low density lipoprotein</i>		
LPL	lipoprotéine lipase		
LTA ₄ H	leucotriène-A ₄ hydrolase		
LTs	leucotriènes		
MCP-1	<i>monocytes chemoattractant protein-1</i>		
MDA	malondialdéhyde		
NF κ B	<i>nuclear factor κB</i>		
PAI-1	<i>plasminogen activator inhibitor-1</i>		
PaO ₂	pression artérielle en oxygène		
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>		
PFA	paraformaldéhyde		
PGC1- α	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1α</i>		
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>		
PPC	pression positive continue		
PtiO ₂	pression partielle tissulaire en oxygène		

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** Illustration des différentes forces qui s'exercent sur les voies aériennes supérieures.
- Figure 2.** Différents stades de sévérité des événements respiratoires selon le degré de collapsus pharyngé.
- Figure 3.** Exemple schématique d'un tracé polysomnographique d'un patient présentant un syndrome d'apnées obstructives du sommeil.
- Figure 4.** Représentation schématique des trois principaux mécanismes à l'origine de l'athérogénèse associée à l'hypoxie intermittente.
- Figure 5.** Schéma des mécanismes intermédiaires reliant SAOS à l'intolérance au glucose, l'insulino-résistance et au diabète de type 2.
- Figure 6.** Schéma des principaux mécanismes par lesquels l'hypoxie intermittente entraîne un déséquilibre du métabolisme lipidique.
- Figure 7.** Classification schématique des différents compartiments du tissu adipeux blanc profond viscéral.
- Figure 8.** Coupes immunohistochimiques d'un dépôt de tissu adipeux brun (*Brown Adipose Tissue*, BAT) et d'un dépôt de tissu adipeux blanc sous-cutané (*White Adipose Tissue*, WAT) dans une zone où les deux tissus se côtoient. Les adipocytes bruns multiloculaires et exprimant UCP-1 (en haut), ainsi que les adipocytes blancs uniloculaires et n'exprimant pas UCP-1 (en bas), sont visibles.
- Figure 9.** Schéma de l'interaction macrophages-adipocytes à l'origine des altérations du tissu adipeux au cours de l'obésité.
- Figure 10.** Représentation schématique du lien entre la dysfonction de l'adipocyte blanc liée à l'obésité et le processus athérogène.
- Figure 11.** Représentation schématique du rôle des altérations du tissu adipeux viscéral induites par l'hypoxie intermittente dans l'athérogénèse associée à l'hypoxie intermittente.
- Figure 12.** Dispositif d'hypoxie intermittente mimant le SAOS chez la souris.
- Figure 13.** Résumé des résultats décrits dans l'article n°1.
- Figure 14.** Résumé des résultats décrits dans l'article n°2.
- Figure 15.** Surface adipocytaire (A) et expression adipeuse de UCP-1 (B) au niveau sous-cutané de souris ApoE^{-/-} sham exposées à l'hypoxie intermittente (HI) ou à la normoxie (N).

Figure 16. Sécrétion de TNF- α (A) et d'IL-6 (B) par le tissu adipeux sous-cutané de souris ApoE^{-/-} sham exposées à l'hypoxie intermittente (HI) ou à la normoxie (N).

Figure 17. Infiltrat macrophagique (A), et expression adipeuse de PAI-1 (B) et de MCP-1 (C) au niveau sous-cutané de souris ApoE^{-/-} sham exposées à l'hypoxie intermittente (HI) ou à la normoxie (N).

Figure 18. Surface adipocytaire (A) et expression adipeuse de UCP-1 (B) au niveau sous-cutané de souris ApoE^{-/-} sham ou lipectomisées, exposées à l'hypoxie intermittente (HI) ou à la normoxie (N).

Figure 19. Expression adipeuse de PAI-1 (A) et de MCP-1 (B) au niveau sous-cutané de souris ApoE^{-/-} sham ou lipectomisées exposées à l'hypoxie intermittente (HI) ou à la normoxie (N).

Figure 20. Infiltrat macrophagique au niveau sous-cutané de souris ApoE^{-/-} sham ou lipectomisées exposées à l'hypoxie intermittente (HI) ou à la normoxie (N).

Figure 21. Résumé des résultats décrits dans l'article n°3.

Figure 22. Résumé des résultats décrits dans le travail n°4.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Critères de diagnostic du SAOS.

Tableau 2. Principaux facteurs sécrétés dans les deux compartiments adipeux, viscéral et sous-cutané.

Tableau 3. Résumé des paramètres d'acquisition des 4 études expérimentales de référence pour l'étude IRM.

Tableau 4. Tableau récapitulatif des dosages par RT-PCR en temps réel d'adipokines pro- et anti-inflammatoires au niveau épидидymal et sous-cutané de souris ApoE^{-/-} *sham* exposées à l'hypoxie intermittente (HI) ou à la normoxie (N).

Première partie : contexte bibliographique

1. Le Syndrome d'Apnées Obstructives du Sommeil ou SAOS

1.1. Définition et physiopathologie du SAOS

Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) est un trouble du sommeil dont la prévalence est comparable à celle de l'asthme. Ce syndrome touche 4 à 6% des adultes d'âge moyen, et jusqu'à 20% de la population d'âge plus avancé (392). La fréquence de la morbi-mortalité cardiovasculaire, ainsi que l'altération de la qualité de vie font de ce syndrome un réel problème de santé publique.

Le SAOS correspond à la survenue durant le sommeil de collapsus pharyngés partiels ou complets répétés, responsables d'interruptions (apnées) ou de réduction significative (hypopnées) de la ventilation. Lors de l'inspiration, les muscles inspiratoires (principalement le diaphragme) se contractent et créent une pression négative. L'air est entraîné dans les poumons par le conduit des voies aériennes supérieures (VAS) au niveau du pharynx, qui ont alors tendance à se collaber. En effet, les VAS ne sont constituées d'aucune structure rigide, offrant ainsi une grande susceptibilité à la déformation. La perméabilité du pharynx est normalement maintenue par la contraction des muscles dilatateurs du pharynx, qui réagissent à différents stimuli : mécaniques (pression négative dans les VAS, volume pulmonaire) et chimiques (hypoxie, hypercapnie). Le collapsus apparaît lorsqu'il y a déséquilibre entre la force générée par la contraction des muscles dilatateurs du pharynx et la pression inspiratoire négative (figure 1). Cette dynamique des forces peut être modifiée par différents facteurs : le rétrécissement anatomique des VAS (anomalies faciales ou des tissus mous, obésité), l'augmentation de la compliance du pharynx ou encore la perte d'efficacité des muscles dilatateurs du pharynx (benzodiazépines, alcool). La perte du stimulus d'éveil au cours du sommeil entraîne une baisse de l'activité musculaire et participe ainsi à l'apparition du collapsus pharyngé.

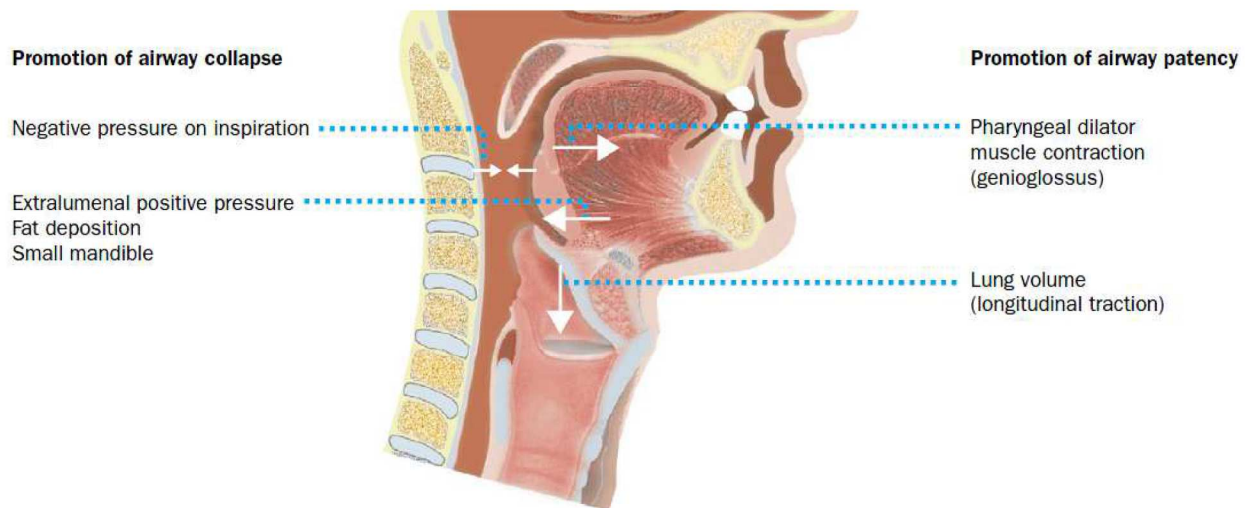


Figure 1. Illustration des différentes forces qui s'exercent sur les voies aériennes supérieures. D'après Malhotra *et al*, 2002 (189).

Les apnées (figure 2) sont définies par une cessation totale du débit aérien pendant au moins 10 secondes, et sont dites obstructives lorsqu'elles sont accompagnées d'une persistance d'efforts respiratoires (9) (313). Les hypopnées (figure 2), quant à elles, sont définies par :

- une réduction d'au moins 50% du flux aérien pendant au moins 10 secondes, par rapport à une période de référence stable (état de veille précédant l'endormissement, ou période précédant l'évènement respiratoire) ;

ou

- une diminution « significative » de la ventilation, associée à une diminution de la saturation artérielle en oxygène de plus de 3% par rapport à une période de référence stable et/ou à un micro-éveil.

Une réduction de moins de 50% du flux aérien est appelée « limitation du débit inspiratoire ».

La comptabilisation des évènements respiratoires permet de calculer 2 indices :

- l'indice d'apnées-hypopnées (IAH), défini par le nombre d'apnées et d'hypopnées par heure de sommeil ou d'enregistrement.

- l'indice d'évènements respiratoires (IER), défini par le nombre d'évènements respiratoires (apnées, hypopnées et limitation du débit inspiratoire) par heure de sommeil ou d'enregistrement.

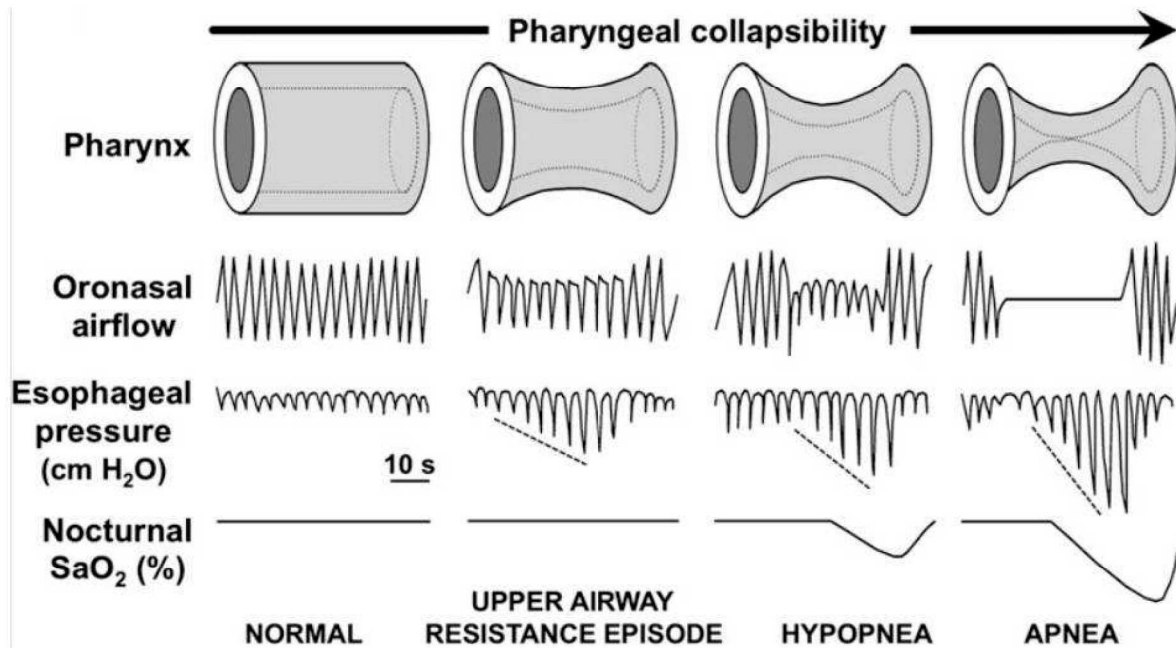


Figure 2. Différents stades de sévérité des évènements respiratoires selon le degré de collapsus pharyngé. D'après Dematteis *et al*, 2009 (68).

La principale manifestation clinique du SAOS est la somnolence diurne excessive liée à la perturbation du sommeil par les nombreux micro-éveils induits par les évènements respiratoires. Il existe d'autres symptômes tels que les ronflements, les céphalées matinales, l'asthénie ou la diminution de la libido, qui sont souvent sous estimés par le patient. L'entourage joue un rôle important dans la suspicion du syndrome puisque les apnées du ronfleur sont, dans la plupart des cas, détectés par le conjoint.

Le SAOS se définit par l'association de signes cliniques et d'anomalies respiratoires nocturnes en nombre supérieur à 5 par heure de sommeil.

A. Hypersomnolence diurne

B. Au moins 2 des symptômes suivants :

- Sommeil non récupérateur
- Sensation d'étouffements nocturnes
- Eveils multiples
- Fatigue
- Trouble de la concentration

C. Plus de 5 évènements obstructifs par heure de sommeil, en polysomnographie ou polygraphie de ventilation

Tableau 1. Critères de diagnostic du SAOS.

Le diagnostic du SAOS est posé lorsque le critère A et/ou le critère B sont présents en association avec le critère C (tableau 1). Les événements respiratoires sont objectivés par un enregistrement polysomnographique réalisé au cours du sommeil (figure 3). La polysomnographie permet de mettre en évidence les trois composantes majeures du SAOS, à savoir les modifications de pression intra-thoracique, la fragmentation du sommeil et les cycles de saturation et désaturation en oxygène (hypoxie intermittente).

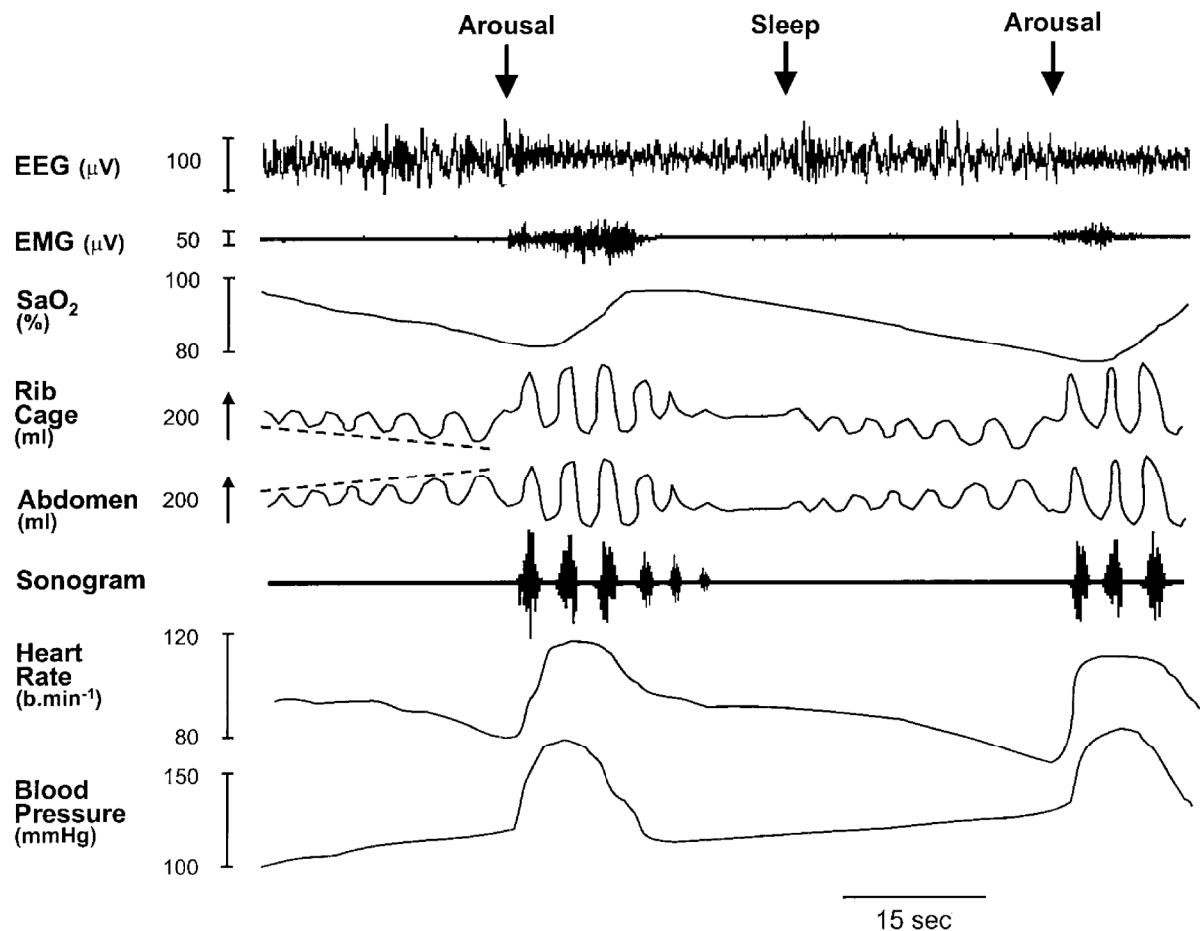


Figure 3. Exemple schématique d'un tracé polysomnographique d'un patient présentant un syndrome d'apnées obstructives du sommeil. EEG : électroencéphalogramme ; EMG : électromyogramme ; SaO₂ : saturation en oxygène. D'après Thompson *et al.*, 2001 (353).

Chaque obstruction pharyngée s'accompagne d'une désaturation de l'oxyhémoglobine artérielle, d'efforts respiratoires de lutte contre l'obstruction des VAS, et enfin d'un micro-éveil salvateur de très courte durée (environ 3 secondes) qui permet la reprise ventilatoire ainsi que la réoxygénation sanguine, mais qui entraîne une fragmentation du sommeil (figure 3). Chaque apnée provoque donc un défaut d'oxygénation sanguine et un défaut d'évacuation

du gaz carbonique. Comme l'hypoxie, l'hypercapnie entraîne une excitation des centres respiratoires et du système sympathique. Cette stimulation participe à l'augmentation de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle, ainsi qu'à la sécrétion hormonale surrénalienne observées chez les patients apnéiques.

Les phénomènes d'hypoxie intermittente (HI) et de fragmentation du sommeil ont de nombreuses conséquences neuropsychologiques et cardiovasculaires. La désorganisation du sommeil caractéristique du SAOS impacte fortement la qualité de vie des patients apnéiques (352). Bien que de grande importance en terme de santé publique, les conséquences associées aux différents troubles cognitifs ne seront pas abordées dans ce manuscrit. L'HI apparaît comme la composante majeure du SAOS en termes de répercussions métaboliques et cardiovasculaires. Les modèles murins du SAOS – principalement les animaux exposés à une HI – confirment le rôle délétère de la composante hypoxique dans le remodelage vasculaire pré-athérosclérotique et athérosclérotique associé au SAOS (68).

1.2. Traitements actuels du SAOS

▪ Pression Positive Continue (PPC) nocturne

Actuellement, le traitement de référence est la pression positive continue (PPC) (338) (29). La PPC consiste à l'application de façon continue d'une pression supérieure à la pression atmosphérique grâce à un masque nasal. La PPC constitue une sorte d'attelle pneumatique permettant le maintien des VAS ouvertes. Le niveau de pression efficace est déterminé individuellement lors de l'instauration du traitement. La PPC réduit voire supprime les anomalies respiratoires, normalise les valeurs de saturation en oxygène, et permet une amélioration des fonctions neurocognitives (88) (398), ainsi qu'une prévention du risque cardiovasculaire (195) (72). La qualité de vie est améliorée chez 80 à 100% des patients observants. Malgré une efficacité prouvée, l'observance de ce traitement demeure un réel problème (8). En effet, pour des raisons de mauvaise tolérance (assèchement de la muqueuse oropharyngée, bruit, irritation locale liée au port du masque, rhinorrhée, conjonctivite liée à des fuites au masque), et de par l'aspect contraignant du port de l'appareil, le taux de patients qui acceptent d'utiliser à long terme la PPC est de 65 à 80% (249) (248).

▪ Mesures hygiéno-diététiques

Des mesures hygiéno-diététiques sont couramment proposées aux patients apnéiques présentant une surcharge pondérale puisque l'obésité constitue un des facteurs de risque le plus important du SAOS (393) et qu'il augmente significativement sa prévalence (392). L'objectif de cette approche thérapeutique est donc de diminuer la masse grasseuse, grâce à la mise en place de régimes alimentaires, ou bien d'exercice physique. Les résultats obtenus à partir de l'étude de la cohorte multicentrique *Sleep Heart Health Study* réalisée chez 2968 personnes (1342 hommes, 1626 femmes) montre qu'il existe un lien entre la modification du poids et la modification de la sévérité du SAOS, évaluée par l'IAH (226). Malgré des résultats confirmant ces données (251) (379), l'efficacité sur le long-terme de la perte de poids chez les patients apnéiques reste encore à déterminer, dans la mesure où ces régimes sévères sont souvent difficiles à mettre en œuvre. De plus, cette option thérapeutique ne concerne que les patients apnéiques présentant une surcharge pondérale, et ne peut donc être proposée aux patients non-obèses.

▪ Traitements mécanique et chirurgical

Le traitement mécanique consiste en une prothèse qui permet d'avancer la mandibule. Ceci a pour effet d'avancer la langue et le voile du palais, dégageant ainsi les VAS. Grâce à un dispositif ajustable, le repositionnement de la mandibule se fait progressivement pendant les premières semaines de la mise en place de l'orthèse, et ce jusqu'à ce que les ronflements, et éventuellement les apnées, soient atténués. Ce traitement est efficace pour les patients porteurs d'un SAOS léger à modéré, et au cas par cas chez les patients sévères. A court terme, la contrainte ressentie est moins importante qu'avec la PPC, mais le devenir au long cours et l'observance restent mal connus. De plus, la correction des événements respiratoires et de la fragmentation du sommeil est très souvent moins bonne que sous PPC (90).

L'approche chirurgicale consiste quant à elle à une intervention sur les tissus mous ou osseux des VAS, et permet également une réduction des apnées. La trachéotomie a été la première intervention chirurgicale employée dans le traitement des apnées. Bien qu'elle se révèle efficace, elle est aujourd'hui très rarement utilisée, notamment en raison de la stigmatisation sociale qu'elle entraîne, et de son inconfort. L'uvulo-palato-pharyngoplastie, l'amygdalectomie, la chirurgie de la base de la langue, la chirurgie hyoïdienne et l'ostéotomie bimaxillaire, constituent différentes alternatives chirurgicales, ayant toutes pour objectif d'augmenter l'ouverture pharyngée et de diminuer la compliance, en remettant en tension la paroi des VAS.

Les VAS sont des tissus mous, ce qui explique leur grande capacité à se déformer, et leur rôle dans les apnées lorsque la réactivité des muscles dilatateurs du pharynx est altérée. Des exercices diurnes des VAS permettent de minimiser leur déformation en les rendant plus rigides, et pourraient être proposés aux patients avec un SAOS modéré. En effet, en 2006, Puhan *et al* s'intéressent à la pratique régulière du didgeridoo chez des patients apnéiques modérés, et montrent que 4 mois de pratique journalière de cet instrument permet d'améliorer significativement la somnolence diurne et l'IAH, suggérant une diminution de la collapsibilité des VAS (263). Quelques années plus tard, l'étude Guimaraes *et al* réalisée chez des apnéiques modérés décrivent une amélioration de la fréquence et de l'intensité des ronflements nocturnes, de la somnolence diurne et de la sévérité du SAOS (évaluée par l'IAH) après 3 mois d'exercices oropharyngés (115).

▪ Traitements pharmacologiques du SAOS

Causes du SAOS. L'efficacité de la PPC est largement démontrée mais ses contraintes pour le patient et pour son conjoint le sont également, raison pour laquelle la recherche de traitement pharmacologique efficace se développe. L'administration de molécules actives au niveau du tronc cérébral (par exemple sérotoninergiques) qui activent les muscles dilatateurs du pharynx et stabilisent le sommeil n'a pour l'instant donné aucun résultat concluant. En revanche, une étude clinique récente réalisée chez 24 patients apnéiques, montre un effet léger mais bénéfique de 4 semaines de traitement par donepezil, un anti-cholinestérasique, administré par voie orale, sur les valeurs d'IAH (337). Certains anti-dépresseurs classiques inhibiteurs de la recapture de la sérotonine (paroxétine, fluoxétine) ont démontré une certaine efficacité (319). Actuellement, les pistes pharmacologiques sont nombreuses, et largement décrites dans la revue Cochrane publiée en 2013 (200). Cependant, d'après ces données, il semble que les effets observés après traitement pharmacologique restent modérés, voire très modérés, dans la mesure où les tests ne sont réalisés qu'à court terme sur de petits échantillons.

Conséquences du SAOS. L'équipe de Vgontzas *et al* envisage une autre piste thérapeutique consistant à diminuer les mécanismes inflammatoires observés dans le SAOS. En 2004, ils montrent que l'antagoniste du *Tumor Necrosis Factor* (TNF)- α , l'etanercept, permet de réduire la somnolence diurne d'une petite cohorte de patients apnéiques (367).

Comme pour le traitement de l'obésité, les effets de la sibutramine, un inhibiteur de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline, ont été testés chez les patients apnéiques. Il apparaît que la sibutramine n'affecte pas le sommeil (198), mais la perte de poids liée à la prise de cette molécule est associée à une amélioration de l'IAH et à une diminution de la somnolence diurne après un traitement de 6 mois (389). Des effets bénéfiques sur le plan métabolique sont également observés chez des patients apnéiques obèses traités pendant 6 mois à la sibutramine, en association avec un régime pauvre en calories et de l'exercice (91). Cependant, ces effets positifs n'impactent pas sur la prise en charge du SAOS puisque la sibutramine est retirée du marché européen en 2010 du fait des événements cardiovasculaires associés à la prise prolongée de ce médicament (382).

Le SAOS est aujourd'hui reconnu comme une pathologie complexe, caractérisée par de multiples mécanismes physiopathologiques possibles, dont la contribution relative varie considérablement entre chaque patient apnéique. La compréhension des mécanismes sous-jacents à l'origine de ce syndrome a bénéficié des progrès majeurs de la recherche clinique et de la recherche expérimentale. Malgré ces avancées, la susceptibilité de chaque individu vis-à-vis de ce syndrome complique considérablement le choix de l'option thérapeutique la plus adaptée sur le long terme. Il est donc nécessaire de développer d'autres approches thérapeutiques à partir d'une meilleure compréhension physiopathologique apportée par les travaux expérimentaux.

1.3. Morbidité et mortalité cardiovasculaire

Depuis plusieurs années, de nombreuses études épidémiologiques décrivent l'existence d'une association entre SAOS et morbi-mortalité cardiovasculaire. Ces données présentent le SAOS comme un facteur de risque cardiovasculaire indépendant pour les pathologies associées telles que l'hypertension artérielle (HTA), les coronaropathies, l'athérosclérose, ou encore les dysfonctions cardiaques (323).

En 2005, l'équipe de Marin *et al* montre dans une étude prospective avec un suivi sur 10 ans une augmentation de la morbi-mortalité cardiovasculaire chez les apnéiques sévères (IAH > 30) non traités pour le SAOS, de façon indépendante des autres facteurs confondants, tels que l'obésité (195). Il existe une relation positive entre la sévérité du SAOS et la prévalence des événements cardiovasculaires, et un traitement par PPC permet de réduire significativement les conséquences cardiovasculaires associées à ce syndrome.

▪ SAOS et dysfonction endothéliale

L'hypoxie, l'hypercapnie et les modifications de pression intra-thoraciques liées au SAOS entraînent une hyperactivité sympathique qui aggrave le stress oxydant et stimulent la sécrétion de substances vasoactives, telles que l'endothéline. Associée à une activation plaquettaire et à une libération de cytokines inflammatoires, l'endothéline (ET)-1 participe à l'altération de la fonction endothéliale observée chez les patients SAOS. La dysfonction endothéliale, un marqueur précoce de l'athérosclérose (219), est le résultat d'une atteinte de la paroi endothéliale. La mesure de la vasodilatation médiée par le flux (FMD, *flow-mediated dilatation*) permet d'estimer cette fonction endothéliale.

D'après l'étude réalisée par Ip *et al*, il apparaît que la FMD est corrélée significativement avec l'index d'apnées-hypopnées chez les patients apnéiques (136). En 2007, Chung *et al* précisent cette association en montrant que la FMD est significativement diminuée chez les patients SAOS sévère comparé aux patients SAOS léger à modéré ou aux sujets contrôles (53). D'après ces données, il semble donc que la diminution de la FMD soit corrélée positivement avec la sévérité du SAOS. Cette dysfonction endothéliale a été montrée à plusieurs reprises chez les patients apnéiques ainsi que chez des animaux exposés à des cycles d'HI (342). Cependant, l'influence des co-morbidités associées au SAOS est à prendre en considération dans l'évaluation de la fonction endothéliale des vaisseaux de résistance (de

petit diamètre). De plus, la plupart des études cliniques ont pour principale limite le faible nombre de patients inclus dans l'étude. En 1996, l'équipe de Carlson *et al* reporte une diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium chez les patients SAOS, indépendamment d'une hypertension (44). Quelques années plus tard, la publication de nouvelles données cliniques suggère que la réponse vasoconstrictrice à l'angiotensine II est augmentée chez les patients SAOS normotendus comparé aux sujets contrôles (157).

La dysfonction endothéliale est souvent décrite comme un mécanisme préliminaire à l'origine des atteintes cardiovasculaires observées chez les patients apnéiques. Elle est très souvent observée chez les patients hypertendus (241) ou diabétiques (274), et constitue une première étape de l'athérogenèse (219). Les comorbidités telles que l'obésité et/ou les dysfonctions métaboliques associées au SAOS, résultent le plus souvent d'une dysfonction endothéliale. Le SAOS lui-même peut donc constituer un facteur de risque indépendant pour l'altération de la fonction endothéliale.

Le traitement du SAOS par la PPC a un effet bénéfique sur la FMD. Chez des patients apnéiques normotendus, 6 mois de traitement par PPC permettent d'augmenter significativement les valeurs de FMD (30), ce qui confirme des résultats précédents observés chez des patients apnéiques normotendus traités par PPC pendant 4 semaines (136).

▪ **SAOS et hypertension artérielle**

La relation entre le SAOS et une pression artérielle élevée est largement décrite et discutée dans des revues antérieures (146) (242). L'augmentation de la pression artérielle est d'origine multifactorielle et peut être causée par l'hyperactivité sympathique, la sécrétion de substances inflammatoires et vasoactives (angiotensine II, aldostérone, endothéline-1, vasopressine), ou encore la dysfonction endothéliale observées au cours du SAOS.

Selon les recommandations de 2003 du « Joint Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure » (51), et celles de la Haute Autorité de Santé sur « la prise en charge des patients adultes atteints d'HTA essentielle » (2005), le SAOS figure parmi les principales causes d'HTA secondaire à rechercher chez les patients hypertendus. L'HTA associée au SAOS présente certaines particularités : environ 60% des patients SAOS sont hypertendus (314) et inversement, le pourcentage de patients hypertendus présentant un SAOS est estimé à 30% (318) ; elle est à prédominance diastolique et nocturne (308) (23) ; enfin, il y a une prévalence élevée d'HTA réfractaire (111) (182) et le statut non-

dipper des HTA (perte de la baisse physiologique nocturne de la TA) est fréquent (308) (23). En effet, le rythme circadien de la tension artérielle (valeurs tensionnelles élevées durant les premières heures du matin, et minimales autour de minuit) est un élément déterminant dans la régulation de la tension. Certains patients apnéiques présentent un statut non-dipper malgré une absence d'hypertension diurne. Chez ces sujets normotendus, l'absence de baisse physiologique de la tension artérielle nocturne constitue un facteur de risque important sur le plan cardiovasculaire.

L'étude la cohorte de la *Sleep Heart and Health Study* confirme le lien entre SAOS et HTA suggérée par des études antérieures (106) (384). Cette étude décrit une relation linéaire entre la sévérité du SAOS (évaluée par l'IAH) et l'HTA (231). De plus, les résultats de l'étude prospective réalisée par Peppard *et al* dans le cadre de la cohorte *Wisconsin Sleep Cohort Study* – suivi d'une population de 709 sujets pendant 4 à 8 ans et non traités pour leurs anomalies respiratoires – montrent un risque relatif 3 fois plus élevé de développer une HTA chez les sujets avec un IAH supérieur à 15 (252).

Le traitement du SAOS par PPC a un effet positif sur le contrôle des valeurs tensionnelles. D'après les données d'une étude randomisée publiée en 2003, la réduction de pression artérielle par traitement PPC est d'autant plus marquée que le SAOS est sévère (32), et plus modérée chez les patients avec un SAOS moins sévère (IAH < 30) (31) (116). En 2010, un essai clinique randomisé réalisé par notre équipe chez 23 patients apnéiques et hypertendus, confirme les effets bénéfiques de la PPC sur les valeurs tensionnelles, mais montre qu'un traitement au valsartan, un antagoniste des récepteurs II à l'angiotensine, réduit de façon plus efficace les valeurs de pression artérielle moyenne sur 24h, comparé à la PPC (250). Cependant, chez les patients apnéiques normotendus et non-dippers, un traitement par PPC n'a pas d'effet sur les valeurs tensionnelles (40) (276). Par ailleurs, il apparaît que les apnéiques sont plus sensibles aux β -bloquants qu'aux autres classes d'anti-hypertenseurs, probablement en raison du blocage du système sympathique hyperactivé durant le SAOS (158).

▪ SAOS et remodelage vasculaire

A plus long terme, la dysfonction endothéliale qui apparaît au cours du SAOS participe au remodelage vasculaire pré-athérogène observé chez les patients apnéiques.

Les premières données décrivant un lien entre SAOS et athérosclérose datent de 1998, lorsque Friedlander *et al* montrent une augmentation de la prévalence des plaques athéromateuses carotidiennes chez les patients apnéiques, comparé aux sujets contrôles (101). Entre 1998 et 2010, de nombreuses études publient des résultats similaires concernant l'association entre le SAOS et le développement de l'athérosclérose (315) (222) (125). Cependant, une des principales limites de ces études réside dans la présence de facteurs confondants pro-athérogènes chez les patients apnéiques. Afin d'éviter la présence de ces facteurs confondants, Drager *et al* se sont intéressés à une cohorte de patients jeunes (< 55 ans) ne présentant aucune comorbidité. D'après les résultats de cette étude, il apparaît que l'augmentation de l'épaisseur intima-média (EIM) carotidienne, un marqueur précoce d'athérosclérose, est corrélée positivement à la sévérité de la désaturation nocturne, indépendamment des autres facteurs de risque cardiovasculaires et métaboliques (76). Cette association indépendante est confirmée la même année par deux études cliniques (212) (22), dont l'une suggère que la progression de l'athérosclérose est également associée aux marqueurs de l'inflammation chez les patients apnéiques (212).

Afin de confirmer l'hypothèse selon laquelle le SAOS serait un facteur de risque indépendant impliqué dans le développement de l'athérosclérose, Drager *et al* réalisent en 2007 une étude randomisée chez des patients apnéiques sévères afin d'évaluer l'effet de 4 mois de PPC sur différents paramètres associés à une atteinte cardiovasculaire : EIM, suivi sur 24h de la pression artérielle, dosage de la protéine C réactive (CRP) plasmatique et des catécholamines. Les résultats de cette étude montrent que 4 mois de traitement permettent de réduire significativement l'EIM. Cette amélioration s'accompagne d'une réduction des marqueurs de l'inflammation (CRP) et de l'activité sympathique (catécholamines), sans modifications du poids et des lipides plasmatiques (75). Ces données suggèrent donc que le SAOS peut être considéré comme un facteur de risque indépendant pour le développement de l'athérosclérose.

▪ SAOS et maladies coronariennes

En 1985, des travaux précurseurs suggèrent un lien entre SAOS et coronaropathies en mettant en évidence un risque relatif d'angor deux fois plus important chez les ronfleurs et ce, même après ajustement sur le niveau de pression artérielle et sur l'indice de masse corporelle (IMC) (156). D'après les résultats de la cohorte de la *Sleep Heart and Health Study*, il apparaît que le SAOS est un facteur de risque indépendant pour le développement des coronaropathies (306).

Par la suite, plusieurs études ont confirmé le lien entre SAOS et maladies coronariennes (245) (243). L'étude prospective menée par Peker *et al* en 2006 chez 105 apnéiques, non coronariens au début de l'étude, montre une augmentation de l'incidence de cette pathologie après un suivi à 7 ans (243). Cette association est fréquente car la plupart des études réalisées montrent une prévalence d'environ 30% du SAOS chez les patients coronariens. De plus, sur une période de suivi de 5 ans, les patients coronariens et porteurs d'un SAOS faible à modéré (AHI > 10) sont plus à risque de décès que les patients non apnéiques (37,5% vs 9,3%, respectivement) (244). Récemment, il a été montré que le volume des lésions coronariennes augmentait chez les patients SAOS, avec une corrélation positive entre l'index AHI et le volume des plaques (360).

De la même façon que dans les cas d'HTA associés au SAOS, le traitement par PPC a un effet bénéfique sur le risque cardiovasculaire associé aux coronaropathies. En effet, les coronariens et apnéiques traités pour le SAOS par PPC sont moins à risque de décès ou d'évènements cardiovasculaires graves par rapport à ceux non traités par PPC (210).

▪ SAOS et dysfonctions cardiaques

En 2010, Gottlieb *et al* décrivent une association indépendante entre le SAOS et l'insuffisance cardiaque (108). De nombreux mécanismes liés au SAOS sont susceptibles de participer au remodelage cardiaque des patients apnéiques : aggravation de l'hypertension nocturne et diurne, augmentation du tonus sympathique ou encore augmentation de la post-charge ventriculaire gauche due à l'augmentation de la rigidité artérielle.

Les patients SAOS présentent une hypertrophie ventriculaire gauche, avec une modification de la fraction d'éjection ventriculaire, à la fois au cours du sommeil (172) mais également pendant l'éveil (5) (11) (280). Par ailleurs, après ajustement pour les valeurs de pression artérielle, la prévalence de l'hypertrophie ventriculaire gauche reste élevée chez les patients apnéiques par rapport aux non-apnéiques (159) (46). L'analyse multivariée de données obtenues à partir d'une cohorte de 150 patients apnéiques non-traités pour leur SAOS, révèle que la pression artérielle systolique et la saturation en oxygène moyenne sont positivement corrélées, et de façon indépendante de facteurs confondants, à l'hypertrophie ventriculaire gauche (21).

Le remodelage cardiaque précoce pourrait donc contribuer à l'insuffisance cardiaque et aux arythmies décrites dans le SAOS. Les résultats de l'étude de la cohorte de la *Sleep Heart and*

Health Study révèlent que les apnéiques sévères ont un risque 2 à 4 fois plus élevé de développer une arythmie complexe comparé aux sujets sains (207), et ce même après ajustement pour les facteurs confondants (284). Parmi les troubles du rythme observés chez les patients apnéiques, la fibrillation auriculaire est souvent décrite chez ces patients. En effet, l'obésité et la sévérité de la désaturation en oxygène constituent deux facteurs de risque indépendant pour l'apparition de cette arythmie (102). Une étude très récente menée par l'équipe de Somers *et al*, et réalisée chez 1071 adultes, montre que le risque de survenue d'un arrêt cardiaque 5 ans après le diagnostic du SAOS, est significativement et indépendamment associé à la sévérité du SAOS, évaluée selon la fréquence des apnées-hypopnées et la sévérité de la désaturation nocturne en oxygène (103).

Les conséquences du SAOS au niveau cardiovasculaire sont nombreuses. Dans la seconde partie de l'introduction de ce manuscrit, seuls les mécanismes à l'origine des atteintes vasculaires – précoces et tardives – seront détaillés.

2. Mécanismes des conséquences vasculaires associées au SAOS

2.1. Processus athérogène

▪ Remodelage précoce (pré-athérosclérose)

L'épaississement de l'intima-média est considéré aujourd'hui comme un marqueur de risque cardiovasculaire bien validé, puisqu'il est défini comme un mécanisme précoce du développement de l'athérosclérose. Ce remodelage délétère est reporté chez les patients SAOS exempts de tous facteurs de risque cardiovasculaire (22). De plus, l'augmentation de l'EIM corrèle positivement avec les marqueurs sériques de l'inflammation (212) et la sévérité de la désaturation en oxygène (22). Cette épaississement est également observée après 14 jours d'HI chez des souris C57Bl6 (69) (14), et affecte la partie média de l'aorte, dont l'aspect est alors comparable au remodelage observé chez les patients SAOS. Ces modifications se caractérisent par une désorganisation du réseau des fibres élastiques, une hypertrophie des cellules musculaires lisses et l'apparition de dépôts mucoïdes (14). Le stress hémodynamique participe aux altérations structurales et dégénératives, dans la mesure où les oscillations de pression artérielle induites par les épisodes d'HI apparaissent dès le premier jour d'exposition (69). D'après des données de notre laboratoire, 14 jours d'HI entraînent une diminution de l'expression de la *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule* (PECAM)-1 au niveau aortique et cardiaque, chez des souris C57Bl6 (69). PECAM-1 est une molécule impliquée dans l'adhésion inter-cellulaire, et qui contribue à la migration des leucocytes au travers de l'endothélium (362). Des données récentes suggèrent une implication de PECAM-1 dans la transduction de signal induit par un stress mécanique (57). La modification de l'expression de PECAM-1 suite à l'HI pourrait donc constituer un mécanisme visant à moduler la sensibilité des cellules endothéliales aux stimuli mécaniques (361). En plus des origines hémodynamiques, l'HI elle-même et les nombreux facteurs générés en réponse à ce stimulus (inflammation systémique et altérations hormono-métaboliques) pourraient contribuer à ces altérations adaptatives et dégénératives.

▪ Remodelage tardif (athérosclérose)

L'augmentation de l'EIM constitue une première étape dans l'apparition de l'athérosclérose. A plus long terme, l'apparition d'un déséquilibre lipidique et d'un statut inflammatoire de bas grade aggrave le remodelage vasculaire, qui s'oriente alors vers un processus

athérosclérotique. L'infiltration de cellules lymphocytaires et macrophagiques au niveau de la paroi vasculaire participe à l'athérogenèse. L'activation de ces cellules inflammatoires par des médiateurs pro-inflammatoires joue un rôle majeur dans l'aggravation de l'athérosclérose (119). En 2009, Turmel *et al* montrent chez 19 apnéiques présentant une coronaropathie stable, qu'il existe une association significative entre la fréquence des épisodes d'apnées obstructives, la fragmentation du sommeil et l'importance du volume des plaques d'athérosclérose coronarienne (360). Plus tardivement, l'équipe de Kent *et al* confirment ces données dans une étude prospective de cas-témoins. D'après leurs résultats obtenus chez 29 patients apnéiques, la sévérité du SAOS est associée de façon significative à la présence et au volume des plaques d'athérosclérose infra-clinique au niveau des coronaires (149). Les premiers travaux démontrant le lien direct entre HI et athérosclérose sont réalisés en 2007 puis en 2008 par le groupe de Polotsky, chez des souris C57Bl6 (298) (297). La dyslipidémie observée chez les souris nourries avec un régime riche en cholestérol est accentuée par l'HI, et contribue à l'accélération du développement de l'athérosclérose. L'HI seule n'était par contre pas suffisante pour induire l'athérosclérose. Afin d'étudier les effets de l'HI sur les stades avancés de l'athérogenèse, une souche de souris transgéniques athéro-sensibles est utilisée, qui se caractérise par une déficience pour l'apolipoprotéine E (souris ApoE^{-/-}). Deux études simultanées prouvent l'effet pro-athérogène de l'HI. Dans la première étude menée par l'équipe de Polotsky *et al*, cet effet est associé à une augmentation du LDL-cholestérol plasmatique, de la pression artérielle diastolique et à un stress oxydant (142). La seconde étude, réalisée au cours de ma thèse, insiste sur l'importance de l'inflammation systémique et vasculaire associée à l'effet pro-athérogène de l'HI : elle s'est traduite par une augmentation des lésions athéromateuses induites par ce stimulus alors que la pression artérielle ainsi que le cholestérol total n'étaient pas modifiés chez les souris hypoxiques (15).

Par l'intermédiaire, entre autres, d'une hyperactivité sympathique, les mécanismes dépendant de l'HI et pouvant aboutir à cette athérogenèse sont nombreux. Parmi ceux-là, certains semblent se distinguer (figure 4) :

- altérations hémodynamiques : hypersensibilité des chémorécepteurs, hyperactivité sympathique, altération de la vasodilatation et de la vasoconstriction, troubles de l'hémostase
- inflammation de bas grade : inflammation systémique, voie de l'acide arachidonique, inflammation vasculaire

- altérations métaboliques : dysfonctions du métabolisme glucidique et du métabolisme lipidique

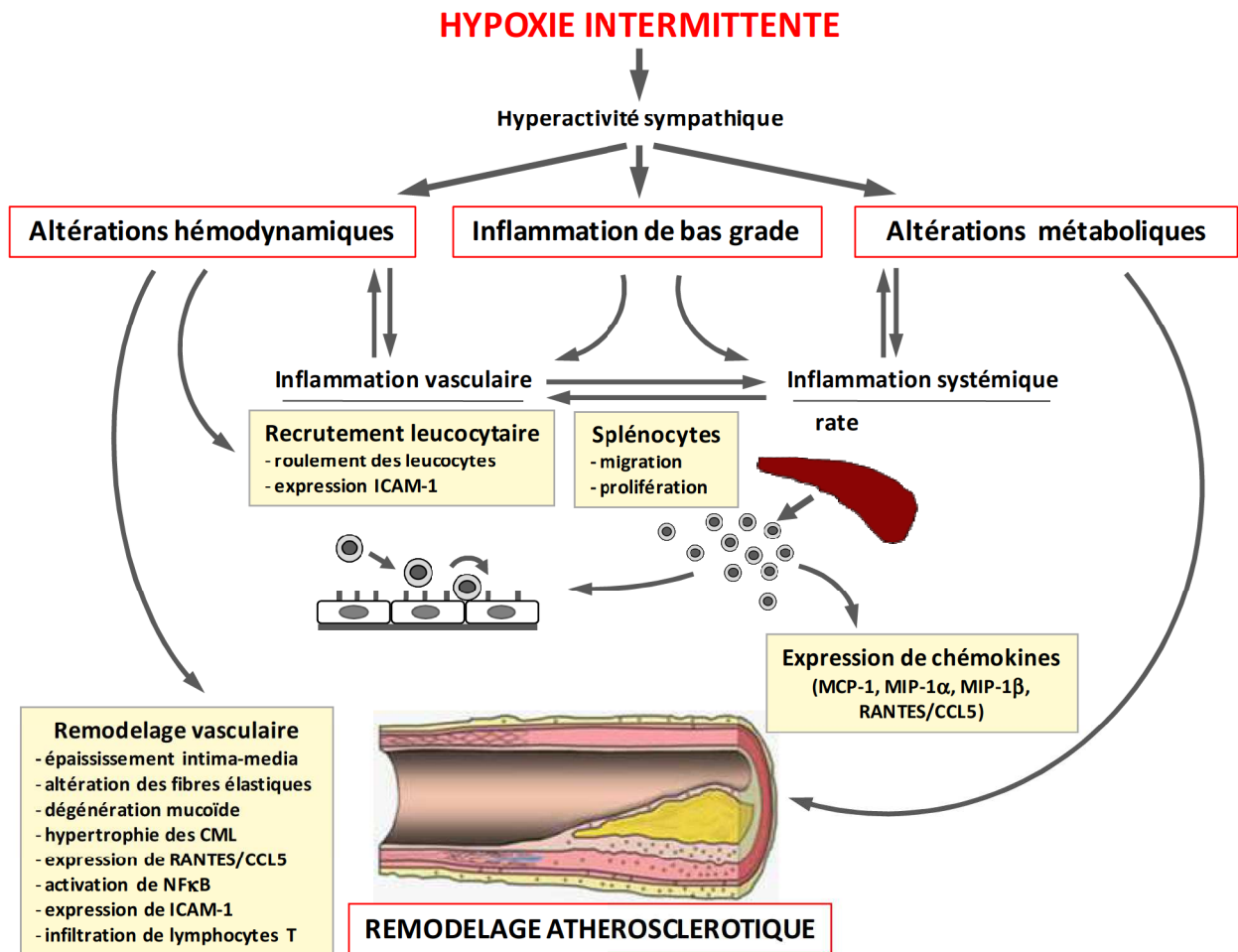


Figure 4. Représentation schématique des trois principaux mécanismes à l'origine de l'athérogenèse associée à l'hypoxie intermittente.

2.2. Altérations hémodynamiques

▪ Hypersensibilité des chémorécepteurs et hyperactivité sympathique

La régulation de l'homéostasie cardiovasculaire et respiratoire est assurée en partie par des structures appelées chémorécepteurs. Ces derniers sont répartis en 2 types : centraux et périphériques. Les chémorécepteurs périphériques, localisés au niveau des corps carotidiens et de la crosse aortique, sont davantage sensibles à l'hypoxie, et plus précisément à la diminution de la PaO₂. La détection d'une baisse de la PaO₂ entraîne une réponse cardiovasculaire et ventilatoire sous la dépendance du tonus sympathique. Au cours du SAOS, on constate une hyperactivité des chémorécepteurs périphériques liée au phénomène d'HI, se traduisant par une activation sympathique soutenue (225). L'hyperactivité sympathique observée lors du cycle nyctéméral du patient entraîne une augmentation de sa pression artérielle (93). Il existe également une diminution de la variabilité de la fréquence cardiaque et une augmentation de la variabilité de la pression artérielle dans le SAOS (223), qui participent à l'augmentation du risque cardiovasculaire (316) (240) (100). De plus, les patients normotendus présentant une diminution de la variabilité de la fréquence cardiaque ont un risque accru de développer une HTA (316). L'hyperactivité sympathique observée chez les apnéiques a pu être mise en évidence par une élévation de l'activité nerveuse sympathique du nerf péronier (322) ainsi que par la mesure des taux de catécholamines urinaires (196) (71). L'analyse spectrale de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle permet de distinguer deux fréquences particulières de spectre, les spectres de basse fréquence (*low frequency*, LF) et les spectres de haute fréquence (*high frequency*, HF). Le calcul du rapport LF/HF apporte une estimation de l'activité sympathique (224). Les données obtenues chez les patients apnéiques montrent une augmentation de ce rapport associée au SAOS (223). Chez des rats, l'HI entraîne une augmentation de la pression artérielle diurne, uniquement lorsque le système nerveux sympathique et les chémorécepteurs carotidiens sont intacts (97). De plus, l'HI augmente l'activité sensorielle des corps carotidiens (247). Les espèces réactives de l'oxygène générées durant les cycles d'hypoxie-réoxygénation semblent jouer un rôle dans la sensibilisation du chémoréflexe carotidien liée à une exposition à l'HI. En effet, un prétraitement avec un piègeur d'anions superoxydes prévient l'hyperactivité des chémorécepteurs induite par l'HI (247). L'angiotensine (Ang) II est un puissant stimulant de la production d'espèces réactives de l'oxygène, et sa surproduction participe au

développement de l'HTA et des complications cardiovasculaires. Des données récentes obtenues chez des rats exposés à 28 jours d'HI, suggèrent que l'Ang II pourrait être impliquée dans l'activation HI-dépendante des chémorécepteurs, par l'intermédiaire du récepteur AT₁ de l'Ang II et de la production d'anions superoxydes (194).

▪ **Altération de la vasodilatation**

Stress radicalaire. Les cycles d'HI caractéristiques du SAOS sont responsables de la production massive de radicaux libres de l'oxygène (RLO, stress oxydant) et de radicaux libres de l'azote (RLN, stress nitrant) à l'origine du stress radicalaire (259) (339). Ce stress endommage les composants cellulaires, mais également certaines biomolécules telles que les lipides, les protéines et l'ADN, altérant ainsi leurs fonctions biologiques. L'apparition d'un stress oxydant lors du SAOS a été décrite au niveau leucocytaire (83) et des polynucléaires neutrophiles (301), au niveau plasmatique (165) (26), et au niveau des condensats respiratoires (45) des patients apnéiques. Une approche thérapeutique par PPC (165) (45) ou par application d'une orthèse d'avancée mandibulaire (137) permet de réduire ce stress oxydant. Chez des patients apnéiques obèses, Schulz *et al* ont montré que 2 nuits de traitement par PPC réduisaient la production d'anions superoxydes par les cellules polynucléaires neutrophiles (301). En 2010, une étude du laboratoire a décrit une relation positive entre la concentration d'isoprostanés urinaires (produits spécifiques de la peroxydation lipidique), la désaturation en oxygène, et l'EIM chez des apnéiques non-obèses (214).

Stress oxydant et altération de la vasodilatation. Au niveau vasculaire, le monoxyde d'azote (*nitric oxide*, NO) est un modulateur essentiel synthétisé par la NO synthase endothéliale (eNOS). Lors d'un stress oxydant, le NO est inactivé par les RLO, et induit la formation de peroxynitrite. L'impact du stress oxydant sur la dysfonction endothéliale est très probablement lié à la diminution de la biodisponibilité du NO observée chez les patients apnéiques (302) (133). En 2008, Jelic *et al* décrivent pour la première fois le lien direct qui existe entre SAOS, dysfonction endothéliale et stress oxydant (140). Leur étude, réalisée chez des patients apnéiques exempts de toutes pathologies cardiovasculaires, montre que l'expression de l'eNOS et de sa forme active phosphorylée mesurée au niveau des cellules endothéliales veineuses, est diminuée significativement comparé aux sujets contrôles. Alors

que l'expression de la nitrotyrosine (un marqueur de stress radicalaire) est augmentée chez les patients SAOS, et un traitement par PPC durant 4 semaines permettent de corriger ces valeurs et d'améliorer la fonction endothéliale mesurée par FMD (140). Lena et Peretz Lavie considèrent le stress oxydant comme l'élément majeur à l'origine des altérations cardiovasculaires associées au SAOS, plutôt que l'hyperactivité sympathique elle-même associée à ce syndrome (164). Cette hypothèse rejoint les résultats décrits précédemment dans la partie « Hypersensibilité des chémorécepteurs et hyperactivité sympathique » (194). Au niveau médullaire, et par l'intermédiaire de son effet pro-oxydant (activation de la NADPH oxydase, de l'eNOS et de la xanthine oxydase), l'Ang II induit une activation sympathique et de ce fait, une augmentation de la pression artérielle (168). Comme l'Ang II, l'ET-1 est également responsable de la formation de RLO, qui s'accompagne d'une vasoconstriction persistante et d'une hypertension chez le rat (65). L'hyperactivité sympathique associée au SAOS joue un rôle majeur dans les complications cardiovasculaires du SAOS, et l'augmentation des RLO et le stress oxydant induit par l'HI pourraient être les éléments déclencheurs de cette excitation sympathique.

▪ **Altération de la vasoconstriction**

Le stress hypoxique récurrent que subit l'organisme durant les épisodes apnéiques, conduit au relargage de substances trophiques et vasoactives comme l'ET-1, l'Ang II et l'aldostérone, responsables d'une vasoconstriction persistante.

Système endothéline. Les données actuelles relatives à l'activation du système endothéline ne sont pas toutes concordantes, et sont probablement liées à la très courte demi-vie de l'ET-1 (378) et/ou aux différents temps de prélèvement. Grâce à une expérience de *split-night*, il a été montré chez les patients apnéiques que le SAOS sévère non-traité pendant 4 heures (entre 22h et 2h) entraîne une augmentation du niveau d'ET-1 plasmatique. Cette augmentation est corrigée après 5 heures (entre 2h et 7h) de traitement par PPC (254). De plus, les modifications des taux d'ET-1 corrélaient positivement avec les changements de pression artérielle et la désaturation nocturne en oxygène (207). En 2000, Grimpen *et al* montrent que les niveaux d'ET-1 plasmatique sont équivalents chez les patients SAOS et les sujets contrôles, et que la PPC n'a pas d'effet sur les concentrations d'endothéline (110). D'un point de vue expérimental, l'exposition de rats à l'HI est associée à une augmentation de la

concentration plasmatique d'ET-1 (144), ainsi qu'à une surexpression des récepteurs ET-A et ET-B au niveau mésentérique (6) et myocardique (33). La réponse contractile aortique à l'ET-1 mesurée chez des rats n'est pas modifiée par 35 jours d'exposition à l'HI (169). En revanche, chez ces mêmes animaux, la réponse contractile à l'ET-1 est augmentée après 35 jours d'HI au niveau de l'artère carotidienne (169). En accord avec ces données, deux études décrivent une augmentation de la réponse à l'ET-1 des artères mésentériques (6) et des coronaires (33) de rats, après 14 jours d'exposition à l'HI.

Système rénine-angiotensine-aldostérone. Chez des rats exposés à 35 jours d'HI, le blocage de récepteur AT₁ de l'Ang II par un traitement au losartan (94), ou la suppression du système rénine-angiotensine grâce à l'absorption d'une charge en sel (98), permet de prévenir l'augmentation de pression artérielle liée à l'HI. En accord avec les travaux précédents décrivant le lien entre Ang II et hyperactivité des chémorécepteurs, ces données confirment l'implication de l'Ang II dans l'HTA induite par le stimulus hypoxique. Cependant, de façon comparable aux résultats concernant les modifications du système endothéline dans le SAOS, les données relatives au système rénine-angiotensine-aldostérone chez les patients apnéiques sont discordantes. En 2000, l'équipe de Carlson *et al* décrit une augmentation de la sensibilité artérielle à la vasoconstriction induite par l'Ang II mesurée au niveau de l'avant-bras de patients apnéiques normotendus, comparé aux sujets contrôles (157). Les travaux réalisés par Moller *et al* en 2003 montrent que les concentrations plasmatiques de l'Ang II et de l'aldostérone sont augmentées chez les patients SAOS par rapport au groupe contrôle (213). Par ailleurs, 14 mois de traitement par PPC permettent de réduire la pression artérielle des patients apnéiques, et cette diminution corrèle significativement avec la diminution de l'activité du système rénine-angiotensine observée chez ces mêmes patients (213). Contrairement à Kraiczi *et al* et Moller *et al*, les résultats de Svatikova *et al* sont peu concluants, puisqu'ils ne décrivent aucune modification des taux plasmatiques d'aldostérone et de l'activité plasmatique de la rénine chez les patients apnéiques, comparé aux sujets contrôles (340).

- **Troubles de l'hémostase et microparticules**

Hémostase. Depuis quelques années déjà, les données cliniques indiquent que le SAOS est associé à un état pro-coagulant. Plusieurs facteurs, tels que l'augmentation de l'hématocrite,

de la viscosité sanguine, des facteurs de coagulation (thrombine, facteur VII, facteur XII), du fibrinogène, ou encore l'activation plaquettaire, y contribuent. L'hématocrite joue un rôle important dans l'homéostasie puisque elle modifie la viscosité sanguine et l'agrégation plaquettaire. De nombreuses études décrivent une augmentation de l'hématocrite chez les patients apnéiques (160) (127) (232), qui corrèle positivement avec la sévérité du SAOS (52). Par ailleurs, 1 nuit (49), 1 mois (397) ou 3 mois (288) de traitement par PPC permettent de corriger cette élévation. Les patients non traités pour leur SAOS présentent également une augmentation de la viscosité sanguine (232) (350), des taux de facteurs de coagulation (275) et de fibrinogène (49) (232). Cependant, les effets bénéfiques de la PPC sur ces 3 paramètres sont encore incertains et nécessitent d'être précisés (180). Malgré des résultats négatifs rapportés par certains auteurs (269), la plupart des études cliniques décrivent une augmentation de l'agrégation plaquettaire chez les patients SAOS (4) (131) (267) (397). Cette augmentation de l'agrégation plaquettaire pourrait être liée aux concentrations plasmatiques élevées de catécholamines observées au cours du SAOS qui, par la stimulation des récepteurs α , ont un effet pro-agrégant (369). L'étude menée par Hui *et al* montre que l'agrégation plaquettaire des patients apnéiques diminue après 1 nuit et après 3 mois (131) de traitement par PPC. En revanche, d'après Oga *et al*, l'effet bénéfique de la PPC n'est observé qu'après 3 mois de traitement (234). Globalement, ces données montrent que la PPC permet de diminuer l'agrégation plaquettaire observée au cours du SAOS, mais la durée de traitement optimum reste encore à préciser. L'augmentation de l'hématocrite, de la viscosité sanguine, des niveaux de facteurs de coagulation et de l'agrégation plaquettaire contribuent au ralentissement du flux sanguin, à la formation de caillots, et de ce fait, aux complications vasculaires associées au SAOS.

Microparticules. Les microparticules (MPs) circulantes sont des vésicules membranaires libérées dans l'espace extracellulaire suite à l'activation ou à l'apoptose cellulaire, et dont leur origine est principalement plaquettaire. Du fait de leur potentiel pro-inflammatoire et pro-coagulant, leurs taux plasmatiques augmentent dans certaines pathologies à risque thrombotique accru (infarctus du myocarde, par exemple) (36) (216). En 2008, Ayers *et al* mesurent pour la première fois les taux de MPs circulantes d'origine plaquettaire, endothéliale et lymphocytaire chez des patients apnéiques présentant un faible risque cardiovasculaire. Les MPs circulantes sont augmentées significativement chez les patients SAOS comparativement aux sujets contrôles, quelque soit leur origine cellulaire (18). En accord avec ces données,

Maruyama *et al* décrivent également une augmentation des MPs circulantes d'origine plaquettaire chez les patients apnéiques sévères comparé aux sujets contrôles (199). Récemment, Priou *et al* ne montrent aucun effet du SAOS sur le nombre total de MPs circulantes (262). En revanche, la sous-population de MPs circulantes provenant des leucocytes activés est augmentée chez les apnéiques (262), et cette augmentation corrèle positivement avec l'AHI (357). De plus, ces MPs induisent un stress oxydant au niveau de culture de cellules endothéliales, et une dysfonction endothéliale aortique et mésentérique chez des souris Swiss (262). Ces données suggèrent un lien entre l'augmentation des MPs leucocytaires et la dysfonction endothéliale observée au cours du SAOS. A l'heure actuelle, les effets d'un traitement par PPC sur l'augmentation des MPs circulantes liée au SAOS sont très peu décrits. Seuls Ayers *et al* en 2012 montrent que 2 semaines de PPC augmentent les taux de MPs d'origine endothéliale chez les patients SAOS, mais n'ont pas d'effet sur les taux des autres MPs circulantes (plaquettaires, granulocytaire et leucocytaires) (19).

L'ensemble des données cliniques et expérimentales montrent qu'une exposition au stimulus hypoxique entraîne de nombreuses altérations hémodynamiques qui participent, en parallèle à de nombreux autres mécanismes, aux dysfonctions vasculaires précoces associées à l'HI.

2.3. Inflammation de bas grade

Le SAOS est considéré aujourd'hui comme une pathologie inflammatoire de bas grade, caractérisée à la fois par une inflammation systémique et une inflammation vasculaire. Qu'il s'agisse de l'activation cellulaire ou des marqueurs de l'inflammation (CRP, cytokines circulantes), le lien entre le SAOS et l'apparition d'un phénotype inflammatoire est clair. En effet, le SAOS peut être considéré comme un état inflammatoire chronique évoluant à bas bruit, au même titre que de nombreuses pathologies qui lui sont associées comme l'obésité, le diabète de type 2 ou encore l'athérosclérose. Ce concept repose sur le fait que les phénomènes inflammatoires observés chez les patients apnéiques sont modérés, mais leur chronicité induit des conséquences vasculaires et métaboliques particulièrement délétères. Les résultats décrits chez les patients apnéiques concernant l'activation leucocytaire illustrent cette notion, puisque la plupart des données sont très souvent obtenues sur des sous-populations cellulaires très ciblées (lymphocytes T CD8⁺CD4⁺ par exemple). L'abondance des données cliniques et expérimentales confirment le rôle de cette inflammation dans le remodelage vasculaire associé au SAOS, que ce remodelage soit précoce (épaississement de l'intima-media) ou plus tardif (athérosclérose).

- **Inflammation systémique**

Médiateurs inflammatoires. De nombreuses études montrent que les niveaux plasmatiques de TNF- α – une cytokine pro-inflammatoire – sont augmentés chez les patients souffrant de SAOS. D'après l'équipe de Minoguchi *et al*, la production spontanée de TNF- α par les monocytes et le taux sérique de TNF- α sont augmentés chez les patients apnéiques (211). De plus, le traitement par PPC permet de corriger cette augmentation de cytokine (211). Les données d'une étude prospective menée par l'équipe de McNicholas montrent une forte association entre la sévérité du SAOS – évaluée par l'index de désaturation en d'oxygène – et les niveaux de TNF- α et ce, indépendamment de certains facteurs confondant tels que l'IMC, l'âge ou encore les taux de lipides circulants (286). Il apparaît également que le taux plasmatique de TNF- α est augmenté chez des apnéiques sévères, comparé aux sujets narcoleptiques non-apnéiques, eux-mêmes présentant cependant, un taux circulant de cytokines pro-inflammatoires plus élevé que les sujets contrôles (366) (365). Ces données

évoquent une relation entre la somnolence et ce marqueur inflammatoire, et sont d'un intérêt particulier puisqu'il n'est pas encore établi qu'un SAOS avec somnolence représente le même risque cardiovasculaire qu'un SAOS sans somnolence. Cette hypothèse rejoint la théorie de l'équipe de Krueger *et al*, qui suggère un effet hypnogène des cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-1 β) (187). En plus d'une augmentation de TNF- α circulant, le SAOS est également associé à des taux élevés d'autres facteurs pro-inflammatoires tels que l'IL-8, l'ICAM-1 ou encore de la *Monocyte Chemoattractant Protein* (MCP)-1 (également appelée *C-C Chemokine Ligand 2* (391) (235). L'augmentation des taux circulants de ces cytokines et chémokines pro-inflammatoires (22) (212), ainsi que des molécules d'adhérence (ICAM) (235), est corrélée positivement à la désaturation en oxygène, mais également à l'augmentation de l'EIM carotidienne. La CRP est une protéine caractéristique des phases inflammatoires aiguës, et est reconnue comme un marqueur prédictif de la survenue d'évènements cardiovasculaires (124) (63) (272). Dans un contexte de SAOS, les études récentes réalisées à grande échelle suggèrent que l'élévation des niveaux de CRP observées chez les apnéiques serait attribuable à la présence de facteurs de risque cardiovasculaires tels que l'obésité (43) (150) (209). La forte relation qui existe entre l'obésité et les niveaux de CRP constitue un biais majeur des études sur les taux de CRP chez ces patients (13). La divergence des résultats est mise en évidence dans de nombreuses études pour lesquelles certaines données révèlent une augmentation des taux de CRP chez les patients apnéiques (307) (391) (41) alors que d'autres ne montrent aucune modification de la CRP liée au SAOS (114) (285).

Activation cellulaire. L'augmentation de médiateurs inflammatoires circulants entraîne chez les patients SAOS une activation des cellules endothéliales qui, par l'intermédiaire de l'expression de molécules d'adhérence, favorisent l'interaction entre les leucocytes et l'endothélium vasculaire (83). En parallèle de cette activation endothéliale, les polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes T sont également activés chez les patients SAOS. Les neutrophiles activés présentent une production accrue de RLO (301) et de sélectines (85), lesquelles sont impliquées dans l'interaction inter-cellulaire. En 2005, l'équipe de Lavie *et al* montre une activation spécifique d'une sous-population lymphocytaire, caractérisée par une augmentation de la cytotoxicité des cellules T CD8⁺ (82), et par une production accrue de cytokines par les lymphocytes T CD8⁺ et les lymphocytes T CD4⁺ (84). Des résultats du laboratoire confirment le rôle de l'HI dans l'apparition de ce statut

inflammatoire observé chez les patients apnéiques. Chez la souris C57Bl6, 2 semaines d'HI entraîne une augmentation de l'expression de chémokines pro-inflammatoires au niveau de la rate (14), ainsi qu'une augmentation des capacités migratoires et prolifératives des lymphocytes T spléniques (14).

▪ Voie de l'acide arachidonique

Voie de la 5-lipoxygénase. Les voies de signalisation associées au métabolisme de l'acide arachidonique (AA) constituent des mécanismes inflammatoires qui peuvent également être impliqués dans l'athérogenèse associée au SAOS. L'acide arachidonique est un précurseur des eicosanoïdes qui regroupent, entre autres, les leucotriènes (LTs). Les LTs sont des dérivés lipidiques associés à la voie enzymatique de la 5-lipoxygénase (5-LO). L'implication des LTs dans le processus pré-athéromateux est liée à leurs nombreux effets sur les cellules inflammatoires (recrutement, adhésion et stimulation des monocytes et des lymphocytes T), endothéliales (activation) et musculaires lisses (recrutement et prolifération) (20). En 2008, des travaux du laboratoire montrent pour la première fois une augmentation de la production de LTB₄, un sous-type de LTs, par les polynucléaires des patients apnéiques. De plus, la production de LTB₄ est significativement corrélée à la sévérité de la désaturation nocturne en oxygène, ainsi qu'aux valeurs de diamètre de la lumière carotidienne chez les patients apnéiques modérés à sévères. Par ailleurs, les taux de LTB₄ sont diminués de 50% après traitement par PPC (170). En 2009, une augmentation des LTE₄ urinaires est décrite chez des patients apnéiques non-obèses comparé à des sujets sains et ce, indépendamment de facteurs confondants tels que le poids (sujets contrôles appariés pour le poids), l'âge ou encore le sexe (329). Plus récemment, l'étude de Stanke-Labesque *et al* montre une activation de la voie des LTB₄ chez les patients SAOS modérés à sévères, caractérisée par une augmentation de l'expression de deux enzymes clés de la biosynthèse du LTB₄, à savoir la *5-Lipoxygenase-Activating Protein* (FLAP) et la leucotriène-A₄ hydrolase (LTA₄H) (330). *In vitro*, l'exposition à l'HI de polynucléaires neutrophiles de sujets contrôles induit la surexpression de la FLAP et de LTA₄H (330). L'ensemble de ces résultats décrivent l'implication des LTs, dans la physiopathologie des atteintes vasculaires liées au syndrome apnéique. Ces données cliniques sont confirmées par les données expérimentales de l'équipe de Gozal *et al*. D'après leurs résultats, les souris double *knock-out* pour l'ApoE et pour le BLT₁ – un des récepteurs du

LTB₄ – sont protégées de l'effet athérogène de l'HI (178). La voie LTB₄/BLT₁ semble donc jouer un rôle dans l'athérogenèse induite par l'HI.

Voie de la cyclooxygénase. La grande famille des eicosanoïdes regroupent également les prostanoïdes, des dérivés lipidiques dont la voie enzymatique dépend de la cyclooxygénase (COX). L'implication de cette voie dans l'athérosclérose associée au SAOS est très peu connue, mais a été étudiée chez des animaux exposés à l'HI et concerne principalement l'inflammation vasculaire. En 2012, Gautier *et al* montre que 8 semaines d'exposition à l'HI entraînent, au niveau du tissu aortique de souris ApoE^{-/-}, une surexpression de la COX-1 et de la thromboxane synthétase, une enzyme impliquée dans le métabolisme de l'AA dépendant de la COX. De plus, cette suractivation transcriptionnelle corrèle positivement avec l'augmentation des lésions athérosclérotiques, suggérant l'implication de cette voie dans le processus athérogène induit par l'HI (104).

▪ **Inflammation vasculaire**

Des travaux récents réalisés par notre équipe montrent une augmentation du roulement leucocytaire et de l'expression de l'*Intercellular Adhesion Molecule* (ICAM)-1 dans les vaisseaux mésentériques chez des souris exposées à 14 ou 35 jours d'HI. En parallèle de l'épaississement de l'EIM décrit précédemment, cette étude montre également une surexpression de la chémokine *Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted* (RANTES)/*C-C Chemokine Ligand 5* (CCL5) et une infiltration lymphocytaire au niveau de la paroi vasculaire (14). L'HI semble avoir joué un rôle direct sur les atteintes vasculaires, puisqu'une exposition à ce stimulus entraîne l'activation du facteur de transcription NFκB dans les tissus cardiovasculaires de souris (14) (109), de rats (179), ainsi que dans les cellules en culture (287). Le facteur de transcription pro-inflammatoire NFκB est reconnu comme un médiateur clé de la réponse inflammatoire, puisqu'il participe à l'expression de facteurs pro-inflammatoires tels que des cytokines (TNFα, IL-6, IL-8), des molécules d'adhérence (ICAM-1) ou encore des enzymes (cyclooxygénase 2) (24), dont les taux sont augmentés chez les patients SAOS (235) (211). Malgré ces observations, la cascade de signalisation induite par le stimulus hypoxique, et à l'origine de cette athérogenèse, reste à préciser. Des travaux du laboratoire (14) ainsi que ceux de l'équipe de Greenberg *et al* (109), montrent que l'HI augmente l'activité de NFκB dans les tissus cardiovasculaires, induisant

ainsi l'expression de nombreux gènes dont la plupart joue un rôle dans l'athérogenèse (58). Très récemment, Song *et al* suggèrent que la voie de signalisation associée à NFκB pourrait être impliquée dans l'apparition de l'athérosclérose induite par l'HI. En utilisant des souris C57Bl6 présentant une délétion pour la sous-unité p50 de NFκB, nourries avec un régime riche en gras et exposées à 14 semaines d'HI, ils montrent que l'absence de NFκB-p50 ralentit l'apparition des lésions athéromateuses liées à l'HI (324). En revanche, chez des souris ApoE^{-/-} soumises à 9 semaines d'HI et nourries avec un régime standard, il semble que la délétion pour la sous-unité p50 de NFκB (souris double *knockt-out* ApoE^{-/-}/NFκB-p50^{-/-}) accélère le développement des plaques d'athérosclérose (89). La divergence de ces résultats pourrait être liée au modèle animal (souris C57Bl6 ou ApoE^{-/-}) et/ou à l'initiation du processus athérogène (artificielle avec un régime riche en gras, ou spontanée). En effet, selon les contextes, la sous-unité p50 interagit différemment avec les 4 autres sous-unités de NFκB (p52^{NF-κB2}, p65^{RelA}, RelB et c-Rel) et peut alors avoir des effets pro-inflammatoires (374) ou anti-inflammatoires (87). L'implication de NFκB-p50 dans les mécanismes athérogènes induits par le stimulus hypoxique reste donc à préciser.

D'après les travaux réalisés chez les patients apnéiques et chez les animaux soumis à une HI, il apparaît que l'effet athérogène de l'HI est lié, en partie, aux altérations inflammatoires induites par ce stimulus. L'instauration de ce phénotype inflammatoire peut être considérée comme une des causes majeures de l'athérosclérose observée chez les patients apnéiques.

2.4. Altérations métaboliques

Les dysfonctions métaboliques observées au cours du SAOS sont liées à un déséquilibre glucido-lipidique. Les cycles d'HI, mais également la fragmentation du sommeil évaluée lors de la polysomnographie, sont les deux composantes du SAOS qui participent à ces altérations. Malgré leur rôle important, les mécanismes associés aux troubles du sommeil seront abordés de façon succincte, principalement dans la partie concernant le métabolisme glucidique. Ce chapitre sera donc essentiellement consacré aux effets délétères de la composante hypoxique sur l'homéostasie glucidique et lipidique.

▪ Dysfonctions du métabolisme glucidique

SAOS, intolérance au glucose et syndrome métabolique. De nombreuses études décrivent un lien entre SAOS et intolérance au glucose ou insulino-résistance (265) (162) (291) (293) (155) (134) (120), mais toutes ne trouvent pas une relation indépendante entre les troubles respiratoires du sommeil et les anomalies métaboliques lorsque les paramètres sont ajustés pour l'obésité. Une étude réalisée à partir d'une cohorte de 57 patients par Tassone *et al* montre que les patients SAOS obèses présentent un degré d'insulino-résistance plus important comparativement à des sujets obèses non-SAOS, indépendamment du degré d'obésité et de la répartition du tissu adipeux (346). D'après les résultats de la cohorte de la *Sleep Heart and Health Study*, il existe une corrélation entre la sévérité du SAOS, la glycémie à jeun et l'altération de la tolérance au glucose (265). Ces données sont confirmées par celles de l'étude de Ip *et al* qui montre que le SAOS est associé à une insulino-résistance indépendamment de la présence d'une obésité (134). De plus, la SaO₂ minimale nocturne apparaît comme un facteur prédictif de l'insulino-résistance indépendamment de l'IMC ou du rapport taille sur hanche (134) (266). Indépendamment de la définition choisie (définition du *National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel (ATP) III* (98), ou définition de l'Organisation Mondiale de la Santé (4)) le syndrome métabolique est très souvent retrouvé chez les patients apnéiques. Le risque de développer ce syndrome augmente avec la sévérité des troubles respiratoires du sommeil, à la fois dans les populations occidentales et orientales (112) (162) (293) (155). A l'heure actuelle, les études publiées s'accordent sur un risque approximatif multiplié par 5 de développer un syndrome métabolique chez les patients SAOS comparé aux sujets sains, mais le rôle relatif du SAOS et de l'obésité dans la pathogenèse du

syndrome métabolique reste à déterminer. Par ailleurs, la prévalence du syndrome métabolique est plus élevée chez les patients présentant un SAOS comparé à la population générale, ou bien chez les sujets obèses sans SAOS (310).

Effets de la PPC. Chez des patients non-diabétiques, Harsch *et al* montrent que la sensibilité à l'insuline – évaluée de façon directe par un clamp euglycémique hyperinsulinémique – est améliorée après 3 mois de PPC (120). Par ailleurs, chez les non-diabétiques non-obèses dont l'IMC est inférieur à 30 kg/m², il semble qu'une nuit seulement de PPC permette d'augmenter l'indice de sensibilité à l'insuline (120). Chez des apnéiques souffrant d'un diabète de type 1 et dont la sensibilité à l'insuline est également mesurée par un clamp, 4 mois de PPC ont un effet bénéfique chez les patients présentant une obésité morbide (IMC supérieur à 42,7 kg/m²) (37). Malgré des résultats positifs, l'effet de la PPC sur l'insulino-résistance des patients apnéiques reste très incertain. En effet, l'étude de West *et al* menée chez des apnéiques présentant un diabète de type 2, ne montre aucun effet de la PPC sur la sensibilité à l'insuline (mesurée à par clamp) après 3 mois de traitement (380). Cette absence d'effet est également décrite par l'équipe de Saarelainen et l'équipe de Smurra chez des apnéiques non-diabétiques, qui ne montrent aucune amélioration de leur sensibilité à l'insuline après 1 nuit (289) ou 2 mois (320) de PPC. Chez des patients SAOS présentant un syndrome métabolique, l'effet de ce traitement sur l'homéostasie glucidique est aussi controversé. Après 8 semaines de PPC, Dorkova *et al* décrivent un effet bénéfique de la PPC sur l'insulino-sensibilité globale évaluée à l'aide du modèle mathématique *Homeostatic Model Assessment* (HOMA)-IR (74). En revanche, des études moins enthousiastes ne montrent aucun effet de la PPC sur l'insulino-résistance systémique, également évaluée par l'HOMA-IR (309) (62). Ces discordances pourraient s'expliquer par la méthode utilisée pour l'évaluation des troubles métaboliques. Dans certaines études où la mesure de la sensibilité à l'insuline ne constitue pas un paramètre principal, une mesure moins contraignante que le clamp mais indirecte, est réalisée. Le calcul de l'HOMA-IR permet d'estimer approximativement la résistance à l'insuline systémique selon un modèle mathématique, dont les limites sont reconnues (217). La méthode d'évaluation utilisée (clamp euglycémique hyperinsulinémique ou HOMA-IR) pourrait expliquer certaines controverses de la littérature.

Fragmentation du sommeil. Les troubles du sommeil sont connus pour participer aux altérations du métabolisme glucidique (326). La sécrétion du cortisol (qui stimule la sécrétion

hépatique de glucose, entre autres) et de l'hormone de croissance (qui a une action lipolytique, hyperglycémiant et donc diabétogène) suit un rythme circadien, synchronisée sur le cycle nyctéméral. Ces deux hormones sont impliquées dans la régulation de l'homéostasie glucidique (figure 5). Il est montré qu'une fragmentation du sommeil diminue la sécrétion d'hormone de croissance (363) et augmente la sécrétion de cortisol (171). De plus, une restriction de sommeil accroît l'activité sympathique (327) et stimule l'inflammation (208). Ainsi, l'ensemble de ces mécanismes associés aux troubles du sommeil liés au SAOS participent progressivement à l'intolérance au glucose, à l'insulino-résistance, et plus tardivement à l'apparition d'un diabète de type 2 (figure 5).

Rôle de l'hypoxie intermittente. Les données concernant les effets délétères de l'HI sur la sensibilité à l'insuline sont hétérogènes et dépendent notamment de la durée d'exposition au stimulus, du modèle murin – obèse ou non-obèse – ou encore de la souche utilisée – sauvage ou mutée. Chez des souris C57Bl6 non-obèses et à la fin de 9h d'exposition, l'HI entraîne une insulino-résistance aiguë évaluée par un clamp euglycémique hyperinsulinémique (132). Cette résistance à l'insuline est transitoire car elle peut être normalisée après un arrêt du stimulus hypoxique diurne (390). Une exposition chronique à l'HI durant 4 (78) ou 12 semaines (255) aggrave l'insulino-résistance et l'intolérance au glucose chez des souris génétiquement obèses (souris déficientes pour la leptine) (255) ainsi que chez des souris dont l'obésité est causée par un régime gras (78). En 2009, des volontaires sains sont exposés à un stimulus hypoxique mimant un SAOS modéré. Après 5h d'exposition, le test dynamique de tolérance au glucose (*Frequently Sampled Intravenous Glucose Tolerance Test*, FSIVGTT) montre une diminution de la sensibilité à l'insuline (évaluée à partir du modèle d'analyse minimal (34)) ainsi qu'une diminution de l'efficacité du glucose (capacité du glucose à faciliter sa propre incorporation) (183).

De nombreux mécanismes liés à l'HI peuvent être à l'origine des altérations du métabolisme glucidique. Une étude expérimentale menée par Polotsky *et al* montre que des souris exposées à un stimulus hypoxique durant 4 ou 12 semaines présentent un taux augmenté d'acides gras libres (142), suggérant une hyperactivité lipolytique adipeuse durant l'HI. L'augmentation du flux d'acides gras libres et l'activation de la biosynthèse lipidique sont à l'origine de dépôts lipidiques ectopiques au niveau du foie et du muscle (figure 6). Cet excès d'acides gras participent à l'altération de l'insulino-sensibilité hépatique en diminuant l'activité des *Insulin Receptor Substrate* (IRS)-1 et 2 (295). Les catécholamines sécrétées lors de l'hyperactivité

sympathique stimulent directement la néoglucogenèse (synthèse de glucose à partir de précurseurs non glucidiques) et la glycogénolyse (synthèse de glucose à partir du glycogène). De plus, les corticostéroïdes relargués suite à l'activation par l'HI de l'axe hypothalamo-hypophysaire (390), inhibent la glycogénogenèse (stockage du glucose sous forme de glycogène) et augmentent la néoglucogenèse. L'altération de ces différentes voies de régulation impliquées dans le métabolisme hépatique du glucose, participe à l'instauration d'une hyperglycémie pathologique. De la même façon que pour le foie, il apparaît que les dépôts lipidiques intra-myocellulaires entraînent une insulino-résistance musculaire (138) (figure 6) en inhibant la signalisation insulinique (67). D'après les résultats d'une étude expérimentale menée chez des souris C57Bl6 exposées à une HI pendant 9 heures, le stimulus hypoxique entraîne une diminution de l'utilisation du glucose et une augmentation de l'insulino-résistance au niveau des fibres musculaires oxydatives (muscle soléaire), mais pas au niveau des fibres glycolytiques (muscle gastrocnémien) (132). Les corticostéroïdes jouent également un rôle dans cette mécanistique, notamment par l'inhibition de la translocation insulino-dépendante des *Glucose Transporteur Type 4* (Glut-4) à la surface des cellules du muscle (215), diminuant ainsi l'incorporation de glucose.

Le glucagon est une hormone hyperglycémisante, sécrétée par les cellules α pancréatiques, et qui stimule la mobilisation du glycogène hépatique, celui-ci étant alors libéré dans le sang sous forme de glucose. Les effets de l'HI sur la sécrétion de glucagon sont méconnus ; en revanche, il semble que l'hypoxie continue entraîne des modifications de cette sécrétion. En effet, Chen *et al* montrent, chez des rats mâles adultes Sprague Dawley, qu'après 2 jours d'exposition à l'hypoxie (environ 11% d'O₂, équivalents à 5000 mètre d'altitude), la concentration plasmatique de glucagon est augmentée de façon transitoire, puisque cette augmentation disparaît après 5 jours d'exposition (47). D'après ces données, le glucagon pourrait être impliqué dans les altérations du métabolisme glucidique induites par l'HI.

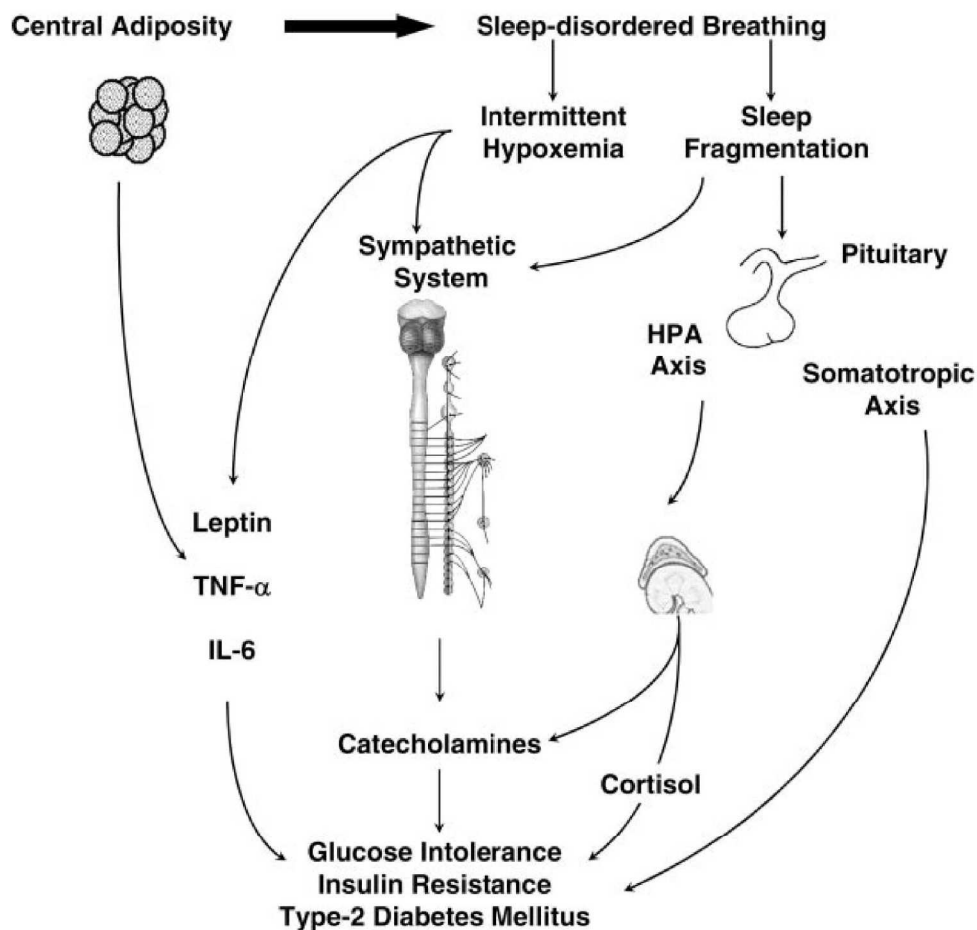


Figure 5. Schéma des mécanismes intermédiaires reliant SAOS à l'intolérance au glucose, l'insulino-résistance et au diabète de type 2. D'après Punjabi *et al*, 2005 (264).

Le lien entre insulino-résistance et altération de la fonction endothéliale est largement reconnu (151) (218). Dans ce contexte d'altération de la sensibilité à l'insuline, de nombreuses études montrent que l'exposition des vaisseaux à des niveaux élevés d'acides gras libres induit une dysfonction endothéliale (331) (10) (356). Des adipokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α (197) ou encore la leptine (372) peuvent avoir des effets délétères sur la fonction endothéliale. La plupart de ces effets sont liés à une diminution de la biodisponibilité du monoxyde d'azote induite par l'insulino-résistance, à l'origine d'une altération de la vasodilatation endothéliale. De plus, une hyperinsulinémie compensatrice se met en place, en réponse à la résistance à l'insuline. L'insuline, dont les effets pleiotropes sont comparables à ceux de facteurs de croissance, induit une prolifération des cellules musculaires lisses, ou encore une dégénérescence vasculaire. Progressivement, la dysfonction vasculaire entraîne une augmentation de l'EIM puis, à plus long terme, le développement de l'athérosclérose.

▪ **Dysfonctions du métabolisme lipidique**

SAOS, dyslipidémies et atteintes hépatiques. A l'heure actuelle, les données cliniques concernant l'impact du SAOS sur les dyslipidémies sont peu convaincantes. En effet, la plupart des résultats sont obtenus à partir d'études cliniques transversales et non-randomisées, avec de faibles cohortes de patients. La majorité de ces travaux ne sont pas élaborés de façon à évaluer précisément le profil lipidique des patients apnéiques. De nombreuses études transversales suggèrent que ni le cholestérol total, ni le LDL-cholestérol ne sont augmentés chez les patients SAOS comparé aux sujets contrôles et ce, indépendamment de certains facteurs confondants tels que le poids (61) (75) (212) (343). Cependant, il est important de noter qu'en plus de la quantité, la qualité des lipides peut être altérée. En effet, les LDL peuvent subir une oxydation, ce qui leur confère alors un fort pouvoir athérogène *via* leur incorporation par les macrophages. Contrairement aux données précédentes, l'étude publiée par McArdle *et al* en 2007 montre que le cholestérol total et le LDL-cholestérol sont augmentés chez les patients SAOS comparé aux sujets contrôles (204). Par ailleurs, d'après Newman *et al* (227) et Roche *et al* (277), il semble que le SAOS soit associé à une diminution du HDL-cholestérol et une augmentation des triglycérides plasmatiques.

Au cours de l'obésité, un déséquilibre lipidique (lié aux acides gras libres et aux triglycérides) associé à une insulino-résistance participe au développement d'une stéatose hépatique (*Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*, NAFLD), dont l'évolution grave est la stéatohépatite non alcoolique (*Non-Alcoholic SteatoHepatitis*, NASH) (56). Chez les patients SAOS, l'association entre ce syndrome et la stéatose hépatique est bien décrite (348) (344) (141) et fait l'objet d'une revue récente (2). En 2012, l'étude menée par Pépin *et al* chez des patients apnéiques présentant une obésité morbide, révèle que les lésions hépatiques de type NAFLD, la fibrose et le score d'activité NAFLD (*NAFLD Activity Score*, NAS) sont significativement plus sévères chez les patients ayant un index de désaturation en oxygène élevé (16).

Effet de la PPC. Les études randomisées évaluant l'effet de la PPC sur le profil lipidique des patients apnéiques sont rares et peu concluantes. En 2007 et 2009, 3 groupes s'intéressent aux effets d'un tel traitement sur les taux circulants de cholestérol total, de LDL-cholestérol, de HDL-cholestérol et de triglycérides (75) (59) (62). D'après leurs résultats, 6 semaines (62), 1 mois (59) ou 4 mois (75) de traitement par PPC n'ont pas d'effets sur la dyslipidémie associée au SAOS. Seuls Robinson *et al* montrent que 1 mois de PPC permet de corriger l'élévation du

cholestérol total associé au SAOS (275). Les données obtenues à partir d'études non-randomisées sont, en revanche, plus positives. En effet, il semble qu'après 1, 2 ou 6 mois de PPC, les patients apnéiques présentent une diminution significative du cholestérol total (332) (64), du LDL-cholestérol (50) (64) et une augmentation significative du HDL-cholestérol (50).

Rôle de l'hypoxie intermittente. D'après les données expérimentales, il apparaît clairement que l'HI peut être une cause directe d'hyperlipidémie. Des souris C57Bl6 (176) ou ApoE^{-/-} (142) (15) exposées à une HI durant 5 jours (176), 2 (15), 4 et 12 semaines (142) présentent des taux plasmatiques augmentés de cholestérol total, de LDL-cholestérol et de triglycérides. De plus, la sévérité des altérations lipidiques est corrélée positivement à la sévérité du stimulus hypoxique (175). L'augmentation du risque cardiovasculaire associé au SAOS pourrait donc être attribuée, au moins en partie, aux dyslipidémies induites par l'HI.

Le métabolisme lipidique hépatique est régulé par le *Sterol Regulatory Element-Binding Proteins* (SREBP)-1 qui active l'expression de nombreux gènes impliqués dans la synthèse et l'incorporation des acides gras, des triglycérides, du cholestérol et des phospholipides (figure 6). Chez des souris C57Bl6 non-obèses, une exposition à 5 jours d'HI entraîne une surexpression de SREBP-1 (173) (174), qui se traduit par une accumulation hépatique de triglycérides, de cholestérol et de phospholipides (173) (174) (176). Chez ces mêmes animaux, et après 4 semaines d'HI, une augmentation de la biosynthèse hépatique de la *Stearoyl Coenzyme A Desaturase* (SCD)-1 – une enzyme impliquée dans la conversion des acides gras saturés en acides gras monosaturés – est observée (176) (figure 6). Polotsky *et al* décrivent une augmentation du taux d'acides gras libres au niveau plasmatique de souris ApoE^{-/-}, suite à une exposition à l'HI de 4 ou 12 semaines (142), suggérant une hyperactivité lipolytique adipeuse et de ce fait, une augmentation du flux d'acides gras libres vers le foie. Chez des souris C57Bl6 non-obèses, l'HI induit une atteinte hépatique (figure 6), associée à un stress oxydant et une accumulation excessive de glycogène (299). L'HI seule n'entraîne pas de NASH ; en revanche, lorsqu'elle est associée à un régime riche en graisse, elle participe à l'aggravation des lésions hépatiques qui se caractérisent alors par l'apparition de lobules inflammatoires, d'un état fibrotique et une expression accrue de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6 et MIP-2) (296). En présence de co-morbidités, l'HI pourrait donc jouer un rôle dans la physiopathologie de la NASH observée chez les patients apnéiques obèses (256).

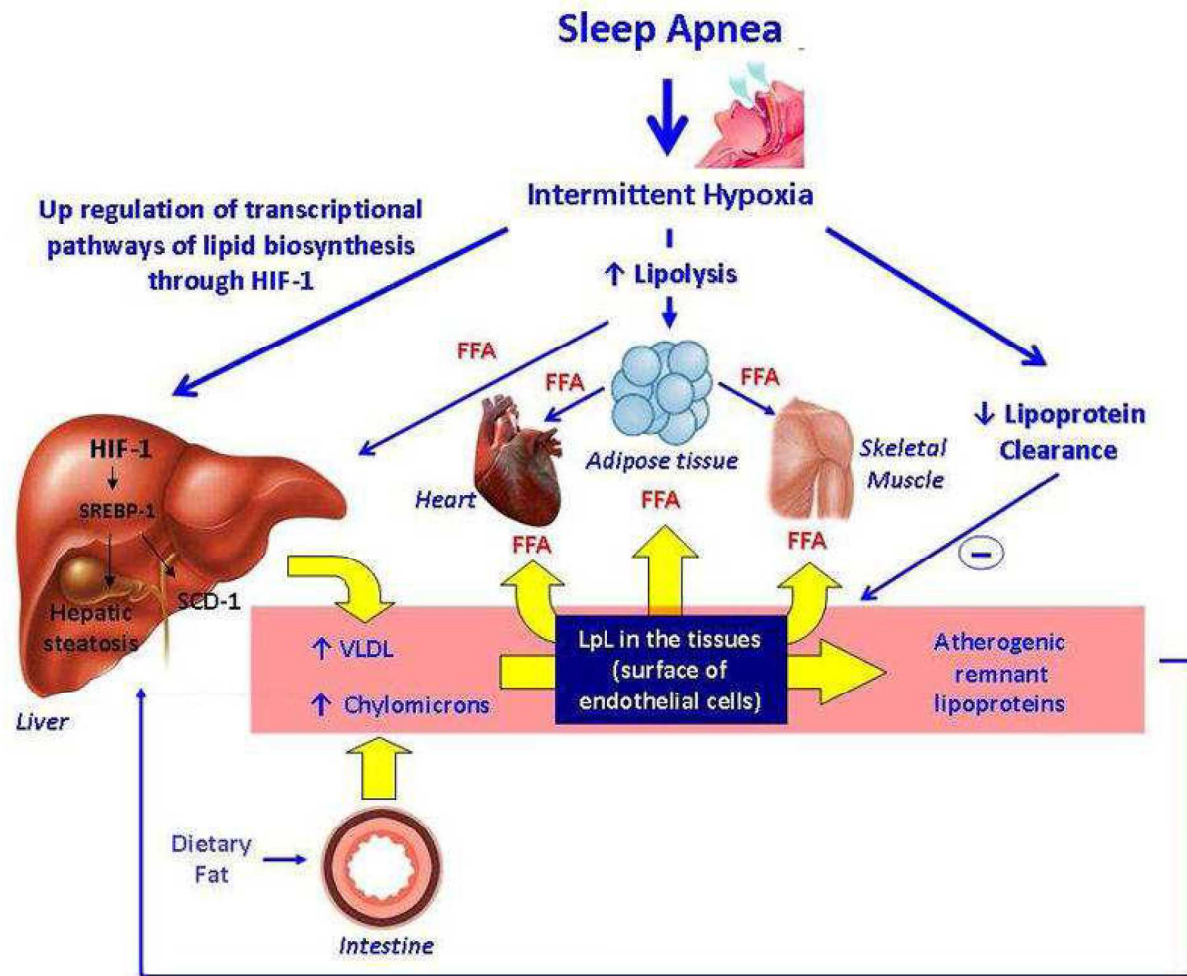


Figure 6. Schéma des principaux mécanismes par lesquels l'hypoxie intermittente entraîne un déséquilibre du métabolisme lipidique. D'après Drager *et al*, 2011 (77).

D'une façon générale, les atteintes hépatiques et musculaires induites par l'HI entraînent une dyslipidémie. Ce déséquilibre lipidique est une étape clé de l'athérogenèse, puisqu'il participe à la formation de cellules spumeuses (macrophages gonflés de gouttelettes lipidiques) qui constituent en partie les plaques d'athérosclérose. La stéatose hépatique est également associée de façon indépendante à une augmentation du risque cardiovasculaire (345) (333). Des études utilisant des marqueurs subcliniques de risque cardiovasculaire montrent que les patients présentant une NAFLD, présentent également une augmentation de l'EIM carotidienne (99) et une augmentation de la prévalence de l'athérosclérose carotidienne (325). Ces mécanismes dépendants de l'HI jouent ainsi un rôle majeur dans l'apparition des lésions athéromateuses observées après une exposition à ce stimulus. L'ensemble de ces données font

l'objet d'une revue très récente (12), et mettent évidence le rôle central du tissu adipeux dans ces dysfonctions métaboliques. En effet, depuis quelques années déjà, le tissu adipeux blanc est décrit non seulement comme un organe de stockage, mais également comme un organe sécréteur de médiateurs inflammatoires, ayant une activité endocrine, paracrine et autocrine. De part cette fonction, le tissu adipeux blanc viscéral joue un rôle majeur dans l'instauration des anomalies métaboliques et inflammatoires, observées au cours de l'obésité par exemple.

3. Tissu adipeux viscéral et altérations métaboliques et vasculaires liées au SAOS

3.1. Le tissu adipeux

A l'heure actuelle, on distingue 2 grands types de tissu adipeux, à savoir le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun, caractérisés par une distribution et des fonctions spécifiques.

- **Tissu adipeux blanc**

En 2003, Shen *et al* proposent une classification systématique de la localisation anatomique des tissu adipeux blancs humains, et distingue ainsi deux grands types de tissus adipeux blancs : le tissu adipeux blanc sous-cutané et le tissu adipeux blanc profond (311). Le tissu adipeux sous-cutané est défini comme la couche de tissu adipeux se situant entre la peau, et les aponévroses et les fascias des muscles. Ce dépôt constitue environ 80% de la masse graisseuse totale d'un individu (370). Contrairement au territoire sous-cutané, la classification anatomique du tissu adipeux blanc profond est plus complexe. Les différents compartiments de la partie viscérale de ce tissu adipeux profond sont classifiés selon le schéma suivant :

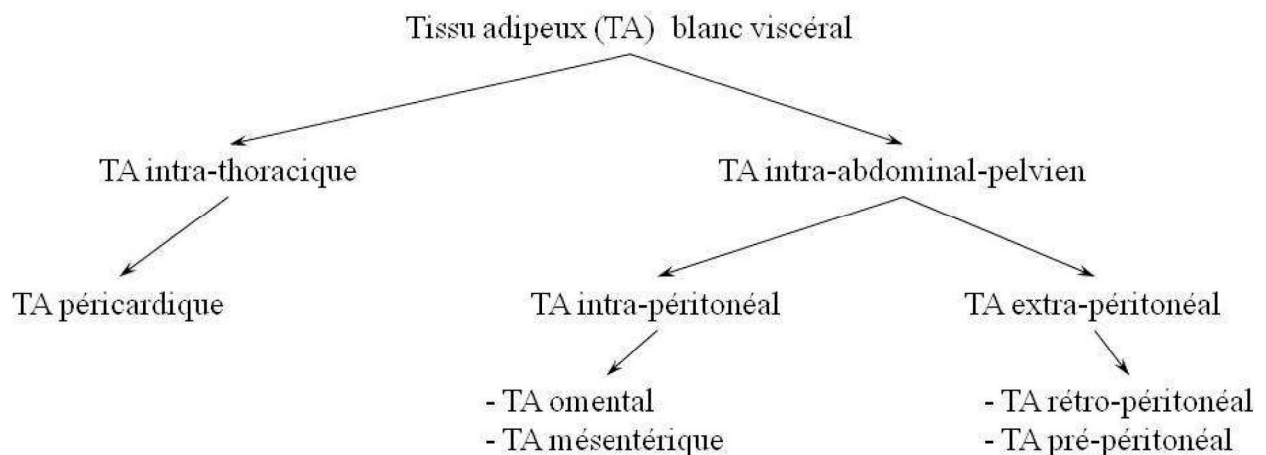


Figure 7. Classification schématique des différents compartiments du tissu adipeux blanc profond viscéral. D'après Shen *et al*, 2003 (311).

Chez l'Homme, la désignation « tissu adipeux viscéral » est très souvent utilisée dans la littérature, et inclus indistinctement les tissus adipeux intra et extra-péritonéal. Au-delà de cette approximation, il apparaît que la proportion de tissu adipeux viscéral dans la masse graisseuse totale d'un individu est bien inférieure à celle du tissu adipeux sous-cutané, puisqu'il représente seulement 10 à 20 % de la masse graisseuse totale chez les hommes, et 5

à 8 % chez les femmes (370). Chez la souris, le tissu adipeux péri-gonadal (ou épидидymal chez le mâle) est l'équivalent du tissu adipeux viscéral de l'humain.

L'adipocyte blanc est constitué principalement d'une vacuole riche en triglycérides – permettant le stockage des nutriments lipidiques – qui refoule à la périphérie le noyau et le cytoplasme (figure 8). Le tissu adipeux blanc renferme 5 à 15 % d'eau et une faible proportion de protéines de la trame conjonctive. Le stockage et la mobilisation de l'énergie sont la principale fonction de ces deux grands compartiments adipeux puisqu'en condition physiologique, l'accumulation de tissu adipeux représente un processus normal d'adaptation à l'excès d'apport énergétique et/ou à une dépense énergétique limitée. Outre cette fonction de stockage et de « déstockage », l'activité endocrine et paracrine de ces tissus adipeux est largement reconnue. En effet, le tissu adipeux blanc est capable de sécréter une diversité de cytokines pro- et anti-inflammatoires, également appelées « adipokines », ainsi que de nombreux médiateurs impliqués dans la régulation de certains processus biologiques (1). Malgré des fonctions communes, la distribution respective des tissus adipeux blancs contribue à des différences régionales en terme d'activité lipolytique (351), ou encore de sécrétion de médiateurs inflammatoires (tableau 2) (370). De plus, le tissu adipeux viscéral est le seul compartiment drainé par la circulation portale. Du fait de cette position anatomique, le sang veineux à l'origine du tissu adipeux viscéral bénéficie d'un accès direct vers le foie, contrairement au tissu adipeux sous-cutané, pour lequel le drainage veineux est systémique. Ainsi, la sécrétion d'acides gras libres et d'adipokines par le tissu adipeux viscéral participent préférentiellement aux altérations métaboliques observées, par exemple, dans l'obésité.

Facteurs sécrétés	Niveau de sécrétion		Effets sur
	Tissu adipeux viscéral	Tissu adipeux sous-cutané	
<i>Retinol Binding Protein</i> (RBP) -4	+	+	- Insulino-résistance - Intolérance au glucose
Estrogènes	+	+	- Prise alimentaire - Métabolisme glucidique - Distribution du tissu adipeux
<i>Insulin-like Growth Factor</i>	+	+	- Insulino-résistance
Vistafine (PBEF)	++	+	- Insulino-résistance
Résistine (FIZZ3)	+	+	- Insulino-résistance - Inflammation
Leptine	+	++	- Comportement alimentaire - Prise alimentaire - Masse graisseuse
Adiponectine	++	+	- Insulino-résistance - Inflammation
<i>Tumor Necrosis Factor</i> (TNF) - α	+	+	- Insulino-résistance - Inflammation
Interleukine (IL) -6	++	+	- Insulino-résistance - Inflammation
<i>Plasminogen Activator Inhibitor</i> (PAI) -1	+	+	- Fibrinolyse

Tableau 2. Principaux facteurs sécrétés dans les deux compartiments adipeux, viscéral et sous-cutané. D'après Wajchenberg, 2000 (370) et Tilg *et al*, 2006 (354).

▪ Tissu adipeux brun

Contrairement aux autres organes, ce n'est que très tardivement – au début du vingtième siècle – que le tissu adipeux brun est reconnu comme un tissu distinct et histologiquement mature (122). Le tissu adipeux brun est présent chez les nourrissons ainsi que chez les enfants, chez lesquels il représente environ 2 à 5 % du poids corporel total. Ce compartiment adipeux diminue au cours du temps puisqu'à l'âge adulte, il ne représente plus que 0,05 à 0,1 % du poids corporel total. Chez l'adulte, les zones de distribution majoritaires du tissu adipeux brun

sont les zones cervicales/axillaires, les zones périrénales/surrénales, et les zones situées le long des larges vaisseaux (aorte) et de la trachée. Le rôle physiologique du tissu adipeux brun en tant qu'effecteur thermogénique est décrit pour la première fois en 1964 par Cameron *et al* (39). Le tissu adipeux brun est caractérisé par des adipocytes riches en gouttelettes lipidiques multiloculaires et en mitochondries, leur conférant ainsi une forte capacité d'oxydation et de production de chaleur (figure 8). L'*Uncoupling Protein* (UCP)-1 – une protéine découplante exprimée à la surface de la membrane interne mitochondriale – joue un rôle majeur dans cette thermogénèse (42). Les gènes tels que celui du *Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator* (PGC) 1- α , du cytochrome c, du récepteur β 3-adrénérique et du *PR Domain containing* (PRDM) 16 sont fortement exprimés au niveau de l'adipocyte brun. Cette spécificité transcriptionnelle reflète les caractéristiques fonctionnelles de ce tissu, à savoir de grandes capacités oxydatives et une grande sensibilité aux catécholamines (42).

A l'âge adulte, le tissu adipeux brun est en faible quantité. Cependant, il semble que ces dépôts peuvent être métaboliquement actifs chez certains individus. La première preuve indirecte évoquant une implication du tissu adipeux brun dans la régulation de la balance énergétique et du poids corporel est obtenue grâce à des études réalisées chez des patients souffrant de phéochromocytome. Lean *et al* suggèrent que les taux élevés de noradrénaline circulante observés chez ces patients (ré)activent le tissu adipeux brun, contribuant ainsi à la perte de poids drastique associée à l'apparition de cette tumeur (166). Grâce à la technique de tomодensitométrie couplée à une tomographie par émission de positons permettant de mesurer l'incorporation de glucose dans les biopsies de tissu adipeux, l'équipe de Virtanen *et al* (368), et l'équipe de van Marken Lichtenbelt *et al* (364), montrent en 2009, la présence de tissu adipeux brun métaboliquement actif chez des volontaires sains exposés au froid. De plus, il apparaît que l'IMC et la masse grasseuse totale sont corrélés négativement à l'activité du tissu adipeux brun, après une analyse par régression non-linéaire (364). Très récemment, les données expérimentales de Stanford *et al* confirment l'hypothèse selon laquelle le tissu adipeux brun joue un rôle primordial dans le maintien d'un statut métabolique physiologique. D'après leurs résultats obtenus chez des souris C57Bl6, la transplantation de tissu adipeux brun au niveau de la cavité viscérale permet d'améliorer la résistance à l'insuline induite par 18 semaines de régime riche en gras (328). De plus, les effets bénéfiques de cette transplantation sont dépendants de la quantité de tissu adipeux brun ajoutée (328).

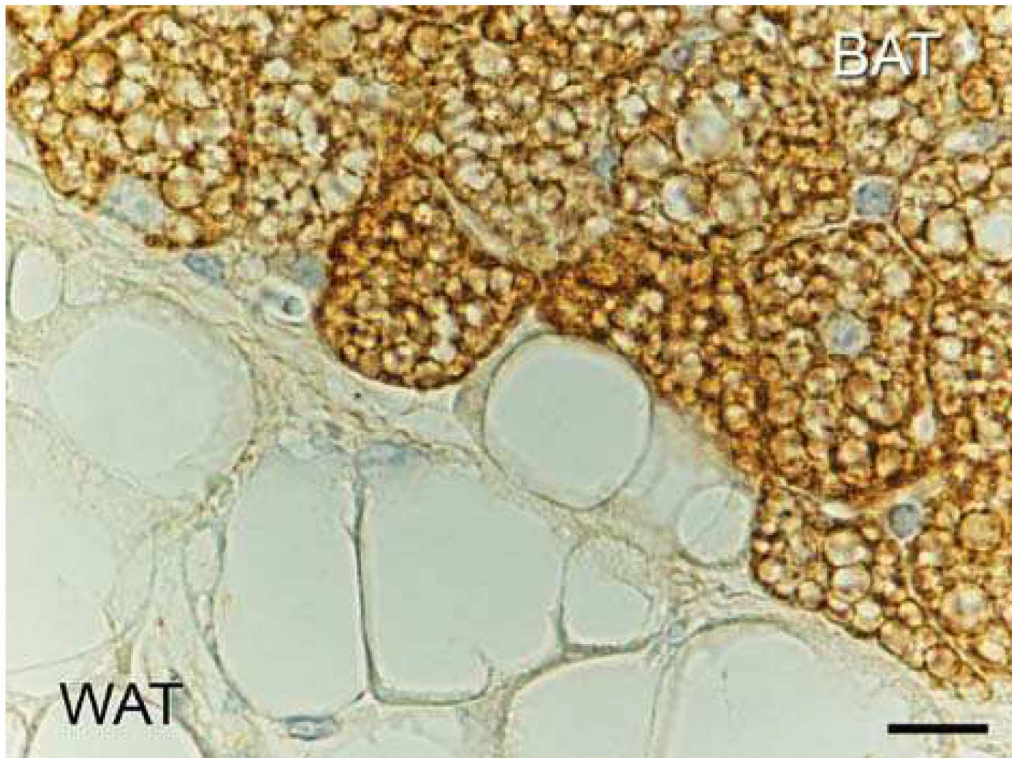


Figure 8. Coupes immunohistochimiques d'un dépôt de tissu adipeux brun (*Brown Adipose Tissue*, BAT) et d'un dépôt de tissu adipeux blanc sous-cutané (*White Adipose Tissue*, WAT) dans une zone où les deux tissus se côtoient. Les adipocytes bruns multiloculaires et exprimant UCP-1 (en haut), ainsi que les adipocytes blancs uniloculaires et n'exprimant pas UCP-1 (en bas), sont visibles. D'après Cinti, 2011 (55).

3.2. Dysfonctions du tissu adipeux viscéral et altérations métaboliques et vasculaires

▪ Tissu adipeux et équilibre glucido-lipidique

Malgré une ingestion épisodique de glucides, le taux de glucose plasmatique reste constant durant toute la journée. En réponse à une élévation de glucose, les cellules β pancréatiques sécrètent de l'insuline, qui stimule l'incorporation du glucose au niveau du muscle et du tissu adipeux. Ce mécanisme permet de prévenir la production de glucose hépatique, en ralentissant la glycogénolyse et la néoglucogenèse. Au niveau du tissu adipeux, l'incorporation du glucose se fait grâce aux transporteurs membranaires Glut-4 insulino-sensibles. Le tissu adipeux blanc a des effets importants sur le contrôle global de la glycémie, bien qu'il ne contribue qu'à une faible proportion de l'élimination du glucose (environ 10 à 15 %) (143), comparé au muscle, responsable de la plus grande partie de cette élimination (> 80 %).

Le territoire adipeux joue également un rôle majeur dans le stockage des lipides absorbés au cours de la journée, qui sont accumulés sous forme de triglycérides dans les adipocytes. La lipolyse adipocytaire correspond à l'hydrolyse des triglycérides formant les gouttelettes lipidiques, et est à l'origine de la sécrétion d'acides gras libres et de glycérol (161). Cette activité lipolytique est inhibée par l'insuline, en particulier. Les acides gras libres sont relargués principalement lors d'un jeûne, et constituent alors une source de nutriments pour le reste du corps. En condition physiologique, il existe un équilibre dynamique entre la sécrétion d'acides gras libres et leur incorporation, ainsi que leur oxydation dans les tissus périphériques, tels que le foie et les muscles (86), ou encore le pancréas (386). Dans un contexte pathologique, obésité ou SAOS par exemple, la balance énergétique est altérée, les adipocytes hypertrophiés augmentent leur activité lipolytique et de ce fait, le relargage d'acides gras libres. Ces derniers ont de nombreux effets délétères sur l'homéostasie glucidique (lipotoxicité) puisqu'ils entraînent une réduction de l'incorporation du glucose au niveau adipeux et musculaire (86), qu'ils stimulent la production de glucose hépatique (278) (279) et qu'ils altèrent la sécrétion d'insuline au niveau des cellules β pancréatiques (386). Récemment, la notion de « réservoir lipidique » apparaît pour décrire une fonction du tissu adipeux, qui joue alors un véritable rôle de « tampon » dans l'équilibre glucidique (281). Ce concept est lié à l'observation de modèles animaux et de patients présentant une

lipodystrophie. De la même façon qu'un excès de tissu adipeux (obésité), un déficit de tissu adipeux (lipodystrophie) est associé à une insulino-résistance et une hyperglycémie. Par ailleurs, dans la mesure où la lipolyse est inhibée par l'insuline, une insulino-résistance conduit naturellement à une augmentation d'acides gras libres, qui, en retour, participent à l'insulino-résistance initiale. A plus long terme, l'apparition d'un phénotype inflammatoire adipeux lié à l'obésité, aggrave l'insulino-résistance du tissu adipeux lui-même, mais également celle du foie et du muscle.

▪ **Inflammation du tissu adipeux viscéral**

Classiquement, le foie et les organes lymphoïdes sont considérés comme les sources principales de production de facteurs inflammatoires. En 1993, l'équipe de Hotamisligil *et al* décrit pour la première fois le rôle direct de TNF- α , une cytokine pro-inflammatoire d'origine adipeuse, dans l'insulino-résistance liée à l'obésité. Le TNF- α participe à cette insulino-résistance en inhibant l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline au niveau du muscle et du tissu adipeux, les deux tissus impliqués majoritairement dans l'incorporation du glucose. Les résultats de Hotamisligil *et al* décrivent une augmentation significative de l'expression de TNF- α par les adipocytes d'animaux obèses. Par ailleurs, le blocage du TNF- α par un anticorps recombinant soluble permet d'améliorer la sensibilité à l'insuline de ces mêmes animaux obèses. Ce travail original suggère qu'un médiateur sécrété par le tissu adipeux épидidymal (équivalent du tissu adipeux viscéral chez l'humain) peut avoir des effets localement, mais également au niveau systémique, et jouer ainsi un rôle dans la régulation de la sensibilité à l'insuline. A l'heure actuelle, ce concept est largement reconnu et étendu à d'autres cytokines inflammatoires d'origine adipeuse telles que l'IL-6, le *Plasminogen Activator Inhibitor* (PAI)-1, la leptine et l'adiponectine, qui peuvent modifier la lipolyse, la sensibilité à l'insuline, la fibrinolyse ou encore le comportement alimentaire (tableau 2). De la même façon que les acides gras libres, l'IL-6 et le TNF- α entraînent une altération de la voie de signalisation insulinique au niveau musculaire et hépatique, confirmant l'importance de l'activité endocrine du tissu adipeux dans la régulation du métabolisme. Les niveaux plasmatiques des adipokines pro-inflammatoires augmentent avec le volume adipeux, tandis que les niveaux circulants d'adipokines anti-inflammatoires diminuent avec l'obésité. Chez les personnes obèses, le tissu adipeux se caractérise par une infiltration macrophagique (377) (385) liée à la sécrétion de MCP-1, une cytokine pro-inflammatoire chimioattractive (395).

Les macrophages recrutés s'organisent en structure en forme de couronne autour des adipocytes en apoptose (220) témoignant d'une activité de phagocytose des débris lipidiques adipocytaires. L'étude de Kanda *et al* décrit les conséquences systémiques d'une telle accumulation. D'après leurs résultats, les souris obèses surexprimant MCP-1 au niveau du tissu adipeux épидидymal présentent une infiltration macrophagique au niveau de ce tissu adipeux, des taux augmentés d'acides gras libres plasmatiques, et développent une insulino-résistance systémique et une intolérance au glucose, en association avec une augmentation de triglycérides intra-hépatiques (145). De plus, la délétion globale du gène codant pour MCP-1 permet de corriger l'ensemble de ces anomalies liées au développement de l'obésité (145). Dans le tissu adipeux, des signaux exogènes comme les acides gras libres induisent une réponse inflammatoire en activant le *Toll Like Receptor* (TLR)-4 et les voies de signalisation intracellulaires associées, principalement la voie du NFκB (312) (figure 9). Dans un contexte particulier comme celui de l'obésité, caractérisé par une lipolyse basale accrue et un statut inflammatoire de bas grade, la voie TLR-4/NFκB joue un rôle particulier (228). Localement, les adipocytes inflammatoires, dont l'activité lipolytique est élevée, libèrent des acides gras qui stimulent la voie TLR-4/NFκB, contribuant ainsi à la mise en place d'une boucle paracrine délétère entre les deux types cellulaires (336) (figure 9).

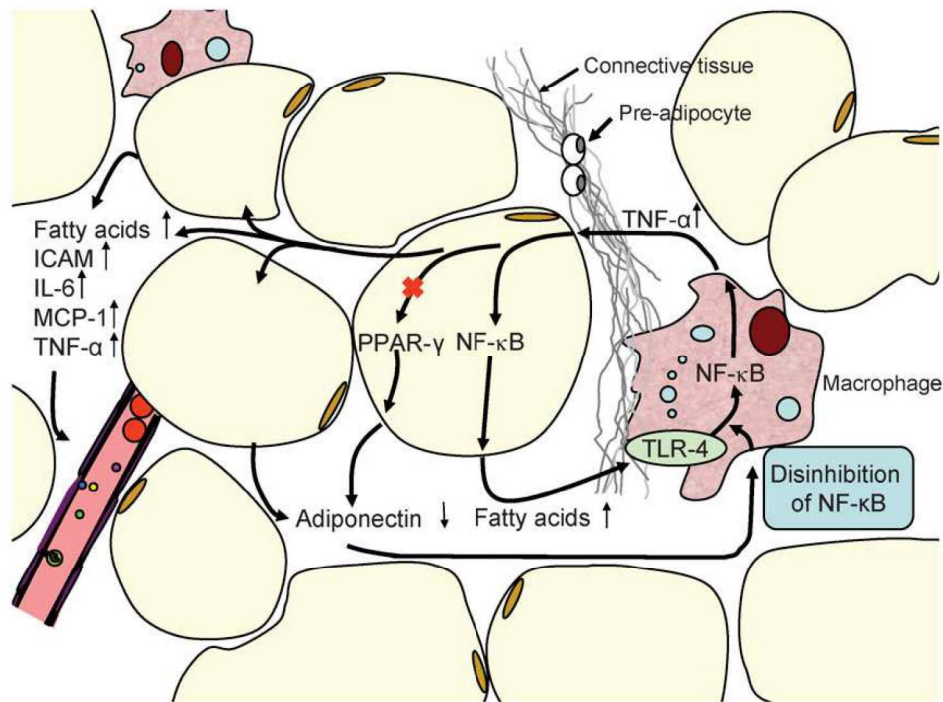


Figure 9. Schéma de l'interaction macrophages-adipocytes à l'origine des altérations du tissu adipeux au cours de l'obésité. ICAM : *intercellular adhesion molecule -1*, IL-6 : *interleukine-6*, MCP-1 : *monocytes chemoattractant protein -1*, NFκB : *nuclear factor κ B*, PPARγ : *peroxisome proliferator-activated receptor γ*, TLR-4 : *toll-like receptor -4*, TNF-α : *tumor necrosis factor -α* ; D'après Hajer *et al*, 2008 (118).

▪ Dysfonctions du tissu adipeux viscéral et remodelage vasculaire

Les données cliniques obtenues à partir de l'*INTERHEART Study* montrent que le rapport taille-hanches et le tour de taille, deux indices de l'obésité abdominale, sont associés de façon plus étroite au risque d'infarctus du myocarde que l'IMC (394), malgré des différences de seuil qui pourraient exister entre les populations (177). Les mécanismes par lesquels l'obésité peut avoir des effets délétères sur les vaisseaux, et ainsi augmenter la mortalité cardiovasculaire sont nombreux (figure 10). De part sa fonction sécrétoire (acides gras libres et médiateurs inflammatoires), le tissu adipeux viscéral est aujourd'hui considéré comme un véritable carrefour de la régulation du statut inflammatoire et cardio-métabolique d'un individu (167). Les cytokines relarguées par le tissu adipeux peuvent avoir un impact direct sur l'environnement athérogène des vaisseaux, ou par l'intermédiaire du foie en modifiant le taux de lipoprotéines hépatiques, des facteurs de coagulation (PAI-1, fibrinogène et facteur VIII) et des médiateurs inflammatoires (CRP, IL-6 et TNF-α).

La leptine est sécrétée majoritairement par les adipocytes. En 2004, Reilly *et al* décrivent une association entre l'hyperleptinémie et la présence d'athérosclérose coronarienne chez des patients présentant un diabète de type 2, indépendamment de l'insulino-résistance (268). Ce résultat est confirmé par une étude expérimentale qui montre qu'une injection de leptine recombinante chez des souris ApoE^{-/-}, accélère le développement de l'athérosclérose (35). En accord avec ces données, Chiba *et al* décrivent une diminution des lésions athéromateuses chez des souris ApoE^{-/-} déficientes pour le récepteur à la leptine (souris ob/ob;ApoE^{-/-}), comparé aux souris contrôles ApoE^{-/-} (48). Malgré ses nombreux effets délétères (induction d'un stress oxydant ; migration, prolifération et hypertrophie des cellules musculaires lisses), il est important de noter que l'obésité est souvent associée à une résistance à la leptine, qui peut atténuer les réponses biologiques induit par cette adipokine. A l'heure actuelle, la contribution de la leptine en tant que facteur de risque cardiovasculaire fait encore débat, dans la mesure où encore peu d'études s'accordent sur ce point. Les concentrations circulantes d'adiponectine varient de façon inversement proportionnelle à l'obésité viscérale (381). Tout comme la leptine, l'adiponectine peut influencer l'environnement athérogène des vaisseaux en revanche, ses effets sont anti-inflammatoires et anti-athérogènes. Malgré ses effets bénéfiques, l'association indépendante entre l'adiponectine et la survenue d'évènements cardiovasculaires futurs reste très incertaine (117) (294). Les résultats d'une étude prospective, et d'une étude de cas-témoins, suggèrent une contribution des facteurs de coagulation et des protéines du système fibrinolytique dans les évènements cardiovasculaires (154). Le PAI-1 fait partie des régulateurs de la fibrinolyse et est largement sécrété par les adipocytes. Des niveaux élevés de PAI-1 plasmatique (liés à un polymorphisme génétique ou à une obésité) sont associés à un risque cardiovasculaire accru (383) (321). Cette association est liée à un déséquilibre entre la fibrinolyse et la thrombose en faveur de la thrombose, contribuant ainsi à la formation de micro-thrombi.

Au niveau de la paroi vasculaire, l'activation des cellules inflammatoires infiltrées (macrophages, lymphocytes) par des cytokines pro-inflammatoires joue un rôle majeur dans l'aggravation de l'athérosclérose (119) (figure 10). Ce processus athérogène lié aux dysfonctions du tissu adipeux fait l'objet de travaux expérimentaux réalisés chez des souris ApoE^{-/-} par Öhman *et al* en 2008. D'après les résultats de cette étude, une implantation sous-cutanée de graisse blanche épидидymale (viscérale) s'accompagne d'une inflammation adipeuse, et cette dernière accélère la formation des lésions athéromateuses (236). Cette étude

confirme qu'un excès de tissu adipeux viscéral, présentant un phénotype inflammatoire, contribue au développement de l'athérosclérose.

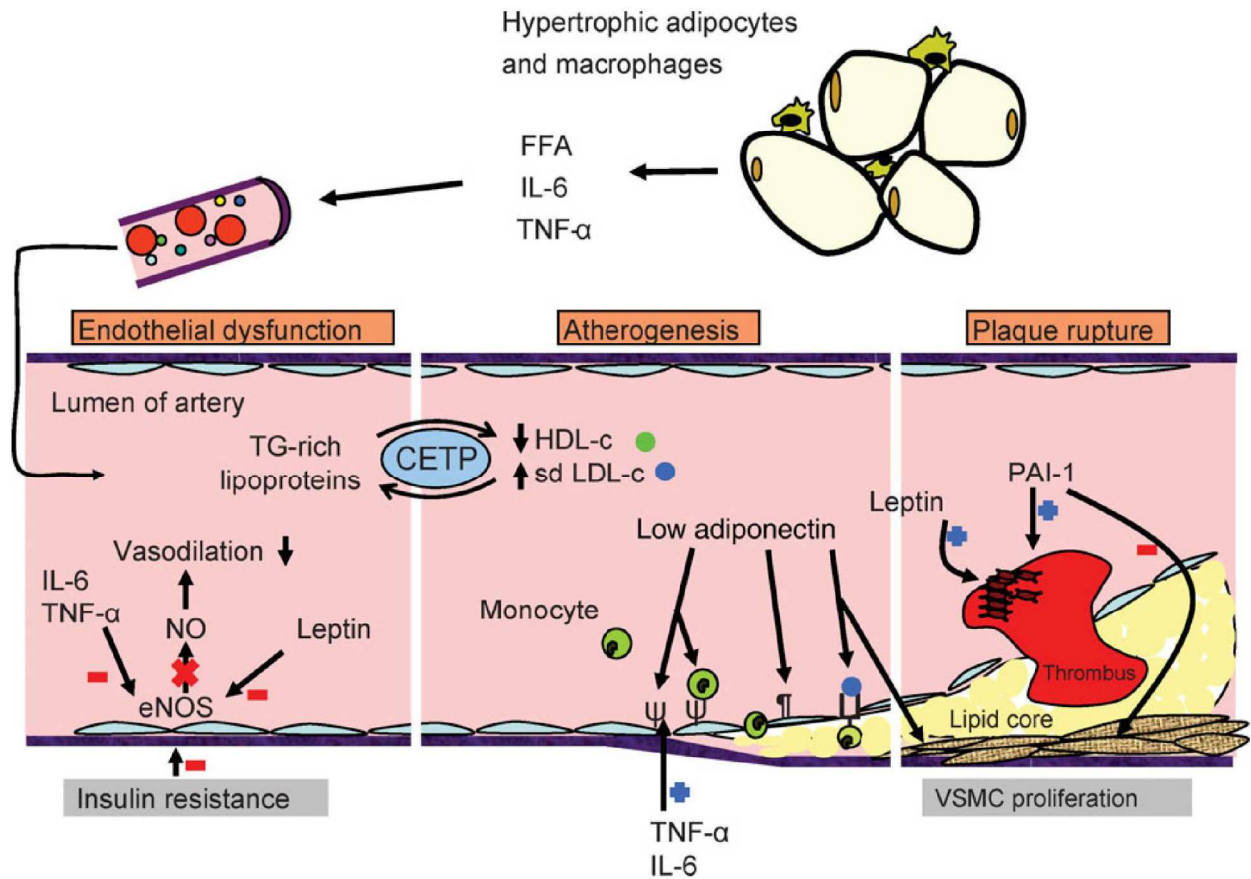


Figure 10. Représentation schématique du lien entre la dysfonction de l'adipocyte blanc liée à l'obésité et le processus athérogène. CETP : *cholesteryl ester transfer protein*, eNOS : *endothelial nitric oxide synthase*, FFA : *free fatty acids*, HDL-c : *high density lipoprotein-cholesterol*, IL-6 : *interleukine-6*, NO : *nitric oxide*, PAI-1 : *plasminogen activator inhibitor-1*, sd LDL-c : *small dense low density lipoprotein-cholesterol*, TG : *triglycérides*, TNF- α : *tumor necrosis factor- α* , VSMC : *vascular smooth muscle cell*. D'après Hajer *et al*, 2008 (118).

3.3. Dysfonctions du tissu adipeux viscéral et conséquences métaboliques et vasculaires au cours du SAOS

- **Contribution relative de l'obésité et du SAOS dans la pathologie apnéique**

L'accumulation des données de la littérature nous prouve qu'il existe une forte association entre SAOS et obésité. Ces deux pathologies partagent des mécanismes physiopathologiques communs, à savoir une activation inflammatoire (150), un stress oxydant (150) et une augmentation de l'activation sympathique (317). Au cours de l'obésité, les complications métaboliques, ainsi que les atteintes cardiovasculaires associées, sont deux conséquences majeures liées aux dysfonctions du tissu adipeux (351). La plupart des patients apnéiques adultes présentent une obésité centrale et une augmentation de masse adipeuse viscérale (113), associée à une augmentation de tissu adipeux au niveau des VAS (379) et à des anomalies métaboliques (147). Par ailleurs, une augmentation d'acides gras libres circulants a été rapportée récemment chez des patients apnéiques ne présentant pas de syndrome métabolique, comparativement aux sujets contrôles après ajustement pour l'IMC, l'âge et le sexe (27), suggérant une augmentation de la lipolyse adipocytaire associée au SAOS. D'une manière générale, les sujets obèses présentent des taux élevés de leptine circulante (une adipokine pro-inflammatoire) qui sont corrélées positivement avec l'IMC, et qui semblent être associés à l'insulino-résistance (60) (186) (193). Chez des patients SAOS présentant un surpoids, les concentrations plasmatiques de leptine sont augmentées par rapport aux sujets contrôles (135). Chez des patients apnéiques non-obèses, Tatsumi *et al* reportent que l'hyperleptinémie est corrélée avec l'IMC, mais également avec l'IAH, ce dernier indiquant la sévérité du SAOS (347). L'adiponectine est une adipokine qui possède des propriétés anti-inflammatoires et qui augmente la sensibilité à l'insuline. Au regard de leur forte prévalence de résistance à l'insuline, les patients SAOS pourraient présenter des concentrations faibles en adiponectine. Cependant les résultats sont contradictoires ; les taux restent néanmoins inversement corrélés à l'insulinémie et à l'insulino-résistance (121).

▪ **Hypoxie du tissu adipeux chez les patients apnéiques obèses : rôle de l'hypoxie intermittente**

L'expansion du tissu adipeux au cours de l'obésité entraîne une privation en oxygène des adipocytes hypertrophiés dans la mesure où leur distance par rapport aux vaisseaux sanguins augmente (355). L'hypoxie du tissu adipeux au cours de l'obésité participe à l'altération de la sécrétion des médiateurs inflammatoires. Dans des préadipocytes humains en culture, l'exposition à une hypoxie continue stimule l'expression et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, la leptine, l'Angptl-4 et le *Vascular Endothelial Factor* (VEGF) (373). En revanche, l'hypoxie continue inhibe la sécrétion d'adiponectine (373). La plupart de ces effets sont médiés par l'*Hypoxia Inductible Factor (HIF) -1*, un facteur de transcription activé lors d'une exposition à l'hypoxie, et varie en fonction de la sévérité de l'hypoxie (355). Dans un contexte de SAOS, les patients sont souvent obèses et présentent des cycles nocturnes d'HI. La contribution de ces deux composantes – hypoxie du tissu adipeux liée à l'obésité et HI liée au SAOS – dans les altérations du tissu adipeux est méconnue. Des travaux récents réalisés chez la souris C57Bl6 non-obèses et menés par Reinke *et al* (270) décrivent pour la première fois le profil tissulaire des fluctuations d'oxygène lors d'une exposition aiguë à l'HI. Grâce à l'utilisation d'une micro-électrode sensible à l'oxygène, la pression partielle tissulaire en oxygène (P_{tiO_2}) est mesurée dans le tissu adipeux épидидymal durant l'exposition des animaux au stimulus hypoxique. D'après les résultats de cette étude, il apparaît que l'amplitude des variations de P_{tiO_2} mesurées au niveau de ce tissu est largement atténuée, comparé à l'amplitude des fluctuations de la saturation en oxygène (SpO_2) mesurée dans la cage. Ainsi, contrairement aux tissus hépatiques et musculaires pour lesquels l'intermittence de l'hypoxie est conservée, il semble que le tissu adipeux épидидymal perçoive une hypoxie tissulaire continue, semblable à celle observée lors d'une obésité, malgré le caractère intermittent du stimulus. L'hypoxie adipeuse observée au cours des épisodes d'apnées pourrait être liée à une redistribution de l' O_2 disponible vers des organes vitaux tels que le cerveau (7). Ainsi, le SAOS pourrait avoir un impact particulier sur le tissu adipeux, en aggravant, chez les patients obèses, un état hypoxique préexistant.

▪ Effet de l'hypoxie intermittente sur le tissu adipeux viscéral

Au niveau du tissu adipeux (épididymal ou sous-cutané) les données concernant les effets de l'HI sont principalement liées à la régulation de la clairance des lipoprotéines riches en triglycérides. Les lipoprotéines riches en triglycérides regroupent les chylomicrons, les VLDL et les remanents de chylomicrons et de VLDL. Elles sont éliminées de la circulation par un processus comportant de nombreuses étapes, dont la première correspond à l'activation de la lipoprotéine lipase (LPL). Cette lipase est une enzyme clé de la régulation du métabolisme lipoprotéique, et est principalement exprimée au niveau du tissu adipeux, du muscle et du cœur (375). Des données expérimentales montrent qu'une hypoxie soutenue à 1% d'O₂ augmente l'expression de l'*Angiopoietin-like* (Angptl) 4, un puissant inhibiteur de la LPL, au niveau de cellules endothéliales humaines d'artère pulmonaire (191) et d'adipocytes (203). En 2012, Drager *et al* montrent qu'une exposition de 4 semaines à une HI entraîne une surexpression de l'Angptl4, associée à une diminution de l'activité de la LPL, au niveau du tissu adipeux épididymal de souris C57Bl6 non-obèses (79). En 2013, ces résultats sont de nouveau décrits chez des souris ApoE^{-/-} non-obèses exposées à 4 semaines d'HI (387). L'effet de l'HI sur l'expression de l'Angptl4 semble être dépendant du territoire adipeux puisqu'elle n'est pas modifiée dans le tissu adipeux sous-cutané, ni dans le tissu adipeux brun (387). L'expression de l'Angptl4 est régulée, au moins en partie, par HIF-1 α dans la mesure où une délétion globale de ce facteur de transcription chez des souris de souche C57Bl6x129 (souris Hif1a^{+/-}) permet de corriger la surexpression de l'Angptl4 induite par l'HI (80). L'altération de cette voie s'accompagne d'une dyslipidémie (79) (caractérisée par une augmentation du cholestérol total, des triglycérides et des LDL-cholestérol) et d'une diminution de l'incorporation des triglycérides dans les 4 principaux compartiments adipeux : épididymal, omental, sous-cutané et brun (387).

En 2012, l'équipe de Gozal *et al* réalise une analyse transcriptionnelle de grande ampleur au niveau du tissu adipeux épididymal de souris C57Bl6 après 6 heures d'HI, ainsi qu'après 1, 3, 6 et 13 jours d'HI (105). Les résultats obtenus montrent que l'HI induit une altération de l'expression de nombreux gènes impliqués dans les étapes clés du métabolisme des lipides, des hydrates de carbone (glucides), et des nucléotides. Elle entraîne également, selon la durée d'exposition au stimulus, une activation transitoire de programmes transcriptionnels coordonnés impliqués dans la fonction mitochondriale et le stress oxydant. Ces changements transcriptionnels induits par ce stimulus s'accompagnent d'un stress oxydant au niveau du

tissu adipeux épiddymal, évalué grâce à l'augmentation de la quantité de malondialdéhyde (MDA) présent dans le tissu de souris hypoxiques (105).

D'après ces résultats expérimentaux, les dysfonctions du tissu adipeux épiddymal observées au cours d'une exposition à l'HI, jouent un rôle dans les désordres métaboliques associés à ce stimulus, par l'intermédiaire notamment d'une diminution de la clairance des triglycérides.

▪ **Implication du tissu adipeux viscéral dans l'athérosclérose associée à l'hypoxie intermittente**

Les modifications transcriptionnelles de la voie de clairance des lipoprotéines induites par l'HI et décrites par Drager *et al*, sont associées à une hypertriglycémie et une hypercholestérolémie (387) (80), ainsi qu'à une accélération de l'athérogenèse (80). Les modifications de l'expression de l'Angptl4 et de l'activité de la LPL dépendent des tissus et concernent principalement le tissu adipeux épiddymal. De plus, elles semblent être impliquées dans le processus athérogène lié à l'HI. Cette hypothèse est vérifiée en traitant des souris ApoE^{-/-} avec un anticorps anti-Angptl4 durant les 4 semaines d'exposition à l'HI (80). D'après les résultats de cette étude, le traitement permet de ralentir le développement de l'athérosclérose induite par l'HI, au niveau de l'aorte thoraco-abdominale et des valves aortiques. Ces données récentes pourraient suggérer que les altérations du tissu adipeux épiddymal induites par l'HI en dehors d'un contexte d'obésité, seraient impliquées dans l'athérosclérose associée à l'HI.

Les données expérimentales relatives aux effets délétères de l'HI sur le tissu adipeux viscéral sont très peu nombreuses, et se limitent à l'aspect métabolique de ces conséquences. Du point de vue inflammatoire, les conséquences de l'HI sur ce tissu ne sont pas décrites dans la littérature. Par ailleurs, l'implication du tissu adipeux viscéral, et de l'inflammation associée, dans le remodelage vasculaire lié à l'HI reste encore à établir.

Deuxième partie : travaux de thèse

1. Objectifs des travaux de thèse

L'augmentation de la morbi-mortalité cardiovasculaire des patients apnéiques est liée aux nombreuses conséquences vasculaires et métaboliques du SAOS. La présence fréquente de co-morbidités chez les patients apnéiques limite la compréhension physiopathologique du SAOS. Ce syndrome est très généralement associé à une obésité, qui semble aggraver les conséquences délétères du SAOS, par l'intermédiaire entre autre des altérations du tissu adipeux blanc viscéral. Cependant les effets de l'HI elle-même sur le tissu adipeux sont très peu connus.

Les objectifs de ce projet de recherche sont donc d'étudier, chez des souris non-obèses, les mécanismes impliqués dans le remodelage vasculaire, et notamment le rôle des altérations du tissu adipeux viscéral (figure 11).

Les travaux mentionnés dans ce manuscrit seront présentés de façon chronologique. De plus, les méthodes utilisées dans les différentes études seront détaillées dans la partie intitulée « Matériel et méthodes ».

Le remodelage vasculaire délétère associé à l'HI est multifactoriel, et peut impliquer des altérations hémodynamiques, métaboliques, ou encore inflammatoires. Au cours de cette thèse, nous nous sommes principalement intéressés à l'implication de la composante inflammatoire dans le processus athérogène lié à l'HI.

L'inflammation associée à l'HI semble jouer un rôle important dans l'athérosclérose induite par ce stimulus (publication n°1). Comme observé au niveau vasculaire, l'HI pourrait également entraîner une inflammation du tissu adipeux, qui participerait aux dysfonctions métaboliques et vasculaires liées à cette HI, indépendamment de toute obésité (publication n°2). Outre ses effets inflammatoires sur le tissu adipeux, l'HI serait également à l'origine de modifications topographiques des territoires adipeux, qui ont été évaluées grâce à une approche par IRM (publication n°3). D'après les données de la littérature et au vu de nos résultats au niveau adipeux et vasculaire, l'activation de la voie pro-inflammatoire TLR-4/NFκB pourrait constituer un des mécanismes impliqué dans les effets délétères induits par l'HI (travail n°4).

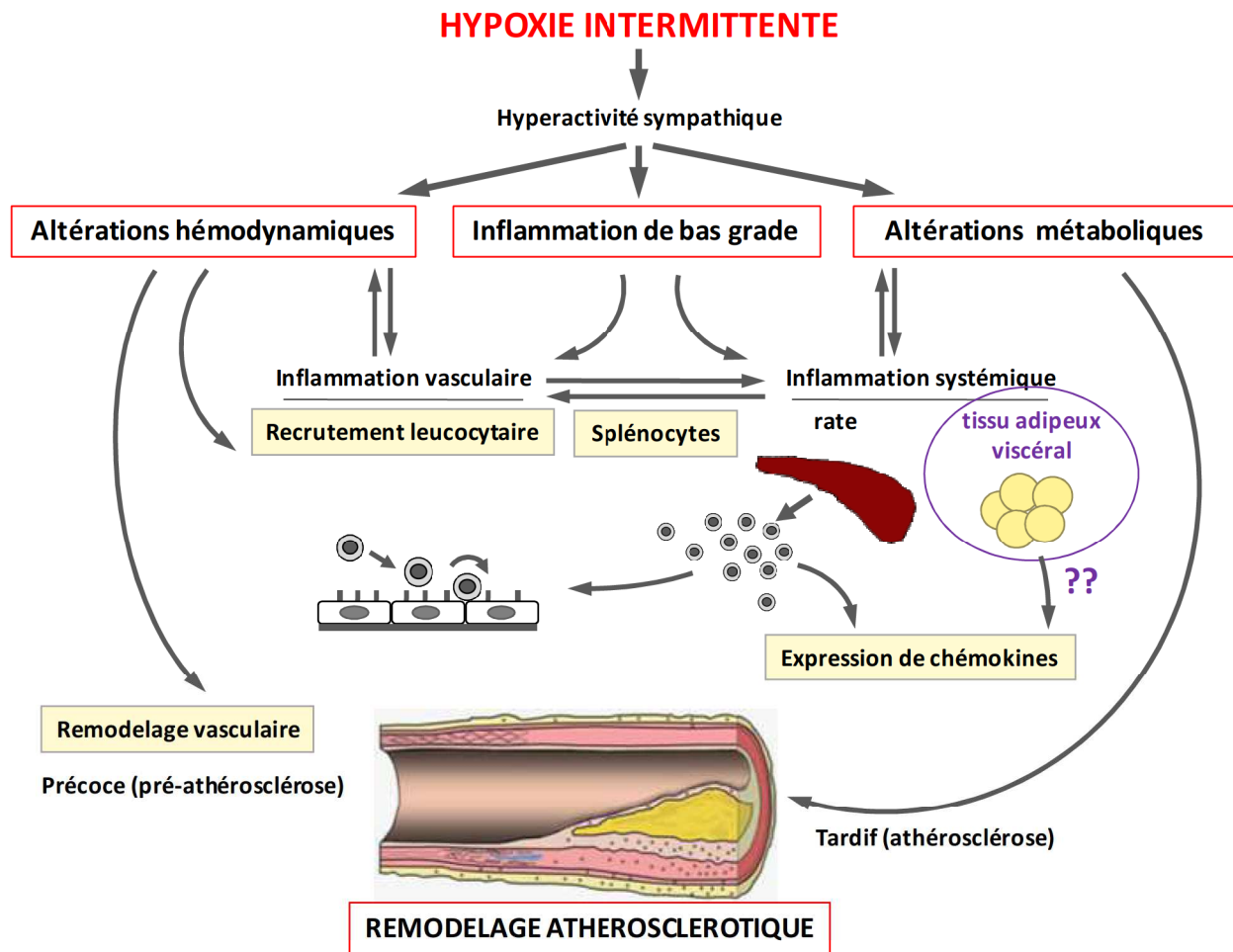


Figure 11. Représentation schématique du rôle des altérations du tissu adipeux viscéral induites par l’hypoxie intermittente dans l’athérogenèse associée à l’hypoxie intermittente. Selon notre hypothèse, l’hypoxie intermittente entraînerait, en dehors de toute obésité, des modifications du tissu adipeux viscéral, qui seraient impliquées dans les troubles métaboliques et l’athérosclérose induits par ce stimulus hypoxique.

2. Matériel et méthodes

2.1. Souches de souris utilisées

Les souches de souris utilisées sont adaptées à l'objectif des différentes études. Les souris C57BL6 et les souris déficientes pour l'apolipoprotéine E (ApoE^{-/-}) permettent d'évaluer différentes sévérités de l'atteinte vasculaire et métabolique associée à l'HI. Les expérimentations sont réalisées sur des souris mâles non-obèses et nourries avec un régime standard puisque la pathologie apnéique touche en majorité les hommes d'âge moyen (392). En effet, les femmes ont une double protection hormonale car la progestérone augmente le tonus des VAS et est protectrice vis-à-vis des complications cardiovasculaires. De plus, elles présentent une répartition graisseuse avantageuse, puisque la masse adipeuse se situe préférentiellement au niveau sous-cutané, contrairement aux hommes, chez qui l'accumulation se fait au niveau viscéral. Chez les souris, la durée de vie moyenne se situe entre 18 et 24 mois. Les souris utilisées afin d'étudier les effets délétères de l'HI sur le remodelage vasculaire sont des mâles âgés de 17 (souris C57Bl6 et TLR-4^{-/-}) à 20 (souris ApoE^{-/-}) semaines (publication n°2 et travail n°4), pour lesquels l'atteinte vasculaire est plus développée qu'à 8 semaines. Ceci nous permet donc de mieux visualiser l'effet aggravateur de l'hypoxie, ou protecteur de la lipectomie. Les souris ApoE^{-/-} étaient élevées dans la plateforme de Haute Technologie Animale (PHTA) de l'Institut Jean Roget, jusqu'à l'âge de 20 semaines. Malgré une certaine autonomie apportée par ce mode de fonctionnement, les contraintes de temps et de coût représentaient 2 inconvénients majeurs de cet élevage. De ce fait, les expérimentations de la publication n°2, dont l'objectif principal était d'étudier les effets de l'hypoxie intermittente sur la distribution topographique du tissu adipeux blanc, ont été réalisées chez des souris C57Bl6 âgées de 8 semaines.

▪ Souris C57Bl6

Les souris C57BL6 permettent d'étudier les lésions vasculaires précoces induites par une exposition à l'HI, évalué grâce à la mesure de l'épaisseur de l'intima-média après exposition. Cette souche de souris ne présentent pas de dyslipidémie, ni de troubles glucidiques (139). Lors d'une alimentation normale, les taux de cholestérol dans le plasma sont faibles. Par ailleurs, plus de 85% du cholestérol plasmatique est sous forme de HDL, alors que chez l'Homme la forme LDL est prédominante (65%-85%). Ces souris permettent donc d'étudier les effets vasculaires d'une exposition à l'HI en s'affranchissant de possible effets

confondants liés à des co-morbidités (dyslipidémie, hypertension) très souvent retrouvées chez les patients apnéiques. En revanche, elles ne permettent pas d'étudier l'athérosclérose à proprement parlé, qui doit alors être induite grâce à un régime riche en cholestérol (298). Ce modèle est dit « négatif » (car athérorésistant) mais constitue un outil expérimental très intéressant pour l'étude d'éventuels traitements futurs des complications vasculaires associées au SAOS. Ces souris proviennent de l'élevage du laboratoire Janvier.

- **Souris ApoE^{-/-}**

Les souris *knock-out* pour l'apolipoprotéine E (souris ApoE^{-/-}), dont le fond génétique est celui de la C57Bl6, développent spontanément des plaques athéromateuses contrairement à la souris C57Bl6. L'ApoE intervient dans le transport des lipides sanguins vers les tissus de stockage périphériques et hépatiques. Les souris ApoE^{-/-} présentent une hyperlipémie à VLDL, et leur taux plasmatique de cholestérol peut atteindre 11mM, contre 1,6 à 2,8 mM pour des souris C57Bl6 (396).. Les lésions développées par ces souris sont complexes et sont comparable à celles observées chez l'Homme (139). Ces souris développent également des troubles glucidiques (altération de la sensibilité à l'insuline) et une inflammation locale et systémique. L'importante dyslipidémie et le phénotype inflammatoire sont à l'origine de l'athérogenèse spontanée caractéristique de ces animaux. L'utilisation de ce modèle animal permet ainsi d'évaluer le caractère aggravant de l'hypoxie sur l'athérogenèse et les troubles glucidiques. Initialement, ces animaux proviennent du laboratoire Charles River, puis ont été élevés à la PHTA de l'Institut Jean Roget.

- **Souris TLR-4^{-/-}**

Dans ce modèle de souris, dont le fond génétique est également celui de la souris C57Bl6, la déficience pour le TLR-4 est ubiquitaire. Ce modèle permet d'étudier la composante inflammatoire liée au SAOS et son implication dans les conséquences délétères de l'HI, à la fois sur le plan métabolique et sur le plan vasculaire. Ces souris nous ont été données par le laboratoire du Dr V. Richard (Inserm U644, Rouen), dans le cadre d'une collaboration.

2.2. Modèle murin de SAOS

Les troubles respiratoires du sommeil, et en particulier le SAOS, sont des pathologies multifactorielles qui regroupent notamment des cycles d'hypoxie intermittente, une fragmentation du sommeil et des efforts respiratoires. La complexité du SAOS, très souvent associées à des co-morbidités, et les limites des investigations cliniques compliquent considérablement la compréhension des mécanismes physiopathologiques à l'origine des conséquences associées à ce syndrome. Les modèles animaux nous permettent de préciser cette mécanistique en étudiant les causes et les conséquences des événements respiratoires, en s'affranchissant, si besoin, des effets confondants observés chez les patients.

Le modèle murin de SAOS utilisé pendant nos travaux de thèse permet de mimer, chez la souris, les épisodes d'hypoxie-réoxygénation observés au cours de ce syndrome. La composante hypoxique est induite artificiellement grâce à un dispositif original développé au laboratoire, nous permettant de moduler aisément la durée d'exposition, de quelques heures à quelques mois selon la problématique abordée. Les mélanges gazeux (air enrichi en azote) se font automatiquement, et la concentration en oxygène dans les cages de stabulation varie de 21% à 5%, 8 heures par jour pendant la partie diurne du nyctémère où prédomine le sommeil polyphasique des rongeurs. De plus, grâce à ce dispositif, les animaux sont exposés dans leur propre cage, en groupe, limitant ainsi le stress induit par l'isolation d'un animal grégaire. Au-delà de la durée d'exposition, il est possible d'intervenir sur d'autres conditions relatives aux modèles animaux eux-mêmes (âge et sexe des animaux, avec ou sans co-morbidités associées) et au stimulus hypoxique (profil des cycles, exposition durant la phase d'éveil ou de sommeil des animaux, eux-mêmes vigils ou anesthésiés). La durée des phases hypoxiques et normoxiques des cycles, ainsi que la pente ascendante et descendante de la FiO_2 , sont conditionnées par les cages et les mélanges de gaz utilisés dans les différents modèles d'HI. En parallèle du groupe hypoxique, des animaux contrôles sont systématiquement exposés dans le même type de cage, à des cycles de normoxie dont la durée est similaire à celle des cycles d'HI, afin d'assurer un même niveau de bruit et de perturbation liés au flux d'air. L'avantage d'un stimulus hypoxique modulable selon les équipes et la problématique abordée, a également ses inconvénients. En effet, l'utilisation de différents stimuli peuvent contribuer aux discordances de résultats qui existent dans la littérature.

Un des principaux inconvénients liés aux modèles murins réside dans le profil du sommeil de ces animaux, qui est très différent de celui des humains. Contrairement à l'Homme, dont la phase de sommeil varie entre 6 et 8 heures consécutives, le rongeur a des phases d'éveil et de sommeil durant les 24 heures du cycle nyctéméral, et les phases de sommeil ont lieu principalement pendant le jour. C'est pourquoi, nos souris sont exposées entre 6h et 14h. De plus, d'après les résultats de Rubin *et al* (283), il semble qu'une exposition au stimulus hypoxique toutes les 30 à 60 secondes (60 à 120 désaturations par heure, 8 heures par jour) correspondrait le mieux à la « physiologie » de la souris. Dans notre modèle le stimulus d'HI utilisé est donc le suivant : cycle de 1 minute composé de 30 secondes de normoxie ($FiO_2 = 21\%$) et de 30 secondes d'hypoxie ($FiO_2 = 5\%$). Cette désaturation intermittente correspond à des apnées sévères chez l'Homme (environ 10% des patients), avec une saturation sanguine artérielle de 50-60%.

Au cours de ces travaux, les souris ont été exposées à ce stimulus durant 4 ou 6 semaines. Six semaines d'exposition correspondent à une durée suffisamment longue pour évaluer de façon significative les effets aggravant de l'HI sur le remodelage vasculaire. Par ailleurs, c'est une durée d'exposition raisonnable vis-à-vis des contraintes de temps liées aux 3 années de thèse qui permettent si besoin, de reproduire plusieurs fois l'expérimentation. Dans le travail n°4, les souris TLR-4^{-/-} et leurs groupes contrôles C57Bl6 n'ont été exposées qu'à 4 semaines d'HI du fait de nombreux problèmes rencontrés lors de la mise en place du protocole liés au transport des animaux et, par la suite, à la disponibilité du dispositif à hypoxie.

Les avantages de ces modèles animaux sont nombreux et largement reconnus pourtant, aucun des modèles actuels n'est idéal. La pertinence de notre modèle au regard de la pathologie humaine sera discutée dans la partie « Discussion et Conclusion » du manuscrit.

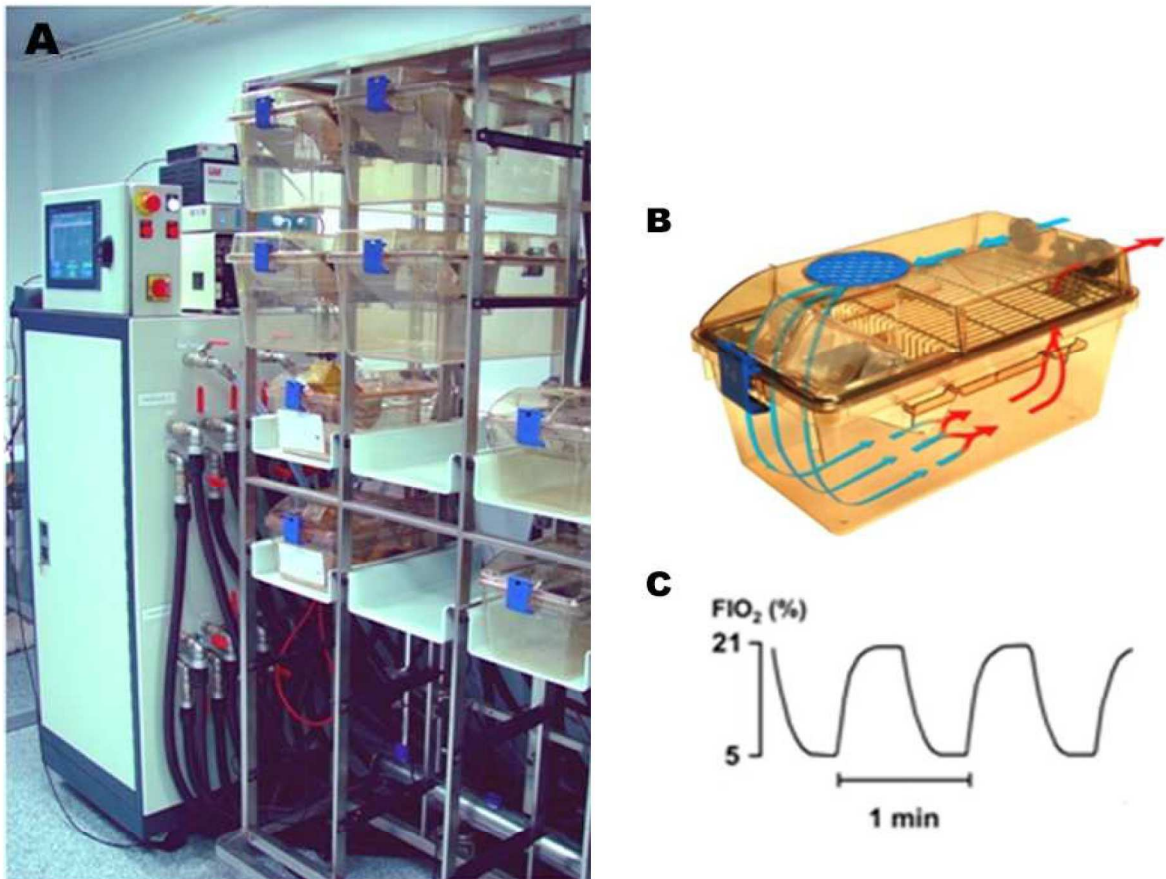


Figure 12. Dispositif d'hypoxie intermittente mimant le SAOS chez la souris. Les cages sont placées sur un portoir (A) permettant une distribution homogène de l'air dans toutes les cages (B). (C) La fraction en oxygène de l'air est modulée par un enrichissement en azote permettant d'obtenir le cycle d'hypoxie intermittente suivant : $F_iO_2=21\%$ durant 30sec puis $F_iO_2=5\%$ durant 30sec.

2.3. Effet de l'hypoxie intermittente sur le tissu adipeux blanc : approche IRM

Au cours d'une exposition à l'HI, il existe dans un premier temps une perte pondérale des souris, qui affecte notamment la graisse épидидymale. Chez des souris lipectomisées au niveau de l'épididyme, nous avons constaté que la reprise pondérale se faisait au détriment de cette graisse épидидymale. De plus, les effets bénéfiques lipectomie épидидymale sont partiels puisqu'elle ne permet pas de corriger l'augmentation d'acides gras libres et de glycérol induite par l'HI. Ensemble, ces données suggèrent une persistance des autres territoires adipeux ainsi qu'une redistribution de la graisse après exposition à l'HI, qui pourraient expliquer l'effet partiel de la lipectomie. Cette hypothèse a été vérifiée par une approche en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), qui nous a permis de quantifier de façon exhaustive les principaux territoires adipeux blancs : épидидymal, sous-cutané, mésentérique et rétro-péritonéal.

En imagerie, la quantification du tissu adipeux peut se faire grâce à la méthode de Dixon, qui s'appuie sur la différence de déplacement chimique eau-graisse. Elle permet ainsi de différencier le signal émis par l'eau, de celui émis par la graisse (185). Cependant, pour cette étude, nous avons décidé d'utiliser une séquence classique en écho de spin pondérée en T1, utilisée en recherche clinique (126) (130), mais surtout en recherche expérimentale (271) (229). Pour cette séquence, il n'y a pas distinction entre le signal de l'eau et celui de la graisse. L'analyse quantitative des 4 territoires adipeux est ensuite réalisée simplement par contourage manuel sur toutes les coupes transversales, à l'aide du logiciel de traitement d'images ImageJ (version 1.45s, NIH).

De nombreuses expériences pilotes ont été réalisées avec l'aide de Hervé Mathieu (Inserm US017/CNRS UMS 3552, Grenoble) afin de mettre au point le protocole d'acquisition. Nous nous sommes appuyés principalement sur 4 études animales (229) (38) (81) (73), dont les paramètres sont résumés dans le tableau suivant :

REFERENCES	Nicolai <i>et al</i> , 2009	Calderan <i>et al</i> , 2006	Du <i>et al</i> , 2005	Donnelly <i>et al</i> , 2003
Modèle animal	rats diabétiques ZDF	souris obèses ob/ob	souris I.AI. ^{-/-}	fantôme
Aimant	1,5 Tesla	4,7 Tesla	3 Tesla	1,5 Tesla
Type de séquence	écho de spin pondérée T1	écho de spin pondérée T1	écho de spin pondérée T1	écho de spin pondérée T1
Temps de Répétition (TR) / Temps d'Echo (TE)	540/9 ms	1009/18 ms	500/8 ms	500/14 ms
Épaisseur des coupes	3 mm	2 mm	2 mm	5 mm
Espace entre 2 coupes	pas d'espace	non précisé	non précisé	pas d'espace
Field Of View (FOV)	8 x 8 cm	4,5 x 4,5 cm	non précisé	24 cm ²

Tableau 3. Résumé des paramètres d'acquisition des 4 études expérimentales de référence pour l'étude IRM.

Dans notre étude, les acquisitions sont obtenues après exposition à l'HI sur animaux euthanasiés afin de s'affranchir des perturbations du signal liées aux mouvements respiratoires. L'IRM sur corps entier est réalisée grâce à un système horizontal 7 T (Avance III console; Bruker) et grâce à l'obtention de séquences millimétriques en écho de spin pondérées T1. Les coupes coronales et les coupes transversales sont obtenues sur la souris entière, du ventre vers le dos et de la queue vers la tête, respectivement. Les paramètres des séquences sont les suivants : TR/TE, 500/8 ms; FOV, 3,84 x 3,84 cm; épaisseur des coupes, 1 mm; espace entre 2 coupes, 1 mm. Le temps total d'acquisition est d'environ 20 minutes par souris, 15 coupes coronales et 64 coupes transversales sont obtenues pour chaque animal.

2.4. Dysfonctions métaboliques associées à l'hypoxie intermittente

▪ Métabolisme lipidique

Les taux plasmatiques de cholestérol total, LDL-cholestérol, HDL-cholestérol et triglycérides sont mesurés sur Modular P® (Roche Diagnostics). Le taux de LDL-cholestérol est déterminé par la formule de Friedewald à partir des valeurs de cholestérol total, de HDL-cholestérol et de triglycérides :

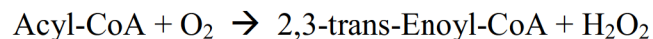
$$\text{LDL-Cholestérol} = \text{Cholestérol total} - (\text{Triglycéride} / 5) - \text{HDL-Cholestérol}$$

La formule de Friedewald n'est pas validée chez le rongeur, en particulier chez la souris ApoE^{-/-}, chez qui la répartition des 4 principales fractions de lipoprotéines (VLDL, IDL, LDL, HDL) est différente de celle de l'Homme. Cependant, cette technique de mesure est largement utilisée dans les études expérimentales pour déterminer les valeurs de LDL-cholestérol à partir des niveaux de cholestérol total, de triglycérides et de HDL-cholestérol (239) (341) (376). Par ailleurs, elle fournit une estimation adéquate pour comparer plusieurs groupes expérimentaux, en particulier chez les souris, pour lesquelles les volumes de plasma sont souvent très restreints.

Les concentrations plasmatiques de ces 4 paramètres sont exprimées en g/l.

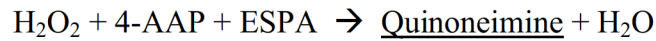
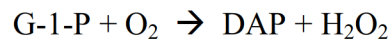
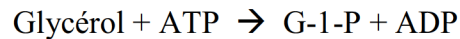
Les acides gras libres (*Non-Esterified Fatty Acid*, NEFA) et le glycérol, les deux produits de la lipolyse, sont dosés manuellement grâce aux kits NEFA-HR(2) (Wako) et Free Glycerol Reagent (Sigma) respectivement.

Le dosage des acides gras libres est basé sur la réaction colorimétrique suivante :



L'intensité du pigment rouge obtenu en fin de réaction est proportionnelle à la concentration d'AGL de l'échantillon, et est quantifiable par lecture spectrophotométrique à une longueur d'onde de 560 nm.

De la même façon que pour les acides gras libres, le dosage du glycérol est basé sur une réaction colorimétrique :



L'intensité du pigment rouge obtenu en fin de réaction est proportionnelle à la concentration de glycérol de l'échantillon, et est quantifiable par lecture spectrophotométrique à une longueur d'onde de 560 nm.

▪ Métabolisme glucidique

Sensibilité à l'insuline. Les techniques d'évaluation de la sensibilité à l'insuline sont nombreuses, et comportent toutes des avantages et des limites à leur utilisation. Le clamp euglycémique hyperinsulinémique, développé en 1979 par DeFronzo *et al* (66), est une méthode largement reconnue comme mesure de référence permettant de déterminer de façon directe les altérations de la sensibilité à l'insuline, à la fois chez l'Homme mais également chez l'animal. Le principal avantage de cette technique est de pouvoir évaluer directement l'effet de l'insuline sur l'utilisation de glucose par l'organisme, ainsi que son effet sur la production hépatique de glucose. En revanche, c'est une approche expérimentale invasive, onéreuse et très lourde à mettre en place (217). Pour ces raisons, nous avons décidé d'utiliser un test dynamique de sensibilité à l'insuline (*Intraperitoneal Insulin Tolerance Test*, IpITT). L'IpITT est une technique indirecte, mais non-invasive et plus facile à mettre en œuvre, permettant d'évaluer les modifications de sensibilité à l'insuline (217). L'air sous la courbe, ainsi que la vitesse et l'amplitude de la diminution de la concentration en glucose suite à une injection d'insuline, nous apportent ainsi une estimation de la sensibilité ou de la résistance à l'insuline suite à une exposition à l'HI.

Après les 8 heures d'exposition journalières, les souris sont pesées et l'insuline est injectée intrapéritonéalement, sous légère anesthésie gazeuse (Isoflurane 1,5%) afin de minimiser les réactions de stress des animaux liées à leur manipulation et à l'injection. Le glucose est mesuré grâce au glucomètre OneTouch Ultra® (Lifescan). La durée du jeûne et les doses d'insuline (insuline recombinante humaine, Novo Nordisk A/S) sont ajustées en fonction des souches de souris utilisées :

- souris ApoE^{-/-} : 10 heures de jeûne, insuline à 0,75 UI/kg de poids corporel. La durée du jeûne est fixée en fonction des contraintes d'horaires d'exposition à l'HI (de 6h à 14h), de façon à ce que le test débute le plus tôt possible après la fin de l'exposition et ce, après un jeûne suffisamment long. La dose d'insuline est choisie en fonction de données déjà publiées dans la littérature (188) (273) et après avoir réalisé plusieurs tests de dose-réponse.

- souris C57Bl6 : les souris C57Bl6 ne développent pas d'insulino-résistance avec l'âge, contrairement aux souris ApoE^{-/-}. Ces animaux sont donc plus sensibles à une injection d'insuline, d'autant plus lorsque le jeûne est long (10 heures, par exemple). Après plusieurs mises au point réalisées au laboratoire, nous avons décidé de réduire la durée du jeûne (6 heures), ainsi que la dose d'insuline (0,50 UI/kg de poids corporel), comparé aux souris ApoE^{-/-}.

- souris TLR-4^{-/-} : les conditions de jeûne (6 heures) et la dose d'insuline injectée (0,50 UI/kg de poids corporel) sont les mêmes que celles des souris C57Bl6, puisque ces 2 souches de souris ont été utilisées dans la même étude (travail n°4).

Insulinémie basale et après une charge de glucose. Le test est réalisé durant la même semaine que l'IpITT et la durée du jeûne est la même que celle de l'IpITT (6 ou 10 heures selon la souche de souris). Le niveau d'insuline plasmatique est mesuré avant une injection de glucose, ce qui correspond à l'insulinémie basale (t0). La dose de glucose injectée (2g/kg poids corporel) est choisie en fonction des données déjà publiées dans la littérature (230) (273) et après avoir réalisé plusieurs tests de dose-réponse. L'insulinémie est également mesurée 15 minutes après l'injection de glucose (t15). Comme pour la mesure de la glycémie, les deux prises de sang sont faites à l'extrémité de la queue. 75 µl de sang sont prélevés afin d'obtenir suffisamment de plasma pour le dosage par technique ELISA.

Les glycémies et les insulinémies à t0 et à t15 permettent de calculer l'indice de sécrétion d'insuline, selon la formule suivante, et exprimé en unité arbitraire (217) :

$$(\text{insuline t15} - \text{insuline t0}) / (\text{glucose t15} - \text{glucose t0})$$

Les réserves pancréatiques d'insuline sont composées de 2 pools d'insuline. Le premier pool de réserve est rapidement mobilisable (environ 15 minutes après l'hyperglycémie), et permet de tamponner rapidement une élévation de la glycémie. Le second pool, constitué d'insuline néoformée, intervient à plus long terme, mais de façon plus prolongée. Le dosage de l'insuline

plasmatique 15 minutes après la charge de glucose nous permet donc d'évaluer la réponse immédiate du pancréas à une hyperglycémie (premier pool d'insuline).

Les troubles du métabolisme glucidique peuvent se caractériser soit par un défaut d'action d'insuline, soit par un défaut de la dynamique de sécrétion d'insuline, comme elle est décrite dans le diabète de type 2. Chez les patients diabétiques, le relargage du premier pool d'insuline est altéré, entraînant alors un mauvais tamponnement de l'hyperglycémie. Le relargage du second pool est exagéré, ce qui induit une hyperinsulinémie inappropriée. Les effets mitogènes de l'insuline expliquent les conséquences délétères et directes de l'hyperinsulinémie au niveau vasculaire, en stimulant, entre autres, la prolifération des cellules musculaires lisses.

2.5. Inflammation systémique

Chez les patients, l'évaluation du statut inflammatoire est réalisée en routine par la vitesse de sédimentation et par le dosage de la CRP. La vitesse de sédimentation, également appelée réaction de Biernacki, est une mesure non spécifique de l'inflammation. Le sang anticoagulé du patient est placé dans un tube vertical, et la vitesse à laquelle les globules rouges tombent est mesurée. Quand il y a un processus inflammatoire, la haute teneur en fibrinogène du sang fait que les globules rouges s'agrègent et sédimentent plus vite. Les volumes de sang obtenus chez la souris ne permettent pas de mesurer la vitesse de sédimentation. La CRP est une protéine de phase aiguë synthétisée principalement par le foie, et est considérée comme un bon marqueur biologique de l'inflammation. Chez le rongeur, la CRP est absente, elle est remplacée par la Serum Amyloïde A (SAA), une protéine pro-inflammatoire (190) dont les fonctions sont très semblables à celles de la CRP (152). Cependant, les difficultés de mise au point des dosages de SAA auxquelles nous avons été confrontés au cours de cette thèse ne nous ont pas permis d'obtenir de données concernant les taux plasmatiques de SAA chez les souris exposées à une HI.

Des cytokines pro- et anti-inflammatoires ont donc été dosées au niveau plasmatique après exposition à l'HI. Les niveaux d'adiponectine circulante ont été dosés par technique ELISA « classique » (kit DuoSet Adiponectin/Acrp30, R&D System). La dilution importante de l'échantillon (1/200ème) permet de doser facilement l'adiponectine avec ce type de kit ELISA, même si les volumes d'échantillon à déposer dans chaque puits (100µl) sont très importants au regard des volumes de plasma disponible pour chaque animal.

Les niveaux plasmatiques des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6, IFN- γ , des chémokines MCP-1 et RANTES, de la leptine et de la cytokine anti-inflammatoire (IL-10) ont été mesurés par technologie multiplex grâce au kit MILLIPLEX™ MAP Mouse Adipokine Panel (Millipore). Les concentrations des différentes cytokines et adipokine ont été déterminées par une mesure de fluorescence, à l'aide du lecteur Luminex® 200™ Total System (Luminex). Cet outil expérimental permet de réaliser de nombreux dosages, en utilisant une quantité minimale de plasma, qui est souvent limitée chez les souris. Cependant, cette technique est coûteuse, il est donc compliqué de réaliser des tests préliminaires afin d'optimiser les conditions de dosage.

2.6. Implication du tissu adipeux viscéral dans les atteintes métaboliques et vasculaires associées à l'hypoxie intermittente

Afin de déterminer l'implication du tissu adipeux épидидymal dans l'athérogenèse et les dysfonctions métaboliques associées à l'HI, une approche chirurgicale a été utilisée. La graisse épидидymale a été retirée bilatéralement et délicatement afin de préserver l'appareil génital et la vessie des animaux. Une attention très particulière a été portée sur la préservation des gonades. La sécrétion d'hormones mâles, telles que la testostérone, joue un rôle majeur dans la fonction vasculaire (9) et la régulation métabolique (8). Un déséquilibre hormonal lié à une atteinte de l'appareil génital, pourrait donc influencer le risque vasculaire et métabolique des souris lipectomisées. Des animaux contrôles ont subi une chirurgie dite « *sham* », pour laquelle le geste opératoire est similaire à celui de la lipectomie mais la graisse épидидymale n'est pas retirée. Durant les trois jours suivant la chirurgie, l'évolution corporelle et le comportement des souris ont été suivis quotidiennement.

3. Travaux expérimentaux

3.1. Rôle de l'inflammation dans le remodelage vasculaire associé à l'hypoxie intermittente

- **Publication n°1 : L'inflammation contribue à l'effet athérogène de l'hypoxie intermittente chez des souris ApoE^{-/-}**

“Inflammation contributes to the atherogenic role of intermittent hypoxia in apolipoprotein-E knock out mice”

Arnaud C, Poulain L, Levy P, Dematteis M.

Atherosclerosis 2011; 219(2): 425-431

Objectif : Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) est caractérisé par des cycles nocturnes d'HI, considérée comme une des composantes majeures impliquées dans la morbi-mortalité cardio-vasculaire associée au SAOS. L'HI entraîne des altérations hémodynamique, hormono-métaboliques et immuno-inflammatoires qui peuvent participer différemment à l'apparition de l'athérosclérose.

L'objectif de cette étude est d'étudier l'implication du processus inflammatoire dans l'effet pro-athérogène de l'HI, chez des souris athéro-sensibles.

Matériel et méthodes : Des souris ApoE^{-/-}, âgées de 15 semaines et nourries pendant 6 semaines avec un régime riche en cholestérol ont été soumises à 14 jours d'HI. L'effet pro-athérogène de l'HI a également été évalué chez des souris âgées 15 et 20 semaines nourries avec un régime standard. Après la période d'exposition, les lésions d'athérosclérose, ainsi que les altérations lipidiques, hémodynamiques et inflammatoires ont été évaluées chez ses différents groupes de souris.

Résultats : L'HI aggrave l'athérosclérose chez les souris nourries avec un régime riche en gras, alors que les niveaux très élevés de cholestérol plasmatiques dus à ce régime ne sont pas modifiés par l'HI. Chez les souris nourries avec un régime standard, l'HI accélère également le développement de l'athérosclérose, mais de façon plus sévère chez les souris âgées de 20 semaines comparé aux souris âgées de 15 semaines. Cependant les niveaux de cholestérol plasmatique – augmentés après l'HI chez ces deux groupes – sont équivalents chez les souris âgées de 15 et de 20 semaines. L'HI entraîne une légère augmentation de la pression artérielle, seulement chez les souris âgées de 20 semaines, et induit une inflammation vasculaire – caractérisée par une augmentation de l'infiltrat lymphocytaire au niveau des lésions athéromateuses – et systémique – caractérisée par une augmentation de la prolifération splénocytaire et une diminution de la sécrétion d'IL-10.

Conclusion : Il apparaît qu'une courte exposition à l'HI a des effets pro-athérogènes majeurs et ce, même chez des souris nourries avec un régime standard. Contrairement aux lipides plasmatiques et aux valeurs hémodynamiques qui sont peu ou pas modifiés par l'HI, il semble que l'inflammation vasculaire et systémique joue, quant à elle, un rôle dans l'athérogenèse liée à l'HI (figure 13, page 97).



Contents lists available at ScienceDirect

Atherosclerosis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/atherosclerosis



Inflammation contributes to the atherogenic role of intermittent hypoxia in apolipoprotein-E knock out mice

Claire Arnaud^{a,b,*}, Laureline Poulain^{a,b}, Patrick Lévy^{a,b,c,1}, Maurice Dematteis^{a,b,d,*}, 1

^a INSERM U1042, Grenoble, F-38042, France

^b Université Joseph Fourier, Grenoble 1, Faculté de Médecine, IFR1, F-38042, France

^c CHU, Hôpital A. Michallon, Laboratoires du Sommeil et EFCR, Grenoble F-38043, France

^d CHU, Hôpital A. Michallon, Pôle Pluridisciplinaire de Médecine, Grenoble F-38043, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 February 2011

Received in revised form 28 June 2011

Accepted 28 July 2011

Available online xxx

Keywords:

Sleep apnea

Intermittent hypoxia

Atherosclerosis

Dyslipidemia

Inflammation

Mice

ABSTRACT

Rationale: Obstructive sleep apnea results in nocturnal intermittent hypoxia (IH) as a main trigger for cardiovascular morbidity, including atherosclerosis. IH induces hemodynamic, hormono-metabolic and also immuno-inflammatory alterations that could differentially contribute to atherosclerosis. Our study aimed at examining their respective contribution to the proatherogenic role of IH in atherosclerosis-prone mice.

Methods: Fifteen-week-old male apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-}) mice fed on a high-cholesterol diet (HCD) for 6 weeks and exposed for the last 14 days to IH (21–5% FiO₂, 60 s cycle, 8 h/day) or air, were investigated for aortic atherosclerosis and lipid alterations. Then IH proatherogenicity was assessed in 15- and 20-week-old ApoE^{-/-} mice fed on a standard-chow diet (SCD) exposed to IH or air for 14 days and assessed for atherosclerosis, lipid, hemodynamic and inflammation alterations.

Results: IH aggravated atherosclerosis in HCD-fed mice, whereas the extremely high cholesterol levels due to HCD were not different between normoxic and hypoxic animals. In SCD-fed mice, IH also aggravated atherosclerosis, more severely in 20 compared to 15-week-old animals. However, cholesterol levels that increased with IH were not different in the two SCD-fed groups. IH slightly elevated arterial blood pressure in 20-week-old animals only, and induced systemic and vascular inflammation, including increased splenocyte proliferation with decreased IL-10 secretion, and increased T-lymphocytes within atherosclerotic plaques.

Conclusions: A short IH exposure without HCD has proatherogenic effects. In contrast to blood pressure or plasma lipids which were slightly or inconstantly affected by IH, inflammation at systemic and vascular levels appears as a potential contributing factor to IH atherogenicity.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Obstructive sleep apnea (OSA) syndrome is a highly prevalent disease, affecting 6–17% of adults [1], and is recognized as an independent cardiovascular risk factor [2]. The Wisconsin sleep cohort showed that untreated severe sleep apnea patients are five times more likely to die from cardiovascular causes [1]. However, the relationship between OSA and mortality appears to be found only before 70 years old [3]. OSA-patients present early signs of atherosclerosis (e.g. carotid artery intima-media thickening,

carotid plaques and arterial stiffness) that are independent of other cardiovascular or metabolic risk factors [4,5], and are reversible in some patients by continuous positive airway pressure (CPAP) therapy [6]. OSA is a clinical situation with dyslipidemia [7], hypertension [8] and systemic inflammation [9] which are in part imputable to the main component of OSA, i.e. intermittent hypoxia (IH). These several OSA-consequences could promote cardiac and vascular disease such as atherosclerosis [2,8]. However, their respective contribution is unknown. Moreover, current pharmacological therapies in apneic patients only aim at normalizing blood pressure and metabolic alterations.

Recent studies showed that long term IH exposure (up to 12 weeks) with high-fat high-cholesterol diet caused atherosclerosis and dyslipidemia in C57BL6 mice, or aggravated both atherosclerotic plaque progression and dyslipidemia in atherosclerosis-prone mice [10–12]. In these studies, the metabolic disorder (dyslipidemia and lipid peroxydation) appeared as the main factor linking atherosclerosis to IH. However, it is well established that

* Corresponding authors at: Laboratoire HP2, Institut Jean Roget, Faculté de Médecine de Grenoble, BP 170, 38042 Grenoble Cedex 9, France.
Tel.: +33 476 63 75 56/476 63 71 71; fax: +33 476 63 71 78.

E-mail addresses: claire.arnaud@ujf-grenoble.fr (C. Arnaud), maurice.dematteis@ujf-grenoble.fr (M. Dematteis).

¹ Co-senior author.

atherosclerosis is a chronic inflammatory disease [13], and there is growing evidence that OSA is a chronic low grade inflammation. Therefore, IH-induced inflammation could be an additional link between OSA and atherosclerosis [9], without the use of a dyslipidemic diet and even after a short-term of IH exposure, as we previously showed that 14 days of IH were sufficient to induce vascular alterations [14–16].

We exposed atherosclerosis-prone mice (apolipoprotein E knock-out (ApoE^{-/-}) mice) to 14 days of IH and assessed atherosclerotic plaque progression and inflammatory alterations. The genesis of atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice is well documented. Mice fed on a standard chow diet develop foam cell lesions as early as 8 weeks, whereas intermediate lesions containing foam cells and smooth muscle cells appear at 15 weeks, and fibrous plaques at 20 weeks of age [17]. Western dyslipidemic diet accelerates this process and exacerbates plasma cholesterol levels. Therefore, we evaluated the effect of IH on different stages of atherosclerosis development, using 15- and 20-week-old ApoE^{-/-} mice fed either on a standard-chow diet or a high-cholesterol diet.

2. Methods

2.1. Animals

We first assessed the proatherogenic effect of IH in 15-week-old male ApoE^{-/-} mice (C57BL6 background) fed on a high-cholesterol diet (HCD) (17.3% fat, 1.30% cholesterol; Safe) for 6 weeks. During the last 14 days, mice were exposed to IH or air (see below), then assessed for atherosclerotic lesions and lipid alterations. Since the animals developed extremely severe dyslipidemia, which is an unusual situation in sleep apnea patients, the other experiments were conducted in mice fed on a standard-chow diet (SCD). Fifteen- and 20-week-old male ApoE^{-/-} SCD-fed mice were exposed to IH or air for 14 days, then investigated for atherosclerotic lesions, lipid, blood pressure, and inflammation alterations. Animals were weighed before and at the end of each week of exposure. All the 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).

2.2. Intermittent hypoxia

IH was performed in experimental cages accommodating 10 mice each, as previously described [15,16]. The animals were exposed to IH (cyclic 21–5% FiO₂, 60 s cycle, normoxic and hypoxic phases both for 30 s, 8 h/day during daytime). FiO₂ was measured with a gas analyzer (ML206, ADInstruments) throughout the experiment. In similar experimental cages, normoxic mice (N) were exposed to air at similar flows than the IH stimulus, thereby reproducing equivalent levels of noise and turbulences related to gas circulation. Ambient temperature was maintained at 20–22 °C. The day following the last exposure period, animals were anesthetized under a mixture of ketamine–xylazine (100 mg/kg–10 mg/kg, intraperitoneal injection). Hemodynamic parameters were recorded, blood was collected from cardiac puncture on EDTA tubes, and tissues were harvested and either frozen in liquid nitrogen then stored at –80 °C until analysis, or processed for splenocyte proliferation and cytokine assays.

2.3. Atherosclerotic lesion size

Atherosclerotic lesions of the thoraco-abdominal aorta and aortic roots were analyzed by Oil-red-O staining. For each aortic root,

we quantified lipid deposition from 5 sections (8 μm thickness), separated by 80 μm from each other, using computer image analysis (MetaMorph6 software, Zeiss microscope) [18].

2.4. Lipid measurements

Total cholesterol was measured in plasma collected after the 14-day period of exposure, using both the Infinity kit (Thermo Electron Corporation) according to the manufacturer's guidelines, and the Modular P[®] device (Roche Diagnostics). HDL-cholesterol and triglycerides (TG) were quantified by a colorimetric enzymatic reaction using the Modular P[®] analyzer (Roche Diagnostics). LDL-cholesterol was calculated using the Friedewald formula.

2.5. Hemodynamic parameters

Diastolic and systolic arterial blood pressures were measured with a carotid artery catheter, digitized, then analyzed using the PowerLab data acquisition system (Powerlab/8SP, ADInstruments).

2.6. Systemic inflammation

Cytokine assay: Splenocytes were isolated from fresh harvested spleens and stimulated using Concanavalin-A (2 μg/ml). Interferon-gamma (IFN-γ) and interleukins IL-4 and IL-10 from supernatants collected 48–72 h after stimulation were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's instructions (R&D Systems).

Proliferation assay: Splenocytes were cultured in 96-well plates at a concentration of 5 × 10⁶ cells/ml. Culture medium consisted of RPMI 1640 supplemented with 25 mM HEPES buffer, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin and 10% heat-inactivated FBS. Cells were stimulated in triplicates with graded concentrations of the mitogenic factor concanavalin-A (Sigma). Forty-eight hours later, cell proliferation was determined using a non-radioactive MTS cell proliferation assay (Promega).

2.7. Vascular inflammation

Macrophage and T-cell infiltration in the atherosclerotic lesions was assessed on immunostained cryosectioned aortic roots, using anti-mouse macrophage (Mac-3, clone M3/84, BD Pharmingen) and CD3 (#A0452, DakoCytomation) antibodies. Collagen was assessed with sirius red staining. Both stainings were quantified from 5 sections (8 μm thickness) per animal, separated by 80 μm from each other, using computer image analysis (MetaMorph6 software, Zeiss microscope) [18], and expressed as a percentage of the lesion size (ratio macrophage or T-cell area to atherosclerosis area).

2.8. Statistical analysis

Results were expressed as means ± SEM and analyzed using parametric (ANOVA and *t*-tests) or nonparametric tests (Kruskal–Wallis and Mann–Whitney) according to normality and variance homogeneity. Statistical significance was set at *p* < 0.05.

3. Results

3.1. Effects of IH in high-cholesterol diet-fed mice

IH aggravated atherosclerosis in both the descending thoraco-abdominal aorta and aortic roots (Fig. 1). Total cholesterol levels were very high, twice the levels measured in SCD animals, but without differences between hypoxic and normoxic animals (Table 1). Therefore, although atherogenesis may have been promoted by extremely high levels of lipids, these last results suggested that the

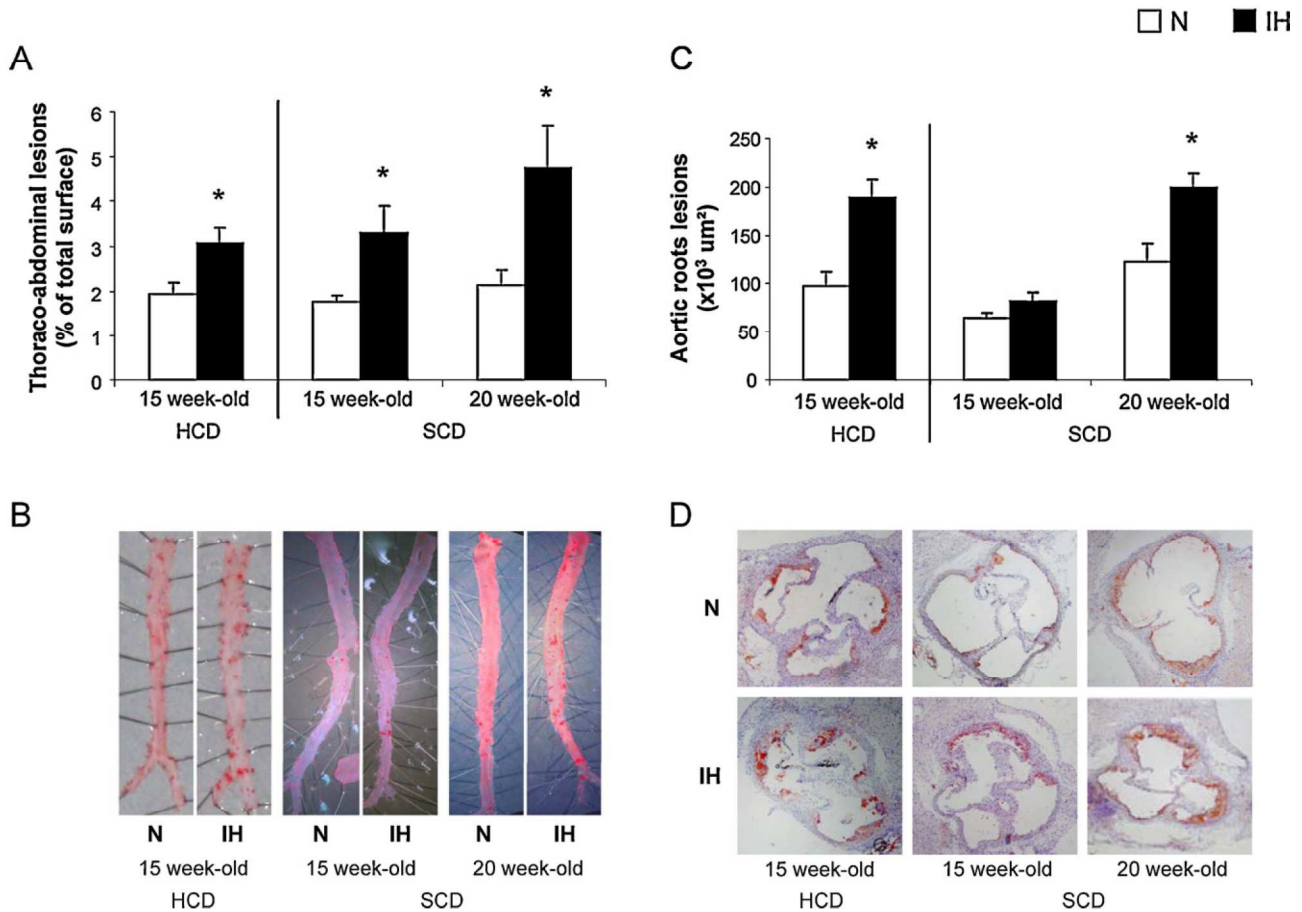


Fig. 1. Atherosclerotic lesion measurements in 15-week-old HCD-fed mice and in 15 and 20-week-old SCD-fed mice. (A) Thoraco-abdominal aortic lesions measured as percentage of total aorta surfaces; * $p < 0.05$ vs N. (B) Representative photographs of thoraco-abdominal lesions. (C) Atherosclerotic lesions in aortic roots, expressed in μm^2 ; * $p < 0.05$ vs N. (D) Representative photographs of aortic root lesions. □ and ■ represent N and IH groups, respectively.

Table 1
 Weight and biological alterations induced by IH in HCD-fed mice.

	N	IH
Age of mice (weeks)	15	15
n	7	9
Mice weight (g)		
Day 0	26.3 ± 0.8	25.4 ± 0.6
Day 8	25.7 ± 0.6	25.9 ± 0.4
Day 14	25.5 ± 0.8	25.4 ± 0.5
Parameters at 14 days		
Hematocrit (%)	44.9 ± 0.3	48.4 ± 0.9*
Total cholesterol (g/l)	12.0 ± 0.5	12.4 ± 1.0

* $p < 0.05$ vs N.

aggravating effect of IH on atherosclerotic lesions was likely not mediated by dyslipidemia only.

3.2. Effects of IH in standard-chow diet-fed mice

3.2.1. Atherosclerotic plaque size

IH aggravated atherosclerosis as shown by larger lesions in thoraco-abdominal aortas from the 2 hypoxic groups of SCD-fed mice (Fig. 1A and B). In the aortic roots, the proatherogenic effect of IH was observed in 20-week-old animals only (Fig. 1C and D). Lesion size in the aortic roots was similar between older SCD-fed animals and 15-week-old HCD-fed hypoxic mice suggesting that the combination of IH and HCD had mutually potentiated their respective detrimental effects (Fig. 1C and D).

3.2.2. Dyslipidemia

IH increased both total and LDL-cholesterol levels in SCD-fed mice, without affecting HDL-cholesterol (Fig. 2A–C). The increases in cholesterol levels were similar in 15- and 20-week-old animals. In contrast, triglyceride significantly increased in 20-week-old hypoxic mice only, whereas body weight was similar in hypoxic 15- and 20-week-old mice at the end of IH exposure. As usually occurring with the experimental model of IH, the body weight of the two SCD-fed groups decreased under IH and remained lower than that of normoxic animals at the end of exposure (Table 2).

3.2.3. Blood pressure

Hematocrit significantly increased in the two groups of SCD-fed mice. Whereas arterial blood pressure measurements were very close between 15-week-old groups, blood pressure values tended to be higher in older hypoxic mice, with +8.3 mmHg for mean BP, +8.9 mmHg for diastolic BP and +7.5 mmHg for systolic BP (Table 2).

3.2.4. Inflammatory alterations

3.2.4.1. Systemic inflammation. IH caused systemic inflammation in the two groups of SCD-fed mice, as shown by the increase in splenocyte proliferation (Fig. 3A) and the trend ($p = 0.06$) for lower splenocyte IL-10 secretion (Fig. 3B). In contrast, splenocyte secretion of IFN γ and IL-4 was unaffected by IH (data not shown).

3.2.4.2. Vascular inflammation. The atherosclerotic plaque composition was assessed in 20-week-old mice, as they presented the more advanced atherosclerotic lesions. IH significantly increased

Table 2
Weight and hemodynamic alterations induced by IH in SCD-fed mice.

	N	IH	N	IH
Age of mice (weeks)	15	15	20	20
<i>n</i>	14	13	9	7–9
Mice weight (g)				
Day 0	28.2 ± 0.5	29.4 ± 0.5	30.7 ± 0.3	30.1 ± 0.4
Day 8	27.8 ± 0.5	25.3 ± 0.4* [§]	30.3 ± 0.3	27.6 ± 0.4* [§]
Day 14	28.6 ± 0.5	27.2 ± 0.4* [§]	30.9 ± 0.4	27.7 ± 0.3* [§]
Parameters at 14 days				
Hematocrit (%)	46.3 ± 0.5	50.1 ± 0.8*	49.4 ± 1.7	52.4 ± 1.3*
Blood pressure				
Mean BP (mmHg)	74.5 ± 2.3	74.5 ± 1.9	71.7 ± 3.4	80.0 ± 3.1
Diastolic BP (mmHg)	68.7 ± 2.4	68.5 ± 1.9	67.4 ± 3.4	76.3 ± 3.4
Systolic BP (mmHg)	86.0 ± 2.3	86.4 ± 2.4	80.1 ± 3.5	87.5 ± 2.6

* $p < 0.05$ vs N.§ $p < 0.05$ vs day 0.

T-lymphocytes (CD3 positive cells) within atherosclerotic lesions (Fig. 4). In contrast, collagen staining (data not shown) and macrophage recruitment (Fig. 4) in aortic roots were unaffected by IH. Although the plaque vulnerability index (the ratio of lipid components to collagen and smooth-muscle cells) was not calculated, the enlarged plaque size without change in collagen content indicated plaque instability in IH animals.

4. Discussion

In view of the known relationship between sleep apnea syndrome and atherosclerosis development [4,5,19], our data strongly support the role of the hypoxic component in OSA-related atherosclerosis. In the present study, we confirmed that IH accelerates atherosclerosis development in ApoE^{-/-} mice, fed either on a SCD or HCD. We showed that the proatherogenic effect occurred after only 14 days of IH and was associated with systemic and vas-

cular inflammation, whereas lipidic and hemodynamic alterations due to IH were inconstant or modest.

4.1. Methodological considerations

The IH model has been developed 19 years ago and reproduces one of the major components of OSA, i.e. the repetitive sequence of hypoxia-reoxygenation, considered as the most detrimental component contributing to the cardiovascular complications of OSA (for review, see [15,20]). Contrasting with the clinical situation of eucapnia or even hypercapnia in severe sleep apnea, IH without CO₂ supplementation results in hypocapnia due to intermittent hyperventilation [21,22]. However, except for the pulmonary artery [22], protocols with various CO₂ supplementation showed similar changes in systemic blood pressure, hematocrit and right ventricular hypertrophy (for review, see [15,20]), further underlining IH as the main detrimental factor for OSA-associated cardiovascular complications.

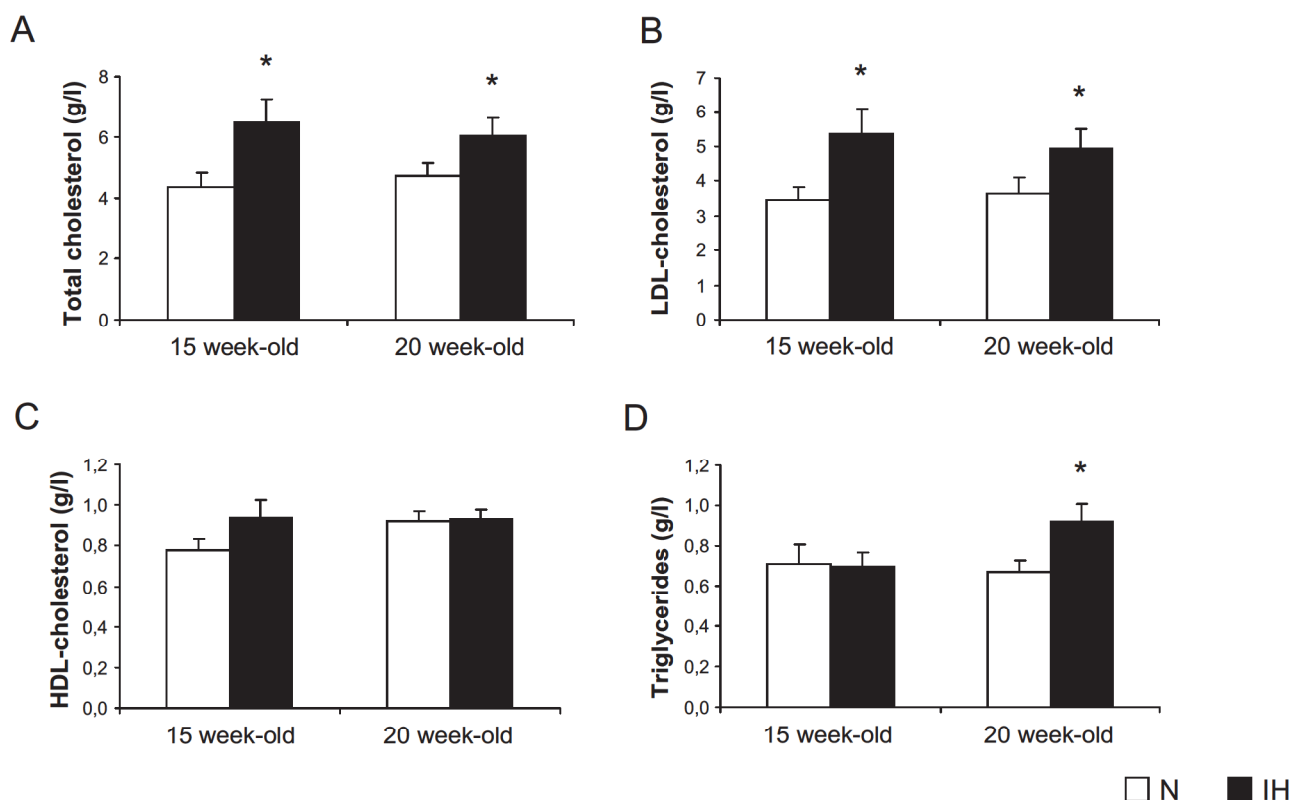


Fig. 2. IH-induced dyslipidemia in 15 and 20-week-old SCD-fed mice. (A) Total cholesterol; (B) LDL-cholesterol; (C) HDL-cholesterol; (D) triglycerides; * $p < 0.05$ vs N. □ and ■ represent N and IH groups, respectively.

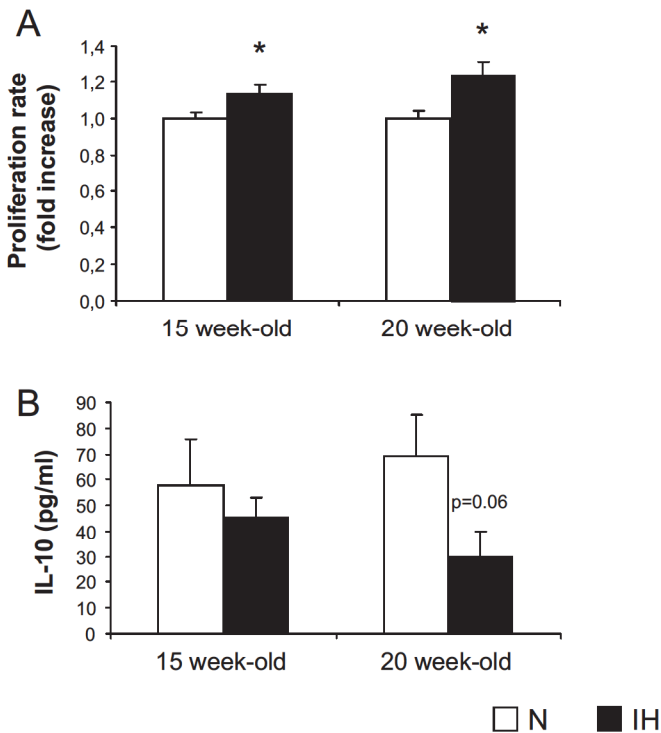


Fig. 3. IH-induced inflammatory response in 15 and 20-week-old SCD-fed mice. (A) Splenocyte proliferation in response to 0.5–5 $\mu\text{g/ml}$ concanavalin-A (ConA) after 14 days of IH or air (N). (B) Quantification of IL-10 secretion from splenocytes of mice exposed to IH or air (N). \square and \blacksquare represent N and IH groups, respectively.

4.2. The proatherogenic role of IH

There is growing evidence that the hypoxic component of OSA seems to play a major role in the development of atherosclerosis in apneic patients. The severity of nocturnal oxygen desaturation has been found as the best predictor for carotid wall hypertrophy, plaque occurrence and volume in OSA-patients [4,5]. Using atherosclerosis-prone mice fed on a high-cholesterol diet, Jun et al. recently showed that long term exposure to IH (4–12 weeks) accelerated atherosclerotic plaque growth [11]. In the present study, we confirmed the proatherogenic role of IH and further evidenced that a shorter exposure to IH, i.e. only 14 days, without a high-cholesterol diet, also led to atherosclerosis aggravation.

4.3. Dyslipidemic alterations due to IH

Atherosclerosis is initiated by imbalance of lipid metabolism leading to atherogenic dyslipidemia, including hypercholesterolemia, and contributing to retention, accumulation and oxidation of lipoproteins in the arterial wall [23]. Several studies reported such anomalies of lipid metabolism in both OSA-patients [8] and mice exposed to IH [7,12], IH-related atherosclerosis appearing to be closely associated with lipid alterations [10,11]. However in our study, 14 days of IH in HCD-fed mice accelerated atherosclerosis development independently of total cholesterol levels. Indeed, even the normoxic mice exhibited extremely high levels of total cholesterol that were not further increased in hypoxic animals. These results suggest that the proatherogenic effect of IH was not mediated by dyslipidemia. However, beside quantitative alterations, we cannot rule out qualitative cholesterol alterations due to IH, such as LDL and HDL oxidation. Because cholesterol levels found in HCD-fed mice were not representative of biological alterations usually measured in OSA-patients but rather in familial dyslipidemia, we assessed the proatherogenic effect of IH in

SCD-fed animals. And again, whereas IH aggravated atherosclerosis more severely in 20 compared to 15-week-old animals, IH similarly increased total and LDL-cholesterols in these two hypoxic SCD-fed groups. The similarity in aortic root lesion size between hypoxic 20-week-old SCD-fed animals and 15-week-old HCD-fed mice suggests that the combination of IH and HCD may have mutually potentiated each other. However, the successive discrepancies between the proatherogenic effect of IH and dyslipidemia levels suggest that IH could have exerted its aggravating effect on atherosclerosis through other contributing factors than dyslipidemia only.

4.4. Blood pressure alterations due to IH

Hemodynamic alterations that have been extensively described in OSA [24] are likely to be involved in atherosclerosis progression. About 60% of OSA-patients develop systemic hypertension [24], even in the absence of any other risk factors when including both clinical and masked hypertension [4,25]. Using animal models [14,15] and also applying IH in healthy humans [26] suggest that IH is a major factor determining blood pressure increase. We have previously shown in C57BL6 mice that blood pressure surges appear at each hypoxic episode, and are associated with increased sympathetic activation [14]. These hemodynamic changes are well known to induce functional and structural alterations of the vascular wall that could contribute to vascular remodeling and atherogenesis [14,15,27]. However in the present study, we found a slight elevation in blood pressure in 20-week-old mice, whereas hemodynamic parameters were unaffected in 15-week-old mice. This suggests that blood pressure alterations may have modestly contributed to atherosclerosis acceleration in our model.

4.5. IH-induced inflammation and atherosclerosis

In addition to metabolic and hemodynamic impairments, inflammation is considered as a key factor in atherosclerosis [13]. A growing body of evidence suggests that OSA is also a chronic low grade inflammatory disease [9,28]. Whereas the mechanisms linking OSA and inflammation are not fully elucidated, experimental models suggest a major role of IH in OSA-related inflammation and subsequent vascular alterations [15,16]. Indeed, we recently demonstrated the role of inflammation in the pre-atherosclerotic remodeling due to IH in C57BL6 mice. This vascular remodeling, characterized by an increased aortic intima-media thickness with inflammation (periadventitial lymphocyte infiltration, increased expression of NF κ B-p50, ICAM-1 and RANTES–CCL5), was attenuated when RANTES/CCL5 activity was neutralized during IH exposure [16]. In the present study, we showed that 14 days of IH also aggravates advanced atherosclerotic lesions in association with higher systemic and vascular inflammation, as shown by the increase in splenocyte proliferation rate and the reduced IL-10 secretion. Splenocyte proliferation directly reflects leukocyte activation [29] and is consistent with data previously reported in OSA-patients and in rodents exposed to IH [16]. Specific lymphocyte activation, with enhanced CD8⁺ T-cell cytotoxicity [30] and increased cytokine production by both CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subtypes [31] were found in OSA-patients. The reduced IL10 secretion by splenocytes also strongly suggests a shift of T-helper cell 2 toward T-helper cell 1 (Th2/Th1 balance) and several studies have demonstrated the anti-atherogenic and anti-inflammatory role of IL10 in mice (for review, see [32]). Therefore in our study, leukocyte activation and reduced IL10 secretion in hypoxic ApoE^{-/-} mice could have contributed to accelerate atherogenesis [13]. This significant role of IH-associated inflammation in atherogenesis was also strengthened by the enhanced CD3 T-cell infiltration within atherosclerotic plaques of hypoxic animals. Therefore beside

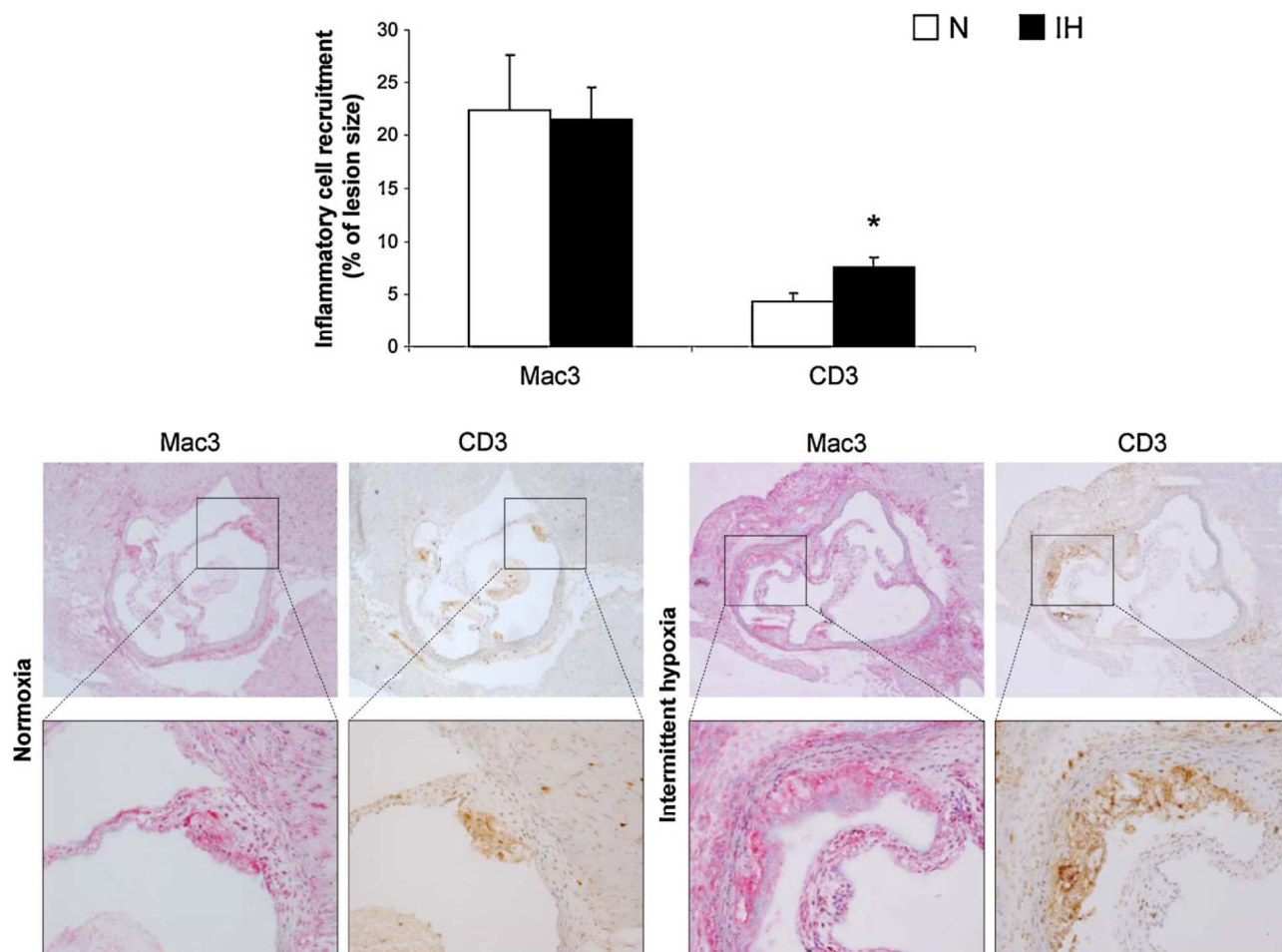


Fig. 4. Atherosclerotic plaque composition in 20-week-old SCD-fed mice. Quantification of T-lymphocyte (CD3 positive cells) and macrophage (Mac-3 positive cells) recruitment in aortic root lesions, expressed in percentage of lesion size; * $p < 0.05$ vs N. Representative photographs of T-cell and macrophage staining in IH and N groups (up: $10 \times$ magnification; down: 10×20 magnification insets). □ and ■ represent N and IH groups, respectively.

enlarging atherosclerosis lesions with evidence of plaque instability, IH induces a more inflammatory plaque phenotype which can also contribute to plaque instability [23,33,34].

In conclusion, as in previous studies, the murine model of IH confirmed its clinical relevance and the critical role of IH, demonstrating that a short exposure to IH without HCD was sufficient to accelerate atherosclerosis, including plaque size and stability, in ApoE^{-/-} mice. The proatherogenic effect of IH was associated with inflammatory, inconstant lipidic and modest hemodynamic alterations. These observations confirm that sleep apnea, through its hypoxic component, could initiate or aggravate several systemic and organ-specific biological factors that are required for the development of atherosclerosis. These findings further support the need for early diagnosis of vascular remodeling in OSA-patients using sub-clinical cardiovascular markers such as carotid intima media thickness, whereas biomarkers enabling to identify at-risk patients remain to be determined. In light of our results, the assessment of the inflammatory response in OSA-patients, currently underestimated in clinical practice as it is not routinely assessed, could represent a valuable candidate biomarker.

Acknowledgment

This research was funded by a grant from Agir@dom to CA and MD.

References

- [1] 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.
- [2] 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. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:686–717.
- [3] Punjabi NM, Caffo BS, Goodwin JL, et al. Sleep-disordered breathing and mortality: a prospective cohort study. *PLoS Med* 2009;6:e1000132.
- [4] Baguet JP, Hammer L, Lévy P, et al. The severity of oxygen desaturation is predictive of carotid wall thickening and plaque occurrence. *Chest* 2005;128:3407–12.
- [5] Drager LF, Bortolotto LA, Lorenzi MC, Figueiredo AC, Krieger EM, Lorenzi-Filho G. Early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:613–8.
- [6] 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.
- [7] Jun J, Polotsky VY. Metabolic consequences of sleep-disordered breathing. *ILAR J* 2009;50:289–306.
- [8] McNicholas WT, Bonsignore MR. Management committee of EU COST ACTION B26 sleep apnoea as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence, basic mechanisms and research priorities. *Eur Respir J* 2007;29:156–78.
- [9] Arnaud C, Dematteis M, Pépin JL, Baguet JP, Lévy P. Obstructive sleep apnea syndrome, immuno-inflammation and atherosclerosis. *Semin Immunopathol* 2009;31:113–25.
- [10] Savransky V, Nanayakkara A, Li J, et al. Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:1290–7.
- [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] Li J, Savransky V, Nanayakkara A, Smith PL, O'Donnell CP, Polotsky VY. Hyperlipidemia and lipid peroxidation are dependent on the severity of chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* 2007;102:557–63.
- [13] Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2006;6:508–19.
- [14] 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.
- [15] Dematteis M, Godin-Ribuot D, Arnaud C, et al. Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding of the human disease. *ILAR J* 2009;50:262–81.
- [16] Arnaud C, Beguin PC, Lantuejoul S, et al. The Inflammatory pre-atherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;(June). PMID: 21680945.
- [17] Meir KS, Leitersdorf E. Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1006–14.
- [18] Kwak BR, Veillard N, Pelli G, et al. Reduced connexin43 expression inhibits atherosclerotic lesion formation in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 2003;107:1033–9.
- [19] Lévy P, Pépin JL, Arnaud C, Baguet JP, Dematteis M, Mach F. Obstructive sleep apnea and atherosclerosis. *Prog Cardiovasc Dis* 2009;51:400–10.
- [20] Kanagy NL. Vascular effects of intermittent hypoxia. *ILAR J* 2009;53:282–8.
- [21] Lee EJ, Woodske ME, Zou B, O'Donnell CP. Dynamic arterial blood gas analysis in conscious, unrestrained C57BL/6J mice during exposure to intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* 2009;107:290–4.
- [22] Snow JB, Kitzis V, Norton CE, et al. Differential effects of chronic hypoxia and intermittent hypocapnic and eucapnic hypoxia on pulmonary vasoreactivity. *J Appl Physiol* 2008;104:110–8.
- [23] Hansson GK. Inflammation atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685–95.
- [24] Peppard PE, Young T, Palta M, Skatrud J. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N Engl J Med* 2000;342:1378–84.
- [25] Baguet JP, Lévy P, Barone-Rochette G, et al. Masked hypertension in obstructive sleep apnea syndrome. *J Hypertens* 2008;26:885–92.
- [26] Tamišier R, Pépin JL, Rémy J, et al. 14 nights of intermittent hypoxia elevate daytime blood pressure and sympathetic activity in healthy humans. *Eur Respir J* 2011;37:119–28.
- [27] Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, Edelman ER, Feldman CL, Stone PH. Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:2379–93.
- [28] Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Systemic inflammation: a key factor in the pathogenesis of cardiovascular complications in obstructive sleep apnoea syndrome? *Thorax* 2009;64:631–6.
- [29] Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998;392:565–8.
- [30] Dyugovskaya L, Lavie P, Hirsh M, Lavie L. Activated CD8+ T-lymphocytes in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 2005;25:820–8.
- [31] 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.
- [32] Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 2006;86:515–81.
- [33] Robertson AK, Hansson GK. T cells in atherogenesis: for better or for worse? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2421–32.
- [34] Weber C, Zernecke A, Libby P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat Rev Immunol* 2008;8:802–15.

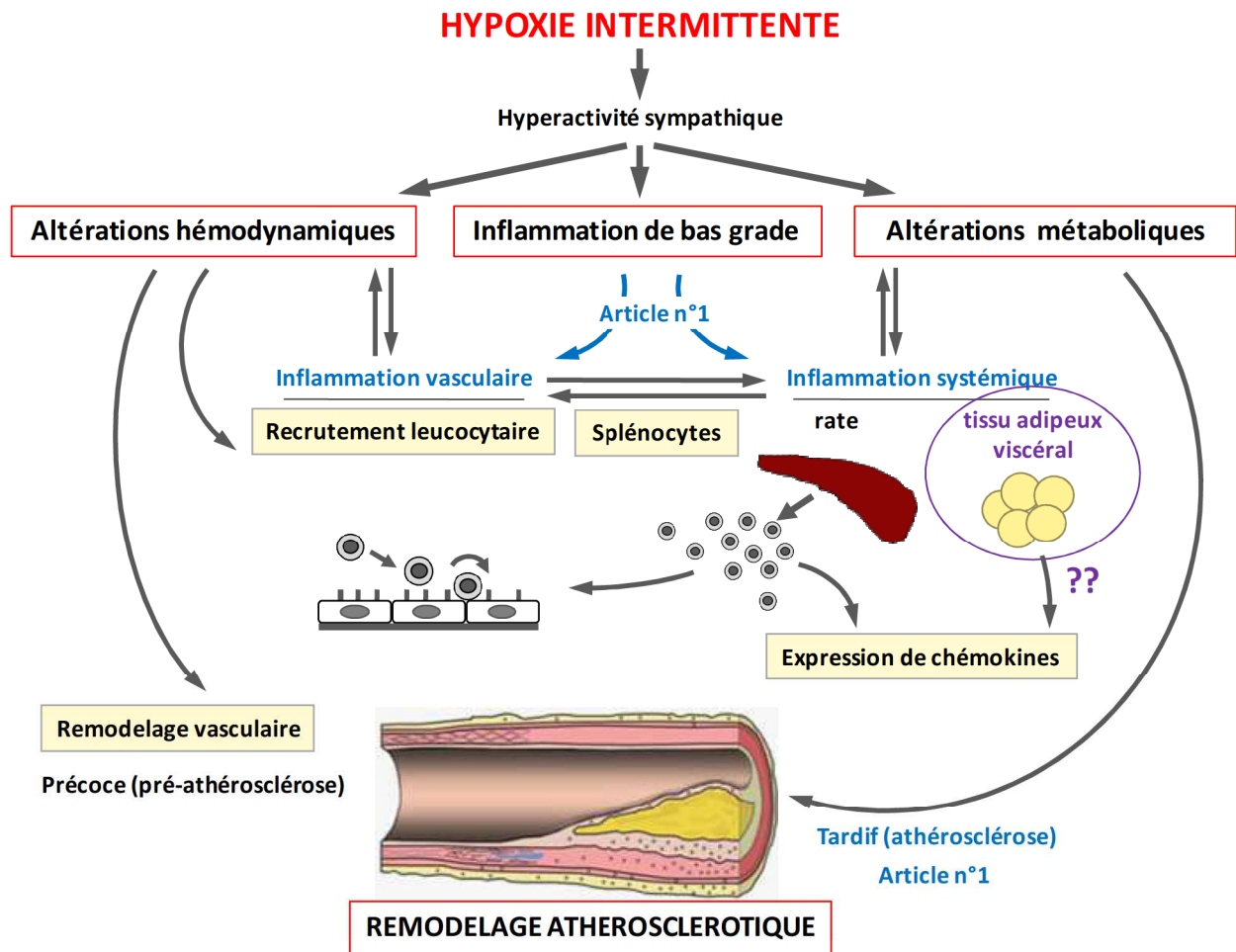


Figure 13. Résumé des résultats décrits dans l'article n°1. D'après ces données, il apparaît que l'hypoxie intermittente entraîne une inflammation vasculaire et systémique, qui joue un rôle majeur dans l'athérosclérose induite par l'hypoxie intermittente.

3.2. Implication du tissu adipeux viscéral dans le remodelage vasculaire associé à l'hypoxie intermittente

- **Publication n°2 : Le remodelage du tissu adipeux viscéral contribue à l'athérogenèse induite par l'hypoxie intermittente**

“Visceral white fat remodeling contributes to intermittent hypoxia-induced atherogenesis”

Poulain L, Thomas A, Rieusset J, Casteilla L, Lévy P, Arnaud C*, Dematteis M.*

*co-senior authors

European Respiratory Journal, accepté, juin 2013

Objectif : Les collapsus pharyngés nocturnes observés durant le SAOS sont à l'origine, entre autres, d'une HI. Cette composante est reconnue comme étant majoritairement impliquée dans les atteintes cardio-vasculaires liées au SAOS. D'après nos précédents résultats (15), l'exposition de souris ApoE^{-/-} non-obèses entraîne une inflammation à la fois systémique mais également vasculaire, qui semble être impliquée, au moins en partie, dans l'athérogenèse associée à l'HI. Par ailleurs, dans un contexte d'obésité, le tissu adipeux blanc joue un rôle dans l'apparition d'une inflammation, d'une insulino-résistance et, à plus long terme, d'altérations vasculaires.

L'HI pourrait donc entraîner une inflammation du tissu adipeux, qui participerait aux dysfonctions métaboliques et vasculaires liées à l'HI, indépendamment de toute obésité.

Matériel et méthodes : Les altérations morphologiques et inflammatoires du tissu adipeux épидидymal ont été étudiées chez des souris ApoE^{-/-} non-obèses âgées de 20 semaines et exposées à 6 semaines d'HI ou de normoxie. Afin de déterminer l'implication de ces altérations dans les conséquences cardio-métaboliques associées à l'HI, une lipectomie épидидymale a été réalisée chez des souris ApoE^{-/-} exposées à l'HI ou à la normoxie. Les modifications métaboliques et le remodelage athérosclérotique ont été évalués dans chez les souris *sham* et les souris lipectomisées.

Résultats : Au niveau du tissu adipeux épидидymal, les résultats de cette étude montrent que l'HI induit un remodelage structural de ce tissu, caractérisé par une diminution de la surface adipocytaire et une augmentation de l'expression d'UCP-1. Ces modifications structurales s'accompagnent d'un remodelage inflammatoire, caractérisé par une augmentation de l'infiltrat macrophagique, de l'expression de MCP-1 et de la sécrétion de deux cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF- α). Par ailleurs, la lipectomie épидидymale permet de corriger la dyslipidémie associée à l'HI, et de réduire les effets pro-athérogènes de ce stimulus.

Conclusion : Cette étude confirme donc le rôle athérogène et dyslipidémiant de l'HI, et suggère que ses conséquences délétères pourraient être médiées, en partie, par des altérations au niveau du tissu adipeux épидидymal, en dehors de tout contexte d'obésité (figure 14, page 124).

Visceral white fat remodeling contributes to intermittent hypoxia-induced atherogenesis

Laureline POULAIN^{1,2}, Amandine THOMAS^{1,2}, Jennifer RIEUSSET³, Louis CASTEILLA⁴,
Patrick LEVY^{1,2,5}, Claire ARNAUD^{1,2,*} and Maurice DEMATTEIS^{1,2,6*}

*Co-senior authors

¹INSERM U1042, HP2 laboratory, Grenoble F-38042, France

²Université Joseph Fourier, Faculté de Médecine, Grenoble F-38042, France

³INSERM UMR-1060, CarMeN Laboratory, Lyon F-69003, France

⁴UMR UPS/CNRS/EFS 5273 INSERM U1031 STROMALab, Toulouse F-31432, France

⁵CHU, Hôpital A. Michallon, Laboratoires du Sommeil et EFCR, Grenoble F-38043, France

⁶CHU, Hôpital A. Michallon, Pôle Pluridisciplinaire de Médecine, Grenoble F-38043, France

Running title: Visceral fat mediates hypoxia atherogenicity

Word count for the body (not including abstract, references, tables and legends): 3148

Word count for the abstract: 204

Total number of figures and tables: 6

Corresponding authors at:

Laboratoire HP2, Institut Jean Roget,
Faculté de Médecine de Grenoble,
BP 170, 38042 Grenoble Cedex 9, France.

Tel: +33 476 63 75 56 (CA)

+33 476 63 71 71 (MD)

Fax: +33 476 63 71 78

E-mail addresses: claire.arnaud@ujf-grenoble.fr (C. Arnaud),
maurice.dematteis@ujf-grenoble.fr (M. Dematteis).

ABSTRACT

Objective: Obstructive sleep apnea is a highly prevalent disease characterized by repetitive upper airway collapse during sleep leading to intermittent hypoxia. Cardio-metabolic complications of sleep apnea have been mostly attributed to intermittent hypoxia. These consequences could be mediated through intermittent hypoxia-related alterations of the visceral white fat, as it is recognized for playing an important role in inflammation, atherogenesis and insulin resistance.

Methods: Epididymal adipose tissue alterations were investigated in twenty-week-old non obese male apolipoprotein E-deficient mice exposed to intermittent hypoxia (21-5% FiO₂, 60s cycle, 8h/day) or air for 6 weeks. These adipose tissue alterations, as well as metabolic alterations and aortic atherosclerosis, were then assessed in lipectomized or sham-operated mice exposed to IH or air for 6 weeks.

Results: Intermittent hypoxia induced morphological (shrunken adipocytes), functional (increased UCP-1 expression) and inflammatory (increased macrophage recruitment and secretion of IL-6 and TNF- α) remodeling of epididymal adipose tissue. Hypoxic mice presented more severe dyslipidemia and atherosclerosis lesions, and developed insulin resistance. Epididymal lipectomy attenuated both intermittent hypoxia-induced dyslipidemia and atherogenesis, but did not improve insulin sensitivity.

Conclusion: Our results confirmed that the dyslipidemic and proatherogenic effects of intermittent hypoxia are partly mediated through morphological, functional and inflammatory remodeling of visceral white fat, regardless of any obesity.

Keywords: Atherosclerosis, Inflammation, Intermittent hypoxia, Sleep apnea,
Visceral white adipose tissue

INTRODUCTION

Obstructive sleep apnea (OSA) is a public-health problem as it affects at least 10% of the middle aged men, and represents a main cause of cardiovascular morbidity and mortality [1]. Repetitive upper airway collapses during sleep result in intermittent hypoxia (IH), thought to be responsible for cardiovascular complications such as atherosclerosis [2]. In OSA patients, increased carotid intima-media thickness (IMT), an early sign of atherosclerosis, correlates with nocturnal oxygen desaturation, independently of other cardiovascular risk factors [3] [4]. The rodent sleep apnea model (i.e. rodents exposed to IH) confirmed the detrimental role of hypoxia in OSA-associated vascular alterations; IH increases aortic IMT in C57BL6 mice [5] [6] and accelerates the development of atherosclerotic lesions in C57BL6 mice on a high cholesterol diet [7] and in atherosclerosis-prone apolipoprotein E-deficient mice (ApoE^{-/-}) [8] [9]. However the direct relationship between sleep apnea or IH and its cardiovascular consequences is not fully elucidated. We and others have evidenced a role for hemodynamic alterations [5], inflammation [6] and metabolic dysregulations [10] [11]. OSA is also frequently associated with obesity which is the main confounder for detrimental consequences of OSA [12]. Indeed, obesity is an independent risk factor for diabetes and cardiovascular events, and is directly associated with increased mortality [13]. In addition to its function as the largest energy storage compartment of the body, the adipose tissue has emerged as a hormonal organ actively modulating metabolism and inflammation through the release of numerous cytokines and adipokines [14]. In obesity, excessive visceral white adipose tissue (WAT) contributes to metabolic dysregulation, vascular lesions and chronic inflammation through autocrine and paracrine regulations [15]. For example, WAT of obese mice exhibits increased TNF- α expression and secretion which is known to mediate insulin resistance [15]. Additionally, a recent study showed that atherosclerosis-prone mice transplanted with inflamed epididymal WAT (EWAT, i.e. the largest and easily harvested visceral WAT depot in mice) developed significantly more atherosclerosis, and that reduction in EWAT inflammation reduced atherosclerosis [16]. Therefore, inflammation of visceral WAT seems to be an important factor for vascular complications and may represent a link between obesity and vascular disease [15].

We have shown that IH induced vascular and systemic inflammation in non-obese C57BL6 [6] and ApoE^{-/-} [9] mice, and noted that IH also induced inflammatory alterations of EWAT and morphological changes with histological features of brown adipose tissue [17]. Therefore, we hypothesized that IH itself could induce EWAT remodeling that could contribute to

metabolic and vascular disorders, independently of any obesity. The aims of the present study were to first characterize IH-induced functional and structural alterations of EWAT using a non-obese mouse model of IH, then to determine the contribution of this fat remodeling to IH-induced metabolic and vascular alterations using EWAT lipectomized animals.

METHODS

Animals

Thirty five 20-week-old male ApoE^{-/-} mice (C57BL6 background) fed on a standard-chow diet were used. They were weighed throughout the experiments, and food intake was measured daily. The study was 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 Care and Use of Laboratory Animals* (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

Intermittent hypoxia

IH was performed as previously described [6]. The animals were exposed during daytime (n=10 per cage, 8h/day, cyclic 21-5% FiO₂, 60s cycle (60 events/h), lowest blood oxygen saturation up to 60%) for 6 weeks. FiO₂ was measured with a gas analyzer (ML206, ADInstruments) throughout the experiment. Control animals (normoxic mice, N) were exposed to air in similar cages to reproduce similar noise and turbulences to those of the IH stimulus. Ambient temperature was maintained at 20-22°C.

Adipose tissue alterations

The day following the last exposure period, animals were anesthetized by intraperitoneal ketamine-xylazine mixture (100 mg/kg-10 mg/kg) for bilateral EWAT collection. The tissue was either snap frozen in liquid nitrogen then stored at -80°C for mRNA study, or fixed in 90% ethanol for immuno-histochemistry, or incubated for cytokine determinations.

Immuno-histochemical study

Ethanol-fixed, paraffin-embedded EWAT were sectioned (3.5 μm), deparaffinized in toluene and rehydrated in descending ethanol series, then stained with hematoxylin-eosin to assess tissue morphology. Adipocyte size was measured from photographs (10x40 magnification) using the NIS-Elements microscope imaging software (Nikon).

For macrophage staining, sections were incubated overnight at 4°C with a rat anti-F4/80 (1:10, eBiosciences). Endogenous peroxidase activity was blocked with hydrogen peroxide. Non-specific binding was blocked with normal goat serum (Vector). Specific staining was detected using the N-Histofine Simple Stain Mouse Max-PO ® (Nichirei Biosciences Inc.)

followed by hematoxylin counterstaining. Macrophage infiltration was calculated as the ratio of nuclei of F4/80 positive cells to total nuclei counted in eight fields for each animal (n=5 mice per group).

UCP-1 and MCP-1 mRNA expression

Uncoupling protein (UCP)-1, the hallmark of brown adipocytes, and monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 mRNA levels were determined by reverse transcription followed by quantitative Real-Time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). Total mRNA was extracted from epididymal fat of IH and N mice (n=7-11 per group), isolated with Tri-reagent (Invitrogen) and analyzed by qRT-PCR (ABI-7500 Applied Biosystems, or LightCycler Roche Diagnostics). Each sample was analyzed in duplicate, and 36B4 or TATA-box Binding Protein (TBP) mRNA level was simultaneously analyzed as a housekeeping gene (Table 1).

Cytokine secretion

EWAT was isolated from mice and weighed. Each pad was divided into two equal pieces and incubated at 37°C with mild shaking in RPMI medium only (Invitrogen) or with the beta-adrenergic agonist isoprenaline ($4 \cdot 10^{-5}$ M, Hospira Enterprises BV). Basal condition was defined as the cytokine secretion in the absence of the lipolytic agent isoprenaline. After 120 minutes of incubation, interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α were measured in the supernatants using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to manufacturer's instructions (R&D System). Cytokine concentrations were expressed as ng/ml for 1g of adipose tissue. Plasmatic levels of IL-6, TNF- α and adiponectin were measured using an ELISA (R&D System). Circulating leptin level was evaluated using MILLIPLEX™ MAP Mouse Adipokine Panel based on multiplex technology (Millipore).

Role of the epididymal adipose tissue

Epididymal lipectomy

In another series of mice, the animals were either lipectomized or sham-operated under intraperitoneal ketamine-xylazine anesthesia (100 mg/kg/10 mg/kg). Bilateral EWAT was carefully removed to keep the gonads intact. Sham animals underwent the same surgical protocol without removing the fat. Surgery sites were closed with 4-0 nylon absorbable monofilament (Ethicon, Inc.) and mice received buprenorphine (0.1 mg/kg, intraperitoneal).

After three days during which body weight was daily measured, the animals were exposed to IH or N for 6 weeks, therefore constituting four experimental groups (lipectomized IH and N mice, sham IH and N mice, n = 7-10 per group). On the day following the last exposure period, the animals were anesthetized as described above. Blood was collected by cardiac puncture. Thoraco-abdominal aorta including the aortic roots was removed and snaps frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

Metabolic alterations

Lipid measurements

Total- and HDL-cholesterol and triglycerides were measured in plasma by a colorimetric enzymatic reaction using the Modular P® analyzer (Roche Diagnostics). LDL-cholesterol was calculated using the Friedewald formula.

Plasma levels of glycerol and non-esterified fatty acids (NEFA) were measured by a colorimetric enzymatic reaction using the Free Glycerol Reagent (Sigma-Aldrich) and the NEFA-HR(2) assay (Wako Diagnostics), respectively.

Intraperitoneal insulin tolerance test (IpITT)

During IH exposure, we used IpITT to assess global insulin sensitivity. Mice were fasted for 10 hours then weighted before blood was collected from the tail tip for baseline glucose determination (t=0). Blood glucose was measured using the OneTouch® Ultra® glucometer. Insulin (0.75 IU/kg body weight, Novo Nordisk A/S) was injected intraperitoneally, followed by further blood glucose measurements at 15, 30, 60 and 90 minutes after the injection. The lowest blood glucose level (nadir) and its timing following insulin administration were calculated.

Assessment of aortic lesions

Atherosclerotic lesion size

Lesions of the thoraco-abdominal aorta and aortic roots were analyzed by Oil-red-O staining (n=7-10 per group). For each aortic root, we quantified lipid deposition from 5 sections (8 µm thickness), separated by 80 µm from each other. Quantitative analysis of lipid deposition was performed using computer image analysis (MetaMorph 7 software, Zeiss Microscope) after manual thresholding (thoraco-abdominal lesion) or contouring (aortic roots).

Atherosclerotic lesion inflammation

Macrophage and T-cell infiltration in the atherosclerotic lesions was assessed on immunostained aortic roots using anti-mouse macrophage (Mac-3, 1:100) and CD3 (1:1000, DakoCytomation) antibodies. Anti- α -smooth muscle actin antibody (1:50, Abcam) was used to stain smooth muscle cells. Non-specific binding was blocked with normal goat serum (Vector). Primary antibodies were detected using the N-Histofine Simple Stain Mouse Max-PO[®] (Nichirei Biosciences Inc.) followed by hematoxylin counterstaining. All stainings were assessed by computer-assisted image analysis (MetaMorph 7 software, Zeiss Microscope). Content of macrophages, smooth muscle cells and collagen were expressed as percentage of plaque size.

Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm standard errors of the means. Differences between two groups over time were determined by a two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures, with a subsequent Tukey's post hoc test. For comparison between independent groups, Student's t test or Mann-Whitney U-test were used according to normality and variance homogeneity. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

IH induces morphological and functional remodeling of epididymal fat

EWAT from IH mice exhibited shrunken adipocytes (Figure 1A) with thicker extracellular matrix (Figure 1B) and increased expression of UCP-1 (Figure 1C).

IH induces inflammatory remodeling of epididymal fat

The hypoxic WAT exhibited increased macrophage (F4/80 positive cells) infiltration (Figure 2A), organized in crown-like structures around individual adipocytes (Figure 2B), and increased expression of MCP-1 mRNA (Figure 2C). This inflammatory phenotype was confirmed by TNF- α and IL-6 secretion from EWAT. At baseline, IL-6 and TNF- α were not modified by IH (Figures 2D,E). After isoprenaline stimulation, both cytokine increased in IH animals, significantly for IL-6 but without reaching significance for TNF- α ($p=0.08$). Whereas we observed localized inflammation in adipose tissue, we did not evidence systemic inflammation, as plasmatic cytokines (IL-6 and TNF- α) were undetectable, and adipokines (adiponectin and leptin) were not different between the four groups.

IH induces insulin resistance and aggravates both dyslipidemia and atherosclerosis

The pre-existing dyslipidemic pattern of the ApoE^{-/-} mouse strain was aggravated by IH, including higher plasma levels of total and LDL-cholesterol, triglycerides, glycerol and NEFA in sham hypoxic compared to normoxic animals (Table 2). Sham-operated hypoxic mice developed insulin resistance as shown by the lower glycemia decline following insulin administration (Figures 3A,B). IH also accelerated the development of atherosclerosis, as shown by the larger lesions in thoraco-abdominal aorta and aortic roots (Figures 4A-D). The atherosclerotic plaque composition was not affected by IH, as shown by the similar plaque content of macrophages (N, 5.40 ± 1.40 vs IH, 3.81 ± 0.56 % of plaque size), T cells (N, 0.25 ± 0.05 vs IH, 0.29 ± 0.04 % of plaque size) and smooth muscle cells (N, 4.5 ± 1.53 vs IH, 4.16 ± 1.20 % of plaque size).

Epididymal lipectomy prevents IH-induced dyslipidemia and atherosclerosis

Lipectomy prevented the IH-related disturbances in plasma cholesterol, whereas glycerol and NEFA levels remained similar to those of sham hypoxic animals (Table 2). The proatherogenic effect of IH was also prevented by lipectomy, as atherosclerotic plaque size in

the thoracoabdominal aorta was very similar to those of normoxic animals (Figures 4A,B). This effect was more modest in the aortic roots (Figures 4C,D). In contrast, plaque quality was not modified by lipectomy, as shown by the plaque contents of macrophages (N, 3.02 ± 0.62 vs IH, 3.99 ± 0.66 % of plaque size), T cells (N, 0.29 ± 0.07 vs IH, 0.26 ± 0.05 % of plaque size) and smooth muscle cells (N, 2.83 ± 1.10 vs IH, 5.0 ± 1.96 % of plaque size). Regarding glucidic metabolism, lipectomy did not prevent the IH-induced insulin resistance. In the other hand and in agreement with the buffering role of WAT to maintain glucose homeostasis, lipectomy induced insulin resistance in normoxic animals (Figures 3A,B).

DISCUSSION

The pathophysiology of OSA-induced atherogenesis and metabolic alterations remains poorly understood. Here, we showed in non-obese ApoE-deficient mice that 6 weeks of IH led to morphologic, functional and inflammatory remodeling of the visceral WAT, and this remodeling contributed to IH-induced dyslipidemia and atherosclerosis. This study is the first to provide evidence that a physiological amount of visceral WAT exposed to IH becomes pathological, behaving like excess fat in obesity.

Methodological considerations

The IH experimental model has been developed more than 2 decades ago and reproduces one of the major components of OSA which is considered as the most detrimental factor contributing to sleep apnea complications [2]. However, in the absence of additional factors (obesity, high fat diet, etc), IH needs to be severe enough to induce measurable and reproducible detrimental effects [2]. Therefore, and as previously published by our group and others, the hypoxic stimulus used in this study mimics severe sleep apnea [2] [5] [6].

IH induces EWAT remodeling

In lean mice, IH induced moderate EWAT inflammation, including macrophage infiltration, increased MCP-1 expression and proinflammatory cytokine release (IL-6 and TNF- α). Fat inflammation is well known in obesity and results at least in part from hypoxia, as adipocytes become too distant from blood vessels with fat expansion [18]. Through the repetitive hypoxia-reoxygenation sequence, IH generates free radical stress and inflammation. IH also increases the sympathoadrenergic activity which in turn exacerbates the oxidative stress [19], and the adipose expression of MCP-1 [20] which is a key chemokine regulating macrophage tissue infiltration [21]. We used isoprenaline to mimic the sympathetic overactivity occurring in OSA patients during sleep, which resulted in enhanced proinflammatory cytokine release. Collectively, our data suggest chronic low-grade EWAT inflammation with intermittent exacerbation during sympathetic activation.

EWAT from IH mice had shrunken adipocytes and UCP-1 overexpression. UCP-1 is a hallmark of brown adipocytes (thermogenic fat) and is also expressed in adipogenic cells gaining characteristics of brown adipocytes (phenotyping switch into "brite" adipocytes, i.e. brown-like adipocytes). Again, beta-adrenergic stimulation may account for both alterations as it leads to lipolysis (NEFA release from adipocytes) and induces the appearance of brite

adipocytes in WAT [22]. However a full characterization is required to confirm the browning of the white fat, as well as the involvement of the sympathoadrenergic system which could be a common denominator of the various WAT remodeling due to IH. Moreover, the meaning of this adipose plasticity, in particular regarding the energy imbalance under IH, remains to be elucidated.

IH induces insulin resistance, dyslipidemia and atherosclerosis

As previously, we used ApoE-deficient mice to assess the atherogenic and metabolic effects of IH, as they are atherosclerotic-prone animals and develop dyslipidemia and insulin resistance. We confirmed the atherogenic and dyslipidemic effects of IH, hypoxic mice exhibited larger aortic atherosclerotic lesions and higher plasmatic levels of cholesterol (total and LDL) and triglycerides. Lipid alterations, constituting an early step of atherogenesis [23], have been previously described both in OSA-patients and in mice exposed to IH [24]. IH also increased plasmatic glycerol and NEFA, and aggravated the insulin resistance. WAT constitutes the main source of NEFA, also called free fatty acids (FFA), and excessive circulating FFA contributes to insulin resistance [25] [26]. The relationship between fat inflammation, in particular macrophage-related inflammation in WAT, and insulin resistance is now largely described in the literature [14]. Our results are in agreement with clinical studies showing a progressive worsening of insulin resistance and metabolic syndrome with OSA severity [24]. Exposure to IH also leads to decreased insulin sensitivity in healthy volunteers [27] and in lean mice [28]. Collectively, our data and those from the literature demonstrate that IH induces metabolic disorders independently of any obesity, and suggest that IH-induced adipose tissue alterations could represent one of the links between inflammation, insulin resistance and vascular consequences.

EWAT lipectomy attenuates the dyslipidemic and atherogenic effects of IH

We performed bilateral EWAT lipectomy before exposure to assess the specific role of EWAT in IH-induced cardiovascular and metabolic alterations. Lipectomized animals had smaller atherosclerotic lesions in thoraco-abdominal aorta whereas the preventive effect was lower in the aortic root. This suggests that, beyond WAT alterations, the atherogenic effect of IH involves additional mechanisms such as regional aortic susceptibility to develop atherosclerosis, e.g. aortic roots are prone to develop the largest lesions in particular due to hemodynamic factors.

From our results, the lower atherosclerosis progression after lipectomy appears to be related to the prevention of IH-induced dyslipidemia, as lipectomized hypoxic mice had similar levels of total and LDL cholesterol to normoxic animals. However the beneficial effect of lipectomy may also be related to the prevention of EWAT inflammation. We did not investigate the mechanisms underlying the beneficial effect on lipid levels as it was beyond the scope of this study. Because we found inflammatory alterations in EWAT, we chose to focus on proinflammatory cytokines but other signaling proteins such as the adipose angiopoietin-like 4, a potent lipoprotein lipase inhibitor, are likely involved in IH-associated atherosclerosis and may have contributed to the preventive effect of lipectomy [29]. In contrast, the IH-induced elevation in plasma glycerol and FFA remained unchanged. Lipectomy in this study was limited to the epididymal compartment which is the largest and most easily harvested visceral WAT depot in mice. However there are other WAT territories such as mesenteric, perirenal, subcutaneous WAT. Glycerol and FFA are two products of lipolysis occurring in the various adipose tissues, including epididymal and subcutaneous tissues. Although visceral WAT is predominantly associated with metabolic disease, the majority of circulating FFA originates from subcutaneous WAT [30].

Regarding insulin sensitivity, whereas it has been shown that removing visceral fat could prevent insulin resistance in obese or aging rats [31], we found that EWAT lipectomy induced insulin resistance in lean normoxic animals. These data confirm the major role of WAT in the homeostatic regulation of glucose; it is indeed one of the primary targets of insulin-stimulated glucose uptake, and it regulates insulin sensitivity through the release of numerous cytokines and adipokines. Therefore clinical situations with quantitative (excessive or overly reduced adipose mass) and/or qualitative alterations of the WAT may lead to insulin resistance [32]. We found that sham-operated hypoxic mice and lipectomized normoxic mice exhibited similar insulin resistance suggesting that EWAT in IH animals was functionally impaired for glucose buffering. As a consequence, lipectomy in hypoxic animals did not further aggravate the insulin resistance."

Conclusion

Although the causative mechanisms remain to be elucidated, we showed that IH had detrimental effects on EWAT of non-obese mice, and these contributed to the cardiovascular and metabolic complications induced by IH. EWAT exhibited inflammatory alterations that were exacerbated under beta-adrenergic activation, the latter mimicking the sympathetic

activation induced by sleep apnea events. Therefore, our original findings suggest novel therapeutic options for OSA patients as the compliance with the gold standard continuous positive airway pressure therapy is limited, and losing fat through weight reduction is applicable only in obese OSA patients. Targeting inflammation either using drugs or improving lifestyle (diet, exercise...), and buffering the nocturnal sympathetic activation could provide further therapeutic options for OSA patients.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by a grant from Agir@dom to MD and a grant from Heart and Artery Foundation to CA and MD.

REFERENCES

1. 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, 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. In collaboration with the National Heart, Lung, and Blood Institute National Center on Sleep Disorders Research (National Institutes of Health). *Circulation* 2008; 118: 1080-1111.
2. Dematteis M, Godin-Ribuot D, Arnaud C, Ribuot C, Stanke-Labesque F, Pepin JL, Levy P. Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding the human disease. *ILAR J* 2009; 50: 262-281.
3. Baguet JP, Hammer L, Levy P, Pierre H, Launois S, Mallion JM, Pepin JL. The severity of oxygen desaturation is predictive of carotid wall thickening and plaque occurrence. *Chest* 2005; 128: 3407-3412.
4. Drager LF, Bortolotto LA, Lorenzi MC, Figueiredo AC, Krieger EM, Lorenzi-Filho G. Early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 613-618.
5. Dematteis M, Julien C, Guillermet C, Sturm N, Lantuejoul S, Mallaret M, Levy P, Gozal E. Intermittent hypoxia induces early functional cardiovascular remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 227-235.
6. Arnaud C, Beguin PC, Lantuejoul S, Pepin JL, Guillermet C, Pelli G, Burger F, Buatois V, Ribuot C, Baguet JP, Mach F, Levy P, Dematteis M. The inflammatory pre-atherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184: 724-31.
7. Savransky V, Nanayakkara A, Li J, Bevans S, Smith PL, Rodriguez A, Polotsky VY. Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 1290-1297.
8. Jun J, Reinke C, Bedja D, Berkowitz D, Bevans-Fonti S, Li J, Barouch LA, Gabrielson K, Polotsky VY. Effect of intermittent hypoxia on atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 2010; 209: 381-386.

9. 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: 425-431.
10. Li J, Thorne LN, Punjabi NM, Sun CK, Schwartz AR, Smith PL, Marino RL, Rodriguez A, Hubbard WC, O'Donnell CP, Polotsky VY. Intermittent hypoxia induces hyperlipidemia in lean mice. *Circ Res* 2005; 97: 698-706.
11. Li J, Nanayakkara A, Jun J, Savransky V, Polotsky VY. Effect of deficiency in SREBP cleavage-activating protein on lipid metabolism during intermittent hypoxia. *Physiol Genomics* 2007; 31: 273-280.
12. Bonsignore MR, McNicholas WT, Montserrat JM, Eckel J. The adipose tissue in obesity and obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 2012; 39: 746-767.
13. Bigaard J, Frederiksen K, Tjonneland A, Thomsen BL, Overvad K, Heitmann BL, Sorensen TI. Waist circumference and body composition in relation to all-cause mortality in middle-aged men and women. *Int J Obes (Lond)* 2005; 29: 778-784.
14. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol* 2010; 72: 219-246.
15. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006; 116: 1793-1801.
16. Ohman MK, Shen Y, Obimba CI, Wright AP, Warnock M, Lawrence DA, Eitzman DT. Visceral adipose tissue inflammation accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2008; 117: 798-805.
17. Poulain L, Rieusset J, Levy PA, Dematteis M, Arnaud C. Intermittent hypoxia induces dyslipidemia and atherogenesis through visceral white adipose tissue inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185(1 MeetingAbstracts): A3867.
18. Trayhurn P, Wang B, Wood IS. Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *Br J Nutr* 2008; 100: 227-235.
19. Prabhakar NR, Kumar GK, Peng YJ. Sympatho-adrenal activation by chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* 2012; 113: 1304-1310.
20. Wang YY, Lin SY, Chuang YH, Chen CJ, Tung KC, Sheu WH. Adipose proinflammatory cytokine expression through sympathetic system is associated with hyperglycemia and insulin resistance in a rat ischemic stroke model. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 300: E155-163.

21. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 2006; 116: 1494-1505.
22. Smorlesi A, Frontini A, Giordano A, Cinti S. The adipose organ: white-brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation. *Obes Rev* 2012; 13 Suppl 2: 83-96.
23. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1685-1695.
24. Jun J, Polotsky VY. Metabolic consequences of sleep-disordered breathing. *ILAR J* 2009; 50: 289-306.
25. Bays H, Mandarino L, DeFronzo RA. Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 463-478.
26. Jensen MD. Is visceral fat involved in the pathogenesis of the metabolic syndrome? Human model. *Obesity (Silver Spring)* 2006; 14: 20S-24S.
27. Louis M, Punjabi NM. Effects of acute intermittent hypoxia on glucose metabolism in awake healthy volunteers. *J Appl Physiol* 2009; 106: 1538-1544.
28. Iiyori N, Alonso LC, Li J, Sanders MH, Garcia-Ocana A, O'Doherty RM, Polotsky VY, O'Donnell CP. Intermittent hypoxia causes insulin resistance in lean mice independent of autonomic activity. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 851-857.
29. Drager LF, Yao Q, Hernandez KL, Shin MK, Bevans-Fonti S, Gay J, Sussan TE, Jun JC, Myers AC, Olivecrona G, Schwartz AR, Halberg N, Scherer PE, Semenza GL, Powell DR, Polotsky VY. Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis via activation of adipose angiopoietin-like 4. *Am J Respir Crit Care Med* 2013.
30. Klein S. The case of visceral fat: argument for the defense. *J Clin Invest* 2004; 113: 1530-1532.
31. Gabriely I, Ma XH, Yang XM, Atzmon G, Rajala MW, Berg AH, Scherer P, Rossetti L, Barzilai N. Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging: an adipokine-mediated process? *Diabetes* 2002; 51: 2951-2958.
32. McKnight SL. WAT-free mice: diabetes without obesity. *Genes Dev* 1998; 12: 3145-3148.

Table 1. Primers used for qRT-PCR analysis.

UCP-1: uncoupling protein-1; MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1; 36B4: acidic ribosomal phosphoprotein (ribosomal protein, large, P0: RPLP0); TBP: TATA box binding protein.

Table 1 Primers used for qRT-PCR analysis.

Gene	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
UCP-1	GAC-CGA-CGG-CCT-TTT-TCA-A	AAA-GCA-CAC-AAA-CAT-GAT-GAC-GTT
MCP-1	TGG-AGC-ATC-CAC-GTG-TTG-GC	ACT-ACA-GCT-TCT-TTG-GGA-CA
TBP	AGT-CGG-AGG-AAT-CAG-ATG-AGG-AT	GGC-TGA-CTT-GGT-TGC-TTT-GG
36B4	TGG-TGT-GCA-CAG-GAG-CCA-AG	TTC-ACA-TCA-CAG-CTC-CCC-AC

Table 2. Weight and biological characteristics in lipectomized and sham-operated apolipoprotein-E deficient mice exposed to intermittent hypoxia or normoxia.

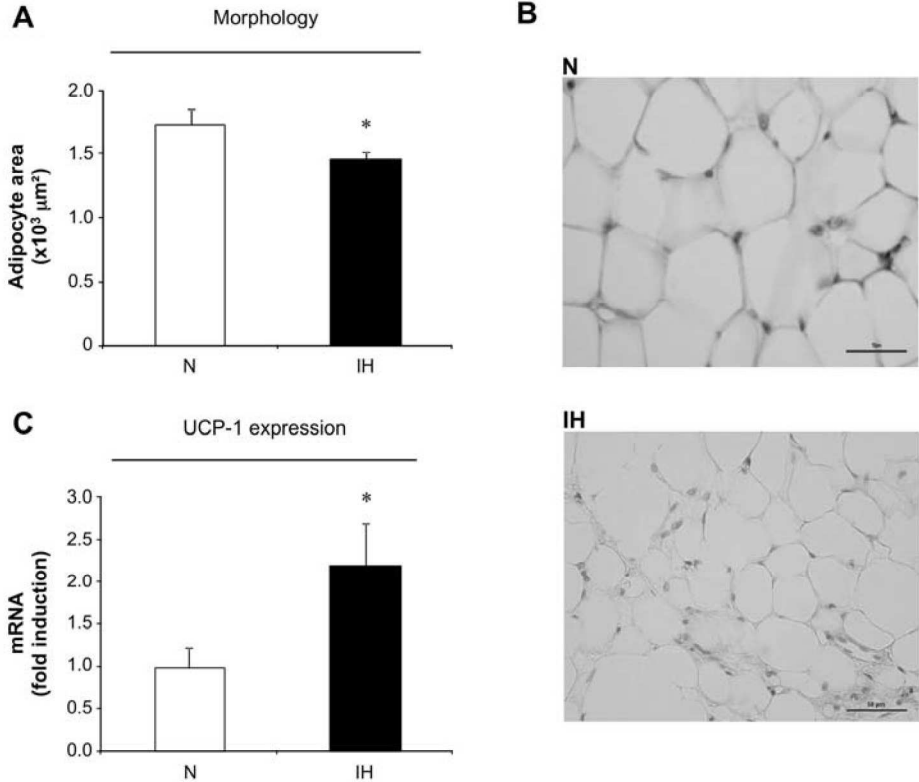
Effects of epididymal lipectomy on weight and biological alterations induced by intermittent hypoxia (IH) or air (N); *p<0.05 vs N, †p<0.05 vs day 0.

Table 2 Weight and biological characteristics in ApoE^{-/-} mice exposed to either IH or N, and lipectomized or sham operated.

	SHAM		LIPECTOMY	
	N	IH	N	IH
Age mice (weeks)	20	20	20	20
n	7	10	9	9
Mice weight (g)				
<i>Day 0</i>	29.4 ± 1.0	28.7 ± 0.7	28.7 ± 0.6	28.8 ± 0.9
<i>Day 7</i>	29.1 ± 1.1	26.6 ± 0.7*†	29.8 ± 0.9	28.2 ± 0.8
<i>Day 42</i>	28.5 ± 1.3	28.5 ± 0.6	30.7 ± 0.5†	28.3 ± 0.7*
Epididymal AT weight (mg)				
<i>Day 42</i>	346.1 ± 37.3	273.1 ± 41.0	absent	absent
Parameters at 42 days				
Hematocrit (%)	41.1 ± 1.7	48.4 ± 0.9*	41.4 ± 0.8	45.3 ± 1.1*
Total cholesterol (g/l)	4.7 ± 0.5	6.3 ± 0.5*	4.7 ± 0.9	4.8 ± 0.3
LDL-cholesterol (g/l)	3.7 ± 0.4	5.1 ± 0.5*	3.7 ± 0.8	3.9 ± 0.3
HDL-cholesterol (g/l)	0.9 ± 0.02	0.9 ± 0.03	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1
Triglycerides (g/l)	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.2*	0.9 ± 0.1	0.6 ± 0.1
Glycerol (g/l)	28.0 ± 2.1	51.1 ± 9.5*	34.4 ± 4.2	59.9 ± 7.1*
NEFA (g/l)	0.9 ± 0.09	1.6 ± 0.08*	1.1 ± 0.2	1.8 ± 0.2*

Figure 1. Intermittent hypoxia induces epididymal white adipose tissue morphological and functional remodeling.

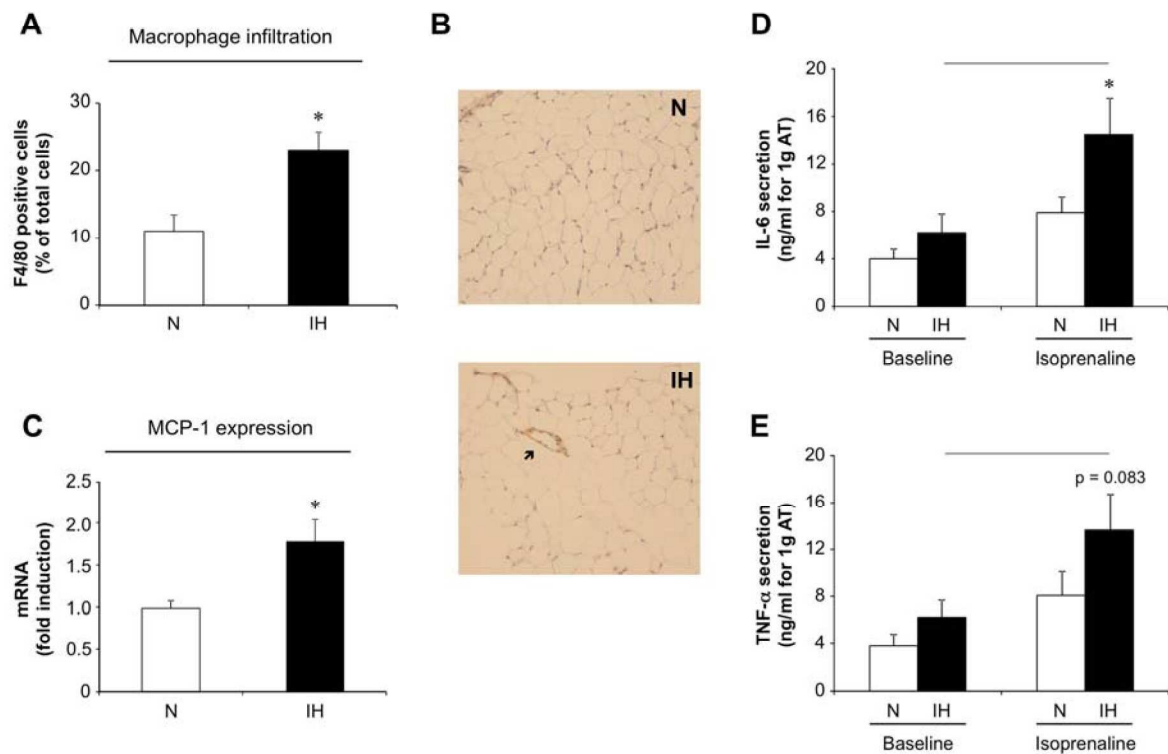
Figure 1



(A) Quantification of adipocyte size after 6 weeks of intermittent hypoxia (IH) or air (N); * $p < 0.05$ vs N; (7-8 per group). **(B)** H&E staining of adipose tissue (10x40 magnification) from IH or N mice; the scale bar represents 50μm. **(C)** Adipose tissue mRNA expression of UCP-1. Measurement is normalized to 36B4 mRNA; * $p < 0.05$ vs N; (n=7-8 per group).

Figure 2. Intermittent hypoxia induces epididymal white adipose tissue inflammatory remodeling.

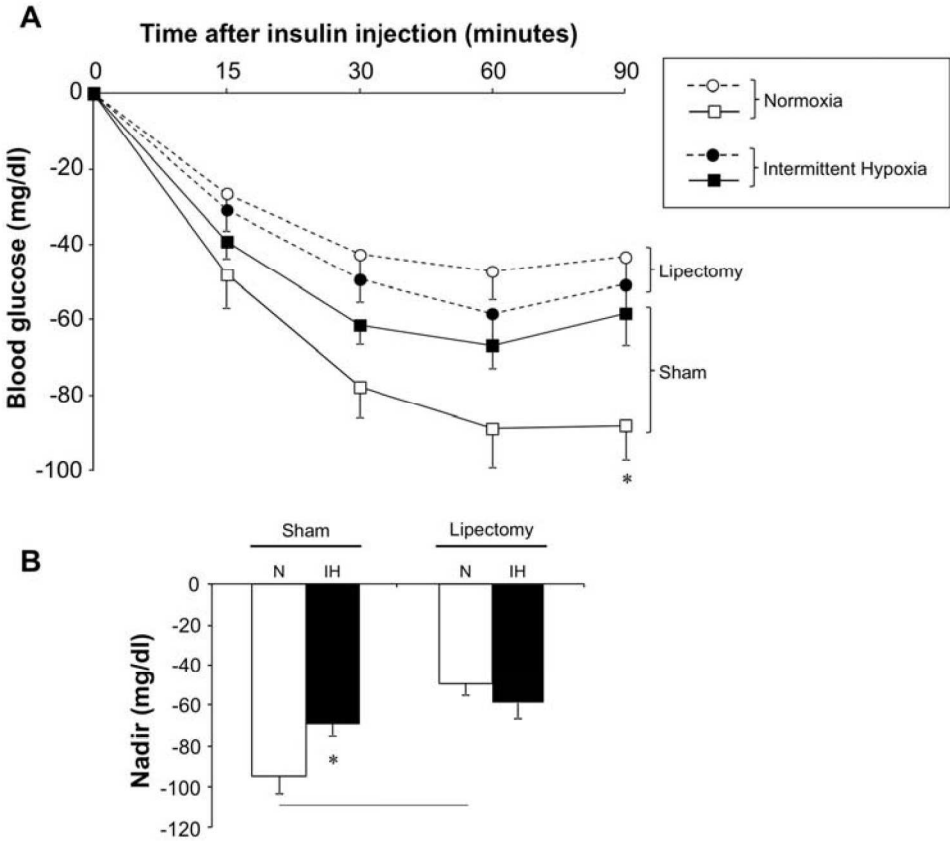
Figure 2



(A) Quantification of macrophage infiltration after 6 weeks of intermittent hypoxia (IH) or air (N); * $p < 0.05$ vs N; (n=5 per group). (B) Representative F4/80 immunostaining with arrow showing macrophages organized as crown-like structure around adipocytes (10x40 magnification). (C) Adipose tissue mRNA expression of MCP-1. Measurement is normalized to Tata box Binding Protein (TBP) mRNA; * $p < 0.05$ vs N; (n=8-11 per group). IL-6 (D) and TNF- α secretion (E) from epididymal adipose tissue at basal condition or after isoprenaline stimulation. * $p < 0.05$ vs N, ‡ $p < 0.05$ vs basal condition; (n=13 per group).

Figure 3. Intermittent hypoxia induces insulin resistance.

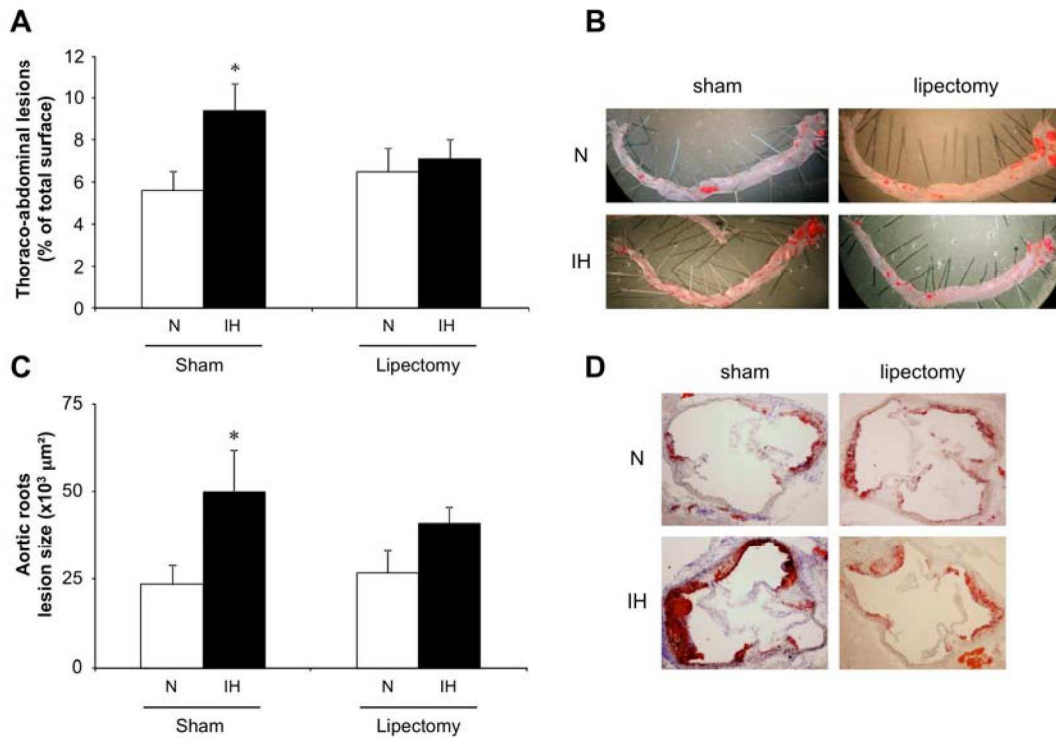
Figure 3



(A) Intraperitoneal insulin tolerance test in epididymal lipectomized or sham-operated mice exposed to intermittent hypoxia (IH) or normoxia (N) for 6 weeks; * $p < 0.05$ vs N, $\$p < 0.05$ vs N sham (n=6-15 per group). **(B)** Lowest blood glucose level during the first 90 minutes (nadir); * $p < 0.05$ vs N, $\$p < 0.05$ vs N sham (n=6-15 per group)

Figure 4. Epididymal lipectomy attenuates intermittent hypoxia-induced atherogenesis.

Figure 4



(A) Thoraco-abdominal aortic lesions expressed as percentage of total aorta surface in lipectomized or sham-operated mice exposed to intermittent hypoxia (IH) or normoxia (N) for 6 weeks; * $p < 0.05$ vs N; (n=10 per group). **(B)** Representative photographs of thoraco-abdominal lesions. **(C)** Atherosclerotic lesions in aortic roots expressed in μm^2 ; * $p < 0.05$ vs N; (n=10 per group). **(D)** Representative photographs of aortic root lesions.

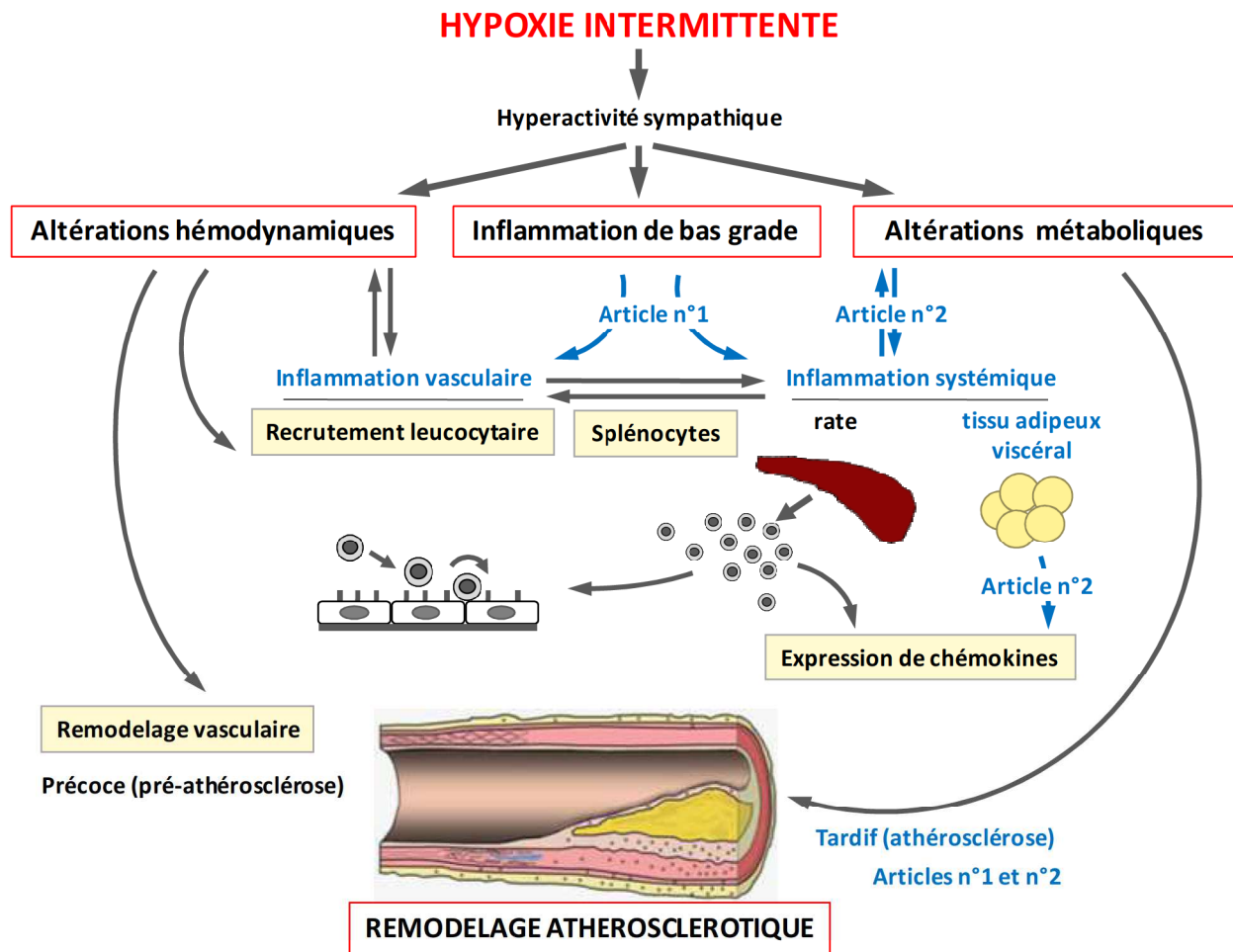


Figure 14. Résumé des résultats décrits dans l'article n°2. Ces données confirment le rôle athérogène et dyslipidémiant de l'hypoxie intermittente, et montrent que ses conséquences délétères peuvent être médiées, en partie, par des altérations au niveau du tissu adipeux épididymal.

▪ Effet de l'hypoxie intermittente sur le tissu adipeux sous-cutané

Les résultats de la publication n°2 montrent qu'une exposition à l'HI entraîne des modifications majeures au niveau du tissu adipeux épидидymal, à la fois morphologiques mais également inflammatoires (258). La lipectomie épидидymale a des effets bénéfiques sur les effets dyslipidémiques et athérogènes de l'HI (258). Cependant, ces effets restent partiels sur la taille des plaques, d'une part, et sur les niveaux d'acides gras libres et le glycérol, d'autre part. Les conséquences de l'HI au niveau des territoires adipeux persistants (sous-cutané en particulier) pourraient expliquer les effets limités d'une telle chirurgie. En parallèle de la caractérisation détaillée du tissu adipeux épидидymal, nous nous sommes donc également intéressés aux effets de l'HI sur le tissu adipeux sous-cutané.

Remodelage morphologique et inflammatoire induits par l'HI

Au niveau épидидymal, l'HI entraîne une hypotrophie marquée des adipocytes, associée à une surexpression d'UCP-1. Le tissu adipeux sous-cutané présente, quant à lui, une légère hypotrophie adipocytaire après 6 semaines d'exposition à l'HI (figure 15A), qui est moins marquée que celle observée au niveau épидидymal. Par ailleurs, chez ces souris, l'expression du gène codant pour la protéine découplante UCP-1 n'est pas modifiée suite à l'HI au niveau sous-cutané (figure 15B).

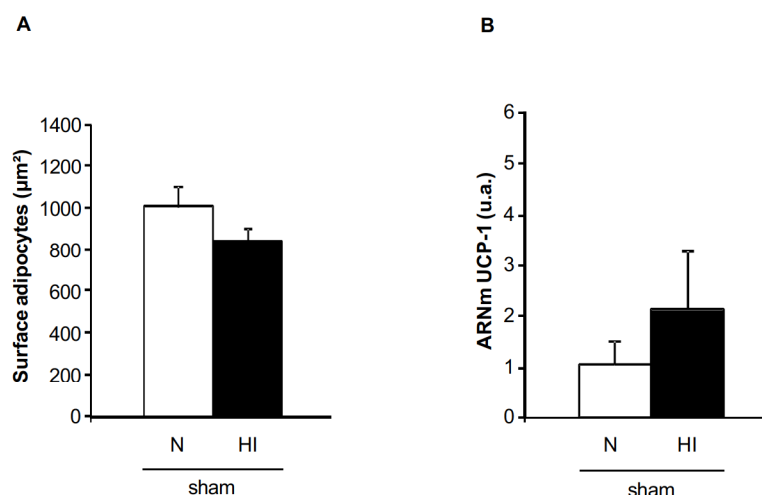


Figure 15. Surface adipocytaire (A) et expression adipeuse de UCP-1 (B) au niveau sous-cutané de souris ApoE^{-/-} sham exposées à l'hypoxie intermittente (HI) ou à la normoxie (N). La variation de l'expression de UCP-1 suite à l'hypoxie intermittente (HI) est exprimée en unité arbitraire (u.a.), et en fonction du groupe normoxique (N) sham.

De la même façon que pour le tissu adipeux épидидymal, nous nous sommes intéressés aux effets pro-inflammatoires de l'HI sur le compartiment sous-cutané. Afin de mettre en évidence un remodelage inflammatoire, nous avons choisi de comparer par RT-PCR en temps réel, l'expression de différentes adipokines dans les tissus adipeux épидидymal et sous-cutané. D'après les résultats du tableau 4, l'HI n'entraîne aucune modification significative de l'expression des adipokines, au niveau sous-cutané comme au niveau épидидymal.

	SHAM			
	Epididymal		Sous-cutané	
	N	HI	N	HI
ARNm (u.a.)				
IL-6	1,00 ± 0,39	0,85 ± 0,24	1,00 ± 0,43	0,55 ± 0,13
IL-1β	1,00 ± 0,23	1,07 ± 0,26	1,00 ± 0,18	0,45 ± 0,15
IL-10	1,00 ± 0,26	0,80 ± 0,24	1,00 ± 0,37	0,42 ± 0,15
RANTES	1,00 ± 0,28	0,76 ± 0,13	1,00 ± 0,33	0,90 ± 0,35
Leptine	1,00 ± 0,22	1,15 ± 0,18	1,00 ± 0,16	0,62 ± 0,21
Adiponectine	1,00 ± 0,17	0,86 ± 0,19	1,00 ± 0,19	0,95 ± 0,24

Tableau 4. Tableau récapitulatif des dosages par RT-PCR en temps réel d'adipokines pro- et anti-inflammatoires au niveau épидидymal et sous-cutané de souris ApoE^{-/-} sham exposées à l'hypoxie intermittente (HI) ou à la normoxie (N). La variation de l'expression de chaque adipokine suite à l'hypoxie intermittente (HI) est exprimée en unité arbitraire (u.a.), et en fonction du groupe normoxique (N) dans chaque compartiment adipeux (épидидymal et sous-cutané).

Nous avons alors évalué le potentiel sécrétoire du tissu adipeux sous-cutané, en condition basale et après une stimulation β-adrénergique (isoprénaline). Concernant la sécrétion de TNF-α par le tissu adipeux sous-cutané en condition basale, l'HI entraîne une légère augmentation de sa sécrétion (figure 16A). De la même façon qu'au niveau épидидymal, une stimulation à l'isoprénaline permet de majorer l'effet de l'HI, puisque le tissu adipeux de souris exposées à l'HI présente alors une augmentation significative de la sécrétion de TNF-α (figure 16A), par rapport aux souris normoxiques. L'HI ne modifie pas la sécrétion d'IL-6 par le tissu adipeux sous-cutané en condition basale (figure 16B), et la stimulation à l'isoprénaline n'entraîne pas d'augmentation significative de cette sécrétion chez les souris exposées à l'HI (figure 16B).

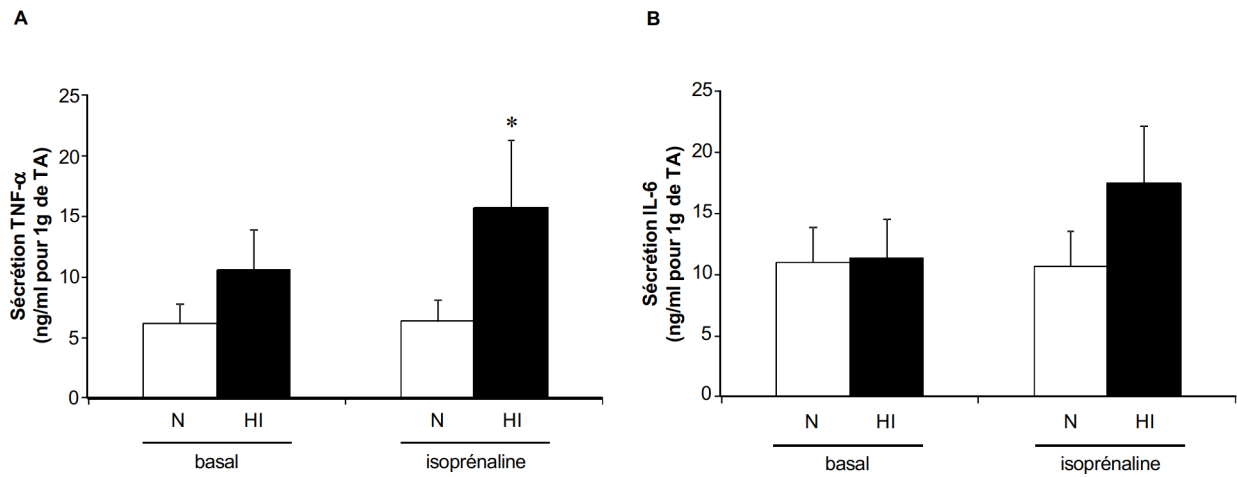


Figure 16. Sécrétion de TNF- α (A) et d'IL-6 (B) par le tissu adipeux sous-cutané de souris ApoE^{-/-} sham exposées à l'hypoxie intermittente (HI) ou à la normoxie (N) ; *p<0,05 N/isoprénaline vs HI/isoprénaline.

Enfin, contrairement au tissu adipeux épiddidymal, nous n'avons pas mis en évidence d'augmentation de l'infiltrat macrophagique (cellules F4/80 positives) au niveau sous-cutané suite à une exposition à l'HI (figure 17A). En accord avec cette observation, ni l'expression de PAI-1 (un facteur chémo-attractant) ni celle de MCP-1 (figures 17B et 17C, respectivement) ne sont modifiées par l'HI dans le tissu adipeux sous-cutané de ces souris.

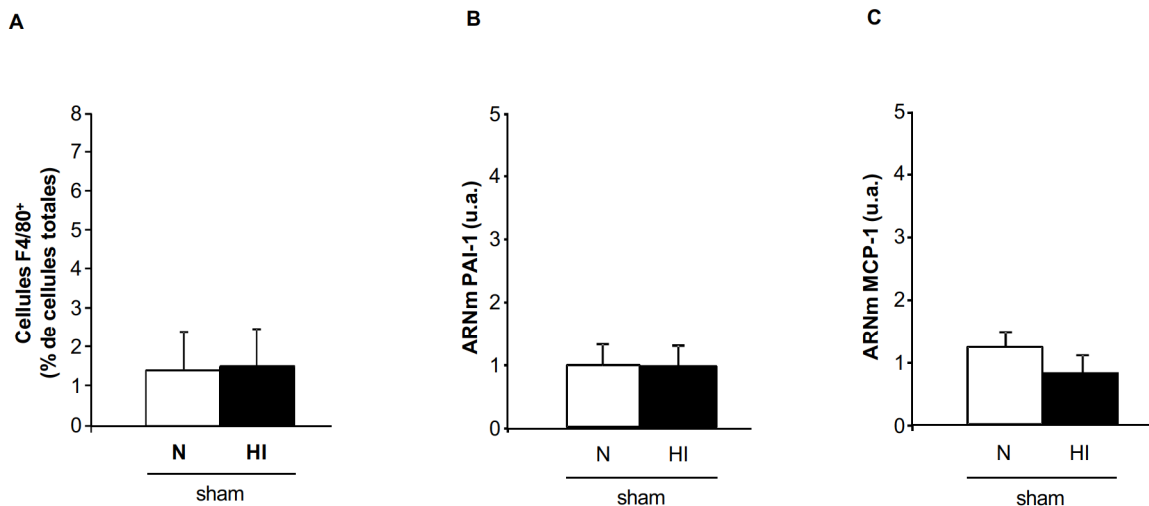


Figure 17. Infiltrat macrophagique (A), et expression adipeuse de PAI-1 (B) et de MCP-1 (C) au niveau sous-cutané de souris ApoE^{-/-} sham exposées à l'hypoxie intermittente (HI) ou à la normoxie (N). La variation de l'expression de PAI-1 et de MCP-1 suite à l'hypoxie intermittente (HI) est exprimée en unité arbitraire (u.a.), et en fonction du groupe normoxique (N) sham.

Du point de vue morphologique et inflammatoire, une exposition à l'HI a peu ou pas d'effet sur le phénotype du tissu adipeux sous-cutané, comparé au tissu adipeux épидидymal. Il semble donc que le tissu adipeux sous-cutané soit moins sensible à l'HI que le tissu adipeux épидидymal.

D'après les données précédentes obtenues chez les souris ApoE^{-/-}, les effets de l'ablation du tissu adipeux épидидymal sont partiels (258). De plus, après 6 semaines d'HI, le poids des animaux lipectomisés est comparable à celui des animaux sham et ce, en l'absence de tissu adipeux épидидymal (258). La lipectomie épидидymale pourrait donc entraîner des atteintes morphologiques et/ou inflammatoires au niveau des autres territoires adipeux blancs, et en particulier le territoire sous-cutané.

Effet d'une lipectomie épидидymale sur le tissu adipeux sous-cutané

D'après les résultats de la figure 18A, il apparaît que la lipectomie entraîne une hypertrophie adipocytaire et ce, seulement chez les souris exposées à l'HI. Cependant, l'expression de UCP-1 au niveau sous-cutané n'est modifiée ni par la lipectomie, ni par l'exposition à l'HI (figure 18B).

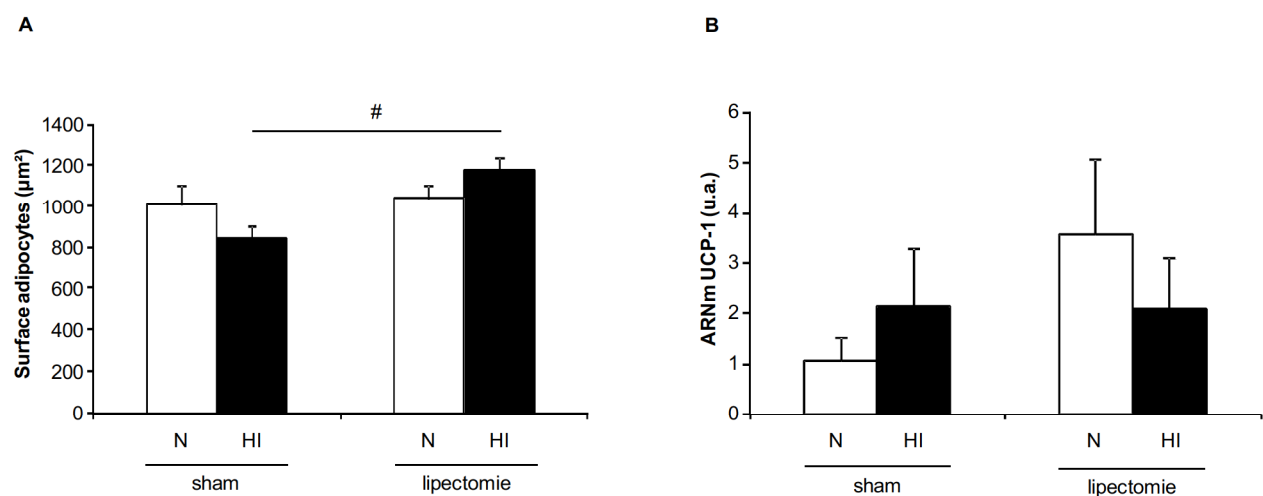


Figure 18. Surface adipocytaire (A) et expression adipeuse de UCP-1 (B) au niveau sous-cutané de souris ApoE^{-/-} sham ou lipectomisées, exposées à l'hypoxie intermittente (HI) ou à la normoxie (N). La variation de l'expression de UCP-1 suite à l'hypoxie intermittente (HI) est exprimée en unité arbitraire (u.a.), et en fonction du groupe normoxique (N) sham dans les 3 groupes de souris ; #p<0,05 HI/sham vs HI/lipectomie.

Suite à la lipectomie épидидymale, le tissu adipeux sous-cutané des souris exposées à l'HI présente une augmentation de l'infiltrat macrophagique, comparé aux souris normoxiques

(figures 19). Contrairement à l'expression de MCP-1 qui n'est modifiée ni par l'HI ni par la lipectomie (figure 20B), l'expression de PAI-1 est augmentée chez les souris lipectomisées, et de façon significative après une exposition à l'HI (figure 20A). Cette augmentation significative de l'expression de PAI-1 au niveau sous-cutané s'accorde avec l'augmentation du recrutement macrophagique dans ce tissu, chez les souris lipectomisées hypoxiques.

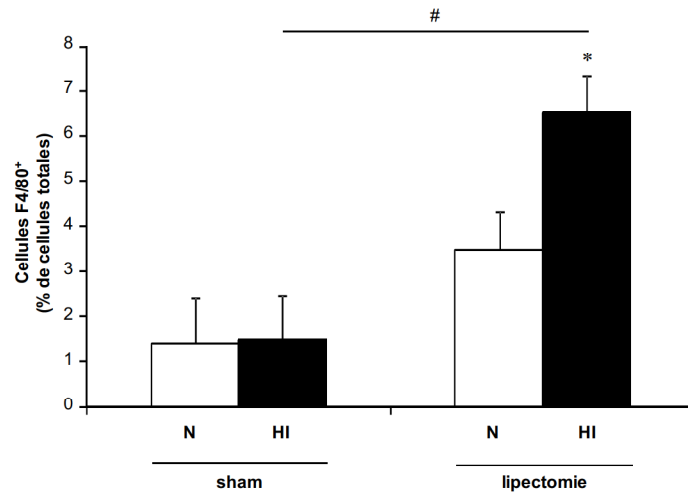


Figure 19. Infiltrat macrophagique au niveau sous-cutané de souris ApoE^{-/-} sham ou lipectomisées exposées à l'hypoxie intermittente (HI) ou à la normoxie (N) ; #p<0,05 HI/sham vs HI/lipectomie ; *p<0,05 N/lipectomie vs HI/lipectomie.

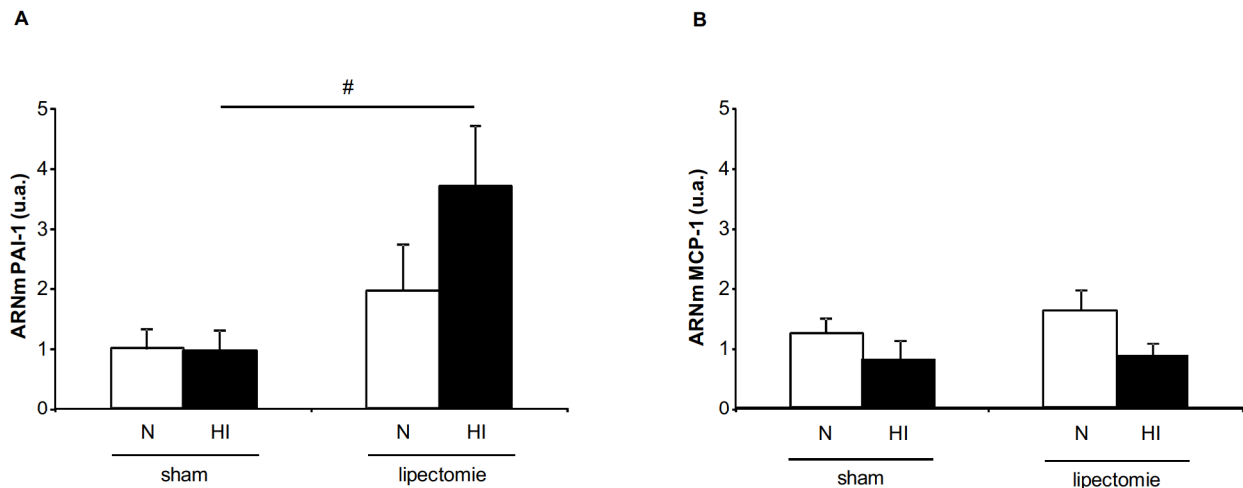


Figure 20. Expression adipeuse de PAI-1 (A) et de MCP-1 (B) au niveau sous-cutané de souris ApoE^{-/-} sham ou lipectomisées exposées à l'hypoxie intermittente (HI) ou à la normoxie (N). La variation de l'expression de PAI-1 et de MCP-1 suite à l'hypoxie intermittente (HI) est exprimée en unité arbitraire (u.a.), et en fonction du groupe normoxique (N) sham dans les 3 groupes de souris ; #p<0,05 HI/sham vs HI/lipectomie.

Les données obtenues chez les souris « *sham* » – souris pour lesquelles le tissu adipeux épидидymal est présent – montrent qu’une exposition à l’HI a peu ou pas d’effets sur la morphologie et le phénotype inflammatoire du territoire sous-cutané. Cependant, l’absence du territoire épидидymal (souris du groupe « lipectomie ») induit un remodelage morphologique et inflammatoire du tissu sous-cutané, qui est d’autant plus marqué chez les souris exposées à une HI. Suite à la lipectomie épидидymale, une compensation semble donc se mettre en place au niveau sous-cutané, principalement chez les souris exposées à l’HI.

Les différents territoires du tissu adipeux blanc fonctionnent comme un organe à part entière (54). Un déséquilibre entre ces territoires pourrait donc être compensé grâce à une redistribution topographique. Cette hypothèse a été vérifiée grâce à une approche IRM (publication n°3), qui nous a permis de quantifier exhaustivement les 4 principaux tissus adipeux blancs : épидидymal, sous-cutané, mésentérique et rétro-péritonéal. Pour cette étude, des souris sauvages C57Bl6 *sham* ou lipectomisées, ont été exposées à 6 semaines d’HI ou de normoxie.

3.3. Effet de l'hypoxie intermittente sur la distribution topographique du tissu adipeux blanc

- **Publication n°3 : Les modifications de l'homéostasie glucidique sont accompagnées de modifications de la répartition adipeuse après une exposition à l'hypoxie intermittente**

“Changes in glucose homeostasis is accompanied by modifications of fat repartition after IH exposure”

Poulain L, Matthieu H, Thomas A, Rémy C, Borel A-L, Lévy P, Arnaud C*, Dematteis M.*

*co-senior authors

En cours de rédaction

Objectif : Le SAOS est caractérisé par des cycles nocturnes d'HI, considérée comme une des composantes majeure impliquée dans la morbi-mortalité cardio-vasculaire associée au SAOS. Le SAOS est une pathologie multifactorielle souvent associée à l'obésité, qui est le principal facteur confondant de ce syndrome. De nombreuses études cliniques montrent que la distribution de l'excès adipeux observé lors de l'obésité peut influencer directement la sévérité des complications métaboliques. Par ailleurs, l'exposition de souris à l'HI a des effets majeurs sur le remodelage morphologique et inflammatoire du tissu adipeux viscéral, et ces altérations sont impliquées dans la dyslipidémie et l'athérosclérose induites par l'HI. Les effets partiels d'une telle chirurgie, ainsi que la reprise pondérale des souris hypoxiques au détriment de la graisse épидидymale, suggèrent que l'HI pourrait induire une redistribution des territoires adipeux.

L'HI pourrait donc avoir des effets sur la distribution des compartiments adipeux blancs, qui seraient impliqués dans les altérations métaboliques observées après une exposition à l'HI.

Matériel et méthodes : Des souris C57Bl6 âgées de 8 semaines ont été exposées à l'HI ou à la normoxie pendant 6 semaines, et les modifications topographiques du tissu adipeux ont été étudiées par IRM sur corps entier. L'implication de ces changements topographiques dans les conséquences métaboliques associées à l'HI, a été étudiée chez des souris ayant subi une lipectomie épидидymale et exposées à l'HI ou à la normoxie.

Résultats : L'HI entraîne des modifications topographiques spécifiques, caractérisées par une fonte épидидymale. Cette fonte épидидymale, initiée de façon physiologique (exposition à l'HI) ou chirurgicale (lipectomie), est compensée par une redistribution du tissu adipeux, en particulier vers le compartiment sous-cutané. Du point de vue métabolique, l'ablation du tissu adipeux épидидymal permet de corriger les effets délétères de l'HI, au vu de l'amélioration de la sensibilité à l'insuline des souris hypoxiques.

Conclusion : Grâce à ces travaux, nous avons pu confirmer la fonte épидидymale induite par l'HI. L'altération de la sensibilité à l'insuline observée chez les souris hypoxiques est améliorée après la lipectomie épидидymale (figure 21, page 152). Cet effet bénéfique pourrait s'expliquer par une redistribution préférentielle du tissu adipeux vers le territoire sous-cutané.

1 **Changes in glucose homeostasis is accompanied by modifications**
2 **of fat repartition after IH exposure**

3
4 Laureline POULAIN^{1,2}, Hervé MATHIEU^{2,6,7}, Amandine THOMAS^{1,2},
5 Anne-Laure BOREL^{1,8}, Chantal REMY^{2,3}, Patrick LEVY^{1,2,4}, Claire ARNAUD^{1,2*} and
6 Maurice DEMATTEIS^{1,2,5*}

7
8 *Co-senior authors
9

10
11 ¹Inserm U1042, Laboratoire HP2, Grenoble F-38042, France

12 ²Université Joseph Fourier, Grenoble 1, Faculté de Médecine, SFR1 F-38042, France

13 ³Inserm U836 – Grenoble Institut des Neurosciences, BP 170, Grenoble F-38042, France

14 ⁴CHU, Hôpital A. Michallon, Laboratoires du Sommeil et EFCR, Grenoble F-38043, France

15 ⁵CHU, Hôpital A. Michallon, Pôle Pluridisciplinaire de Médecine, Grenoble F-38043, France

16 ⁶Inserm, US017, Grenoble, F-38043, France

17 ⁷CNRS, UMS 3552, Grenoble, F-38043, France

18 ⁸CHU, Hôpital A. Michallon, Département d'endocrinologie, Grenoble F-38043, France
19
20

21 **Running title:**

22
23 Word count for the body (not including abstract, references, tables and legends): 2505

24 Word count for the abstract: 183

25 Total number of figures and tables: 5
26
27

28 Corresponding authors at:

29
30 Laboratoire HP2, Institut Jean Roget,
31 Faculté de Médecine de Grenoble,
32 BP 170, 38042 Grenoble Cedex 9, France.
33

34 Tel: +33 476 63 75 56 (CA)

35 +33 476 63 71 71 (MD)

36 Fax: +33 476 63 71 78
37

38 E-mail addresses: claire.arnaud@ujf-grenoble.fr (C. Arnaud),
39 mauricc.demattcis@ujf-grenoble.fr (M. Demattcis).
40
41

1 **ABSTRACT** 183

2

3 **Objective:** Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) is characterized by repetitive upper
4 airway collapse during night leading to intermittent hypoxia (IH). The latter is responsible for
5 vascular and metabolic complications such as atherosclerosis and insulin resistance. These
6 consequences could be mediated through IH-related alterations of the abdominal white
7 adipose tissue

8 **Methods:** Eight-week-old male C57BL6 mice exposed to IH (21-5% FiO₂, 60s cycle, 8h/day)
9 or air for six weeks were investigated for topographic fat alterations using whole-body MRI.
10 The specific role of epididymal fat in the IH-induced metabolic dysfunctions was assessed in
11 lipectomized or sham-operated mice exposed to IH or air using intraperitoneal insulin
12 tolerance test (IpITT).

13 **Results:** IH induced epididymal AT loss and insulin resistance. Epididymal lipectomy led to a
14 compensatory extent in subcutaneous fat. IH-induced deterioration of glucose/insulin
15 homeostasis was suppressed in epididymal –lipectomized mice.

16 **Conclusion:** IH induces a body weight loss in mice and a reduction in epididymal fat. Despite
17 this body weight loss, mice submitted to IH presented with insulin resistance. Such IH-
18 induced insulin resistance was not seen in epididymal lipectomized mice possibly through a
19 compensatory increase in subcutaneous fat.

20

21

22

23 **Keywords:** Adipose tissue, Glucose homeostasis, Intermittent hypoxia, Sleep apnea

24

25

1 INTRODUCTION 443

2 Obstructive sleep apnea (OSA) is a worldwide public-health problem affecting at least 10% of
3 the middle aged population and representing a main cause of cardiovascular morbidity and
4 mortality [1]. OSA is characterized by repetitive upper airway collapses resulting in
5 intermittent hypoxia (IH) and sleep fragmentation, but IH is considered as the main
6 component leading to OSA-associated cardiometabolic dysfunctions [2]. Obesity is a major
7 confounder as it is frequently associated with OSA and causes detrimental consequences
8 similar to those of OSA [3]. Indeed OSA and obesity share chronic low-grade inflammation
9 [4], oxidative stress [5] and increased sympathetic activity [5] that lead to metabolic
10 alterations such as insulin resistance [6]. Obesity is a well known independent risk factor for
11 diabetes and cardiovascular events, and is directly associated with increased mortality [7].
12 However, rather than obesity *per se*, there are growing evidence that the pattern of fat
13 distribution within the body is a major determinant of the metabolic profile and the severity of
14 complications [8]. The abdominal fat is indeed composed of two major fat compartments: the
15 subcutaneous and the intra-abdominal fat, the latter including the intraperitoneal (also called
16 visceral) omental and mesenteric fat, and the retroperitoneal perirenal fat. An individual with
17 normal body mass index (BMI) and excessive visceral fat has a greater risk of developing
18 metabolic syndrome compared to a more obese individual with a lesser amount of visceral fat
19 [9]. The excessive visceral white adipose tissue (WAT) releases numerous cytokines and
20 adipokines with autocrine, paracrine and endocrine signaling that cause metabolic
21 dysregulations, as well as vascular alterations and chronic inflammation [10]. We and others
22 have recently shown that IH had detrimental effects on the epididymal WAT of non-obese
23 mice. They consisted of structural and inflammatory remodeling [11] as well as alterations of
24 the lipoprotein clearance pathway [12] [13]. These WAT consequences contributed to
25 complications caused by IH as epididymal lipectomy before IH exposure attenuated IH-
26 induced dyslipidemia and atherogenesis [11]. This partial preventive effect suggests that other
27 alterations occurred. IH may lead to another pattern of fat distribution as we repetitively found
28 that mice exposed to IH had smaller epididymal fat pads (the largest visceral WAT depot in
29 mice) but similar or lower body weight to those of normoxic animals [11]. Therefore the aims
30 of the present study were:

- 31 1) to investigate the IH effects on regional distribution of body fat using magnetic resonance
32 imaging in a non-obese mouse model of IH;
- 33 2) to assess whether the IH-related pattern of fat distribution was associated with metabolic
34 alterations;

- 1 3) to evaluate whether epididymal lipectomy before IH exposure had a protective role on IH-
- 2 induced metabolic alterations and an influence on the IH-related pattern of fat distribution.
- 3

1 **METHODS** 692

2 **Animals**

3 Twenty six eight-week-old male C57BL6 mice fed on a standard-chow diet were used. The
4 study was conducted in accordance with the European Convention for the Protection of
5 Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Council of Europe,
6 European Treaties ETS 123, Strasbourg, 18 March 1986), and to the Guide for Care and Use
7 of Laboratory Animals (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). The protocol was
8 approved by our local ethic comity (Joseph Fourier University, 62-UHTA-HP2-MD-02,
9 January 06, 2011).

10

11 **Intermittent hypoxia**

12 IH was performed in experimental cages, as previously described [14]. The animals were
13 exposed during daytime (n=10 per cage, 8h/day, cyclic 21-5% FiO₂, 60s cycle (60 events/h),
14 lowest blood oxygen saturation up to 60%) for 6 weeks. FiO₂ was measured with a gas
15 analyzer (ML206, ADInstruments) throughout the experiment. Control animals (normoxic
16 mice, N) were exposed to air in similar cages to reproduce similar noise and turbulences to
17 those of the IH stimulus. Ambient temperature was maintained at 20-22°C.

18

19 **Epididymal lipectomy**

20 As previously published [11], animals were either lipectomized or sham-operated under
21 intraperitoneal ketamine-xylazine anesthesia (100 mg/kg-10 mg/kg). Bilateral epididymal
22 WAT was carefully removed to keep the gonads intact. Sham animals underwent the same
23 surgical protocol without removing the fat. Surgery sites were closed with 4-0 nylon
24 absorbable monofilament (Ethicon, Inc.) and mice received buprenorphine (0.1 mg/kg,
25 intraperitoneal). After 3 days of recovery, animals were exposed either to IH or N for 6
26 weeks, constituting four experimental groups (lipectomized IH and N mice, sham IH and N
27 mice, n = 6-7 per group)..

28

29 **Metabolic alterations**

30 Insulin sensitivity and secretion were successively assessed with a 5-day interval at the sixth
31 week of IH exposure using the insulin tolerance test and the insulin secretion index.

32

33

34

1 ***Intraperitoneal insulin tolerance test (IpITT)***

2 Mice were fasted for 5 hours then weighed before blood was collected from the tail tip for
3 baseline glucose determination (t=0) using the OneTouch® Ultra® glucometer. Insulin (0.5
4 IU/kg body weight, Novo Nordisk A/S) was injected intraperitoneally, followed by further
5 blood glucose measurements at 15, 30 and 60 minutes after the injection. Over the 60-minute
6 period, the glucose nadir (the lowest blood glucose level) was calculated, and the glucose area
7 under the curve (AUC) was measured using trapezoidal integration.

8

9 ***Insulin secretion index calculation***

10 Mice were fasted for 10 hours then weighed. Blood was collected as described above for
11 glucose and insulin measurements before (t0) and 15 minutes (t15) after an intraperitoneal
12 glucose administration (2 g/kg body weight). Insulin levels were measured from 10 µl plasma
13 samples using a Rat/Mouse ELISA kit (Millipore) according to the manufacturer's
14 instructions and expressed in ng/ml. The insulin secretion index was calculated ((insulin t15 –
15 insulin t0) / (glucose t15 – glucose t0)) and expressed in arbitrary units [15].

16

17 **Magnetic resonance imaging (MRI)**

18 The analysis was performed the day following the end of IH exposure. Animals (n=4 per
19 group) were euthanized (intraperitoneal sodium pentobarbital, 50 mg/kg) to avoid respiratory
20 motion artifacts, and imaged on a 7.0 T MRI system (Avance III console; Bruker, Germany;
21 Grenoble MRI facility IRMaGe). Spin-echo T1-weighted images (TR/TE 500/8 ms; field of
22 view 3.84 x 3.84 cm; slice thickness 1 mm; interslice gap 1 mm) were obtained through the
23 entire mouse, from frontal to dorsal side (15 coronal slices), and from tail to head (64
24 transverse slices) (Figure 1A).

25 The volumes of the four fat compartments (epididymal, subcutaneous, mesenteric and
26 retroperitoneal) were measured on the transverse slices by manual thresholding using the
27 ImageJ software (version 1.45s, NIH, USA). The volume of fat (mm³) was obtained by
28 multiplying the area of fat of each slice (mm²) times 2 (1-mm slice thickness + 1-mm
29 interslice gap) and adding the volumes of each slice, then adjusted for 1g of body weight. The
30 total fat volume was calculated by summing the four compartments. The volume and
31 topographic distribution of fat compartments was also assessed according to four body
32 regions (cervicothoracic, thoracoabdominal, abdominal and perineal regions) (Figures 1A,
33 2A, 3A, 4A).

34

1 **Statistical analysis**

2 Results were expressed as means \pm SEM and analyzed using parametric (ANOVA and t-tests)
3 or nonparametric tests (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, and Spearman rank correlation test)
4 according to normality and variance homogeneity. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

5

1 **RESULTS** 330

2 **IH induces glucose homeostasis alterations**

3 The basal glucose homeostasis was not altered by IH, as shown by the similar basal plasma
4 glucose and plasma insulin levels, in either lipectomized or sham operated mice submitted to
5 IH compared to either lipectomized or sham operated mice in normoxic conditions (Table 1).
6 However, the dynamic insulin tolerance test showed that sham-operated hypoxic mice
7 responded less to insulin administration, compared to sham-operated normoxic mice (Table
8 1). This was demonstrated by a lower area under the curve (AUC) and a lower nadir in
9 response to insulin administration. After glucose injection, glycaemia was similar in normoxic
10 and hypoxic groups, whereas insulin levels and insulin secretion index were increased in
11 sham operated mice exposed to IH (Table 1). Taken together, these results evidenced an
12 insulin resistance in our non-obese mice exposed to IH.

13

14 **Fat volumes distribution were modified after IH exposure and epididymal lipectomy**

15 ***IH***

16 Whereas IH did not affect total adipose tissue volume (Figure 1C), we observed a significant
17 epididymal AT loss in hypoxic mice (Figures 2B and 2C) that seemed to be associated with a
18 slight redistribution of adipose tissue toward subcutaneous and mesenteric adipose territories
19 (Figures 3B and 4B). Retroperitoneal AT is not affected by IH (data not shown).

20

21 ***Lipectomy***

22 Epididymal lipectomy did not alter total adipose tissue volume in both normoxic and hypoxic
23 groups (Figure 1C). As shown in figure 2, epididymal AT was still absent 6 weeks after the
24 surgery, whereas total adipose tissue volume was similar to sham animals (Figure 1C). This
25 was associated with a compensatory increased of subcutaneous AT volume at Pelvis-Tail
26 level (Figure 3C and 3D) in both normoxic and hypoxic mice.

27 Epididymal lipectomy did not affect retroperitoneal AT volume (data not shown).

28

29 **Epididymal lipectomy prevents IH-induced glucose homeostasis modifications**

30 The basal glucose homeostasis was not modified by the surgery (Table 1). Lipectomy
31 prevented the IH-related disturbances in glucose homeostasis, as shown by the similar
32 responses to glucose and insulin administration in both normoxic and hypoxic lipectomized
33 mice.

34

1 **DISCUSSION** 1040

2 The pathophysiology of OSA-induced metabolic alterations remains poorly understood. In the
3 current study, we showed in non-obese C57BL6 mice that 6 weeks of IH resulted in glucose
4 homeostasis modifications, associated with redistribution of fat territories.

5

6 **IH induces glucose homeostasis alterations**

7 In the present study, we used non-obese C57BL6 mice. After IH exposure, the basal blood
8 glucose and the basal insulin levels remained unchanged between the different groups.
9 However, during the insulin sensitivity test, animals exposed to 6 weeks of IH showed an
10 altered glucose homeostasis characterized by a trend to lower AUC and nadir compared to
11 normoxic mice. This was accompanied by increased insulin levels after glucose injection with
12 no difference in blood glucose in the hypoxic mice, leading to increased insulinogenic index.
13 Together these results demonstrate that IH *per se* can induce metabolic disorders in mice,
14 independently of any obesity. These results are in agreement with clinical studies in OSA
15 patients showing a progressive worsening of insulin resistance and metabolic syndrome with
16 OSA severity, independently of obesity [16] [17]. Previous studies also show decreased
17 insulin sensitivity in healthy volunteers exposed to IH [18], as well as in lean mice after only
18 5 days of IH [19].

19

20 **IH and lipectomy induce differential topographic changes of AT compartments**

21 Literature is poor regarding the effects of IH *per se* on adipose tissue. Recent works showed
22 that IH led to various changes in epididymal AT such as adipocyte gene expression
23 modifications [20] [21], alteration of lipoprotein clearance pathways [12] [22], sustained
24 continuous hypoxia despite the normoxia-hypoxia cycles [23] and inflammation [24]. In the
25 present study we showed that in addition to functional alterations, AT underwent specific
26 topographic changes. Thanks to a MRI approach, a complete quantification of different AT
27 compartments was realized. The four following fat territories were also assessed for their
28 volume modifications after IH exposure: epididymal AT, subcutaneous AT, mesenteric AT
29 and retroperitoneal AT. MRI quantification shows that the total fat mass is not modified in the
30 hypoxic mice despite a significant loss of epididymal AT. Unlike epididymal AT,
31 subcutaneous and mesenteric volumes are slightly increased after IH, suggesting a
32 compensatory phenomenon. A very recent experimental study shows that IH increased
33 Angptl4 only in epididymal AT probably because to a more severe hypoxia and activation of
34 HIF1 α in this AT territory [22]. As it is proposed in this study, we suggest that effects of IH

1 could be tissue-dependent, explaining the differential response of AT compartments to IH
2 regarding their volume changes. Furthermore we show that IH-induced altered insulin
3 sensitivity was associated with an epididymal AT wasting. These results are in agreement
4 with a study from the group of Polotsky, showing an increased HOMA index and a decreased
5 epididymal fat weight in lean mice exposed to 4 weeks of IH [29]. Collectively these results
6 suggest that IH increases epididymal AT lipolysis, which can contribute to insulin resistance.
7 Among mechanisms that could explain IH-induced lipolysis, IH activates the sympathetic
8 nervous system [25] which in turn is known to induce lipolysis through activation of the
9 hormone-sensitive lipase in adipose tissue [26]. It has been described that human abdominal
10 visceral adipocytes are more sensitive to catecholamines-induced lipolysis than subcutaneous
11 abdominal adipose cells [9]. These clinical data support the hypothesis of tissue-dependent
12 effects of IH, in particular at adipose territories level.

13 To mimic the epididymal AT loss observed during IH and to assess the implication of this
14 territory in the IH-induced metabolic alterations, we carried out a surgery to remove
15 epididymal white fat. After 6 weeks of IH exposure, epididymal territory was still absent in
16 normoxic as in hypoxic lipectomized mice. The total AT volume was similar in sham-
17 operated compared to the lipectomized mice suggesting a compensation by other adipose
18 tissues. After lipectomy, we observe a significant increase of subcutaneous AT volume at tail
19 level, in both normoxic and hypoxic mice, which was consistent with previous experimental
20 results [27]. As observed in sham-operated mice after IH exposure, the imbalance between the
21 different fat compartments following partial lipectomy is compensated by redistribution, in
22 particular to the subcutaneous site. This result is consistent with the Kennedy's "lipostatic"
23 hypothesis that the "adipose organ" is able to adapt to its homeostasis modifications, in part
24 through sensory innervations control and/or regulation of circulating humoral factors [28].

25

26 **Epididymal lipectomy leads to beneficial effects on IH-induced metabolic disturbances**

27 As described above, IH induced epididymal AT alterations such as inflammatory phenotype
28 acquisition or local hypoxia apparition. Local AT hypoxia as observed in obesity has been
29 described to participate to the obesity-associated inflammation of AT [29] and insulin
30 resistance [30]. In the present study we demonstrated that insulin sensitivity was improved in
31 hypoxic lipectomized animals compared to sham-operated hypoxic mice, consistent with
32 previous study showing that removing visceral fat could prevent insulin resistance in obese
33 aging rats [31]. The beneficial effects of the lipectomy could be explained by the
34 compensatory extent un subcutaneous fat.

1 Visceral adipocytes are defined by a peculiar metabolic profile compared to subcutaneous
2 cells, characterized by hyperlipolytic activity and resistance to the antilipolytic effect of insulin
3 [9]. Clinical studies describe differences between visceral and subcutaneous AT regarding
4 their implication in insulin sensitivity. McLaughlin reports a positive association between
5 visceral AT and insulin resistance, whereas subcutaneous AT is associated with insulin
6 sensitivity, after BMI adjustment [32]. Furthermore recent studies in normal-overweight
7 individuals [33] and obese subjects [34] challenge the efficacy of subcutaneous liposuction
8 regarding metabolism parameters. Despite some controversial results, the relationship
9 between adipose tissue distribution and insulin resistance in human obesity is largely
10 described in the literature [9]. Together these results show the important role of AT
11 distribution in insulin resistance and that the AT sensitivity to insulin is linked to its
12 localization. The AT redistribution to a more insulin-sensitive tissue could also have
13 participated to the beneficial effects of epididymal lipectomy on the IH-induced insulin
14 resistance.

15

16 **Conclusion**

17 In this study IH led to topographic changes of fat territories including a reduction in
18 epididymal AT. Despite this reduction in epididymal fat, IH also increased insulin resistance.
19 This deterioration in insulin sensitivity was prevented in epididymal-lipectomized mice,
20 possibly through the compensatory increase in subcutaneous fat. Further studies should
21 address the question of functional modifications of white adipose tissue from territories that
22 are usually considered as insulin-sensitive but could become dysfunctional under IH
23 condition.

24

1 REFERENCES

- 2 1. Somers VK, White DP, Amin R, Abraham WT, Costa F, Culebras A, Daniels S, Floras JS, Hunt
3 CE, Olson LJ, Pickering TG, Russell R, Woo M, Young T. Sleep apnea and cardiovascular disease: an
4 American Heart Association/American College Of Cardiology Foundation Scientific Statement from
5 the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education
6 Committee, Council on Clinical Cardiology, Stroke Council, and Council On Cardiovascular Nursing. In
7 collaboration with the National Heart, Lung, and Blood Institute National Center on Sleep Disorders
8 Research (National Institutes of Health). *Circulation* 2008; 118(10): 1080-1111.
- 9 2. Dematteis M, Godin-Ribuot D, Arnaud C, Ribuot C, Stanke-Labesque F, Pepin JL, Levy P.
10 Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to
11 understanding the human disease. *ILAR J* 2009; 50(3): 262-281.
- 12 3. Bonsignore MR, McNicholas WT, Montserrat JM, Eckel J. The adipose tissue in obesity and
13 obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 2011.
- 14 4. Wolk R, Somers VK. Obesity-related cardiovascular disease: implications of obstructive sleep
15 apnea. *Diabetes Obes Metab* 2006; 8(3): 250-260.
- 16 5. Lavie L, Lavie P. Molecular mechanisms of cardiovascular disease in OSAHS: the oxidative
17 stress link. *Eur Respir J* 2009; 33(6): 1467-1484.
- 18 6. Jun J, Polotsky VY. Sleep disordered breathing and metabolic effects: evidence from animal
19 models. *Sleep Med Clin* 2007; 2(2): 263-277.
- 20 7. Biggaard J, Frederiksen K, Tjonneland A, Thomsen BL, Overvad K, Heitmann BL, Sorensen TI.
21 Waist circumference and body composition in relation to all-cause mortality in middle-aged men and
22 women. *Int J Obes (Lond)* 2005; 29(7): 778-784.
- 23 8. Abate N, Garg A, Peshock RM, Stray-Gundersen J, Grundy SM. Relationships of generalized
24 and regional adiposity to insulin sensitivity in men. *J Clin Invest* 1995; 96(1): 88-98.
- 25 9. Tchernof A, Despres JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev*
26 2013; 93(1): 359-404.
- 27 10. Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* 2005;
28 96(9): 939-949.
- 29 11. Poulain L, Thomas A, Rieusset J, Casteilla L, Levy P, Arnaud C, Dematteis M. Visceral white fat
30 remodeling contributes to intermittent hypoxia-induced atherogenesis. *Eur Respir J* 2013: Accepted
31 for publication.
- 32 12. Drager LF, Yao Q, Hernandez KL, Shin MK, Bevans-Fonti S, Gay J, Sussan TE, Jun JC, Myers AC,
33 Olivecrona G, Schwartz AR, Halberg N, Scherer PE, Semenza GL, Powell DR, Polotsky VY. Chronic
34 intermittent hypoxia induces atherosclerosis via activation of adipose angiopoietin-like 4. *Am J Respir*
35 *Crit Care Med* 2013: Epub ahead of print.
- 36 13. Yao Q, Shin MK, Jun JC, Hernandez KL, Aggarwal NR, Mock JR, Gay J, Drager LF, Polotsky VY.
37 Effect of chronic intermittent hypoxia on triglyceride uptake in different tissues. *J Lipid Res* 2013;
38 54(4): 1058-1065.
- 39 14. Arnaud C, Beguin PC, Lantuejoul S, Pepin JL, Guillermet C, Pelli G, Burger F, Buatois V, Ribuot
40 C, Baguet JP, Mach F, Levy P, Dematteis M. The inflammatory pre-atherosclerotic remodeling
41 induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition. *Am J Respir Crit Care Med*
42 2011.
- 43 15. Muniyappa R, Lee S, Chen H, Quon MJ. Current approaches for assessing insulin sensitivity
44 and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol Metab*
45 2008; 294(1): E15-26.
- 46 16. Priou P, Le Vaillant M, Meslier N, Chollet S, Masson P, Humeau MP, Pigeanne T, Bizieux-
47 Thamin A, Goupil F, Gagnadoux F. Independent association between obstructive sleep apnea
48 severity and glycated hemoglobin in adults without diabetes. *Diabetes Care* 2012; 35(9): 1902-1906.
- 49 17. Pamidi S, Wroblewski K, Broussard J, Day A, Hanlon EC, Abraham V, Tasali E. Obstructive
50 sleep apnea in young lean men: impact on insulin sensitivity and secretion. *Diabetes Care* 2012;
51 35(11): 2384-2389.

- 1 18. Louis M, Punjabi NM. Effects of acute intermittent hypoxia on glucose metabolism in awake
2 healthy volunteers. *J Appl Physiol* 2009; 106(5): 1538-1544.
- 3 19. Iiyori N, Alonso LC, Li J, Sanders MH, Garcia-Ocana A, O'Doherty RM, Polotsky VY, O'Donnell
4 CP. Intermittent hypoxia causes insulin resistance in lean mice independent of autonomic activity.
5 *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175(8): 851-857.
- 6 20. Gharib SA, Khalyfa A, Abdelkarim A, Ramesh V, Buazza M, Kaushal N, Bhushan B, Gozal D.
7 Intermittent hypoxia activates temporally coordinated transcriptional programs in visceral adipose
8 tissue. *J Mol Med (Berl)* 2011.
- 9 21. Li J, Grigoryev DN, Ye SQ, Thorne L, Schwartz AR, Smith PL, O'Donnell CP, Polotsky VY.
10 Chronic intermittent hypoxia upregulates genes of lipid biosynthesis in obese mice. *J Appl Physiol*
11 2005; 99(5): 1643-1648.
- 12 22. Yao Q, Shin MK, Jun JC, Hernandez KL, Aggarwal NR, Mock JR, Gay J, Drager LF, Polotsky VY.
13 The Effect of Chronic Intermittent Hypoxia on Triglyceride Uptake in Different Tissues. *J Lipid Res*
14 2013.
- 15 23. Reinke C, Bevans-Fonti S, Drager LF, Shin MK, Polotsky VY. Effects of different acute hypoxic
16 regimens on tissue oxygen profiles and metabolic outcomes. *J Appl Physiol* 2011; 111(3): 881-890.
- 17 24. Poulain L, Rieusset J, Levy P, Dematteis M, Arnaud C. Intermittent hypoxia Induces
18 dyslipidemia and atherogenesis through visceral white adipose tissue inflammation. *Am J Respir Crit*
19 *Care Med* 2012; 185(1 MeetingAbstracts): A3867.
- 20 25. Prabhakar NR, Kumar GK, Peng YJ. Sympatho-adrenal activation by chronic intermittent
21 hypoxia. *J Appl Physiol* 2012; 113(8): 1304-1310.
- 22 26. Kolditz CI, Langin D. Adipose tissue lipolysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010; 13(4): 377-
23 381.
- 24 27. Mauer MM, Bartness TJ. Fat pad-specific compensatory mass increases after varying degrees
25 of lipectomy in Siberian hamsters. *Am J Physiol* 1997; 273(6 Pt 2): R2117-2123.
- 26 28. Mauer MM, Harris RB, Bartness TJ. The regulation of total body fat: lessons learned from
27 lipectomy studies. *Neurosci Biobehav Rev* 2001; 25(1): 15-28.
- 28 29. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest* 2011;
29 121(6): 2094-2101.
- 30 30. Trayhurn P, Wang B, Wood IS. Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of
31 tissue function in obesity? *Br J Nutr* 2008; 100(2): 227-235.
- 32 31. Gabriely I, Ma XH, Yang XM, Atzmon G, Rajala MW, Berg AH, Scherer P, Rossetti L, Barzilai N.
33 Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging: an adipokine-
34 mediated process? *Diabetes* 2002; 51(10): 2951-2958.
- 35 32. McLaughlin T, Lamendola C, Liu A, Abbasi F. Preferential fat deposition in subcutaneous
36 versus visceral depots is associated with insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(11):
37 E1756-1760.
- 38 33. Ybarra J, Blanco-Vaca F, Fernandez S, Castellvi A, Bonet R, Palomer X, Ordonez-Llanos J, Trius
39 A, Vila-Rovira R, Perez A. The effects of liposuction removal of subcutaneous abdominal fat on lipid
40 metabolism are independent of insulin sensitivity in normal-overweight individuals. *Obes Surg* 2008;
41 18(4): 408-414.
- 42 34. Klein S, Fontana L, Young VL, Coggan AR, Kilo C, Patterson BW, Mohammed BS. Absence of an
43 effect of liposuction on insulin action and risk factors for coronary heart disease. *N Engl J Med* 2004;
44 350(25): 2549-2557.
- 45
46
47

1 **FIGURE LEGENDS**

2

3 **Table. Weight and glucose regulation in mice exposed to intermittent hypoxia or**
4 **normoxia.**

5 Insulin sensitivity and secretion were assessed at the fifth week of exposure to intermittent
6 hypoxia (IH) or air (N) in lipectomized and sham-operated C57BL6 mice. AUC = area under
7 the curve.

8

9 **Figure 1. MRI quantification of total white adipose tissue volume in mice exposed to**
10 **intermittent hypoxia or normoxia.**

11 (A) Representative coronal and tranverse T1-weighted images. (B) Total white adipose tissue
12 volume after 6 weeks of intermittent hypoxia (IH) or air (N) in lipectomized and sham-
13 operated C57BL6 mice, n=4 per group.

14

15 **Figure 2. MRI quantification of epididymal white adipose tissue volume in mice exposed**
16 **to intermittent hypoxia or normoxia.**

17 (A) Representative photographs and transverse MRI slices of epididymal fat pads (arrow) and
18 gonads (G). (B) Epididymal fat volume after 6 weeks of intermittent hypoxia (IH) or air (N)
19 in lipectomized and sham-operated C57BL6 mice, n=4 per group; *p<0.05 N-sham vs IH-
20 sham, #p<0.05 N-sham vs N-lipectomy and IH-sham vs IH-lipectomy.

21

22 **Figure 3. MRI quantification of mesenteric white adipose tissue volume in mice exposed**
23 **to intermittent hypoxia or normoxia**

24 (A) Representative transverse MRI slices (arrow showing the mesenteric fat), (B) total and
25 (C) regional mesenteric fat volume in the 3 parts of the abdominal cavity after 6 weeks of
26 intermittent hypoxia (IH) or air (N) in lipectomized or sham-operated mice, n=4 per group.

27

28 **Figure 4. MRI quantification of subcutaneous white adipose tissue volume in mice**
29 **exposed to intermittent hypoxia or normoxia**

30 (A) Representative transverse MRI slices (arrow showing the subcutaneous fat), (B) total and
31 (C) regional subcutaneous fat volume in the 4 body regions after 6 weeks of intermittent
32 hypoxia (IH) or air (N) in lipectomized or sham-operated mice, n=4 per group; *p<0.05 N-
33 sham vs N-lipectomy and IH-sham vs IH-lipectomy.

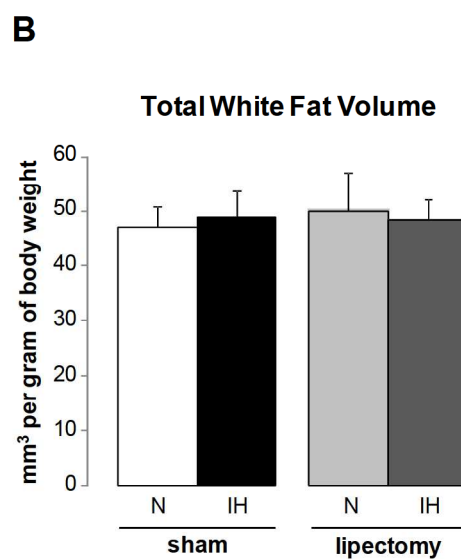
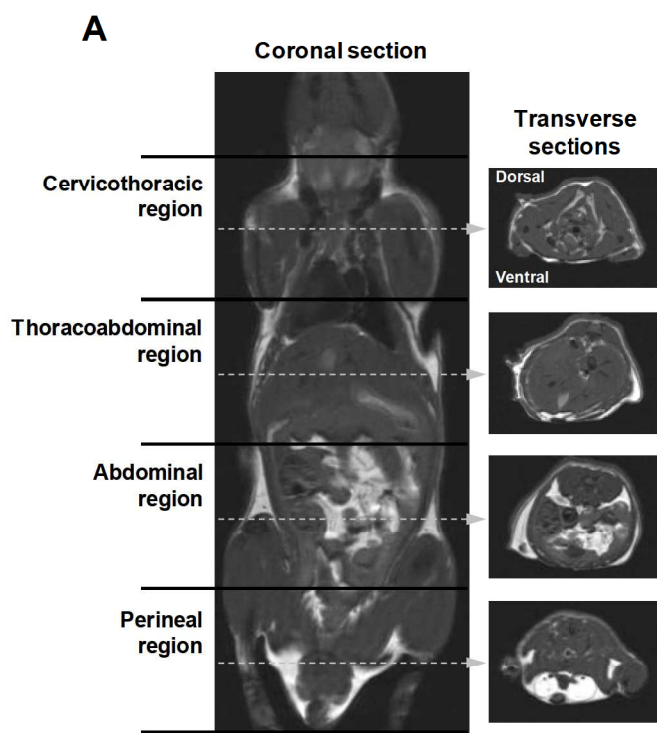
34

Table

	SHAM			LIPECTOMY		
	N	IH	p N vs IH	N	IH	p N vs IH
n	7	7		6	6	
Body weight after IH exposure (g)	27.4 ± 0.9	25.4 ± 0.4	<0.05	26.9 ± 0.7	26.0 ± 0.5	n.s.
Insulin sensitivity						
Blood glucose after 5h of fasting (mg/dl)	199.8 ± 7.6	191.6 ± 10.0	n.s.	200.8 ± 9.7	192.6 ± 9.0	n.s.
Blood glucose AUC (min.mg/dl)	-3553 ± 578	-2146 ± 446	0.07	-3063 ± 362	-2907 ± 315	n.s.
Blood glucose nadir (mg/dl)	-85.6 ± 13.4	-54.7 ± 9.6	0.08	-77.2 ± 9.4	-75.2 ± 5.1	n.s.
Insulin secretion						
<i>Baseline measurements after 10h of fasting</i>						
Blood glucose (mg/dl)	102.5 ± 8.8	100.0 ± 9.0	n.s.	90.0 ± 3.2	92.5 ± 10.1	n.s.
Plasma insulin (ng/ml)	0.159 ± 0.053	0.138 ± 0.035	n.s.	0.131 ± 0.023	0.122 ± 0.012	n.s.
<i>Measurements 15min after glucose load</i>						
Blood glucose (mg/dl)	356.8 ± 11.5	344.0 ± 12.1	n.s.	387.8 ± 24.6	401.7 ± 27.5	n.s.
Plasma insulin (ng/ml)	0.173 ± 0.016	0.289 ± 0.032	<0.05	0.207 ± 0.026	0.219 ± 0.026	n.s.
Insulin secretion index (a.u.)	0.23 ± 0.02	0.63 ± 0.14	<0.05	0.34 ± 0.11	0.37 ± 0.09	n.s.

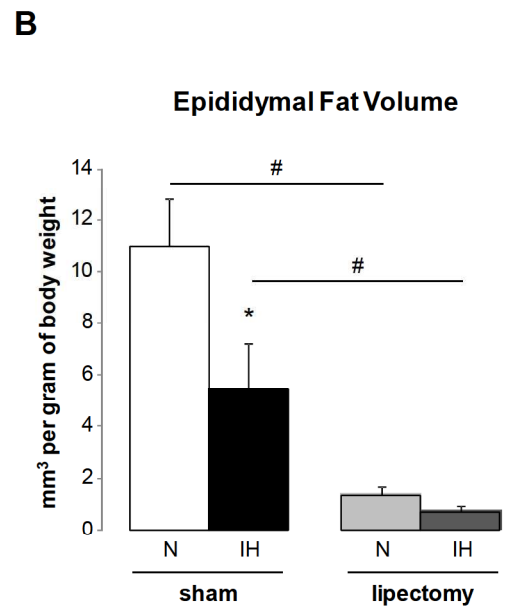
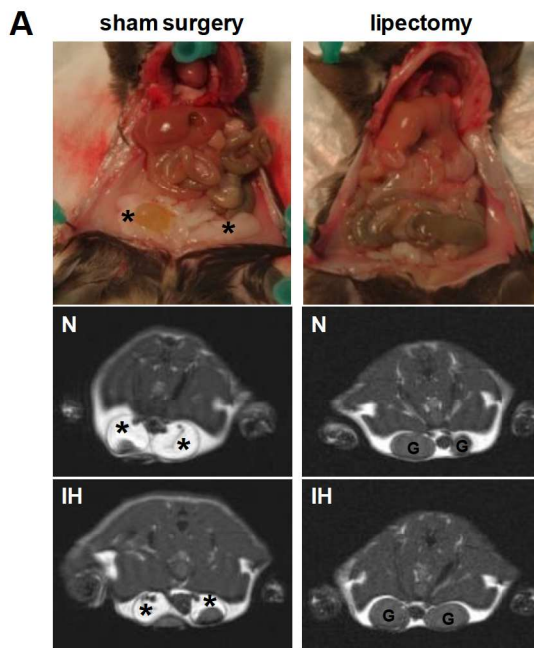
1
2
3
4
5

Figure 1



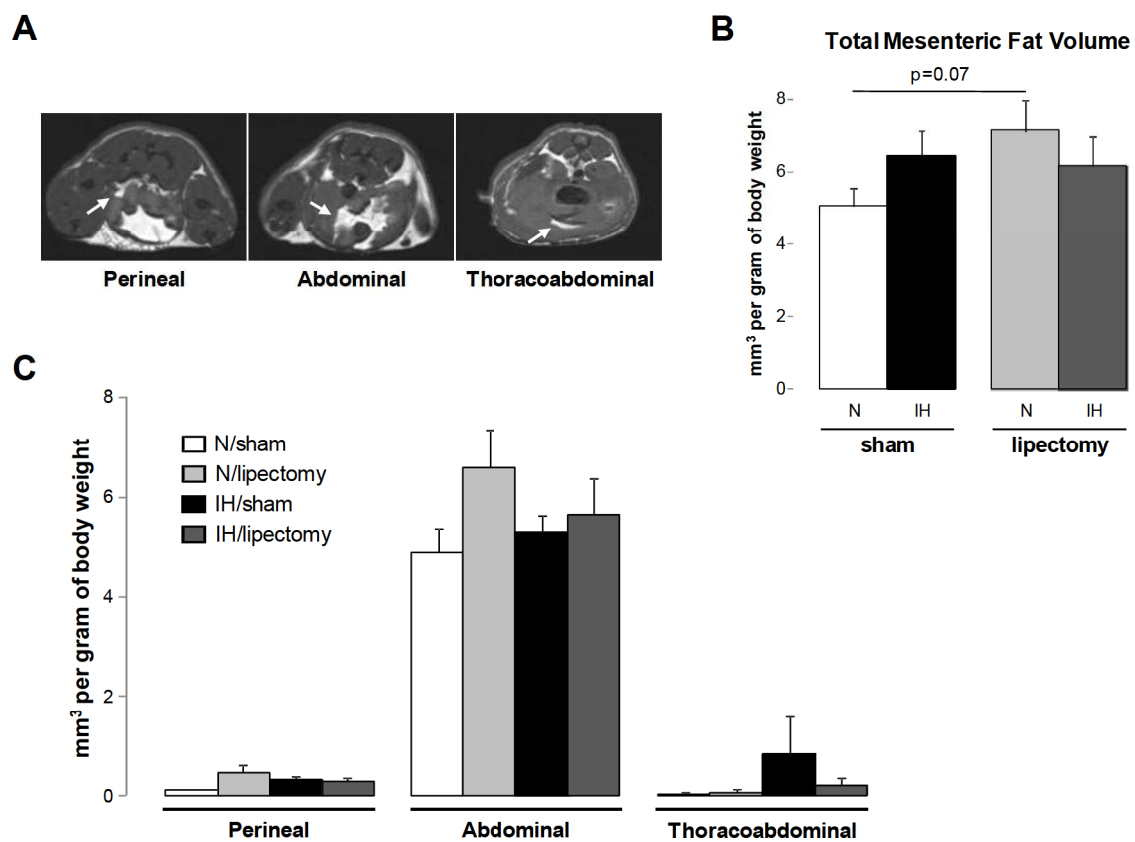
1
2
3
4

Figure 2



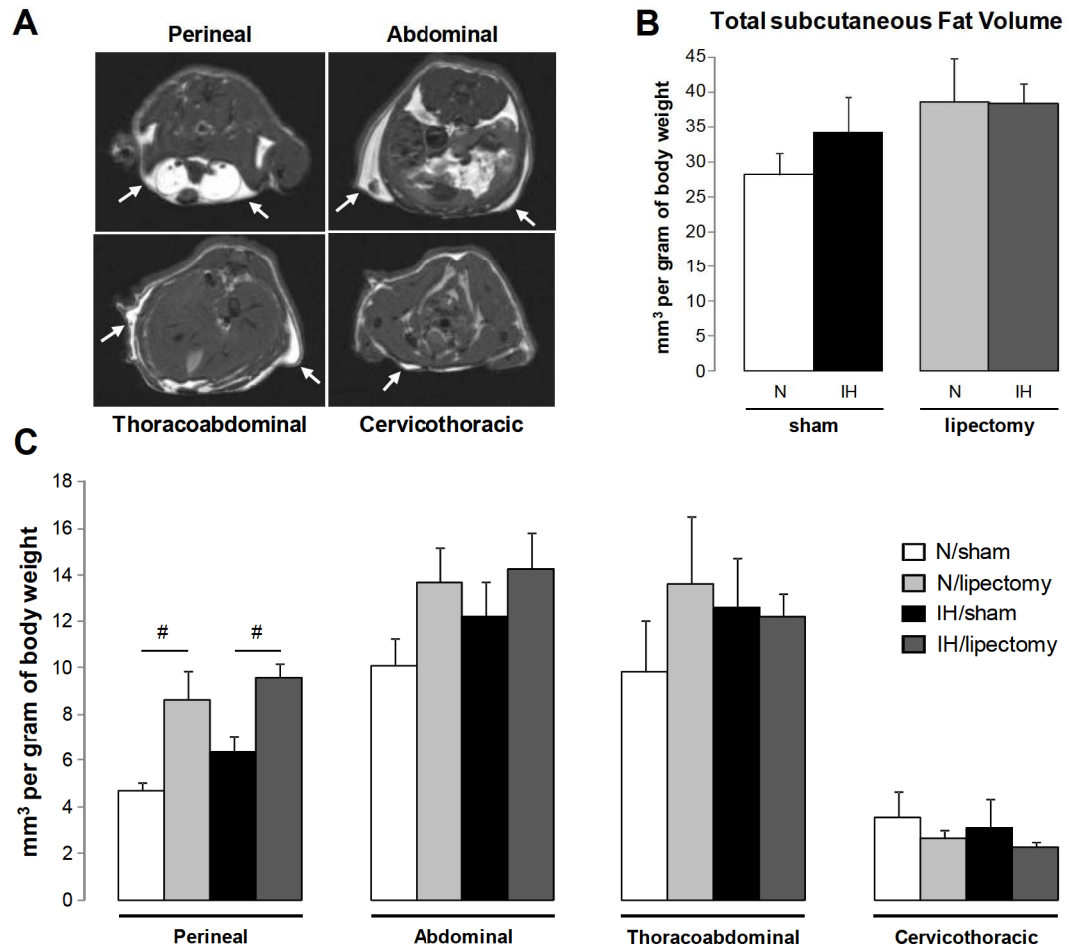
1
2
3
4

Figure 3



1
2
3
4

Figure 4



1

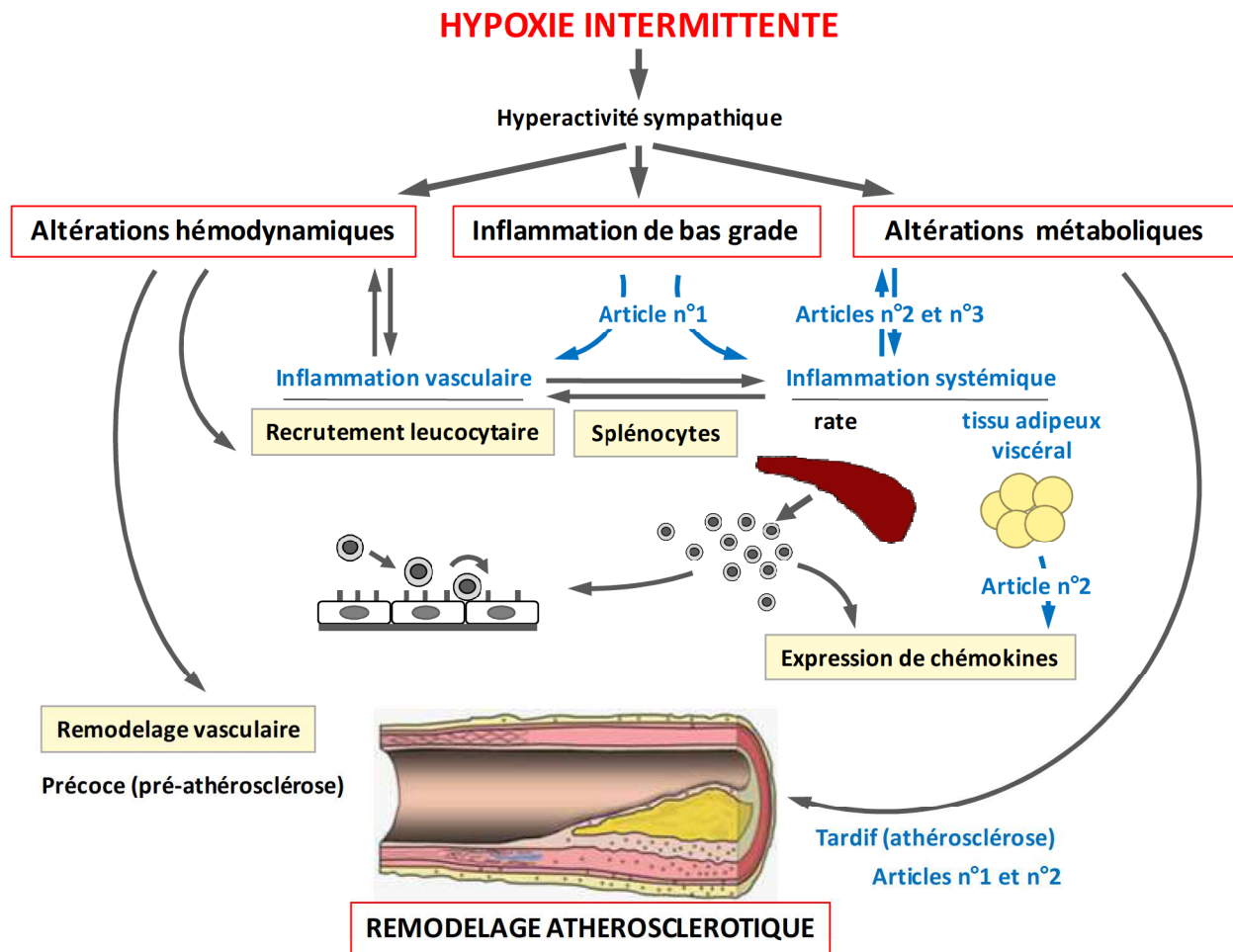


Figure 21. Résumé des résultats décrits dans l'article n°3. Ces données montrent, qu'en plus de modifications qualitatives (inflammation, morphologie), l'hypoxie intermittente entraîne également des modifications quantitatives (fonte épидидymale), qui sont impliquées dans les altérations métaboliques observées après une hypoxie intermittente. Par ailleurs, un déséquilibre adipeux, initié de façon « physiologique » (hypoxie intermittente) ou de façon artificielle (chirurgie) est compensé par les autres territoires adipeux, en particulier le territoire sous-cutané.

3.4. Travail n°4 : Rôle de la voie TLR-4/NFκB dans les altérations métaboliques et vasculaires induites par l'hypoxie intermittente

“Toll Like Receptor 4 pathway is involved in the cardiometabolic alterations induced by intermittent hypoxia.”

Poulain L, Richard V, Lévy P, Arnaud C*, Dematteis M.*

*co-senior authors

Objectif : Le SAOS est une pathologie fréquente qui affecte environ 10% de la population adulte d'âge moyen. De nombreuses études cliniques décrivent l'association fréquente entre le SAOS et les complications métaboliques, telles que l'insulino-résistance. De plus, le SAOS est considéré comme un facteur de risque cardiovasculaire indépendant. Les collapsus pharyngés répétitifs caractéristiques du SAOS sont à l'origine d'une HI nocturne, qui semble être la composante majeure du SAOS en termes de répercussion cardio-métaboliques. De plus, les animaux exposés à l'HI montrent que les atteintes métaboliques et vasculaires induites par ce stimulus sont médiées, en partie, par l'inflammation systémique. Par ailleurs, au cours de l'obésité, l'activation de la voie pro-inflammatoire TLR-4/NFκB est impliquée dans l'insulino-résistance et le remodelage vasculaire associés à cette pathologie.

D'après nos précédents résultats concernant les atteintes inflammatoires, métaboliques et vasculaires induites par l'HI, la voie TLR-4/NFκB pourrait donc être impliquée dans les conséquences cardio-métaboliques de l'HI.

Matériel et méthodes : Des souris TLR-4^{-/-} âgées de 17 semaines, ainsi que leur groupe contrôle C57Bl6, ont été exposées à 4 semaines d'HI ou de normoxie. La sensibilité à l'insuline a été évaluée durant les 4 semaines d'exposition. A la fin de l'exposition, les effets de l'HI au niveau adipeux (inflammation) et vasculaire (épaisseur intima-media) ont été étudiés chez les 4 groupes d'animaux.

Résultats : L'insulino-résistance induite par l'HI chez les souris C57Bl6, est absente chez les souris TLR-4^{-/-}. Chez les souris hypoxiques, la déficience pour le TLR-4 permet également de prévenir le remodelage inflammatoire vasculaire et l'augmentation de sécrétion d'IL-6 et de TNF-α par le tissu adipeux épидидymal. Une moindre inflammation du tissu adipeux épидидymal associée à une correction de l'insulino-résistance pourrait expliquer les effets bénéfiques de la déficience pour le TLR-4 sur les atteintes vasculaires induites par l'HI.

Conclusion : L'HI entraîne des altérations métaboliques et tissulaires (tissu adipeux épидидymal et aorte thoracique) qui semblent être médiées, en partie, par la voie pro-inflammatoire TLR-4/NFκB (figure 22, page 172). Ces données confirment le rôle majeur de la composante inflammatoire dans les conséquences délétères de l'HI.

1 **Toll Like Receptor 4 pathway is involved in the cardiometabolic**
2 **alterations induced by intermittent hypoxia.**

3
4 Laureline POULAIN^{1,2}, Vincent RICHARD³, Patrick LEVY^{1,2,4}, Maurice DEMATTEIS^{1,2,5*}
5 and Claire ARNAUD^{1,2,*}
6

7 *Co-senior authors
8
9

10 ¹INSERM U1042, HP2 laboratory, Grenoble F-38042, France

11 ²Université Joseph Fourier, Faculté de Médecine, Grenoble F-38042, France

12 ³INSERM U644, UFR Médecine-Pharmacie, 22 Boulevard Gambetta, 76183 Rouen Cedex

13 ⁴CHU, Hôpital A. Michallon, Laboratoires du Sommeil et EFCR, Grenoble F-38043, France

14 ⁵CHU, Hôpital A. Michallon, Pôle Pluridisciplinaire de Médecine, Grenoble F-38043, France
15
16
17

18 **Running title:**

19 Word count for the body:

20 Word count for the abstract:

21 Total number of figures and tables:
22
23

24 Corresponding authors at:
25

26 Laboratoire HP2, Institut Jean Roget,
27 Faculté de Médecine de Grenoble,
28 BP 170, 38042 Grenoble Cedex 9, France.
29

30 Tel: +33 476 63 75 56 (CA)

31 +33 476 63 71 71 (MD)

32 Fax: +33 476 63 71 78
33

34 E-mail addresses: claire.arnaud@ujf-grenoble.fr (C. Arnaud),
35 maurice.dematteis@ujf-grenoble.fr (M. Dematteis).
36

1 **ABSTRACT**

2

3 **Objective:** Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) is characterized by repetitive upper
4 airway collapse during night leading to intermittent hypoxia (IH). The latter is responsible for
5 vascular and metabolic complications such as atherosclerosis and insulin resistance. As
6 obesity, OSAS is associated with a systemic low-grade inflammation which contributes to
7 cardio-metabolic alterations associated to IH. Since Toll-like receptors (TLR)-4 are involved
8 in the development of insulin resistance and vascular remodeling observed in obesity, the
9 inflammatory and metabolic consequences of IH could be mediated at least in part through the
10 TLR-4 pathway activation.

11 **Methods:** Seventeen weeks old male TLR-4^{-/-} mice (C57BL6 background) and their control
12 groups (C57BL6 mice) were exposed to either IH (FiO₂ 21-5%, 1 min cycle, 8 h/day) or air
13 (normoxic mice) for 4 weeks. During IH exposure, animals were assessed for insulin
14 sensitivity. After exposure, mice were sacrificed and analyzed for vascular remodeling (aorta
15 intima-media thickness) and epididymal adipose tissue inflammation.

16 **Results:** *In vivo* insulin sensitivity tests show that TLR-4 deficiency prevented IH-induced
17 insulin resistance. Compared to hypoxic C57BL6, TLR-4 deficiency prevented the increased
18 secretion of Interleukine (IL)-6 and Tumor Necrosis Factor (TNF)- α by the epididymal fat
19 and the intima-media thickening.

20 **Conclusion:** IH induces metabolic and vascular alterations, at least in part through the pro-
21 inflammatory TLR-4 pathway activation. These results confirm the important role of
22 inflammation in the cardio-metabolic consequences associated to IH.

23

24 **Keywords:** Atherosclerosis, Inflammation, Intermittent hypoxia, Sleep apnea, Toll Like
25 Receptor-4

26

27

28

1 INTRODUCTION

2 Obstructive sleep apnea (OSA) is a public-health problem as it affects at least 10% of the
3 middle aged men, and represents a main cause of cardiovascular morbidity and mortality [1].
4 An independent association between OSA, insulin-resistance and type 2 diabetes has been
5 consistently demonstrated by a number of cross-sectional studies, observational studies and
6 large population-based studies [2] [3] [4] [5]. Moreover, in OSA patients, increased carotid
7 intima-media thickness (IMT), an early sign of atherosclerosis, correlates with nocturnal
8 oxygen desaturation, independently of other cardiovascular risk factors [6] [7]. Very recently,
9 Kent *et al* found in a prospective case-control study, that severity of OSA may predict occult
10 coronary atherosclerosis in otherwise healthy overweight or obese male subjects [8].
11 Repetitive upper airway collapses during sleep result in intermittent hypoxia (IH), thought to
12 be responsible for cardiometabolic complications such as atherosclerosis and insulin
13 resistance [9]. Evidence from animal sleep apnea model (i.e. rodents exposed to IH) confirms
14 that IH-induced insulin resistance and vascular remodeling are mediated in part through
15 activation of the sympathetic nervous system [10] and systemic inflammation [11].
16 Furthermore we previously showed that IH aggravated dyslipidemia and atherogenesis
17 through epididymal white adipose tissue (EWAT) inflammatory remodeling [12].
18 In obesity it is increasingly recognized that chronic activation of inflammatory signaling
19 pathway are causally linked to insulin resistance [13] and vascular alterations [14]. Recent
20 studies suggest that these deleterious effects could be mediated, at least in part, through the
21 activation of Toll-Like Receptor (TLR), and in particular the TLR-4. TLRs are a family of
22 pattern-recognition receptors that play a critical role in the innate immune system by
23 activating pro-inflammatory signaling pathways in response to microbial pathogens [15].
24 TLR-4 binds to lipopolysaccharide (LPS) triggering a downstream cascade, which leads to the
25 activation of the pro-inflammatory Nuclear Factor (NF) κ B pathway and finally to the
26 expression of numerous pro-inflammatory molecules, such as IL-6 and TNF- α [16]. Two
27 recent experimental studies described free fatty acids (FFA) as a activator for TLR-4/NF κ B
28 pathway, suggesting a likely mechanism linking obesity-induced excess FFA to insulin
29 resistance [17] [18]. Furthermore, studies on different strains of mice showed that expression
30 and activation of TLR-4 are involved in aortic inflammation [19] and in atherogenesis [20].
31 Together these experimental data confirm the major role of TLR-4/NF κ B pathway in the
32 crosstalk between inflammation, atherosclerosis and metabolism dysfunctions.

1 In C57Bl6 mice we have shown that IH induced cardiovascular inflammation, characterized
2 by an increased activity of NFκB in aortic [21] and cardiac (unpublished data) tissues.
3 According to these data and to our previous results regarding inflammation at EWAT [12] and
4 vascular [21] levels, we postulate that the metabolic and vascular consequences of IH could
5 be mediated at least in part through the pro-inflammatory TLR-4/NFκB pathway activation.
6

1 **METHODS**

2

3 **Animals**

4 Seventeen weeks old male TLR-4 deficient mice (C57Bl6 background) and their control
5 groups (C57Bl6 mice) fed on a standard-chow diet were used. They were weighed throughout
6 the experiments, and food intake was measured daily. The study was conducted in accordance
7 with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for
8 Experimental and Other Scientific Purposes (Council of Europe, European Treaties ETS 123,
9 Strasbourg, 18 March 1986), and to the *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (NIH
10 Publication No. 85-23, revised 1996).

11

12 **Intermittent hypoxia**

13 IH was performed as previously described [12]. The four groups of animals were exposed
14 during daytime (n=10 per cage, 8h/day, cyclic 21-5% FiO₂, 60s cycle (60 events/h), lowest
15 blood oxygen saturation up to 60%) for 4 weeks. FiO₂ was measured with a gas analyzer
16 (ML206, ADInstruments) throughout the experiment. Control animals (normoxic mice, N)
17 were exposed to air in similar cages to reproduce similar noise and turbulences to those of the
18 IH stimulus. Ambient temperature was maintained at 20-22°C. On the day following the last
19 exposure period, the animals were anesthetized with intraperitoneal ketamine-xylazine
20 anesthesia (100 mg/kg/10 mg/kg).

21

22 **Metabolic alterations**

23 Blood was collected by cardiac puncture. The plasmatic fraction was collected after blood
24 centrifugation during 10 minutes at 11000 rpm (4°C).

25

26 ***Lipid measurements***

27 Total cholesterol was measured in plasma by a colorimetric enzymatic reaction using the
28 Infinity kit (ThermoElectron Corporation) according to the manufacturer's guidelines.

29 Plasma levels non-esterified fatty acids (NEFA) were measured by a colorimetric enzymatic
30 reaction using the NEFA FS Kit (DiaSys).

31

32

33

34 ***Insulin measurement***

1 Plasma insulin was quantified by a Mouse Ultrasensitive Insulin Enzyme-Linked
2 Immunosorbent Assay (ELISA). The 96-well microplate is coated with a monoclonal
3 antibody specific for insulin. 25 μ l of plasma was incubated with 75 μ l Working Strength
4 Conjugate. Insulin was measured according to the manufacturers' instructions and expressed
5 in ng/ml (Alpco).

6

7 ***Intraperitoneal insulin tolerance test (IpITT)***

8 During the **three first weeks** of IH exposure, we used IpITT to assess global insulin
9 sensitivity. Mice were fasted for 5 hours then weighted before blood was collected from the
10 tail tip for baseline glucose determination (t=0). Blood glucose was measured using the
11 OneTouch® Ultra® glucometer. Insulin (0.5 IU/kg body weight, Novo Nordisk A/S) was
12 injected intraperitoneally, followed by further blood glucose measurements at 15, 30, 60 and
13 90 minutes after the injection. The lowest blood glucose level (nadir) and its timing following
14 insulin administration were calculated.

15

16 **Adipose tissue alterations**

17 The day following the last exposure period, animals were anesthetized as described above for
18 bilateral EWAT collection. The tissue was either snap frozen in liquid nitrogen then stored at
19 -80°C for Nuclear Factor (NF) κ B activity and cytokines quantification, or incubated for
20 cytokines secretion study.

21

22 ***NF κ B activity***

23 As activation of the pro-inflammatory transcription factor NF κ B requires nuclear
24 translocation, we investigated whether IH could activate NF κ B by assessing the nuclear
25 expression of the NF κ B-p50 subunit. Nuclear NF κ B-p50 was determined in EWAT of
26 C57Bl6 and TLR-4 exposed to N or IH. EWAT was homogenized in a lysis buffer containing
27 1M DTT (Active Motif) and centrifuged two times to ensure to collect the total cytosolic
28 fractions. The pellets were resuspended in a complete lysis buffer containing 10mM DTT,
29 protease inhibitor cocktail and lysis buffer AM1 (Active Motif). After 30 min incubation on
30 ice, the pellet was centrifuged 10 min at 14000 g. Proteins concentration was determined
31 using the BCA assay (ThermoScientific). Nuclear expression of the NF κ B-p50 subunit was
32 determined using the TransAM NF κ B-p65/p50/p52 kit (Active Motif). Nuclear proteins (10
33 μ g/ml) were assayed for the presence of activated p50 by ELISA using antibody specific for

1 activated p50 following binding to NFκB consensus sequence. NFκB activity is expressed in
2 arbitrary units.

3

4 ***Cytokine secretion***

5 EWAT was isolated from mice and weighed. Each pad was divided into two equal pieces and
6 incubated at 37°C with mild shaking in RPMI medium. After 120 minutes of incubation,
7 interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor (TNF)-α were measured in the supernatants using
8 an ELISA test according to manufacturer's instructions (R&D System). Cytokine
9 concentrations were expressed as ng/ml for 1g of adipose tissue.

10

11 **Assessment of aortic lesions**

12 ***Carotid Intima-Media Thickness (IMT)***

13 IH and N aortas were embedded in OCT compounds (Tissue-Tek, Sakura), sectioned (10 μm)
14 and stained. Hematoxylin-eosin staining was used to assess the intima-media thickness (IMT).
15 Morphometric analysis (up to 15 measurements on 10 noncontiguous midthoracic aorta
16 sections per animal) was performed with a light microscope (Nikon Eclipse 80i, Nikon) and
17 the NIS-Elements microscope imaging software (Nikon).

18

19 ***NFκB activity***

20 As described above, activation of the pro-inflammatory transcription factor NFκB requires
21 nuclear translocation. We investigated whether IH could activate NFκB by assessing the
22 nuclear expression of the NFκB-p50 subunit. Nuclear NFκB-p50 was determined in thoracic
23 aorta of C57Bl6 and TLR-4 exposed to N or IH. Homogenization and extraction were
24 performed as described above, as well as the proteins concentrations determination. Nuclear
25 expression of the NFκB-p50 subunit was determined using the TransAM NFκB-p65/p50/p52
26 kit (Active Motif). Nuclear proteins (15 μg/ml) were assayed for the presence of activated p50
27 by ELISA using antibody specific for activated p50 following binding to NFκB consensus
28 sequence. NFκB activity is expressed in arbitrary units.

29

30

31 **Statistical analysis**

32 Results were expressed as mean ± standard errors of the means. Differences between two
33 groups over time were determined by a two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated

1 measures, with a subsequent Tukey's post hoc test. For comparison between independent
2 groups, Student's t test or Mann-Whitney U-test were used according to normality and
3 variance homogeneity. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

4

1 **RESULTS**

2

3 **TLR-4 deficiency prevented the IH-induced insulin resistance**

4 After IH exposure total cholesterol, plasmatic NEFA, blood glucose and serum insulin are
5 modified neither in C57BL6 mice nor in TLR-4^{-/-} mice (Table 1). Four weeks of IH leads to
6 increased hematocrit in C57BL6 mice, which is absent in TLR-4^{-/-} mice. Global insulin
7 sensitivity was assessed during the first three weeks of IH exposure. During IH exposure, the
8 dynamic insulin tolerance test showed that C57BL6 hypoxic mice responded less to insulin
9 administration, compared to C57BL6 normoxic mice (Figure 1A,B). TLR-4^{-/-} mice are
10 prevented by the IH-induced insulin resistance, as shown by the similar responses to insulin
11 administration in both normoxic and hypoxic TLR-4^{-/-} mice (Figure 1A,B).

12

13 **TLR-4 deficiency prevented the IH-induced epididymal adipose tissue inflammation**

14 The hypoxic epididymal adipose tissue of C57BL6 mice exhibited inflammatory phenotype
15 characterized by increased secretion of TNF- α and IL-6 (Figures 2A,B). The pro-
16 inflammatory effect of four weeks of IH at adipose tissue level is prevented in TLR-4^{-/-} mice,
17 as the levels of both secreted cytokines are similar of those of normoxic C57BL6 mice
18 (Figures 2A, B). However NF κ B-p50 activity is not modified by IH in epididymal adipose
19 tissue of C57BL6 (N, 100.0 \pm 42.1 vs IH, 70.6 \pm 25.9 u.a.) and TLR-4^{-/-} mice (N, 163.2 \pm 78.4
20 vs IH, 384.1 \pm 224.2 u.a.).

21

22 **TLR-4 deficiency prevented the IH-induced inflammatory vascular remodeling**

23 Four weeks of IH induces an inflammatory vascular remodeling in C57BL6 mice aorta,
24 characterized by an increased intima-media thickness (IMT) (Figure 3A) and an increased
25 NF κ B-p50 activity (Figure 3B). The TLR-4 deficiency prevented both the morphological and
26 inflammatory remodeling of arterial wall caused by IH, as the IMT and the NF κ B-p50 activity
27 are similar to those of normoxic C57BL6 mice (Figures 3A,B).

28

1 **DISCUSSION**

2 *Ce travail est encore en cours, et la discussion de la plupart des résultats est intégrée à celle*
3 *des autres études, dans la dernière partie de ce manuscrit de thèse. L'étude de l'activation de*
4 *la voie TLR-4/NFκB sera, entre autres, complétée par des dosages en RT-PCR quantitative*
5 *au niveau du tissu adipeux épидидymal et de l'aorte abdominale.*

6

7 The pathophysiology of OSA-induced vascular remodeling remains poorly understood. Here,
8 we show in non-obese C57BL6 mice that exposure to IH leads to EWAT inflammation,
9 associated with insulin resistance and increased intima-media thickness. These deleterious
10 effects are mediated at least in part through the pro-inflammatory TLR-4 pathway activation,
11 as the TLR-4 deficiency prevents the IH-induced metabolic and vascular alterations.

12 In lean mice, the hypoxic EWAT exhibited qualitative and quantitative modifications. IH
13 induces EWAT wasting and inflammation, characterized by increased release of two pro-
14 inflammatory cytokines (TNF-α and IL-6). This result is in agreement with our previous data
15 in non-obese ApoE^{-/-} mice exposed to 6 weeks of IH [12], and may be explain by local
16 hypoxia apparition [22] leading to EWAT dysregulation [23]. Exposure to IH also leads to
17 decreased insulin sensitivity, confirming previous studies in obese [24] and non-obese [25]
18 mice, or in healthy volunteers [26]. In parallel to EWAT and metabolic alterations, hypoxic
19 C57BL6 mice show inflammatory vascular remodeling, including increased activity of NFκB
20 activity and intima-media thickening.

21 The relationship between inflammation, insulin resistance and vascular remodeling is now
22 largely described in the literature [14], and may implicate the TLR-4/NFκB pathway. TLR-4^{-/-}
23 mice were exposed to IH or normoxia to assess the specific role of the TLR-4 receptor
24 activation in the cardiometabolic consequences of IH. After IH exposure, we show that TLR-
25 4 deficiency prevents the increased secretion of IL-6 and TNFα by the epididymal fat in
26 hypoxic mice. According to this data, and to previous studies in murine models of obesity
27 [17] [18], it seems that IH itself could activate TLR-4/NFκB pathway, in a similar manner to
28 that is described in the obesity. Furthermore, the lower epididymal inflammation, associated
29 with a correction of insulin resistance observed in hypoxic TLR-4^{-/-} mice, may explain the
30 beneficial effect on arterial remodeling of TLR-4 deficiency. Together, these results confirm
31 the important role of inflammation in the metabolic and vascular consequences associated to
32 IH.

33

1 REFERENCES

- 2 1. Somers VK, White DP, Amin R, Abraham WT, Costa F, Culebras A, Daniels S, Floras JS, Hunt
3 CE, Olson LJ, Pickering TG, Russell R, Woo M, Young T. Sleep apnea and cardiovascular disease: an
4 American Heart Association/American College Of Cardiology Foundation Scientific Statement from
5 the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education
6 Committee, Council on Clinical Cardiology, Stroke Council, and Council On Cardiovascular Nursing. In
7 collaboration with the National Heart, Lung, and Blood Institute National Center on Sleep Disorders
8 Research (National Institutes of Health). *Circulation* 2008; 118(10): 1080-1111.
- 9 2. Punjabi NM, Shahar E, Redline S, Gottlieb DJ, Givelber R, Resnick HE. Sleep-disordered
10 breathing, glucose intolerance, and insulin resistance: the Sleep Heart Health Study. *Am J Epidemiol*
11 2004; 160(6): 521-530.
- 12 3. Reichmuth KJ, Austin D, Skatrud JB, Young T. Association of sleep apnea and type II diabetes:
13 a population-based study. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172(12): 1590-1595.
- 14 4. Botros N, Concato J, Mohsenin V, Selim B, Doctor K, Yaggi HK. Obstructive sleep apnea as a
15 risk factor for type 2 diabetes. *Am J Med* 2009; 122(12): 1122-1127.
- 16 5. Togeiro SM, Carneiro G, Ribeiro Filho FF, Zanella MT, Santos-Silva R, Taddei JA, Bittencourt
17 LR, Tufik S. Consequences of obstructive sleep apnea on metabolic profile: a Population-Based
18 Survey. *Obesity (Silver Spring)* 2013; 21(4): 847-851.
- 19 6. Baguet JP, Hammer L, Levy P, Pierre H, Launois S, Mallion JM, Pepin JL. The severity of oxygen
20 desaturation is predictive of carotid wall thickening and plaque occurrence. *Chest* 2005; 128(5):
21 3407-3412.
- 22 7. Drager LF, Bortolotto LA, Lorenzi MC, Figueiredo AC, Krieger EM, Lorenzi-Filho G. Early signs
23 of atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172(5): 613-618.
- 24 8. Kent BD, Garvey JF, Ryan S, Nolan G, Dodd JD, McNicholas WT. Severity of obstructive sleep
25 apnoea predicts coronary artery plaque burden: a coronary CT angiography study. *Eur Respir J* 2013.
- 26 9. Dematteis M, Godin-Ribuot D, Arnaud C, Ribuot C, Stanke-Labesque F, Pepin JL, Levy P.
27 Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to
28 understanding the human disease. *ILAR J* 2009; 50(3): 262-281.
- 29 10. Dematteis M, Julien C, Guillermet C, Sturm N, Lantuejoul S, Mallaret M, Levy P, Gozal E.
30 Intermittent hypoxia induces early functional cardiovascular remodeling in mice. *Am J Respir Crit*
31 *Care Med* 2008; 177(2): 227-235.
- 32 11. Jun J, Polotsky VY. Sleep disordered breathing and metabolic effects: evidence from animal
33 models. *Sleep Med Clin* 2007; 2(2): 263-277.
- 34 12. Poulain L, Thomas A, Rieusset J, Casteilla L, Levy P, Arnaud C, Dematteis M. Visceral white fat
35 remodeling contributes to intermittent hypoxia-induced atherogenesis. *Eur Respir J* 2013: Accepted
36 for publication.
- 37 13. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol*
38 2010; 72: 219-246.
- 39 14. Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and
40 vascular diseases. *Eur Heart J* 2008; 29(24): 2959-2971.
- 41 15. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001; 1(2): 135-145.
- 42 16. Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(10):
43 725-734.
- 44 17. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty
45 acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2006; 116(11): 3015-3025.
- 46 18. Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, Araujo
47 EP, Vassallo J, Curi R, Velloso LA, Saad MJ. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents
48 diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56(8): 1986-1998.
- 49 19. Kim F, Pham M, Luttrell I, Bannerman DD, Tupper J, Thaler J, Hawn TR, Raines EW, Schwartz
50 MW. Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced
51 obesity. *Circ Res* 2007; 100(11): 1589-1596.

- 1 20. Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, Zhang W, Yano J, Doherty TM, Akira S, Rajavashisth TB,
2 Arditì M. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and
3 alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(29):
4 10679-10684.
- 5 21. Arnaud C, Beguin PC, Lantuejoul S, Pepin JL, Guillermet C, Pelli G, Burger F, Buatois V, Ribuot
6 C, Baguet JP, Mach F, Levy P, Dematteis M. The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced
7 by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition. *Am J Respir Crit Care Med* 2011:
8 184(6): 724-731.
- 9 22. Reinke C, Bevans-Fonti S, Drager LF, Shin MK, Polotsky VY. Effects of different acute hypoxic
10 regimens on tissue oxygen profiles and metabolic outcomes. *J Appl Physiol* 2011; 111(3): 881-890.
- 11 23. Trayhurn P, Wang B, Wood IS. Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of
12 tissue function in obesity? *Br J Nutr* 2008; 100(2): 227-235.
- 13 24. Polotsky VY, Li J, Punjabi NM, Rubin AE, Smith PL, Schwartz AR, O'Donnell CP. Intermittent
14 hypoxia increases insulin resistance in genetically obese mice. *J Physiol* 2003; 552(Pt 1): 253-264.
- 15 25. Iiyori N, Alonso LC, Li J, Sanders MH, Garcia-Ocana A, O'Doherty RM, Polotsky VY, O'Donnell
16 CP. Intermittent hypoxia causes insulin resistance in lean mice independent of autonomic activity.
17 *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175(8): 851-857.
- 18 26. Louis M, Punjabi NM. Effects of acute intermittent hypoxia on glucose metabolism in awake
19 healthy volunteers. *J Appl Physiol* 2009; 106(5): 1538-1544.
- 20
21

1 **FIGURE LEGENDS**

2

3 **Table. Weight and biological characteristics in C57BL6 and TLR-4^{-/-} mice exposed to**
4 **intermittent hypoxia or normoxia.**

5 Effects of TLR-4 deficiency on weight and biological alterations induced by intermittent
6 hypoxia (IH) or normoxia (N); *p<0.05 N/C57BL6 vs IH/C57BL6, \$p<0.05 IH/C57BL6 vs
7 IH/TLR-4^{-/-}, #p<0.05 N/TLR-4^{-/-} vs IH/TLR-4^{-/-}; (n=7-9 per group).

8

9 **Figure 1. TLR-4 deficiency prevented the IH-induced insulin resistance**

10 **(A)** Glucose variation during the 90 minutes intraperitoneal insulin tolerance test (IpITT) in
11 C57BL6 or TLR-4^{-/-} mice exposed to **1 week** of intermittent hypoxia (IH) or normoxia (N) ;
12 *p<0.05 N/C57BL6 vs IH/C57BL6; (n=7-9 per group). **(B)** Lowest blood glucose level during
13 the first 90 minutes (nadir); *p<0.05 N/C57BL6 vs IH/C57BL6, \$p<0.05 IH/C57BL6 vs
14 IH/TLR-4^{-/-} (n=7-9 per group).

15

16 **Figure 2. TLR-4 deficiency prevented the IH-induced epididymal adipose tissue**
17 **inflammation**

18 TNF- α **(A)** and IL-6 secretion **(B)** from EWAT of C57BL6 or TLR-4^{-/-} mice exposed to 4
19 weeks of intermittent hypoxia (IH) or normoxia (N) ; *p<0.05 N/C57BL6 vs IH/C57BL6,
20 \$p<0.05 IH/C57BL6 vs IH/TLR-4^{-/-}; (n=6-8 per group).

21

22 **Figure 3. TLR-4 deficiency prevented both the IH-induced intima-media thickening and**
23 **the IH-induced nuclear NF κ B activity**

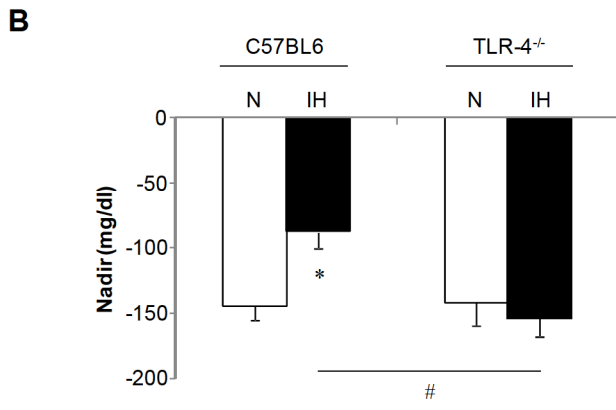
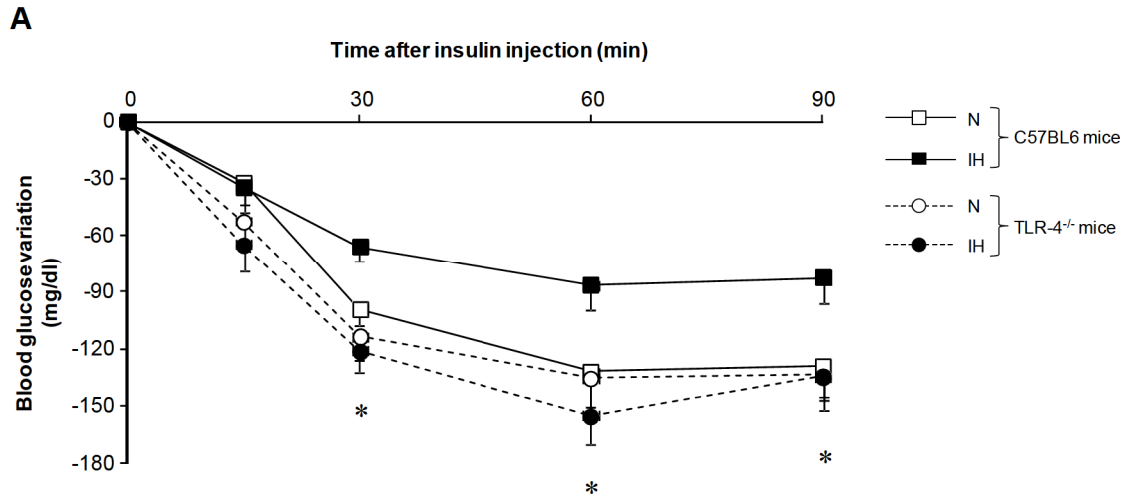
24 **(A)** Aortic intima-media thickness in C57BL6 or TLR-4^{-/-} mice exposed to 4 weeks of
25 intermittent hypoxia (IH) or normoxia (N); *p<0.05 N/C57BL6 vs IH/C57BL6; (n=5-6 per
26 group). **(B)** Aortic NF κ B-p50 activity in C57BL6 or TLR-4^{-/-} mice exposed to 4 weeks of
27 intermittent hypoxia (IH) or normoxia (N); *p<0.05 N/C57BL6 vs IH/C57BL6; (n=5-6 per
28 group).

Table

	C57BL6		TLR-4^{-/-}	
	N	IH	N	IH
Age mice (weeks)	17	17	17	17
Mice weight (g)				
<i>Day 0</i>	28.1 ± 0.4	29.1 ± 0.6	26.6 ± 1.0	26.3 ± 1.1 ^{\$}
<i>Day 7</i>	29.0 ± 0.5	24.8 ± 0.5*	27.0 ± 0.9	24.5 ± 0.9 [#]
<i>Day 28</i>	26.3 ± 0.6	23.9 ± 0.4*	25.1 ± 0.7	23.6 ± 0.8
Epididymal AT weight (day 28)				
<i>mg</i>	385.1 ± 20.3	288.0 ± 17.6*	385.6 ± 22.0	346.1 ± 18.1 ^{\$}
<i>% of body weight</i>	1.46 ± 0.07	1.20 ± 0.06	1.55 ± 0.11	1.50 ± 0.11 ^{\$}
Parameters at day 28 (fasting 10h)				
Hematocrit (%)	39.4 ± 0.7	43.4 ± 0.4*	42.7 ± 0.6	43.7 ± 0.9
Total cholesterol (g/l)	92.2 ± 6.5	91.8 ± 7.8	83.4 ± 4.7	89.3 ± 7.8
NEFA (mmol/l)	0.65 ± 0.10	0.54 ± 0.06	0.73 ± 0.09	0.75 ± 0.08
Blood glucose (mg/dl)	98.6 ± 4.2	101.5 ± 7.4	89.6 ± 3.4	88.1 ± 5.4
Serum insulin (ng/ml)	0.023 ± 0.003	0.012 ± 0.002	0.033 ± 0.007	0.023 ± 0.004

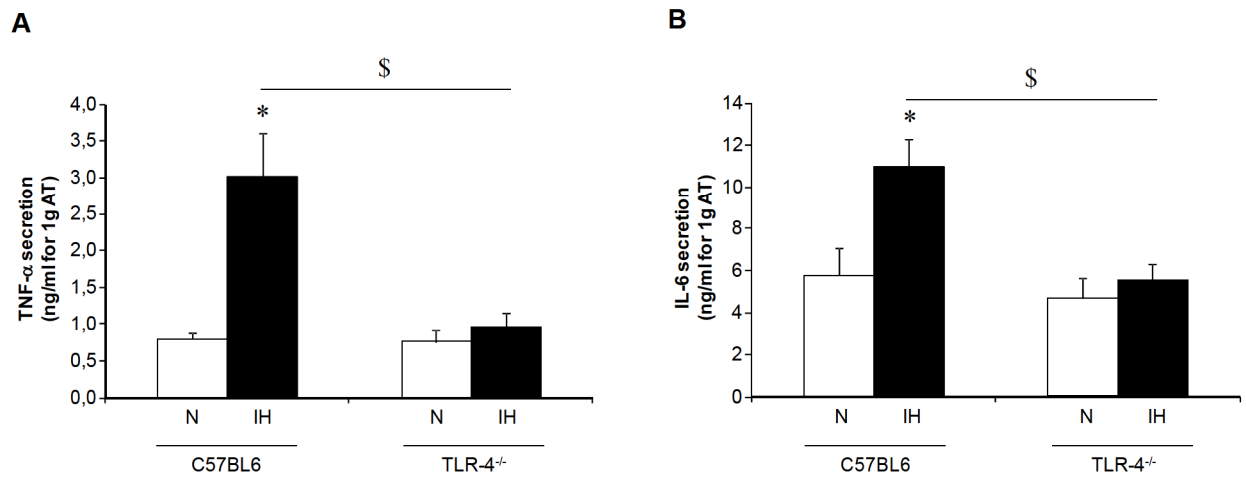
1
2
3
4

Figure 1



1
2

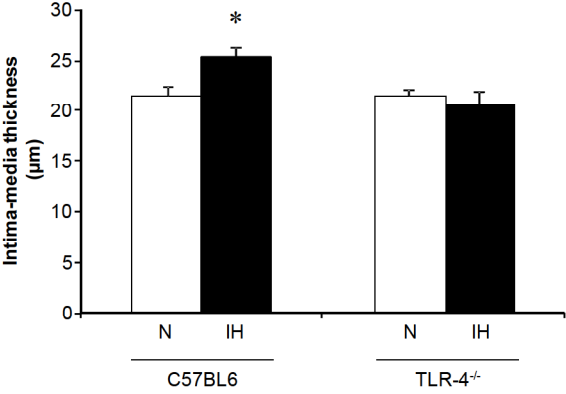
Figure 2



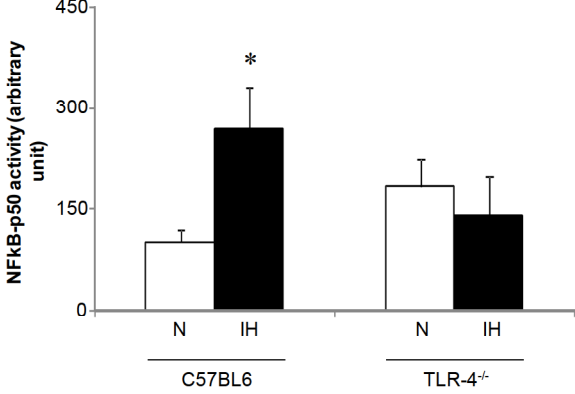
- 1
- 2
- 3
- 4
- 5

Figure 3

A



B



- 1
- 2
- 3
- 4

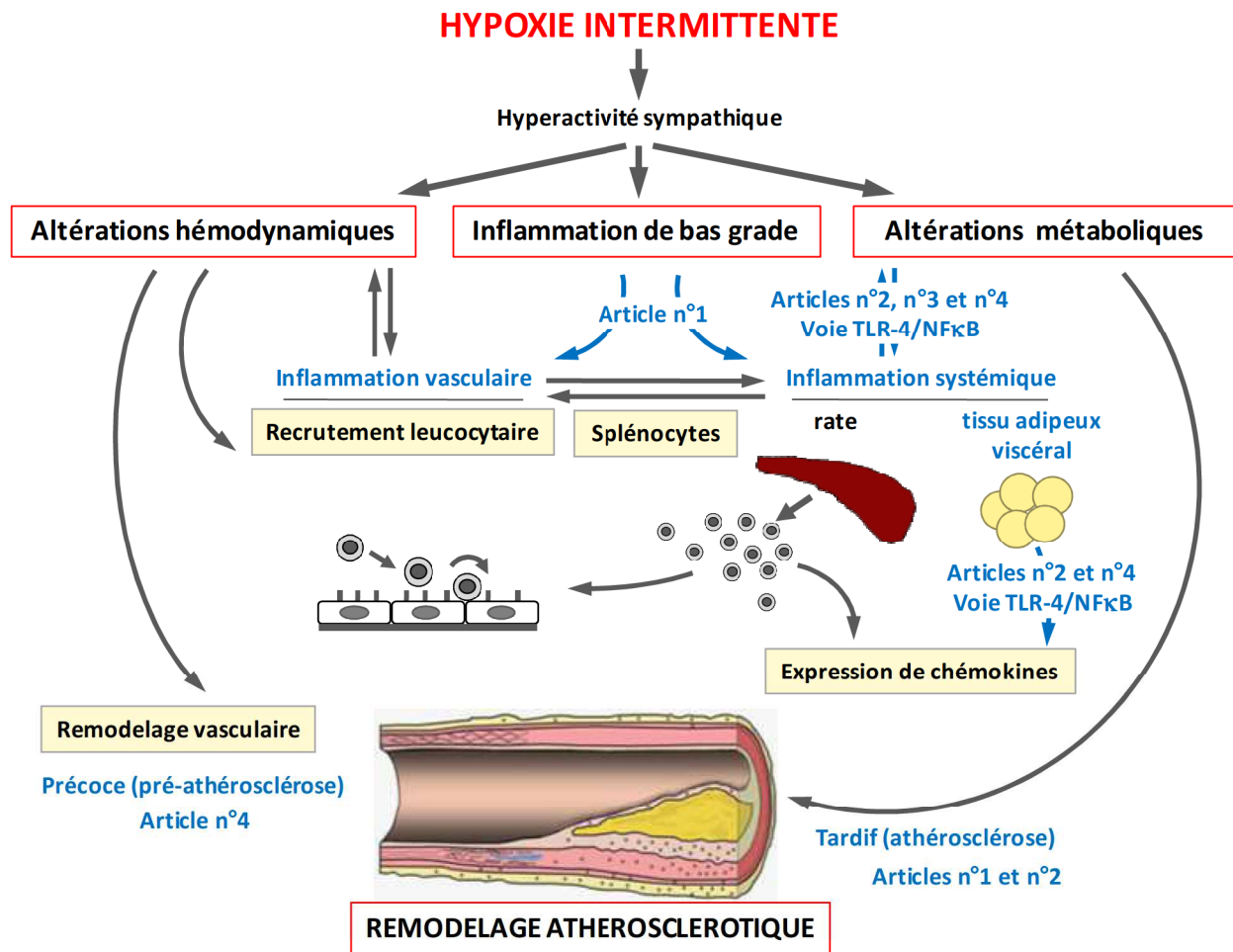


Figure 22. Résumé des résultats décrits dans le travail n°4. Ces données montrent que le récepteur TLR-4 est impliqué dans les atteintes métaboliques (insulino-résistance), adipeuses (sécrétion de cytokines pro-inflammatoires) et vasculaires (remodelage vasculaire précoce) induites par une exposition à l'hypoxie intermittente.

4. Discussion des résultats

Grâce aux résultats obtenus au cours de ma thèse, nous avons pu montrer que le tissu adipeux viscéral était sensible à l'HI, puisque suite à une exposition au stimulus hypoxique, il subit un remodelage majeur, à la fois morphologique et inflammatoire. De plus, grâce à une approche chirurgicale originale, nous avons également démontré que ces altérations adipeuses contribuent, en dehors de tout contexte d'obésité, aux dysfonctions métabolique et vasculaire associées à l'HI. Enfin, les résultats préliminaires de notre dernière étude suggèrent que l'activation de la voie pro-inflammatoire TLR-4/NFκB serait impliquée dans les conséquences métaboliques et vasculaires observées suite à une exposition à l'HI. L'ensemble de ces données confirment l'importance de la composante inflammatoire, et notamment de l'inflammation du tissu adipeux viscéral, dans les atteintes métaboliques et vasculaires induites par l'HI.

4.1. Pertinence du modèle au regard de la pathologie humaine

Tous les travaux de cette thèse ont été réalisés à l'aide d'un dispositif d'exposition à l'HI, développé au laboratoire. Dans le modèle expérimental utilisé au cours de cette thèse, les cycles d'HI se composent de 30 secondes de normoxie (FiO_2 à 21 %) suivies de 30 secondes d'hypoxie (FiO_2 à 5%). Avec un index d'évènement à 60 par heure et une saturation artérielle en oxygène (SpO_2) minimale avoisinant les 60 %, ce modèle mime une forme sévère du SAOS, qui concerne moins de 10% des patients apnéiques. Ce stimulus ne représente donc pas la forme majoritaire de ce syndrome observée dans la population apnéique mais cette sévérité est justifiée. En effet, un des objectifs de nos travaux de thèses était d'identifier les effets propres de l'HI sur le plan adipeux, vasculaire et métabolique. Les souris C57Bl6 et les souris TLR-4^{-/-} exposées au stimulus ne présentent pas de co-morbidités puisqu'elles ne sont ni obèses et ni dyslipidémiques, ni de susceptibilité ou de fragilité d'organe. La sévérité de ce stimulus est donc nécessaire pour observer les effets de l'HI, au niveau adipeux, vasculaire et métabolique, et ce, de façon reproductible chez des animaux sans co-morbidité. Outre la somnolence diurne, la sévérité du syndrome est également basée sur deux critères, à savoir la désaturation artérielle en oxygène et la fréquence des évènements respiratoires (index d'apnées-hypopnées, IAH). Notre modèle expérimental n'est donc que partiellement isomorphe, dans la mesure où seule la désaturation en oxygène n'est pris en compte afin de modéliser la sévérité du SAOS.

Lors des apnées nocturnes que subissent les patients, une diminution de la PaO_2 (hypoxie) mais également une augmentation de la $PaCO_2$ (hypercapnie), sont observées. Cette hypercapnie intermittente s'explique par un défaut d'évacuation du CO_2 lié à l'obstruction des VAS, et est à l'origine d'une acidose respiratoire. La modification du pH artériel (acidose respiratoire) en réponse à l'hypercapnie constituer un élément confondant supplémentaire chez les patients apnéiques. Contrairement à la pathologie humaine, les animaux exposés au stimulus hypoxique présentent une diminution intermittente de la $PaCO_2$ (hypocapnie) induite par une hyperventilation compensatrice. Actuellement, la phase hypoxique du cycle est réalisée grâce à un mélange gazeux d'oxygène et d'azote, permettant de faire diminuer la FiO_2 dans les cages de souris, sans variation de volume gazeux. Afin de rapprocher notre modèle du syndrome apnéique, nous pourrions envisager d'enrichir ce mélange gazeux avec du dioxyde de carbone, afin de recréer artificiellement une hypercapnie intermittente, comparable à celle observée chez les patients SAOS. Cependant, d'après Fletcher *et al*, il

semble que l'hypercapnie associée au SAOS ne joue qu'un rôle mineur dans les modifications de pression artérielle associées au SAOS (95) (96). D'après ces données, la pertinence d'un modèle hypoxique-hypercapnique intermittent reste donc à déterminer.

Chez le patient, l'installation d'apnées répétitives au cours de la nuit se fait progressivement, lorsqu'un déséquilibre apparaît entre la force générée par la contraction des muscles dilatateurs du pharynx et la pression inspiratoire négative (17). D'autre part, Sforza *et al* sont les premiers à émettre l'hypothèse selon laquelle le ronflement précéderait l'apparition d'un SAOS et d'une somnolence, suggérant ainsi que le SAOS est une maladie progressant naturellement. Les données cliniques sont contradictoires, puisque certaines équipes décrivent une aggravation des symptômes chez les patients SAOS légers à modérés (304) (181), alors que d'autres groupes ne décrivent aucune modification (92) (246), voire une amélioration (128), des symptômes au cours du temps. Malgré ces discordances, il apparaît que la prévalence et la sévérité du SAOS évolue au cours du temps, du fait notamment de l'apparition de co-morbidités telles que l'obésité (251) (226). Dans notre modèle animal, lorsque les souris sont placées dans le dispositif, l'exposition aux cycles hypoxiques est brutale. A l'opposé du SAOS, les animaux subissent donc de façon immédiate une désaturation en oxygène très importante (SpO_2 à environ 60 %), semblable à celle d'un SAOS sévère. Cette exposition immédiate peut être à l'origine d'une inflammation, et induire de nombreux mécanismes en réponse au stress de cette exposition. Le cortisol et la noradrénaline, les deux principales hormones sécrétées dans ces conditions, ont des effets délétères au niveau métabolique entre autres, en modifiant la prise alimentaire et en activant la lipolyse du tissu adipeux par exemple. Ce stress peut avoir des effets majeurs sur certains paramètres cardiovasculaires et métaboliques, et principalement ceux dont les changements sont rapides (glycémie, par exemple). Ces hormones sécrétées pourraient donc aggraver les effets liés à l'HI elle-même. Exposer progressivement les animaux avec une aggravation du stimulus hypoxique sur plusieurs jours permettrait de répondre à cette problématique. Cependant, cette approche expérimentale est très contraignante, et serait difficile à mettre en place, notamment vis-à-vis des autres expérimentateurs qui utilisent le dispositif en même temps. Il faut également noter que les souris utilisées dans nos expérimentations sont des jeunes adultes (âgées de 17 à 20 semaines, voire de 8 semaines), ce qui ne correspond pas tout à fait à la réalité de la pathologie apnéique, qui touche majoritairement les hommes d'âges moyen (40-50 ans). Cette limite du modèle est liée principalement au coût financier que représente l'achat ou l'élevage à la PHTA d'animaux plus âgés (plus de 6 mois). D'après la

littérature, les effets du SAOS sur les personnes âgées (65 ans ou plus) sont très peu décrits, mais selon les résultats de Sforza *et al*, il semble que le lien entre le risque vasculaire cérébral (associé au développement de l'athérosclérose carotidienne) et les troubles du sommeil ne soit pas significatif chez les patients apnéiques âgés de 65 ans. Ce lien serait probablement lié à la coexistence d'autres facteurs athérogènes tels que le vieillissement lui-même (305). Malgré les contraintes de coût et de temps liées à un tel protocole, il serait pertinent de laisser vieillir les animaux dans le dispositif d'HI, en augmentant progressivement la sévérité du stimulus hypoxique.

Les rongeurs sont très souvent employés dans les modèles d'HI de part leur facilité à être utilisés lors des expérimentations de longue durée, ce qui permet de mimer la pathologie humaine sur le long court. Cependant un des principaux inconvénients de ces modèles dans l'étude des troubles respiratoires du sommeil, est le profil du sommeil de ces animaux, très différent de celui des humains. Contrairement à l'Homme, dont la durée du sommeil varie entre 6 et 8 heures consécutives, le rongeur présente plusieurs phases de veille et de sommeil durant les 24 heures du cycle nyctéméral, les phases de sommeil prédominant pendant le jour. Cette différence est inhérente au modèle animal et ne peut être modifiée. Rubin *et al* mesurent en 2003 le nombre et la durée des événements respiratoires chez des souris A/J et DBA/2J (283). Grâce à un système d'hypoxie asservi à la mesure du sommeil, ils montrent qu'une exposition au stimulus hypoxique toutes les 30 à 60 secondes (60 à 120 désaturations par heure, 8 heures par jour) correspondrait le mieux à la « physiologie » de la souris.

D'après l'équipe de Polotsky *et al*, le stimulus hypoxique entraîne une altération du sommeil chez les rongeurs (257). Dans cette étude expérimentale, une polysomnographie a été réalisée chez des souris C57Bl6, soumises soit à une HI soit à une fragmentation du sommeil, et ce durant 5 jours. L'exposition au stimulus hypoxique et à la fragmentation du sommeil a été réalisée au cours de la phase diurne du cycle nyctéméral. Leurs résultats montrent que l'HI entraîne des perturbations importantes du sommeil, à la fois pendant la phase diurne (exposition à l'HI) mais également pendant la phase nocturne, en l'absence d'HI. Le modèle d'HI n'est donc pas un modèle « pur » puisque l'HI elle-même entraîne des anomalies du sommeil chez les animaux exposés.

Une des composantes du SAOS sont les efforts respiratoires nocturnes, à l'origine d'une inflammation systémique (221). Ce processus inflammatoire pourrait représenter un des mécanismes expliquant l'association qu'il existe entre le SAOS et la survenue d'une dissection aortique (292). Les efforts respiratoires nocturnes observés au cours de la

pathologie apnéique sont absents dans notre modèle d'HI, alors qu'ils semblent être impliqués dans les altérations vasculaires associées au SAOS.

D'une façon générale, le stimulus hypoxique utilisé au cours de cette thèse présente un certain nombre de limites reconnues, liées principalement au fait que cet outil expérimental n'est, par définition, qu'un modèle du SAOS. Les différents éléments décrits précédemment peuvent interférer, à différents degrés, dans les résultats observés après une exposition à l'HI et gêner, dans une certaine mesure, leurs extrapolation à la pathologie humaine. Malgré cela, le modèle d'HI est validé et largement utilisé par d'autres groupes, afin d'étudier la contribution de l'HI dans les mécanismes physiopathologiques du SAOS (68).

4.2. Résultats expérimentaux et liens physiopathologiques avec le SAOS

L'ensemble des résultats décrits dans ce manuscrit montre que le tissu adipeux viscéral est sensible à l'HI, puisque suite à une exposition au stimulus hypoxique, il subit un remodelage à la fois morphologique et inflammatoire. Ces altérations au niveau adipeux contribuent, en dehors de tout contexte d'obésité, aux dysfonctions métabolique et vasculaire associées à l'HI.

▪ Remodelage vasculaire associé à l'hypoxie intermittente

Les différentes sévérités de l'atteinte vasculaire suite à l'HI ont été évaluées chez 2 souches de souris différentes, à savoir les souris C57Bl6 et les souris *knock-out* pour l'apolipoprotéine E (souris ApoE^{-/-}). Extrapolée au patient SAOS, l'utilisation de ces différentes souches permet d'évaluer 2 types de patients apnéiques, le premier sans co-morbidité, et le second présentant des risques de complications vasculaires.

Chez les souris C57Bl6, qui sont athérorésistantes, le remodelage vasculaire délétère associé à l'HI se traduit par une augmentation l'EIM aortique après 4 semaines d'exposition à ce stimulus (travail n°4). Ce remodelage aortique précoce s'accompagne d'une inflammation vasculaire, caractérisé par une augmentation de l'activité du facteur de transcription pro-inflammatoire NFκB dans le groupe hypoxique, comparé au groupe normoxique. Ces résultats sont en accord avec ceux déjà observés chez des souris C57Bl6 exposées à 2 semaines d'HI (14) (69). L'effet de l'HI au niveau vasculaire a également été étudié à un stade plus tardif de l'athérogenèse, chez des souris ApoE^{-/-}. Cette souche de souris développe spontanément des plaques d'athérosclérose, contrairement aux souris C57Bl6. Une exposition à 2 (publication n°1) (15) et 6 semaines d'HI (publication n°2) (258) accélère le processus d'athérogenèse chez des souris ApoE^{-/-} non-obèses et nourries avec un régime standard, comme le montre l'augmentation des lésions athéromateuses au niveau de l'aorte thoraco-abdominale et des valves aortiques des souris hypoxiques, comparé aux souris normoxiques. Ces travaux confirment l'effet pro-athérogène de l'HI, décrit également par l'équipe de Polotsky *et al* (298) et celle de Liu *et al* (324) chez des souris C57Bl6 nourries avec un régime riche en cholestérol, ainsi que chez des souris ApoE^{-/-} nourries avec un régime standard (89) (104). L'HI joue donc un rôle majeur dans l'apparition du remodelage vasculaire délétère – pré-athérosclérotique et athérosclérotique – observé chez les patients apnéiques. D'un point de

vue clinique, 3 grandes études décrivent une corrélation positive entre l'atteinte vasculaire et la sévérité du SAOS, évaluée par l'IAH (22) (76) (212). De plus, Drager *et al* montrent que 4 mois de traitement par PPC permettent d'améliorer significativement l'atteinte vasculaire chez les patients présentant un SAOS sévère (75). L'HI a donc des effets délétères au niveau vasculaire, mais ils restent modestes dans les souches non susceptibles de développer spontanément les lésions vasculaires, telles que les souris C57Bl6. Chez les patients SAOS, l'association de cofacteurs (alimentation riche en lipides et/ou tabac et/ou sédentarité) est nécessaire pour que le caractère délétère de l'HI s'exprime. D'après nos données, l'HI induit un remodelage vasculaire notamment *via* la composante inflammatoire. Une majoration de cette inflammation pourra contribuer à l'évolution des lésions. Une bonne caractérisation des sujets à risque concernant leurs antécédents familiaux, ou encore leur mode de vie, est donc essentielle afin d'évaluer au mieux leur pronostic et d'optimiser l'approche thérapeutique.

Chez les apnéiques, il existe une association indépendante entre la sévérité de l'hypoxie et les altérations vasculaires, mais les mécanismes à l'origine de ces atteintes restent à préciser. Dans l'obésité, le tissu adipeux viscéral – et principalement son inflammation – joue un rôle central dans la physiopathologie des complications vasculaires de cette pathologie, par l'intermédiaire notamment de son activité sécrétoire (118). Dans un contexte de SAOS, en parallèle d'une inflammation systémique et vasculaire, nous avons évalué les effets de l'HI sur l'inflammation du tissu adipeux viscéral, qui pourrait contribuer au remodelage vasculaire induit par l'HI.

- **Hypoxie intermittente et remodelage du tissu adipeux viscéral**

Les travaux réalisés au cours de cette thèse montrent que, en dehors de tout contexte d'obésité, l'HI elle-même a des effets délétères sur le tissu adipeux, et en particulier le compartiment épидидymal. D'après les données supplémentaires obtenues chez les souris ApoE^{-/-} et décrites dans ce manuscrit, l'exposition à 6 semaines d'HI induit peu ou pas d'effet sur le tissu adipeux sous-cutané, d'un point de vue inflammatoire et morphologique (258). L'infiltrat macrophagique du tissu adipeux sous-cutané des souris normoxiques et hypoxiques est très inférieur à celui du tissu adipeux épидидymal. Par ailleurs, l'HI n'a pas d'effet sur le recrutement de macrophages, ni sur l'expression de MCP-1 et de PAI-1, comparé au tissu adipeux épидидymal. Ces données rejoignent les résultats décrits chez les patients obèses, pour

lesquels le recrutement macrophagique se fait majoritairement au niveau du tissu adipeux viscéral, par rapport au tissu adipeux sous-cutané (220) (334). Les 6 semaines d'HI n'entraînent pas non plus de fonte de ce territoire (publication n°3), contrairement au tissu adipeux épидидymal des souris hypoxiques. L'étude récente de Yao *et al* concernant l'altération de la clairance des lipoprotéines après une exposition à l'HI, montre que l'expression de l'Angptl-4 dans le tissu adipeux sous-cutané n'est pas modifiée par l'HI, contrairement au tissu adipeux épидидymal (387). Cette surexpression sélective pourrait être s'expliquer par la régulation différentielle de HIF-1 α dans ces tissus, liée à la différence de sévérité de l'hypoxie (387). En accord avec cette hypothèse, les effets morphologiques et inflammatoires de l'HI observés dans nos travaux sont tissu-dépendants et touchent principalement le territoire épидидymal.

Chez des souris ApoE^{-/-}, une exposition à l'HI induit des changements morphologiques du tissu adipeux épидидymal, qui se traduisent par une désorganisation adipocytaire, la présence de gouttelettes lipidiques multiloculaires et une surexpression d'UCP-1 (258), une protéine découplante spécifique du tissu adipeux brun. Ces résultats suggèrent un changement phénotypique du tissu adipeux blanc vers un phénotype brun, couramment appelé tissu adipeux « *brite* » en référence au tissu adipeux « *brown-in-white* » (253) (371). Nous avons complétée la caractérisation phénotypique du tissu adipeux épидидymal suite à l'HI par une approche par RT-PCR quantitative, chez des souris C57Bl6 non-obèses. Nos résultats préliminaires montrent que l'expression du gène *Homeobox (Hox)c9*, marqueur du tissu adipeux blanc, et des gènes *Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator (PGC)-1 α* et UCP-1, 2 marqueurs du tissu adipeux brun, est augmentée après 6 semaines ainsi qu'après 24 semaines d'exposition à l'HI. Le rôle de cette plasticité adipeuse reste à déterminer, mais pourrait être liée au statut énergétique des animaux (328), ou encore à la chute de température corporelle observée durant l'exposition à l'HI (25).

Les modifications morphologiques épидидymales sont également caractérisées par une hypotrophie adipocytaire (258) ainsi qu'une fonte de ce territoire (258) (publication n°2). Ces résultats évoquent une augmentation de la lipolyse adipocytaire, qui est confirmée par les dosages plasmatiques du glycérol et des acides gras libres chez les souris ApoE^{-/-}. D'après nos résultats, ces souris présentent une augmentation des concentrations d'acides gras libres et de glycérol, les deux produits de la lipolyse, suite à une exposition à l'HI. Les données de l'équipe de Polotsky *et al* décrivent également une augmentation des taux d'acides gras libres

après 4 semaines d'HI chez des souris ApoE^{-/-} (52) et après 5 jours d'HI chez une souche de souris C57Bl6x129 (173). Cependant, dans notre étude réalisée chez des souris C57Bl6 et exposées à 4 semaines d'HI (travail n°4), nous ne retrouvons pas cette augmentation d'acides gras libres et de glycérol. Cette discordance est également observée dans d'autres études expérimentales, où 12 semaines d'HI entraînent une augmentation des taux d'acides gras libres chez des souris ApoE^{-/-} (142), alors qu'ils ne sont pas modifiés chez des souris C57Bl6 hypoxiques après la même durée d'exposition (299). Ces résultats pourraient s'expliquer par les différences liées à nos modèles animaux, à savoir l'âge des animaux ou encore la souche de souris utilisée. Au cours du SAOS, une hyperactivité sympathique est observée, en réponse à l'HI. Cette activation pourrait participer à la stimulation de la lipolyse, et donc à l'augmentation du taux d'acides gras libres plasmatiques déjà décrite chez les patients apnéiques (27). De plus, les résultats de l'équipe de Barcelo *et al* montrent que les niveaux d'acides gras libres circulants sont indépendamment associés à l'IAH, confirmant le lien entre l'HI et la sécrétion d'acides gras libres (27).

La fonte épидидymale observée après l'HI chez les souris ApoE^{-/-} (258) et C57Bl6 (publication n°3 et travail n°4) est absente chez les souris TLR-4^{-/-}, confirmant le lien qu'il existe entre l'hyperactivité lipolytique et l'inflammation, déjà décrit dans l'obésité. En effet, chez des patients obèses, l'augmentation de l'activité lipolytique des adipocytes est associée à une infiltration macrophagique (385). Au niveau du compartiment adipeux, des signaux exogènes comme les acides gras libres sont à l'origine d'une réponse inflammatoire, par l'intermédiaire de l'activation du récepteur TLR-4 et des voies de signalisation intracellulaires associées, telle que la voie dépendante de NFκB (335). Cette atteinte adipeuse est également observée après 6 semaines d'HI chez des souris ApoE^{-/-}. Elle se caractérise par une augmentation du recrutement de macrophages, une surexpression de MCP-1 et une sécrétion accrue de deux cytokines pro-inflammatoires, IL-6 et TNF-α (258). Ces résultats sont en accord avec ceux observés dans le travail n°4 réalisé chez des souris C57Bl6 exposées durant 4 semaines à l'HI. La sécrétion de TNF-α et d'IL-6 par le tissu adipeux épидидymal est augmentée significativement chez les souris hypoxiques, comparé aux souris normoxiques. En dehors de toute obésité, le stimulus hypoxique a donc des conséquences majeures au niveau du tissu adipeux épидидymal, qui acquiert alors un phénotype inflammatoire semblable à celui observé dans un contexte d'obésité (237). Exposé à l'HI, un tissu en quantité normale devient alors pathologique, et contribuerait aux complications vasculaires et métaboliques induites par ce

stimulus. Ces données confirment l'importance du phénotypage et de la prise en charge spécifique de chaque patient, en particulier les patients non-obèses.

D'après nos données chez les souris TLR-4^{-/-} (travail n°4), il apparaît que l'augmentation de la sécrétion d'IL-6 et TNF- α liée à l'HI, est absente chez les souris TLR-4^{-/-}, traduisant l'implication de ce récepteur dans l'inflammation du tissu adipeux HI-dépendante. L'activation de cette voie au cours d'une inflammation est très bien décrite dans un contexte d'obésité. D'après Shi *et al*, la surexpression, au niveau adipeux, de gènes codant pour TNF- α et IL-6 induite par 39 semaines de régime gras, est abolie chez les souris TLR-4^{-/-} (312). En 2007, les résultats obtenus chez des souris C3H/HeJ, présentant également une déficience pour le TLR-4 et nourries avec un régime gras durant 8 semaines, corroborent ceux de Shi *et al* (359). D'après ces études expérimentales, et au vu de nos résultats, l'HI elle-même, hors obésité, semble entraîner une activation de la voie TLR-4/NF κ B, de façon comparable à ce qui est décrit dans l'obésité. Les données du travail n°4 confirment donc l'importance des phénomènes inflammatoires liés à l'HI. L'analyse détaillée du tissu adipeux épидидymal chez les souris TLR-4^{-/-} et leur groupe contrôle C57Bl6 est en cours. Elle sera complétée par des dosages en RT-PCR afin d'évaluer l'effet de l'HI sur l'activation de la voie TLR-4/NF κ B, l'expression de cytokines inflammatoires, et la morphologie des adipocytes. Chez les patients apnéiques, une étude très récente décrit une augmentation de l'expression des récepteurs TLR-4 et TLR-2 à la surface de monocytes circulants, comparé aux sujets contrôles et ce, indépendamment de l'IMC et du rapport taille-hanche (3). Chez ces patients, cette surexpression s'accompagne d'une activation de NF κ B au niveau monocytaire, et d'une sécrétion accrue de TNF- α , d'IL-6 et d'interféron (IFN) - γ , une cytokine pro-inflammatoire. De plus, 8 semaines de traitement par PPC permettent de corriger la surexpression du TLR-2 et 4, ainsi que l'augmentation de sécrétion des cytokines (3). Ces données cliniques, ainsi que nos résultats, suggèrent que la voie TLR-4/NF κ B est impliquée dans la réponse inflammatoire associée à l'HI, et pourrait ainsi participer à la progression de l'athérosclérose observée au cours du SAOS.

En plus des atteintes vasculaires, les altérations du tissu adipeux viscéral peuvent également être à l'origine de dysfonctions métaboliques, dans la mesure où ce territoire joue un rôle primordial dans la régulation de l'homéostasie glucido-lipidique. Au cours de ces travaux de thèse, nous avons donc également étudié l'impact d'une exposition à l'HI au niveau du

métabolisme lipidique et glucidique, chez des souris non-obèses soumises au stimulus hypoxique.

- **Désordres métaboliques induits par l'hypoxie intermittente**

Les résultats des publications n°1 et 2 obtenues chez les souris ApoE^{-/-} confirment l'effet délétère de l'HI sur le métabolisme lipidique déjà décrit par d'autre groupe (80) (142), puisqu'il apparaît que 2 (15) et 6 (258) semaines d'exposition à l'HI induisent une augmentation du cholestérol total, du LDL-cholestérol et des triglycérides. Ce déséquilibre lipidique constitue une étape importante dans l'initiation du processus d'athérosclérose (119). En 2012, Schwartz et Reaven décrivent dans une revue bibliographique le lien qui existe entre les lipoprotéines riches en triglycéride et l'augmentation du risque cardiovasculaire (303). En effet, la lipolyse de ces lipoprotéines entraîne une inflammation vasculaire par l'intermédiaire du relargage de lipides pro-inflammatoires (acides gras et lipides oxydés), et par l'activation de la voie pro-inflammatoire TLR-4/NFκB au niveau de la paroi artérielle par les acides gras relargués (303). Ce processus participe ainsi au développement de l'athérosclérose *via* le TLR-4, en parallèle de l'incorporation des lipides oxydés par les macrophages (formation de cellules spumeuses).

Nos travaux confirment également l'effet délétère de l'HI sur la sensibilité à l'insuline, que d'autres équipes ont déjà montré chez des souris obèses (255) et non-obèses (132), ainsi que chez des volontaires sains exposés à 14 nuits d'HI (183). Chez des souris ApoE^{-/-}, l'HI aggrave l'insulino-résistance des animaux (258), et chez des souris C57Bl6, elle participe à l'altération de la sensibilité à l'insuline (publication n°3 et travail n°4). Chez des patients apnéiques obèses, l'augmentation de l'IAH est associée, de façon indépendante à l'IMC, à une diminution de la sensibilité à l'insuline, après une analyse par régression linéaire multiple (266). Chez des patients apnéiques obèses et non-obèses, Ip *et al* montrent également que l'insulino-résistance est associée à la sévérité du SAOS, évaluée par l'IAH et la désaturation en oxygène (134). Ces données cliniques confirment l'importance du stimulus hypoxique dans l'apparition d'une insulino-résistance associée au SAOS.

Chez les personnes obèses, ou présentant un surpoids pathologique, le lien entre les altérations inflammatoires du tissu adipeux viscéral et les complications métaboliques est largement décrit (233) (184) (349). D'après des études expérimentales réalisées chez des modèles murins d'obésité induits par un régime riche en gras et riche en cholestérol, l'activation de la

voie pro-inflammatoire TLR-4/NFκB constituerait un des mécanismes reliant immuno-inflammation et désordres métaboliques de l'obésité (236). Dans notre modèle d'HI, l'insulino-résistance induite chez les souris C57Bl6 est absente chez les souris TLR-4^{-/-}. Ces données confirment le rôle de l'inflammation, et notamment de l'activation de la voie TLR-4/NFκB, dans l'apparition des dysfonctions métaboliques et inflammatoires induites par l'HI.

Dans un contexte de SAOS, l'implication du tissu adipeux viscéral dans les atteintes métaboliques et vasculaires associées au syndrome est méconnue, du fait notamment des effets confondants liés à l'obésité. Chez des souris non-obèses, une approche chirurgicale (ablation du tissu adipeux épидидymal) nous a permis de déterminer l'implication des altérations de ce tissu dans les modifications métaboliques et vasculaires liées à la composante hypoxique du syndrome apnéique.

▪ Rôle spécifique du tissu adipeux viscéral dans les altérations métaboliques et vasculaires associées à l'hypoxie intermittente

Les stratégies expérimentales utilisées au cours de cette thèse confirment l'importance de la composante inflammatoire dans l'atteinte vasculaire associée à l'HI, et nous ont permis de montrer qu'en réduisant les altérations du tissu adipeux viscéral, nous améliorons cette atteinte vasculaire. En revanche, l'utilisation de 2 souches de souris distinctes (C57Bl6 et ApoE^{-/-}) conduit à des résultats discordants quant aux effets de la lipectomie sur la régulation de l'homéostasie glucidique, qui pourraient s'expliquer par des différences de sensibilité à l'HI en fonction des souches de souris.

D'après nos résultats décrits chez les souris ApoE^{-/-}, la lipectomie épидидymale permet de corriger la dyslipidémie et de ralentir le développement des lésions athéromateuses induites par le stimulus hypoxique (258). Un déséquilibre lipidique constitue une des premières étapes du processus athérogène, et les effets bénéfiques de la lipectomie au niveau vasculaire pourraient être liés, en partie, à la correction des dysfonctions métaboliques que nous observons. En effet, chez les souris hypoxiques lipectomisées, l'hypercholestérolémie et l'hypertriglycéridémie sont corrigées. Le ralentissement de l'athérogenèse chez ce même groupe d'animaux pourrait également s'expliquer par l'absence d'inflammation du tissu adipeux viscéral, dont la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires participe au

développement des lésions. Chez les souris TLR-4^{-/-}, l'augmentation de l'EIM et de l'activité au niveau aortique de NFκB induites par l'HI sont abolies, suggérant que l'activation de la voie pro-inflammatoire TLR-4/NFκB est impliquée dans l'atteinte vasculaire induite par le stimulus hypoxique. Au vu du lien qui existe entre l'insulino-résistance et la dysfonction endothéliale (106) (31), l'effet bénéfique de la déficience pour le TLR-4 sur le remodelage vasculaire pourrait s'expliquer par la moindre inflammation du tissu adipeux épididymal observée chez les souris TLR-4^{-/-}, ainsi que par l'absence d'insulino-résistance chez ces mêmes animaux. D'après les données de la littérature, il apparaît que le rôle des adipocytes blancs dans la sensibilité à l'insuline soit lié à leur localisation. En effet, selon les études de Preis *et al* (261) et de McLaughlin *et al* (206), le tissu adipeux viscéral est associé plus fortement à une insulino-résistance que le tissu adipeux sous-cutané. Chez les souris C57Bl6 hypoxiques, la lipectomie permet d'améliorer la sensibilité à l'insuline (publication n°3). Cet effet bénéfique pourraient donc s'expliquer d'une part, par une inhibition des altérations inflammatoires du tissu adipeux épididymal induites par l'HI (travail n°4), et d'autre part, par une redistribution préférentielle du tissu adipeux vers le territoire sous-cutané (publication n°3). Chez les souris ApoE^{-/-} exposées à la normoxie, la lipectomie épididymale entraîne une altération de l'insulino-sensibilité. Ces données confirment le rôle tampon du tissu adipeux dans l'homéostasie glucidique, dans la mesure où ce territoire constitue un des principaux organes impliqués dans l'incorporation du glucose induite par l'insuline (281). L'observation de modèles animaux et de patients présentant une lipodystrophie, conduit au concept de « réservoir lipidique ». En effet, de la même façon qu'un excès de tissu adipeux (obésité), un déficit de tissu adipeux (lipodystrophie) est associé à une insulino-résistance et une hyperglycémie (205). Des situations pathologiques se traduisant par des modifications quantitatives et/ou qualitatives du tissu adipeux peuvent donc être à l'origine d'une insulino-résistance.

L'approche chirurgicale nous a permis de déterminer l'implication du tissu adipeux viscéral dans les conséquences délétères d'une exposition à l'HI, sur le plan métabolique et vasculaire. Cependant, un tel modèle expérimental présente quelques limites puisque les effets bénéfiques de la chirurgie restent partiels. Chez des souris ApoE^{-/-}, la lipectomie ne permet pas, entre autres, de corriger une augmentation d'acides gras libres et de glycérol liée à l'HI (258). La persistance des autres territoires adipeux ainsi qu'une redistribution de la graisse suite à la chirurgie vers le tissu adipeux sous-cutané, pourraient expliquer ces données. Les

résultats supplémentaires obtenus chez les souris ApoE^{-/-} montrent que le territoire sous-cutané des souris n'ayant pas subi d'ablation du tissu adipeux épидидymal (souris « sham ») est peu sensible à l'HI. Cependant, suite à la lipectomie épидидymale, une redistribution à la fois morphologique et inflammatoire apparaît au niveau sous-cutané, principalement chez les souris exposées à l'HI. Ce compartiment adipeux, peu sensible à l'HI chez les souris « sham », subit des altérations importantes lorsque le compartiment épидидymal est absent. Il semble donc exister une balance entre les différents territoires adipeux, qui pourrait être modifiée par la lipectomie épидидymale. Cette hypothèse a été vérifiée grâce à une approche par IRM, qui nous a permis de quantifier de manière exhaustive les principaux territoires adipeux blancs : épидидymal, sous-cutané, mésentérique et rétro-péritonéal. Les résultats de la publication n°3 concernent les effets topographiques de la lipectomie suite à un déséquilibre adipeux, initié de façon physiologique (fonte épидидymale liée à l'HI) ou de façon artificielle (chirurgie épидидymale). D'après nos données, et d'une façon globale, il semble que l'absence d'un compartiment adipeux soit compensée par les autres territoires. De plus, suite à une lipectomie du tissu adipeux épидидymal, la redistribution se fait préférentiellement vers le tissu adipeux sous-cutané. En plus de modifications qualitatives (inflammation, hypotrophie), le compartiment adipeux épидидymal subit des modifications quantitatives (fonte), qui influencent la distribution des autres territoires adipeux, en particulier le territoire sous-cutané. En 1997, l'étude de Mauer *et al* réalisée chez des hamsters de Sibérie, montre qu'une lipectomie épидидymale entraîne une augmentation de la masse du tissu adipeux sous-cutané seulement, évaluée 3 mois après la chirurgie, et que le compartiment épидидymal ne repousse pas après ces 3 mois (201). Ces données expérimentales, ainsi que nos résultats (publication n°3), sont cohérents avec l'hypothèse « lipostatique » émise par Kennedy, selon laquelle le tissu adipeux serait capable de s'adapter à des modifications de son homéostasie, en partie grâce au contrôle de l'innervation sympathique et/ou à la régulation facteurs humoraux circulants (202). De plus, l'innervation différentielle des tissus adipeux blancs (mésentérique, épидидymal, rétro-péritonéal et sous-cutané inguinal) est à l'origine des différences de capacité proliférative et de modalités de croissance (hypertrophie ou hyperplasie) (123). Ces spécificités adipeuses pourraient jouer un rôle dans la redistribution préférentielle du tissu adipeux observée dans notre modèle, suite à la fonte épидидymale ou à la lipectomie.

4.3. Remodelage du tissu adipeux viscéral et perspectives thérapeutiques pour le patient SAOS

Malgré une réelle augmentation du nombre annuel de publications sur le SAOS ces 10 dernières années (environ 660 études publiées en 2002 et 1725 en 2012, avec la recherche « sleep apnea syndrome » sur PubMed), les mécanismes exacts à l'origine des conséquences délétères de ce syndrome restent imprécis. Le SAOS est depuis très longtemps reconnu comme une pathologie hétérogène, caractérisée par de multiples causes physiopathologiques potentielles, qui incluent des facteurs anatomiques, neuromusculaires, chimiques et mécaniques (70). La complexité de ce syndrome réside également dans le fait que la contribution relative de chacune de ces causes peut varier considérablement entre chaque patient. De plus, les contraintes inhérentes à la recherche clinique – liées au prélèvement d'organes très souvent restreint, ou encore aux méthodes très contraignantes d'évaluation de la régulation métabolique – limitent la compréhension de la physiopathologie du syndrome apnéique. Un meilleur phénotypage clinique et paraclinique de chaque patient permettrait de cibler plus facilement l'option thérapeutique la mieux adaptée à chaque individu (chirurgical, mécanique ou encore pharmacologique) afin d'optimiser la réponse au traitement. Aujourd'hui, le *gold standard* thérapeutique du SAOS est la PPC, qui permet de maintenir de façon constante, l'ouverture des VAS. Cependant, la compliance au traitement de certains patients et l'inefficacité de ce traitement sur certaines complications du SAOS représentent des limites thérapeutiques. A l'heure actuelle, la méconnaissance physiopathologique de ce syndrome a largement limité le développement de nouveaux traitements. La recherche de nouveaux outils thérapeutiques permettant une meilleure prise en charge des patients apnéiques constitue donc un véritable enjeu de santé publique.

▪ Morphologie et distribution du tissu adipeux viscéral

Paradoxalement, l'HI pourrait avoir des effets bénéfiques sur le phénotype du tissu adipeux blanc, puisqu'elle semble être impliquée dans l'apparition d'adipocytes « *brite* » dans le compartiment adipeux épидидymal (258). La stimulation adrénérergique induite par l'HI pourrait être à l'origine de ce changement de phénotype. Des travaux supplémentaires sont nécessaires afin d'expliquer cette plasticité adipeuse, ainsi que l'éventuelle implication du système sympatho-adrénérergique, qui pourrait constituer un dénominateur commun des différents

remodelages du tissu adipeux épидидymal induits par l'HI. De plus, la signification de cette plasticité, particulièrement en ce qui concerne les déséquilibres métaboliques induits par l'HI, reste à déterminer. Il apparaît que le tissu adipeux brun peut être métaboliquement actif chez des adultes sains (290) (368), et peut être impliqué dans la régulation de l'équilibre métabolique chez des souris obèses (328). D'après ces données, la transformation phénotypique du tissu adipeux blanc en tissu adipeux « *brite* » est proposée comme stratégie thérapeutique dans le cadre de l'obésité (163). Le tissu adipeux est donc un tissu plastique, non seulement vis-à-vis des autres territoires, mais également au sein de son propre territoire par rapport à son phénotype (inflammatoire ou pas, « *brite* » ou blanc). Chez les patients apnéiques obèses, une approche pharmacologique visant à favoriser la transformation du tissu adipeux blanc en tissu adipeux « *brite* » pourrait donc être envisagée afin d'améliorer leur statut métabolique. A plus long terme, cela permettrait le ralentissement des lésions vasculaires, très souvent associées aux dysfonctions métaboliques.

Depuis quelques années, les effets bénéfiques d'une liposuction du tissu adipeux sous-cutané sur le métabolisme glucidique sont remis en questions (153) (388). Ces données cliniques reposent sur le caractère délétère du tissu adipeux viscéral dans la régulation métabolique, comparé au tissu adipeux sous-cutané. Une intervention visant à moduler spécifiquement l'excès de masse adipeuse viscérale pourrait donc être proposée dans le cadre du SAOS. En effet, d'après les données de la publication n°3, la lipectomie épидидymale est compensée par une redistribution ciblée vers le tissu adipeux sous-cutané. Cette redistribution spécifique vers un compartiment qui, du point de vue de la sensibilité à l'insuline semble protecteur comparé au tissu adipeux viscéral, constitue un argument supplémentaire en faveur cette option thérapeutique.

Chez les patients d'âge moyen obèses ou présentant un surpoids, l'exercice physique permet de diminuer la masse grasse viscérale. Cet effet est obtenu à l'aide de programmes multi-modalités (endurance, force) d'au moins 8 semaines et d'intensité modérée à élevée (148). La fonte du tissu adipeux viscéral observée après une telle activité physique, qui explique en partie ses effets bénéfiques, pourrait également jouer un rôle dans l'équilibre des territoires adipeux blancs, tel que nous le décrivons dans la publication n°3.

▪ Inflammation du tissu adipeux viscéral

En dehors de toute obésité, le tissu adipeux viscéral des animaux exposés à une HI subit des altérations inflammatoires majeures. Dans un contexte de SAOS, les patients non-obèses sont susceptibles d'être sous-diagnostiqués pour ce syndrome, dans la mesure où l'obésité est une co-morbidité très fréquente de la pathologie apnéique. Or, d'après nos données, il apparaît que la composante hypoxique elle-même a des effets directs sur le tissu adipeux viscéral qui, par l'intermédiaire de son inflammation, participe aux atteintes métaboliques et vasculaires liées à l'HI. Certains patients apnéiques non-obèses présentent donc un risque de complications vasculaires au même titre que les patients obèses, pour lesquels le SAOS est plus facilement diagnostiqué. Le SAOS et l'obésité partagent des mécanismes physiopathologiques communs (activation inflammatoire, stress oxydant, augmentation de l'activation sympathique). Au cours de l'obésité, les complications métaboliques, ainsi que les atteintes vasculaires, sont 2 conséquences majeures liées aux dysfonctions du tissu adipeux (351). Chez les patients apnéiques obèses, les modifications inflammatoires décrites au niveau adipeux pourraient donc aggraver les conséquences délétères au niveau métabolique et vasculaire liées à leur obésité. Par ailleurs, chez ces mêmes patients, les effets d'un traitement par PPC sur la masse adipeuse viscérale sont très incertains. Très récemment, Hoyos *et al* montrent que 12 semaines de PPC seule ne permettent pas de réduire l'adiposité viscérale de patients SAOS obèses (129). L'étude de Sivam *et al* en 2012 rejoint ces observations, puisqu'elle ne décrit aucun effet de la PPC sur la distribution adipeuse (viscérale et sous-cutanée), après 8 semaines de traitement (317). D'après ces données, il semble qu'une thérapie combinée soit la mieux adaptée à la prise en charge des patients SAOS obèses, en associant la PPC à d'autres interventions pharmacologique, physique ou encore diététique.

L'inflammation du tissu adipeux viscéral constitue donc une cible thérapeutique supplémentaire pour les patients apnéiques obèses et surtout non-obèses, pour lesquels une perte de masse grasseuse – suite à un régime ou de l'exercice – ne peut pas être proposée. De ce point de vue, l'effet bénéfique d'un traitement par dérivés salicylés fait l'objet d'une étude clinique récente. En 2013, Goldfine *et al* décrivent un effet bénéfique d'un tel traitement chez des personnes obèses présentant une intolérance au glucose, chez lesquelles l'activité adipeuse de NFκB est diminuée (107). Les résultats préliminaires du travail n°4 suggèrent que la voie TLR-4/NFκB serait impliquée dans les altérations métaboliques et vasculaires associées à l'HI. Dans le traitement du sepsis, le blocage du récepteur TLR-4 par un analogue

du lipide A, l'éritoran, fait l'objet d'un intérêt particulier, malgré des données cliniques encore discordantes (28) (238). Dans une pathologie comme le SAOS, pour laquelle l'apparition d'une réponse inflammatoire joue un rôle majeur dans les atteintes vasculaires de ce syndrome, le blocage de cette voie pourrait ainsi constituer un traitement dans le but d'améliorer le statut inflammatoire et métabolique des patients apnéiques.

D'après nos données, le phénotype inflammatoire induit par l'HI est majoré par une stimulation à l'isoprénaline, un agoniste β (258). La composante hypoxique du SAOS est à l'origine d'une augmentation de l'activité sympatho-adrénergique nocturne (260). L'isoprénaline permet de mimer expérimentalement cette hyperactivité sympathique observée chez les patients apnéiques (322), qui peut induire une augmentation du taux circulants de cytokines inflammatoires. Chez les souris exposées à l'HI, cette activation sympatho-adrénergique pourrait donc aggraver l'inflammation du tissu adipeux épидidymal (258), confirmant des résultats récents obtenus chez des souris C57Bl6 (282). L'hyperactivité sympathique, mais également l'inflammation accrue qui en résulte, sont deux étapes intermédiaires impliquées dans le remodelage vasculaire et le développement de l'HTA (300). Les résultats de l'étude réalisée à partir de la *Wisconsin Sleep Cohort Study* sur un suivi de 4 à 8 ans, montrent qu'il existe un lien important entre l'apparition d'une HTA et le SAOS (251). La PPC semble être le traitement le plus efficace pour normaliser les valeurs tensionnelles des patients apnéiques. En revanche, concernant l'approche pharmacologique (β -bloquants, bloqueurs du système rénine-angiotensine, clonidine) il semble encore difficile de déterminer quelle alternative thérapeutique sera la plus adaptée pour le patient sur le long terme (358). En effet, un des effets secondaires d'une thérapie anti-hypertensive (en particulier les β -bloquants) est le développement d'une intolérance au glucose, qui favoriserait alors l'apparition d'un diabète de type 2 (192). Chez les patients apnéiques, qui présentent très souvent des troubles glucidiques, un traitement par β -bloquants pourrait aggraver les dysfonctions métaboliques déjà installées. Malgré des données encore insuffisantes quant au choix de la meilleure option pharmacologique, les résultats de ces travaux de thèse confirment l'intérêt d'une thérapie visant à diminuer l'hyperactivation sympathique caractéristique du SAOS.

5. Conclusion générale

Depuis quelques années déjà, le SAOS est reconnu comme un facteur de risque cardiovasculaire indépendant. Il est également à l'origine d'une dérégulation du métabolisme glucido-lipidique, qui favorise les atteintes vasculaires associées à ce syndrome. L'implication du tissu adipeux viscéral dans la physiopathologie du SAOS est très difficile à déterminer, du fait notamment de la présence fréquente de co-morbidités, telles que l'obésité.

Les résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse montrent pour la première fois que les altérations inflammatoires et morphologiques du tissu adipeux viscéral sont, en partie, impliquées dans les atteintes vasculaire associées à l'HI. De façon directe *via* sa fonction sécrétoire, ou par l'intermédiaire des dysfonctions métaboliques, ce compartiment adipeux est impliqué dans le remodelage délétère des vaisseaux observé après une exposition à l'HI.

La compréhension des mécanismes physiopathologiques des complications du SAOS telle que nous l'avons décrite au travers des différentes approches expérimentales, pourrait permettre d'envisager de nouvelles perspectives thérapeutiques, en complément ou comme alternative à la PPC, notamment chez les patients à haut risque cardiovasculaire.

Références bibliographiques

1. **Ahima RS, and Flier JS.** Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 11: 327-332, 2000.
2. **Ahmed MH, and Byrne CD.** Obstructive sleep apnea syndrome and fatty liver: association or causal link? *World J Gastroenterol* 16: 4243-4252, 2010.
3. **Akinnusi M, Jaoude P, Kufel T, and El-Solh AA.** Toll-like receptor activity in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep Breath* 17: 1009-1016, 2012.
4. **Akinnusi ME, Paasch LL, Szarpa KR, Wallace PK, and El Solh AA.** Impact of nasal continuous positive airway pressure therapy on markers of platelet activation in patients with obstructive sleep apnea. *Respiration* 77: 25-31, 2009.
5. **Alchanatis M, Tourkohoriti G, Kosmas EN, Panoutsopoulos G, Kakouros S, Papadima K, Gaga M, and Jordanoglou JB.** Evidence for left ventricular dysfunction in patients with obstructive sleep apnoea syndrome. *Eur Respir J* 20: 1239-1245, 2002.
6. **Allahdadi KJ, Walker BR, and Kanagy NL.** Augmented endothelin vasoconstriction in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension* 45: 705-709, 2005.
7. **Almendros I, Farre R, Planas AM, Torres M, Bonsignore MR, Navajas D, and Montserrat JM.** Tissue oxygenation in brain, muscle, and fat in a rat model of sleep apnea: differential effect of obstructive apneas and intermittent hypoxia. *Sleep* 34: 1127-1133, 2011.
8. **Aloia MS, Arnedt JT, Riggs RL, Hecht J, and Borrelli B.** Clinical management of poor adherence to CPAP: motivational enhancement. *Behav Sleep Med* 2: 205-222, 2004.
9. **American Academy of Sleep Medicine AASM.** Sleep-related breathing disorders in adults: recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. The Report of an American Academy of Sleep Medicine Task Force. *Sleep* 22: 667-689, 1999.
10. **Arcaro G, Cretti A, Balzano S, Lechi A, Muggeo M, Bonora E, and Bonadonna RC.** Insulin causes endothelial dysfunction in humans: sites and mechanisms. *Circulation* 105: 576-582, 2002.
11. **Arias MA, Garcia-Rio F, Alonso-Fernandez A, Mediano O, Martinez I, and Villamor J.** Obstructive sleep apnea syndrome affects left ventricular diastolic function: effects of nasal continuous positive airway pressure in men. *Circulation* 112: 375-383, 2005.
12. **Armstrong MJ, Adams LA, Canbay A, and Syn WK.** Extra-hepatic complications of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2013.
13. **Arnardottir ES, Maislin G, Schwab RJ, Staley B, Benediktsdottir B, Olafsson I, Juliusson S, Romer M, Gislason T, and Pack AI.** The interaction of obstructive sleep apnea and obesity on the inflammatory markers C-reactive protein and interleukin-6: the Icelandic Sleep Apnea Cohort. *Sleep* 35: 921-932, 2012.
14. **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 pre-atherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition. *Am J Respir Crit Care Med* 2011.
15. **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.
16. **Aron-Wisnewsky J, Minville C, Tordjman J, Levy P, Bouillot JL, Basdevant A, Bedossa P, Clement K, and Pepin JL.** Chronic intermittent hypoxia is a major trigger for non-alcoholic fatty liver disease in morbid obese. *J Hepatol* 56: 225-233, 2011.
17. **Ayappa I, and Rapoport DM.** The upper airway in sleep: physiology of the pharynx. *Sleep Med Rev* 7: 9-33, 2003.

18. **Ayers L, Ferry B, Craig S, Nicoll D, Stradling JR, and Kohler M.** Circulating cell-derived microparticles in patients with minimally symptomatic obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 33: 574-580, 2009.
19. **Ayers L, Stoewhas AC, Ferry B, Stradling J, and Kohler M.** Elevated levels of endothelial cell-derived microparticles following short-term withdrawal of continuous positive airway pressure in patients with obstructive sleep apnea: data from a randomized controlled trial. *Respiration* 85: 478-485, 2012.
20. **Back M.** Leukotriene receptors: crucial components in vascular inflammation. *ScientificWorldJournal* 7: 1422-1439, 2007.
21. **Baguet JP, Barone-Rochette G, Levy P, Vautrin E, Pierre H, Ormezzano O, and Pepin JL.** Left ventricular diastolic dysfunction is linked to severity of obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 36: 1323-1329, 2010.
22. **Baguet JP, Hammer L, Levy P, Pierre H, Launois S, Mallion JM, and Pepin JL.** The severity of oxygen desaturation is predictive of carotid wall thickening and plaque occurrence. *Chest* 128: 3407-3412, 2005.
23. **Baguet JP, Hammer L, Levy P, Pierre H, Rossini E, Mouret S, Ormezzano O, Mallion JM, and Pepin JL.** Night-time and diastolic hypertension are common and underestimated conditions in newly diagnosed apnoeic patients. *J Hypertens* 23: 521-527, 2005.
24. **Baker RG, Hayden MS, and Ghosh S.** NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab* 13: 11-22, 2011.
25. **Barbatelli G, Murano I, Madsen L, Hao Q, Jimenez M, Kristiansen K, Giacobino JP, De Matteis R, and Cinti S.** The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E1244-1253, 2010.
26. **Barcelo A, Miralles C, Barbe F, Vila M, Pons S, and Agusti AG.** Abnormal lipid peroxidation in patients with sleep apnoea. *Eur Respir J* 16: 644-647, 2000.
27. **Barcelo A, Pierola J, de la Pena M, Esquinas C, Fuster A, Sanchez-de-la-Torre M, Carrera M, Alonso-Fernandez A, Ladaría A, Bosch M, and Barbe F.** Free fatty acids and the metabolic syndrome in patients with obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 37: 1418-1423, 2010.
28. **Barochia A, Solomon S, Cui X, Natanson C, and Eichacker PQ.** Eritoran tetrasodium (E5564) treatment for sepsis: review of preclinical and clinical studies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 7: 479-494, 2011.
29. **Basner RC.** Continuous positive airway pressure for obstructive sleep apnea. *N Engl J Med* 356: 1751-1758, 2007.
30. **Bayram NA, Ciftci B, Keles T, Durmaz T, Turhan S, Bozkurt E, and Peker Y.** Endothelial function in normotensive men with obstructive sleep apnea before and 6 months after CPAP treatment. *Sleep* 32: 1257-1263, 2009.
31. **Bazzano LA, Khan Z, Reynolds K, and He J.** Effect of nocturnal nasal continuous positive airway pressure on blood pressure in obstructive sleep apnea. *Hypertension* 50: 417-423, 2007.
32. **Becker HF, Jerrentrup A, Ploch T, Grote L, Penzel T, Sullivan CE, and Peter JH.** Effect of nasal continuous positive airway pressure treatment on blood pressure in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation* 107: 68-73, 2003.
33. **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.
34. **Bergman RN, Ider YZ, Bowden CR, and Cobelli C.** Quantitative estimation of insulin sensitivity. *Am J Physiol* 236: E667-677, 1979.

35. **Bodary PF, Gu S, Shen Y, Hasty AH, Buckler JM, and Eitzman DT.** Recombinant leptin promotes atherosclerosis and thrombosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: e119-122, 2005.
36. **Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T, Henry P, Mathieu E, Tedgui A, and Mallat Z.** Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation* 104: 2649-2652, 2001.
37. **Brooks B, Cistulli PA, Borkman M, Ross G, McGhee S, Grunstein RR, Sullivan CE, and Yue DK.** Obstructive sleep apnea in obese noninsulin-dependent diabetic patients: effect of continuous positive airway pressure treatment on insulin responsiveness. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 1681-1685, 1994.
38. **Calderan L, Marzola P, Nicolato E, Fabene PF, Milanese C, Bernardi P, Giordano A, Cinti S, and Sbarbati A.** In vivo phenotyping of the ob/ob mouse by magnetic resonance imaging and ¹H-magnetic resonance spectroscopy. *Obesity (Silver Spring)* 14: 405-414, 2006.
39. **Cameron IL, and Smith RE.** Cytological Responses of Brown Fat Tissue in Cold-Exposed Rats. *J Cell Biol* 23: 89-100, 1964.
40. **Campos-Rodriguez F, Grilo-Reina A, Perez-Ronchel J, Merino-Sanchez M, Gonzalez-Benitez MA, Beltran-Robles M, and Almeida-Gonzalez C.** Effect of continuous positive airway pressure on ambulatory BP in patients with sleep apnea and hypertension: a placebo-controlled trial. *Chest* 129: 1459-1467, 2006.
41. **Can M, Acikgoz S, Mungan G, Bayraktaroglu T, Kocak E, Guven B, and Demirtas S.** Serum cardiovascular risk factors in obstructive sleep apnea. *Chest* 129: 233-237, 2006.
42. **Cannon B, and Nedergaard J.** Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84: 277-359, 2004.
43. **Cao JJ, Arnold AM, Manolio TA, Polak JF, Psaty BM, Hirsch CH, Kuller LH, and Cushman M.** Association of carotid artery intima-media thickness, plaques, and C-reactive protein with future cardiovascular disease and all-cause mortality: the Cardiovascular Health Study. *Circulation* 116: 32-38, 2007.
44. **Carlson JT, Rangemark C, and Hedner JA.** Attenuated endothelium-dependent vascular relaxation in patients with sleep apnoea. *J Hypertens* 14: 577-584, 1996.
45. **Carpagnano GE, Kharitonov SA, Resta O, Foschino-Barbaro MP, Gramiccioni E, and Barnes PJ.** 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, 2003.
46. **Chami HA, Devereux RB, Gottdiener JS, Mehra R, Roman MJ, Benjamin EJ, and Gottlieb DJ.** Left ventricular morphology and systolic function in sleep-disordered breathing: the Sleep Heart Health Study. *Circulation* 117: 2599-2607, 2008.
47. **Chen XQ, Dong J, Niu CY, Fan JM, and Du JZ.** Effects of hypoxia on glucose, insulin, glucagon, and modulation by corticotropin-releasing factor receptor type 1 in the rat. *Endocrinology* 148: 3271-3278, 2007.
48. **Chiba T, Shinozaki S, Nakazawa T, Kawakami A, Ai M, Kaneko E, Kitagawa M, Kondo K, Chait A, and Shimokado K.** Leptin deficiency suppresses progression of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 196: 68-75, 2008.
49. **Chin K, Ohi M, Kita H, Noguchi T, Otsuka N, Tsuboi T, Mishima M, and Kuno K.** Effects of NCPAP therapy on fibrinogen levels in obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 153: 1972-1976, 1996.
50. **Chin K, Shimizu K, Nakamura T, Narai N, Masuzaki H, Ogawa Y, Mishima M, Nakao K, and Ohi M.** Changes in intra-abdominal visceral fat and serum leptin levels in patients with

obstructive sleep apnea syndrome following nasal continuous positive airway pressure therapy. *Circulation* 100: 706-712, 1999.

51. **Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Jr., and Roccella EJ.** The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 289: 2560-2572, 2003.
52. **Choi JB, Loreda JS, Norman D, Mills PJ, Ancoli-Israel S, Ziegler MG, and Dimsdale JE.** Does obstructive sleep apnea increase hematocrit? *Sleep Breath* 10: 155-160, 2006.
53. **Chung S, Yoon IY, Shin YK, Lee CH, Kim JW, Lee T, Choi DJ, and Ahn HJ.** Endothelial dysfunction and C-reactive protein in relation with the severity of obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep* 30: 997-1001, 2007.
54. **Cinti S.** The adipose organ at a glance. *Dis Model Mech* 5: 588-594, 2012.
55. **Cinti S.** Between brown and white: novel aspects of adipocyte differentiation. *Ann Med* 43: 104-115, 2011.
56. **Cohen JC, Horton JD, and Hobbs III.** Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* 332: 1519-1523, 2011.
57. **Collins C, Guilluy C, Welch C, O'Brien ET, Hahn K, Superfine R, Burridge K, and Tzima E.** Localized tensional forces on PECAM-1 elicit a global mechanotransduction response via the integrin-RhoA pathway. *Curr Biol* 22: 2087-2094, 2012.
58. **Collins T, and Cybulsky MI.** NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest* 107: 255-264, 2001.
59. **Comondore VR, Cheema R, Fox J, Butt A, John Mancini GB, Fleetham JA, Ryan CF, Chan S, and Ayas NT.** The impact of CPAP on cardiovascular biomarkers in minimally symptomatic patients with obstructive sleep apnea: a pilot feasibility randomized crossover trial. *Lung* 187: 17-22, 2009.
60. **Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, and et al.** Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334: 292-295, 1996.
61. **Coughlin SR, Mawdsley L, Mugarza JA, Calverley PM, and Wilding JP.** Obstructive sleep apnoea is independently associated with an increased prevalence of metabolic syndrome. *Eur Heart J* 25: 735-741, 2004.
62. **Coughlin SR, Mawdsley L, Mugarza JA, Wilding JP, and Calverley PM.** Cardiovascular and metabolic effects of CPAP in obese males with OSA. *Eur Respir J* 29: 720-727, 2007.
63. **Crea F, Biasucci LM, Buffon A, Liuzzo G, Monaco C, Caligiuri G, Kol A, Sperti G, Cianflone D, and Maseri A.** Role of inflammation in the pathogenesis of unstable coronary artery disease. *Am J Cardiol* 80: 10E-16E, 1997.
64. **Cuhadaroglu C, Utkusavas A, Ozturk L, Salman S, and Ece T.** Effects of nasal CPAP treatment on insulin resistance, lipid profile, and plasma leptin in sleep apnea. *Lung* 187: 75-81, 2009.
65. **Dai X, Galligan JJ, Watts SW, Fink GD, and Kreulen DL.** Increased O₂*- production and upregulation of ETB receptors by sympathetic neurons in DOCA-salt hypertensive rats. *Hypertension* 43: 1048-1054, 2004.
66. **DeFronzo RA, Tobin JD, and Andres R.** Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 237: E214-223, 1979.
67. **Delarue J, and Magnan C.** Free fatty acids and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10: 142-148, 2007.

68. **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.
69. **Dematteis M, Julien C, Guillermet C, Sturm N, Lantuejoul S, Mallaret M, Levy P, and Gozal E.** Intermittent hypoxia induces early functional cardiovascular remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 177: 227-235, 2008.
70. **Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ, and O'Donnell CP.** Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol Rev* 90: 47-112, 2010.
71. **Dimsdale JE, Coy T, Ziegler MG, Ancoli-Israel S, and Clausen J.** The effect of sleep apnea on plasma and urinary catecholamines. *Sleep* 18: 377-381, 1995.
72. **Doherty LS, Kiely JL, Swan V, and McNicholas WT.** Long-term effects of nasal continuous positive airway pressure therapy on cardiovascular outcomes in sleep apnea syndrome. *Chest* 127: 2076-2084, 2005.
73. **Donnelly LF, O'Brien KJ, Dardzinski BJ, Poe SA, Bean JA, Holland SK, and Daniels SR.** Using a phantom to compare MR techniques for determining the ratio of intraabdominal to subcutaneous adipose tissue. *AJR Am J Roentgenol* 180: 993-998, 2003.
74. **Dorkova Z, Petrasova D, Molcanyiova A, Popovnakova M, and Tkacova R.** Effects of continuous positive airway pressure on cardiovascular risk profile in patients with severe obstructive sleep apnea and metabolic syndrome. *Chest* 134: 686-692, 2008.
75. **Drager LF, Bortolotto LA, Figueiredo AC, Krieger EM, and Lorenzi GF.** Effects of continuous positive airway pressure on early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 176: 706-712, 2007.
76. **Drager LF, Bortolotto LA, Lorenzi MC, Figueiredo AC, Krieger EM, and Lorenzi-Filho G.** Early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 172: 613-618, 2005.
77. **Drager LF, Jun JC, and Polotsky VY.** Metabolic consequences of intermittent hypoxia: relevance to obstructive sleep apnea. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 24: 843-851, 2010.
78. **Drager LF, Li J, Reinke C, Bevans-Fonti S, Jun JC, and Polotsky VY.** Intermittent hypoxia exacerbates metabolic effects of diet-induced obesity. *Obesity (Silver Spring)* 19: 2167-2174, 2011.
79. **Drager LF, Li J, Shin MK, Reinke C, Aggarwal NR, Jun JC, Bevans-Fonti S, Sztalryd C, O'Byrne SM, Kroupa O, Olivecrona G, Blaner WS, and Polotsky VY.** Intermittent hypoxia inhibits clearance of triglyceride-rich lipoproteins and inactivates adipose lipoprotein lipase in a mouse model of sleep apnoea. *Eur Heart J* 33: 783-790, 2012.
80. **Drager LF, Yao Q, Hernandez KL, Shin MK, Bevans-Fonti S, Gay J, Sussan TE, Jun JC, Myers AC, Olivecrona G, Schwartz AR, Halberg N, Scherer PE, Semenza GL, Powell DR, and Polotsky VY.** Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis via activation of adipose angiopoietin-like 4. *Am J Respir Crit Care Med* Epub ahead of print: 2013.
81. **Du H, Dardzinski BJ, O'Brien KJ, and Donnelly LF.** MRI of fat distribution in a mouse model of lysosomal acid lipase deficiency. *AJR Am J Roentgenol* 184: 658-662, 2005.
82. **Dyugovskaya L, Lavie P, Hirsh M, and Lavie L.** Activated CD8+ T-lymphocytes in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 25: 820-828, 2005.
83. **Dyugovskaya L, Lavie P, and Lavie L.** Increased adhesion molecules expression and production of reactive oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 934-939, 2002.
84. **Dyugovskaya L, Lavie P, and Lavie L.** Lymphocyte activation as a possible measure of atherosclerotic risk in patients with sleep apnea. *Ann N Y Acad Sci* 1051: 340-350, 2005.

85. **Dyugovskaya L, Polyakov A, Lavie P, and Lavie L.** Delayed neutrophil apoptosis in patients with sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 177: 544-554, 2008.
86. **Eckel RH, Grundy SM, and Zimmet PZ.** The metabolic syndrome. *Lancet* 365: 1415-1428, 2005.
87. **Elsharkawy AM, Oakley F, Lin F, Packham G, Mann DA, and Mann J.** The NF-kappaB p50:p50:HDAC-1 repressor complex orchestrates transcriptional inhibition of multiple pro-inflammatory genes. *J Hepatol* 53: 519-527, 2010.
88. **Engleman HM, Martin SE, Deary IJ, and Douglas NJ.** Effect of continuous positive airway pressure treatment on daytime function in sleep apnoea/hypopnoea syndrome. *Lancet* 343: 572-575, 1994.
89. **Fang G, Song D, Ye X, Mao SZ, Liu G, and Liu SF.** Chronic intermittent hypoxia exposure induces atherosclerosis in ApoE knockout mice: role of NF-kappaB p50. *Am J Pathol* 181: 1530-1539, 2012.
90. **Ferguson KA, Cartwright R, Rogers R, and Schmidt-Nowara W.** Oral appliances for snoring and obstructive sleep apnea: a review. *Sleep* 29: 244-262, 2006.
91. **Ferland A, Poirier P, and Series F.** Sibutramine versus continuous positive airway pressure in obese obstructive sleep apnoea patients. *Eur Respir J* 34: 694-701, 2009.
92. **Fisher D, Pillar G, Malhotra A, Peled N, and Lavie P.** Long-term follow-up of untreated patients with sleep apnoea syndrome. *Respir Med* 96: 337-343, 2002.
93. **Fletcher EC.** Sympathetic over activity in the etiology of hypertension of obstructive sleep apnea. *Sleep* 26: 15-19, 2003.
94. **Fletcher EC, Bao G, and Li R.** Renin activity and blood pressure in response to chronic episodic hypoxia. *Hypertension* 34: 309-314, 1999.
95. **Fletcher EC, Bao G, and Miller CC, 3rd.** Effect of recurrent episodic hypocapnic, eucapnic, and hypercapnic hypoxia on systemic blood pressure. *J Appl Physiol (1985)* 78: 1516-1521, 1995.
96. **Fletcher EC, Lesske J, Behm R, Miller CC, 3rd, Stauss H, and Unger T.** Carotid chemoreceptors, systemic blood pressure, and chronic episodic hypoxia mimicking sleep apnea. *J Appl Physiol (1985)* 72: 1978-1984, 1992.
97. **Fletcher EC, Lesske J, Culman J, Miller CC, and Unger T.** Sympathetic denervation blocks blood pressure elevation in episodic hypoxia. *Hypertension* 20: 612-619, 1992.
98. **Fletcher EC, Orolinova N, and Bader M.** Blood pressure response to chronic episodic hypoxia: the renin-angiotensin system. *J Appl Physiol* 92: 627-633, 2002.
99. **Fracanzani AL, Burdick L, Raselli S, Pedotti P, Grigore L, Santorelli G, Valenti L, Maraschi A, Catapano A, and Fargion S.** Carotid artery intima-media thickness in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Med* 121: 72-78, 2008.
100. **Frattola A, Parati G, Cuspidi C, Albini F, and Mancia G.** Prognostic value of 24-hour blood pressure variability. *J Hypertens* 11: 1133-1137, 1993.
101. **Friedlander AH, Yueh R, and Littner MR.** The prevalence of calcified carotid artery atheromas in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *J Oral Maxillofac Surg* 56: 950-954, 1998.
102. **Gami AS, Hodge DO, Herges RM, Olson EJ, Nykodym J, Kara T, and Somers VK.** Obstructive sleep apnea, obesity, and the risk of incident atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 49: 565-571, 2007.
103. **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* 2013.

104. **Gautier E, Arnaud C, Back M, Pepin JL, Petri MH, Baguet JP, Tamisier R, Levy P, and Stanke-Labesque F.** Intermittent hypoxia activated cyclooxygenase pathway: role in atherosclerosis. *Eur Respir J* 2012.
105. **Gharib SA, Khalyfa A, Abdelkarim A, Ramesh V, Buazza M, Kaushal N, Bhushan B, and Gozal D.** Intermittent hypoxia activates temporally coordinated transcriptional programs in visceral adipose tissue. *J Mol Med (Berl)* 2011.
106. **Gislason T, Aberg H, and Taube A.** Snoring and systemic hypertension--an epidemiological study. *Acta Med Scand* 222: 415-421, 1987.
107. **Goldfine AB, Conlin PR, Halperin F, Koska J, Permana P, Schwenke D, Shoelson SE, and Reaven PD.** A randomised trial of salsalate for insulin resistance and cardiovascular risk factors in persons with abnormal glucose tolerance. *Diabetologia* 56: 714-723, 2013.
108. **Gottlieb DJ, Yenokyan G, Newman AB, O'Connor GT, Punjabi NM, Quan SF, Redline S, Resnick HE, Tong EK, Diener-West M, and Shahar E.** Prospective study of obstructive sleep apnea and incident coronary heart disease and heart failure: the sleep heart health study. *Circulation* 122: 352-360, 2010.
109. **Greenberg H, Ye X, Wilson D, Htoo AK, Hendersen T, and Liu SF.** Chronic intermittent hypoxia activates nuclear factor-kappaB in cardiovascular tissues in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 343: 591-596, 2006.
110. **Grimpen F, Kanne P, Schulz E, Hagenah G, Hasenfuss G, and Andreas S.** Endothelin-1 plasma levels are not elevated in patients with obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 15: 320-325, 2000.
111. **Grote L, Hedner J, and Peter JH.** Sleep-related breathing disorder is an independent risk factor for uncontrolled hypertension. *J Hypertens* 18: 679-685, 2000.
112. **Gruber A, Horwood F, Sithole J, Ali NJ, and Idris I.** Obstructive sleep apnoea is independently associated with the metabolic syndrome but not insulin resistance state. *Cardiovasc Diabetol* 5: 22, 2006.
113. **Grunstein R, Wilcox I, Yang TS, Gould Y, and Hedner J.** Snoring and sleep apnoea in men: association with central obesity and hypertension. *Int J Obes Relat Metab Disord* 17: 533-540, 1993.
114. **Guilleminault C, Kirisoglu C, and Ohayon MM.** C-reactive protein and sleep-disordered breathing. *Sleep* 27: 1507-1511, 2004.
115. **Guimaraes KC, Drager LF, Genta PR, Marcondes BF, and Lorenzi-Filho G.** Effects of oropharyngeal exercises on patients with moderate obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 179: 962-966, 2009.
116. **Haentjens P, Van Meerhaeghe A, Moscariello A, De Weerdts S, Poppe K, Dupont A, and Velkeniers B.** 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: 757-764, 2007.
117. **Hajer GR, van der Graaf Y, Olijhoek JK, Edlinger M, and Visseren FL.** Low plasma levels of adiponectin are associated with low risk for future cardiovascular events in patients with clinical evident vascular disease. *Am Heart J* 154: 750 e751-757, 2007.
118. **Hajer GR, van Haeften TW, and Visseren FL.** Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J* 29: 2959-2971, 2008.
119. **Hansson GK.** Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352: 1685-1695, 2005.
120. **Harsch IA, Schahin SP, Radespiel-Troger M, Weintz O, Jahreiss H, Fuchs FS, Wiest GH, Hahn EG, Lohmann T, Konturek PC, and Ficker JH.** Continuous positive airway pressure

treatment rapidly improves insulin sensitivity in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 169: 156-162, 2004.

121. **Harsch IA, Wallaschofski H, Koebnick C, Pour Schahin S, Hahn EG, Ficker JH, and Lohmann T.** Adiponectin in patients with obstructive sleep apnea syndrome: course and physiological relevance. *Respiration* 71: 580-586, 2004.

122. **Hatai S.** On the presence in human embryos of an interscapular gland corresponding to the so-called hibernating gland of lower mammals. *Anat Anz* 21: 369-373, 1902.

123. **Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, and Martin RJ.** The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev* 2: 239-254, 2001.

124. **Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, and Pepys MB.** Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *Lancet* 349: 462-466, 1997.

125. **Hayashi M, Fujimoto K, Urushibata K, Uchikawa S, Imamura H, and Kubo K.** Nocturnal oxygen desaturation correlates with the severity of coronary atherosclerosis in coronary artery disease. *Chest* 124: 936-941, 2003.

126. **Hernandez TL, Kittelson JM, Law CK, Ketch LL, Stob NR, Lindstrom RC, Scherzinger A, Stamm ER, and Eckel RH.** Fat redistribution following suction lipectomy: defense of body fat and patterns of restoration. *Obesity (Silver Spring)* 19: 1388-1395, 2011.

127. **Hoffstein V, Herridge M, Mateika S, Redline S, and Strohl KP.** Hematocrit levels in sleep apnea. *Chest* 106: 787-791, 1994.

128. **Honsberg AE, Dodge RR, Cline MG, and Quan SF.** Incidence and remission of habitual snoring over a 5- to 6-year period. *Chest* 108: 604-609, 1995.

129. **Hoyos CM, Killick R, Yee BJ, Phillips CL, Grunstein RR, and Liu PY.** Cardiometabolic changes after continuous positive airway pressure for obstructive sleep apnoea: a randomised sham-controlled study. *Thorax* 67: 1081-1089, 2012.

130. **Hu HH, and Kan HE.** Quantitative proton MR techniques for measuring fat. *NMR Biomed* 2013.

131. **Hui DS, Ko FW, Fok JP, Chan MC, Li TS, Tomlinson B, and Cheng G.** The effects of nasal continuous positive airway pressure on platelet activation in obstructive sleep apnea syndrome. *Chest* 125: 1768-1775, 2004.

132. **Iiyori N, Alonso LC, Li J, Sanders MH, Garcia-Ocana A, O'Doherty RM, Polotsky VY, and O'Donnell CP.** Intermittent hypoxia causes insulin resistance in lean mice independent of autonomic activity. *Am J Respir Crit Care Med* 175: 851-857, 2007.

133. **Ip MS, Lam B, Chan LY, Zheng L, Tsang KW, Fung PC, and Lam WK.** 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: 2166-2171, 2000.

134. **Ip MS, Lam B, Ng MM, Lam WK, Tsang KW, and Lam KS.** Obstructive sleep apnea is independently associated with insulin resistance. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 670-676, 2002.

135. **Ip MS, Lam KS, Ho C, Tsang KW, and Lam W.** Serum leptin and vascular risk factors in obstructive sleep apnea. *Chest* 118: 580-586, 2000.

136. **Ip MS, Tse HF, Lam B, Tsang KW, and Lam WK.** Endothelial function in obstructive sleep apnea and response to treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 169: 348-353, 2004.

137. **Itzhaki S, Dorchin H, Clark G, Lavie L, Lavie P, and Pillar G.** The effects of 1-year treatment with a Herbst mandibular advancement splint on obstructive sleep apnea, oxidative stress, and endothelial function. *Chest* 131: 740-749, 2007.

138. **Jacob S, Machann J, Rett K, Brechtel K, Volk A, Renn W, Maerker E, Matthaei S, Schick F, Claussen CD, and Haring HU.** Association of increased intramyocellular lipid content

- with insulin resistance in lean nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 48: 1113-1119, 1999.
139. **Jawien J, Nastalek P, and Korbut R.** Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol* 55: 503-517, 2004.
140. **Jelic S, Padeletti M, Kawut SM, Higgins C, Canfield SM, Onat D, Colombo PC, Basner RC, Factor P, and LeJemtel TH.** Inflammation, oxidative stress, and repair capacity of the vascular endothelium in obstructive sleep apnea. *Circulation* 117: 2270-2278, 2008.
141. **Jouet P, Sabate JM, Maillard D, Msika S, Mechler C, Ledoux S, Harnois F, and Coffin B.** Relationship between obstructive sleep apnea and liver abnormalities in morbidly obese patients: a prospective study. *Obes Surg* 17: 478-485, 2007.
142. **Jun J, Reinke C, Bedja D, Berkowitz D, Bevans-Fonti S, Li J, Barouch LA, Gabrielson K, and Polotsky VY.** Effect of intermittent hypoxia on atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 209: 381-386, 2010.
143. **Kahn BB.** Lilly lecture 1995. Glucose transport: pivotal step in insulin action. *Diabetes* 45: 1644-1654, 1996.
144. **Kanagy NL, Walker BR, and Nelin LD.** Role of endothelin in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension* 37: 511-515, 2001.
145. **Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, and Kasuga M.** MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 116: 1494-1505, 2006.
146. **Kapa S, Sert Kuniyoshi FH, and Somers VK.** Sleep apnea and hypertension: interactions and implications for management. *Hypertension* 51: 605-608, 2008.
147. **Katsuki A, Sumida Y, Urakawa H, Gabazza EC, Murashima S, Maruyama N, Morioka K, Nakatani K, Yano Y, and Adachi Y.** Increased visceral fat and serum levels of triglyceride are associated with insulin resistance in Japanese metabolically obese, normal weight subjects with normal glucose tolerance. *Diabetes Care* 26: 2341-2344, 2003.
148. **Kay SJ, and Fiatarone Singh MA.** The influence of physical activity on abdominal fat: a systematic review of the literature. *Obes Rev* 7: 183-200, 2006.
149. **Kent BD, Garvey JF, Ryan S, Nolan G, Dodd JD, and McNicholas WT.** Severity of obstructive sleep apnoea predicts coronary artery plaque burden: a coronary CT angiography study. *Eur Respir J* 2013.
150. **Khera A, de Lemos JA, Peshock RM, Lo HS, Stanek HG, Murphy SA, Wians FH, Jr., Grundy SM, and McGuire DK.** Relationship between C-reactive protein and subclinical atherosclerosis: the Dallas Heart Study. *Circulation* 113: 38-43, 2006.
151. **Kim JA, Montagnani M, Koh KK, and Quon MJ.** Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation* 113: 1888-1904, 2006.
152. **Kisilevsky R, and Manley PN.** Acute-phase serum amyloid A: perspectives on its physiological and pathological roles. *Amyloid* 19: 5-14, 2012.
153. **Klein S, Fontana L, Young VL, Coggan AR, Kilo C, Patterson BW, and Mohammed BS.** Absence of an effect of liposuction on insulin action and risk factors for coronary heart disease. *N Engl J Med* 350: 2549-2557, 2004.
154. **Kohler HP, and Grant PJ.** Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med* 342: 1792-1801, 2000.
155. **Kono M, Tatsumi K, Saibara T, Nakamura A, Tanabe N, Takiguchi Y, and Kuriyama T.** Obstructive sleep apnea syndrome is associated with some components of metabolic syndrome. *Chest* 131: 1387-1392, 2007.

156. **Koskenvuo M, Kaprio J, Partinen M, Langinvainio H, Sarna S, and Heikkila K.** Snoring as a risk factor for hypertension and angina pectoris. *Lancet* 1: 893-896, 1985.
157. **Kraiczi H, Hedner J, Peker Y, and Carlson J.** Increased vasoconstrictor sensitivity in obstructive sleep apnea. *J Appl Physiol* 89: 493-498, 2000.
158. **Kraiczi H, Hedner J, Peker Y, and Grote L.** Comparison of atenolol, amlodipine, enalapril, hydrochlorothiazide, and losartan for antihypertensive treatment in patients with obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 1423-1428, 2000.
159. **Kraiczi H, Peker Y, Caidahl K, Samuelsson A, and Hedner J.** Blood pressure, cardiac structure and severity of obstructive sleep apnea in a sleep clinic population. *J Hypertens* 19: 2071-2078, 2001.
160. **Krieger J, Sforza E, Delanoe C, and Petiau C.** Decrease in haematocrit with continuous positive airway pressure treatment in obstructive sleep apnoea patients. *Eur Respir J* 5: 228-233, 1992.
161. **Lafontan M, and Langin D.** Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res* 48: 275-297, 2009.
162. **Lam JC, Lam B, Lam CL, Fong D, Wang JK, Tse HF, Lam KS, and Ip MS.** Obstructive sleep apnea and the metabolic syndrome in community-based Chinese adults in Hong Kong. *Respir Med* 100: 980-987, 2006.
163. **Langin D.** Recruitment of brown fat and conversion of white into brown adipocytes: strategies to fight the metabolic complications of obesity? *Biochim Biophys Acta* 1801: 372-376, 2009.
164. **Lavie L, and Lavie P.** CrossTalk opposing view: Most cardiovascular diseases in sleep apnoea are not caused by sympathetic activation. *J Physiol* 590: 2817-2819; discussion 2821, 2012.
165. **Lavie L, Vishnevsky A, and Lavie P.** Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. *Sleep* 27: 123-128, 2004.
166. **Lean ME, James WP, Jennings G, and Trayhurn P.** Brown adipose tissue in patients with pheochromocytoma. *Int J Obes* 10: 219-227, 1986.
167. **Lee DE, Kehlenbrink S, Lee H, Hawkins M, and Yudkin JS.** Getting the message across: mechanisms of physiological cross talk by adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E1210-1229, 2009.
168. **Lee MY, and Griendling KK.** Redox signaling, vascular function, and hypertension. *Antioxid Redox Signal* 10: 1045-1059, 2008.
169. **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.
170. **Lefebvre B, Pepin JL, Baguet JP, Tamisier R, Roustit M, Riedweg K, Bessard G, Levy P, and Stanke-Labesque F.** Leukotriene B4: early mediator of atherosclerosis in obstructive sleep apnoea? *Eur Respir J* 32: 113-120, 2008.
171. **Leproult R, Copinschi G, Buxton O, and Van Cauter E.** Sleep loss results in an elevation of cortisol levels the next evening. *Sleep* 20: 865-870, 1997.
172. **Levy PA, Guilleminault C, Fagret D, Gaio JM, Romand P, Bonnet C, Pison CM, Wolf JE, and Paramelle B.** Changes in left ventricular ejection fraction during REM sleep and exercise in chronic obstructive pulmonary disease and sleep apnoea syndrome. *Eur Respir J* 4: 347-352, 1991.
173. **Li J, Bosch-Marce M, Nanayakkara A, Savransky V, Fried SK, Semenza GL, and Polotsky VY.** Altered metabolic responses to intermittent hypoxia in mice with partial deficiency of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Physiol Genomics* 25: 450-457, 2006.
174. **Li J, Nanayakkara A, Jun J, Savransky V, and Polotsky VY.** Effect of deficiency in SREBP cleavage-activating protein on lipid metabolism during intermittent hypoxia. *Physiol Genomics* 31: 273-280, 2007.

175. **Li J, Savransky V, Nanayakkara A, Smith PL, O'Donnell CP, and Polotsky VY.** Hyperlipidemia and lipid peroxidation are dependent on the severity of chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* 102: 557-563, 2007.
176. **Li J, Thorne LN, Punjabi NM, Sun CK, Schwartz AR, Smith PL, Marino RL, Rodriguez A, Hubbard WC, O'Donnell CP, and Polotsky VY.** Intermittent hypoxia induces hyperlipidemia in lean mice. *Circ Res* 97: 698-706, 2005.
177. **Li R, Lu W, Jia J, Zhang S, Shi L, Li Y, Yang Q, and Kan H.** Relationships between indices of obesity and its cardiovascular comorbidities in a Chinese population. *Circ J* 72: 973-978, 2008.
178. **Li RC, Haribabu B, Mathis SP, Kim J, and Gozal D.** Leukotriene B4 receptor-1 mediates intermittent hypoxia-induced atherogenesis. *Am J Respir Crit Care Med* 184: 124-131, 2011.
179. **Li S, Qian XH, Zhou W, Zhang Y, Feng J, Wan NS, Zhang Z, Guo R, and Chen BY.** Time-dependent inflammatory factor production and NFkappaB activation in a rodent model of intermittent hypoxia. *Swiss Med Wkly* 141: w13309, 2011.
180. **Liak C, and Fitzpatrick M.** Coagulability in obstructive sleep apnea. *Can Respir J* 18: 338-348, 2011.
181. **Lindberg E, Elmasry A, Gislason T, Janson C, Bengtsson H, Hetta J, Nettelbladt M, and Boman G.** Evolution of sleep apnea syndrome in sleepy snorers: a population-based prospective study. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 2024-2027, 1999.
182. **Logan AG, Perlikowski SM, Mente A, Tisler A, Tkacova R, Niroumand M, Leung RS, and Bradley TD.** High prevalence of unrecognized sleep apnoea in drug-resistant hypertension. *J Hypertens* 19: 2271-2277, 2001.
183. **Louis M, and Punjabi NM.** Effects of acute intermittent hypoxia on glucose metabolism in awake healthy volunteers. *J Appl Physiol* 106: 1538-1544, 2009.
184. **Lumeng CN, and Saltiel AR.** Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest* 121: 2111-2117, 2011.
185. **Ma J.** Dixon techniques for water and fat imaging. *J Magn Reson Imaging* 28: 543-558, 2008.
186. **Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, and et al.** Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1: 1155-1161, 1995.
187. **Majde JA, and Krueger JM.** Links between the innate immune system and sleep. *J Allergy Clin Immunol* 116: 1188-1198, 2005.
188. **Malakauskas SM, Kourany WM, Zhang XY, Lu D, Stevens RD, Koves TR, Hohmeier HE, Muoio DM, Newgard CB, and Le TH.** Increased insulin sensitivity in mice lacking collectrin, a downstream target of HNF-1alpha. *Mol Endocrinol* 23: 881-892, 2009.
189. **Malhotra A, and White DP.** Obstructive sleep apnoea. *Lancet* 360: 237-245, 2002.
190. **Malle E, Steinmetz A, and Raynes JG.** Serum amyloid A (SAA): an acute phase protein and apolipoprotein. *Atherosclerosis* 102: 131-146, 1993.
191. **Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, Garcia JG, and Semenza GL.** Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 105: 659-669, 2005.
192. **Mancia G, Grassi G, and Zanchetti A.** New-onset diabetes and antihypertensive drugs. *J Hypertens* 24: 3-10, 2006.
193. **Mantzoros CS.** The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Med* 130: 671-680, 1999.

194. **Marcus NJ, Li YL, Bird CE, Schultz HD, and Morgan BJ.** Chronic intermittent hypoxia augments chemoreflex control of sympathetic activity: role of the angiotensin II type 1 receptor. *Respir Physiol Neurobiol* 171: 36-45, 2010.
195. **Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, and Agusti AG.** Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet* 365: 1046-1053, 2005.
196. **Marrone O, Riccobono L, Salvaggio A, Mirabella A, Bonanno A, and Bonsignore MR.** Catecholamines and blood pressure in obstructive sleep apnea syndrome. *Chest* 103: 722-727, 1993.
197. **Martens FM, Rabelink TJ, op 't Roodt J, de Koning EJ, and Visseren FL.** TNF-alpha induces endothelial dysfunction in diabetic adults, an effect reversible by the PPAR-gamma agonist pioglitazone. *Eur Heart J* 27: 1605-1609, 2006.
198. **Martinez D, and Basile BR.** Sibutramine does not worsen sleep apnea syndrome: a randomized double-blind placebo-controlled study. *Sleep Med* 6: 467-470, 2005.
199. **Maruyama K, Morishita E, Sekiya A, Omote M, Kadono T, Asakura H, Hashimoto M, Kobayashi M, Nakatsumi Y, Takada S, and Ohtake S.** Plasma levels of platelet-derived microparticles in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *J Atheroscler Thromb* 19: 98-104, 2011.
200. **Mason M, Welsh EJ, and Smith I.** Drug therapy for obstructive sleep apnoea in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 5: CD003002, 2013.
201. **Mauer MM, and Bartness TJ.** Fat pad-specific compensatory mass increases after varying degrees of lipectomy in Siberian hamsters. *Am J Physiol* 273: R2117-2123, 1997.
202. **Mauer MM, Harris RB, and Bartness TJ.** The regulation of total body fat: lessons learned from lipectomy studies. *Neurosci Biobehav Rev* 25: 15-28, 2001.
203. **Mazzatti D, Lim FL, O'Hara A, Wood IS, and Trayhurn P.** A microarray analysis of the hypoxia-induced modulation of gene expression in human adipocytes. *Arch Physiol Biochem* 118: 112-120, 2012.
204. **McArdle N, Hillman D, Beilin L, and Watts G.** Metabolic risk factors for vascular disease in obstructive sleep apnea: a matched controlled study. *Am J Respir Crit Care Med* 175: 190-195, 2007.
205. **McKnight SL.** WAT-free mice: diabetes without obesity. *Genes Dev* 12: 3145-3148, 1998.
206. **McLaughlin T, Lamendola C, Liu A, and Abbasi F.** Preferential fat deposition in subcutaneous versus visceral depots is associated with insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 96: E1756-1760, 2011.
207. **Mehra R, Benjamin EJ, Shahar E, Gottlieb DJ, Nawabit R, Kirchner HL, Sahadevan J, and Redline S.** Association of nocturnal arrhythmias with sleep-disordered breathing: The Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 910-916, 2006.
208. **Meier-Ewert HK, Ridker PM, Rifai N, Regan MM, Price NJ, Dinges DF, and Mullington JM.** Effect of sleep loss on C-reactive protein, an inflammatory marker of cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol* 43: 678-683, 2004.
209. **Miller M, Zhan M, and Havas S.** High attributable risk of elevated C-reactive protein level to conventional coronary heart disease risk factors: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med* 165: 2063-2068, 2005.
210. **Milleron O, Pilliere R, Foucher A, de Roquefeuil F, Aegerter P, Jondeau G, Raffestin BG, and Dubourg O.** Benefits of obstructive sleep apnoea treatment in coronary artery disease: a long-term follow-up study. *Eur Heart J* 25: 728-734, 2004.

211. **Minoguchi K, Tazaki T, Yokoe T, Minoguchi H, Watanabe Y, Yamamoto M, and Adachi M.** Elevated production of tumor necrosis factor- α by monocytes in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Chest* 126: 1473-1479, 2004.
212. **Minoguchi K, Yokoe T, Tazaki T, Minoguchi H, Tanaka A, Oda N, Okada S, Ohta S, Naito H, and Adachi M.** Increased carotid intima-media thickness and serum inflammatory markers in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 172: 625-630, 2005.
213. **Moller DS, Lind P, Strunge B, and Pedersen EB.** Abnormal vasoactive hormones and 24-hour blood pressure in obstructive sleep apnea. *Am J Hypertens* 16: 274-280, 2003.
214. **Monneret D, Pepin JL, Godin-Ribuot D, Ducros V, Baguet JP, Levy P, and Faure P.** 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, 2009.
215. **Morton NM.** Obesity and corticosteroids: 11 β -hydroxysteroid type 1 as a cause and therapeutic target in metabolic disease. *Mol Cell Endocrinol* 316: 154-164, 2009.
216. **Mostefai HA, Meziani F, Mastronardi ML, Agouni A, Heymes C, Sargentini C, Asfar P, Martinez MC, and Andriantsitohaina R.** Circulating microparticles from patients with septic shock exert protective role in vascular function. *Am J Respir Crit Care Med* 178: 1148-1155, 2008.
217. **Muniyappa R, Lee S, Chen H, and Quon MJ.** Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E15-26, 2008.
218. **Muniyappa R, Montagnani M, Koh KK, and Quon MJ.** Cardiovascular actions of insulin. *Endocr Rev* 28: 463-491, 2007.
219. **Munzel T, Sinning C, Post F, Warnholtz A, and Schulz E.** Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Ann Med* 40: 180-196, 2008.
220. **Murano I, Barbatelli G, Parisani V, Latini C, Muzzonigro G, Castellucci M, and Cinti S.** Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J Lipid Res* 49: 1562-1568, 2008.
221. **Nacher M, Farre R, Montserrat JM, Torres M, Navajas D, Bulbena O, and Serrano-Mollar A.** Biological consequences of oxygen desaturation and respiratory effort in an acute animal model of obstructive sleep apnea (OSA). *Sleep Med* 10: 892-897, 2009.
222. **Nachtmann A, Stang A, Wang YM, Wondzinski E, and Thilmann AF.** Association of obstructive sleep apnea and stenotic artery disease in ischemic stroke patients. *Atherosclerosis* 169: 301-307, 2003.
223. **Narkiewicz K, Montano N, Cogliati C, van de Borne PJ, Dyken ME, and Somers VK.** Altered cardiovascular variability in obstructive sleep apnea. *Circulation* 98: 1071-1077, 1998.
224. **Narkiewicz K, and Somers VK.** Cardiovascular variability characteristics in obstructive sleep apnea. *Auton Neurosci* 90: 89-94, 2001.
225. **Narkiewicz K, van de Borne PJ, Pesek CA, Dyken ME, Montano N, and Somers VK.** Selective potentiation of peripheral chemoreflex sensitivity in obstructive sleep apnea. *Circulation* 99: 1183-1189, 1999.
226. **Newman AB, Foster G, Givelber R, Nieto FJ, Redline S, and Young T.** Progression and regression of sleep-disordered breathing with changes in weight: the Sleep Heart Health Study. *Arch Intern Med* 165: 2408-2413, 2005.
227. **Newman AB, Nieto FJ, Guidry U, Lind BK, Redline S, Pickering TG, and Quan SF.** Relation of sleep-disordered breathing to cardiovascular disease risk factors: the Sleep Heart Health Study. *Am J Epidemiol* 154: 50-59, 2001.
228. **Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A, Liu-Bryan R, Glass CK, Neels JG, and Olefsky JM.** A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic

adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem* 282: 35279-35292, 2007.

229. **Nicolai A, Li M, Kim DH, Peterson SJ, Vanella L, Positano V, Gastaldelli A, Rezzani R, Rodella LF, Drummond G, Kusmic C, L'Abbate A, Kappas A, and Abraham NG.** Heme oxygenase-1 induction remodels adipose tissue and improves insulin sensitivity in obesity-induced diabetic rats. *Hypertension* 53: 508-515, 2009.

230. **Nieto-Vazquez I, Fernandez-Veledo S, de Alvaro C, Rondinone CM, Valverde AM, and Lorenzo M.** Protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient myocytes show increased insulin sensitivity and protection against tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance. *Diabetes* 56: 404-413, 2007.

231. **Nieto FJ, Young TB, Lind BK, Shahar E, Samet JM, Redline S, D'Agostino RB, Newman AB, Lebowitz MD, and Pickering TG.** Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. Sleep Heart Health Study. *JAMA* 283: 1829-1836, 2000.

232. **Nobili L, Schiavi G, Bozano E, De Carli F, Ferrillo F, and Nobili F.** Morning increase of whole blood viscosity in obstructive sleep apnea syndrome. *Clin Hemorheol Microcirc* 22: 21-27, 2000.

233. **Odegaard JI, and Chawla A.** Pleiotropic actions of insulin resistance and inflammation in metabolic homeostasis. *Science* 339: 172-177, 2013.

234. **Oga T, Chin K, Tabuchi A, Kawato M, Morimoto T, Takahashi K, Handa T, Taniguchi R, Kondo H, Mishima M, Kita T, and Horiuchi H.** Effects of obstructive sleep apnea with intermittent hypoxia on platelet aggregability. *J Atheroscler Thromb* 16: 862-869, 2009.

235. **Ohga E, Tomita T, Wada H, Yamamoto H, Nagase T, and Ouchi Y.** Effects of obstructive sleep apnea on circulating ICAM-1, IL-8, and MCP-1. *J Appl Physiol* 94: 179-184, 2003.

236. **Ohman MK, Shen Y, Obimba CI, Wright AP, Warnock M, Lawrence DA, and Eitzman DT.** Visceral adipose tissue inflammation accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 117: 798-805, 2008.

237. **Olefsky JM, and Glass CK.** Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol* 72: 219-246, 2010.

238. **Opal SM, Laterre PF, Francois B, LaRosa SP, Angus DC, Mira JP, Wittebole X, Dugernier T, Perrotin D, Tidswell M, Jauregui L, Krell K, Pachel J, Takahashi T, Peckelsen C, Cordasco E, Chang CS, Oeyen S, Aikawa N, Maruyama T, Schein R, Kalil AC, Van Nuffelen M, Lynn M, Rossignol DP, Gogate J, Roberts MB, Wheeler JL, and Vincent JL.** Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *JAMA* 309: 1154-1162, 2013.

239. **Owens AP, 3rd, Passam FH, Antoniak S, Marshall SM, McDaniel AL, Rudel L, Williams JC, Hubbard BK, Dutton JA, Wang J, Tobias PS, Curtiss LK, Daugherty A, Kirchhofer D, Luyendyk JP, Moriarty PM, Nagarajan S, Furie BC, Furie B, Johns DG, Temel RE, and Mackman N.** Monocyte tissue factor-dependent activation of coagulation in hypercholesterolemic mice and monkeys is inhibited by simvastatin. *J Clin Invest* 122: 558-568.

240. **Palatini P, Penzo M, Racioppa A, Zugno E, Guzzardi G, Anaclerio M, and Pessina AC.** Clinical relevance of nighttime blood pressure and of daytime blood pressure variability. *Arch Intern Med* 152: 1855-1860, 1992.

241. **Pedrinelli R, Giampietro O, Carmassi F, Melillo E, Dell'Omo G, Catapano G, Matteucci E, Talarico L, Morale M, De Negri F, and et al.** Microalbuminuria and endothelial dysfunction in essential hypertension. *Lancet* 344: 14-18, 1994.

242. **Pedrosa RP, Krieger EM, Lorenzi-Filho G, and Drager LF.** Recent advances of the impact of obstructive sleep apnea on systemic hypertension. *Arq Bras Cardiol* 97: e40-47, 2011.
243. **Peker Y, Carlson J, and Hedner J.** Increased incidence of coronary artery disease in sleep apnoea: a long-term follow-up. *Eur Respir J* 28: 596-602, 2006.
244. **Peker Y, Hedner J, Kraiczi H, and Loth S.** Respiratory disturbance index: an independent predictor of mortality in coronary artery disease. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 81-86, 2000.
245. **Peker Y, Hedner J, Norum J, Kraiczi H, and Carlson J.** 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: 159-165, 2002.
246. **Pendlebury ST, Pepin JL, Veale D, and Levy P.** Natural evolution of moderate sleep apnoea syndrome: significant progression over a mean of 17 months. *Thorax* 52: 872-878, 1997.
247. **Peng YJ, Overholt JL, Kline D, Kumar GK, and Prabhakar NR.** Induction of sensory long-term facilitation in the carotid body by intermittent hypoxia: implications for recurrent apneas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10073-10078, 2003.
248. **Pepin JL, Chouri-Pontarollo N, Tamisier R, and Levy P.** [Long term compliance with nasal CPAP]. *Rev Mal Respir* 22: 922-924, 2005.
249. **Pepin JL, Krieger J, Rodenstein D, Cornette A, Sforza E, Delguste P, Deschaux C, Grillier V, and Levy P.** Effective compliance during the first 3 months of continuous positive airway pressure. A European prospective study of 121 patients. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 1124-1129, 1999.
250. **Pepin JL, Tamisier R, Barone-Rochette G, Launois SH, Levy P, and Baguet JP.** Comparison of continuous positive airway pressure and valsartan in hypertensive patients with sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 954-960, 2010.
251. **Peppard PE, Young T, Palta M, Dempsey J, and Skatrud J.** Longitudinal study of moderate weight change and sleep-disordered breathing. *JAMA* 284: 3015-3021, 2000.
252. **Peppard PE, Young T, Palta M, and Skatrud J.** Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N Engl J Med* 342: 1378-1384, 2000.
253. **Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, and Nedergaard J.** Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem* 285: 7153-7164, 2009.
254. **Phillips BG, Narkiewicz K, Pesek CA, Haynes WG, Dyken ME, and Somers VK.** Effects of obstructive sleep apnea on endothelin-1 and blood pressure. *J Hypertens* 17: 61-66, 1999.
255. **Polotsky VY, Li J, Punjabi NM, Rubin AE, Smith PL, Schwartz AR, and O'Donnell CP.** Intermittent hypoxia increases insulin resistance in genetically obese mice. *J Physiol* 552: 253-264, 2003.
256. **Polotsky VY, Patil SP, Savransky V, Laffan A, Fonti S, Frame LA, Steele KE, Schweitzer MA, Clark JM, Torbenson MS, and Schwartz AR.** Obstructive sleep apnea, insulin resistance, and steatohepatitis in severe obesity. *Am J Respir Crit Care Med* 179: 228-234, 2009.
257. **Polotsky VY, Rubin AE, Balbir A, Dean T, Smith PL, Schwartz AR, and O'Donnell CP.** Intermittent hypoxia causes REM sleep deficits and decreases EEG delta power in NREM sleep in the C57BL/6J mouse. *Sleep Med* 7: 7-16, 2006.
258. **Poulain L, Thomas A, Rieusset J, Casteilla L, Levy P, Arnaud C, and Dematteis M.** Visceral white fat remodeling contributes to intermittent hypoxia-induced atherogenesis. *Eur Respir J* Accepted for publication: 2013.
259. **Prabhakar NR.** Sleep apneas: an oxidative stress? *Am J Respir Crit Care Med* 165: 859-860, 2002.

260. **Prabhakar NR, Kumar GK, and Nanduri J.** Intermittent hypoxia augments acute hypoxic sensing via HIF-mediated ROS. *Respir Physiol Neurobiol* 174: 230-234, 2010.
261. **Preis SR, Massaro JM, Robins SJ, Hoffmann U, Vasan RS, Irlbeck T, Meigs JB, Sutherland P, D'Agostino RB, Sr., O'Donnell CJ, and Fox CS.** Abdominal subcutaneous and visceral adipose tissue and insulin resistance in the Framingham heart study. *Obesity (Silver Spring)* 18: 2191-2198, 2010.
262. **Priou P, Gagnadoux F, Tesse A, Mastronardi ML, Agouni A, Meslier N, Racineux JL, Martinez MC, Trzepizur W, and Andriantsitohaina R.** Endothelial dysfunction and circulating microparticles from patients with obstructive sleep apnea. *Am J Pathol* 177: 974-983, 2010.
263. **Puhan MA, Suarez A, Lo Cascio C, Zahn A, Heitz M, and Braendli O.** Didgeridoo playing as alternative treatment for obstructive sleep apnoea syndrome: randomised controlled trial. *BMJ* 332: 266-270, 2006.
264. **Punjabi NM, and Polotsky VY.** Disorders of glucose metabolism in sleep apnea. *J Appl Physiol* 99: 1998-2007, 2005.
265. **Punjabi NM, Shahar E, Redline S, Gottlieb DJ, Givelber R, and Resnick HE.** Sleep-disordered breathing, glucose intolerance, and insulin resistance: the Sleep Heart Health Study. *Am J Epidemiol* 160: 521-530, 2004.
266. **Punjabi NM, Sorkin JD, Katzel LI, Goldberg AP, Schwartz AR, and Smith PL.** Sleep-disordered breathing and insulin resistance in middle-aged and overweight men. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 677-682, 2002.
267. **Rahangdale S, Yeh SY, Novack V, Stevenson K, Barnard MR, Furman MI, Frelinger AL, Michelson AD, and Malhotra A.** The influence of intermittent hypoxemia on platelet activation in obese patients with obstructive sleep apnea. *J Clin Sleep Med* 7: 172-178, 2011.
268. **Reilly MP, Iqbal N, Schutta M, Wolfe ML, Scally M, Localio AR, Rader DJ, and Kimmel SE.** Plasma leptin levels are associated with coronary atherosclerosis in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 3872-3878, 2004.
269. **Reinhart WH, Oswald J, Walter R, and Kuhn M.** Blood viscosity and platelet function in patients with obstructive sleep apnea syndrome treated with nasal continuous positive airway pressure. *Clin Hemorheol Microcirc* 27: 201-207, 2002.
270. **Reinke C, Bevans-Fonti S, Drager LF, Shin MK, and Polotsky VY.** Effects of different acute hypoxic regimens on tissue oxygen profiles and metabolic outcomes. *J Appl Physiol* 111: 881-890, 2011.
271. **Richey JM, Woolcott OO, Stefanovski D, Harrison LN, Zheng D, Lottati M, Hsu IR, Kim SP, Kabir M, Catalano KJ, Chiu JD, Ionut V, Kolka C, Mooradian V, and Bergman RN.** Rimonabant prevents additional accumulation of visceral and subcutaneous fat during high-fat feeding in dogs. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E1311-1318, 2009.
272. **Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, and Hennekens CH.** Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation* 97: 425-428, 1998.
273. **Rieusset J, Touri F, Michalik L, Escher P, Desvergne B, Niesor E, and Wahli W.** A new selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonist with antiobesity and antidiabetic activity. *Mol Endocrinol* 16: 2628-2644, 2002.
274. **Rizzoni D, Porteri E, Guelfi D, Muiesan ML, Piccoli A, Valentini U, Cimino A, Girelli A, Salvetti M, De Ciuceis C, Tiberio GA, Giulini SM, Sleiman I, Monteduro C, and Rosei EA.** Endothelial dysfunction in small resistance arteries of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Hypertens* 19: 913-919, 2001.

275. **Robinson GV, Pepperell JC, Segal HC, Davies RJ, and Stradling JR.** Circulating cardiovascular risk factors in obstructive sleep apnoea: data from randomised controlled trials. *Thorax* 59: 777-782, 2004.
276. **Robinson GV, Smith DM, Langford BA, Davies RJ, and Stradling JR.** Continuous positive airway pressure does not reduce blood pressure in nonsleepy hypertensive OSA patients. *Eur Respir J* 27: 1229-1235, 2006.
277. **Roche F, Sforza E, Pichot V, Maudoux D, Garcin A, Celle S, Picard-Kossovsky M, Gaspoz JM, and Barthelemy JC.** Obstructive sleep apnoea/hypopnea influences high-density lipoprotein cholesterol in the elderly. *Sleep Med* 10: 882-886, 2009.
278. **Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, and Shulman GI.** Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* 97: 2859-2865, 1996.
279. **Roden M, Stingl H, Chandramouli V, Schumann WC, Hofer A, Landau BR, Nowotny P, Waldhausl W, and Shulman GI.** Effects of free fatty acid elevation on postabsorptive endogenous glucose production and gluconeogenesis in humans. *Diabetes* 49: 701-707, 2000.
280. **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.
281. **Rosen ED, and Spiegelman BM.** Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444: 847-853, 2006.
282. **Roth Flach RJ, Matevossian A, Akie TE, Negrin KA, Paul MT, and Czech MP.** beta3-adrenergic receptor stimulation induces E-selectin-mediated adipose tissue inflammation. *J Biol Chem* 2012.
283. **Rubin AE, Polotsky VY, Balbir A, Krishnan JA, Schwartz AR, Smith PL, Fitzgerald RS, Tankersley CG, Shirahata M, and O'Donnell CP.** Differences in sleep-induced hypoxia between A/J and DBA/2J mouse strains. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 1520-1527, 2003.
284. **Ryan CM, Usui K, Floras JS, and Bradley TD.** Effect of continuous positive airway pressure on ventricular ectopy in heart failure patients with obstructive sleep apnoea. *Thorax* 60: 781-785, 2005.
285. **Ryan S, Nolan GM, Hannigan E, Cunningham S, Taylor C, and McNicholas WT.** Cardiovascular risk markers in obstructive sleep apnoea syndrome and correlation with obesity. *Thorax* 62: 509-514, 2007.
286. **Ryan S, Taylor CT, and McNicholas WT.** Predictors of elevated nuclear factor-kappaB-dependent genes in obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 174: 824-830, 2006.
287. **Ryan S, Taylor CT, and McNicholas WT.** Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation* 112: 2660-2667, 2005.
288. **Saarelainen S, Hasan J, Siitonen S, and Seppala E.** Effect of nasal CPAP treatment on plasma volume, aldosterone and 24-h blood pressure in obstructive sleep apnoea. *J Sleep Res* 5: 181-185, 1996.
289. **Saarelainen S, Lahtela J, and Kallonen E.** Effect of nasal CPAP treatment on insulin sensitivity and plasma leptin. *J Sleep Res* 6: 146-147, 1997.
290. **Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Miyagawa M, Kameya T, Nakada K, Kawai Y, and Tsujisaki M.** High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* 58: 1526-1531, 2009.

291. **Sam K, Lam B, Ooi CG, Cooke M, and Ip MS.** Effect of a non-adjustable oral appliance on upper airway morphology in obstructive sleep apnoea. *Respir Med* 100: 897-902, 2006.
292. **Sampol G, Romero O, Salas A, Tovar JL, Lloberes P, Sagales T, and Evangelista A.** Obstructive sleep apnea and thoracic aorta dissection. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 1528-1531, 2003.
293. **Sasanabe R, Banno K, Otake K, Hasegawa R, Usui K, Morita M, and Shiomi T.** Metabolic syndrome in Japanese patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Hypertens Res* 29: 315-322, 2006.
294. **Sattar N, Wannamethee G, Sarwar N, Tchernova J, Cherry L, Wallace AM, Danesh J, and Whincup PH.** Adiponectin and coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis. *Circulation* 114: 623-629, 2006.
295. **Savage DB, Petersen KF, and Shulman GI.** Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev* 87: 507-520, 2007.
296. **Savransky V, Bevans S, Nanayakkara A, Li J, Smith PL, Torbenson MS, and Polotsky VY.** Chronic intermittent hypoxia causes hepatitis in a mouse model of diet-induced fatty liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293: G871-877, 2007.
297. **Savransky V, Jun J, Li J, Nanayakkara A, Fonti S, Moser AB, Steele KE, Schweitzer MA, Patil SP, Bhanot S, Schwartz AR, and Polotsky VY.** Dyslipidemia and atherosclerosis induced by chronic intermittent hypoxia are attenuated by deficiency of stearoyl coenzyme A desaturase. *Circ Res* 103: 1173-1180, 2008.
298. **Savransky V, Nanayakkara A, Li J, Bevans S, Smith PL, Rodriguez A, and Polotsky VY.** Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis. *Am J Respir Crit Care Med* 175: 1290-1297, 2007.
299. **Savransky V, Nanayakkara A, Vivero A, Li J, Bevans S, Smith PL, Torbenson MS, and Polotsky VY.** Chronic intermittent hypoxia predisposes to liver injury. *Hepatology* 45: 1007-1013, 2007.
300. **Schiffrin EL.** Vascular remodeling in hypertension: mechanisms and treatment. *Hypertension* 59: 367-374, 2011.
301. **Schulz R, Mahmoudi S, Hattar K, Sibelius U, Olschewski H, Mayer K, Seeger W, and Grimminger F.** Enhanced release of superoxide from polymorphonuclear neutrophils in obstructive sleep apnea. Impact of continuous positive airway pressure therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 566-570, 2000.
302. **Schulz R, Schmidt D, Blum A, Lopes-Ribeiro X, Lucke C, Mayer K, Olschewski H, Seeger W, and Grimminger F.** Decreased plasma levels of nitric oxide derivatives in obstructive sleep apnoea: response to CPAP therapy. *Thorax* 55: 1046-1051, 2000.
303. **Schwartz EA, and Reaven PD.** Lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins, vascular inflammation, and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1821: 858-866, 2011.
304. **Sforza E, Addati G, Cirignotta F, and Lugaresi E.** Natural evolution of sleep apnoea syndrome: a five year longitudinal study. *Eur Respir J* 7: 1765-1770, 1994.
305. **Sforza E, Boissier C, Martin MS, Feasson S, Barthelemy JC, and Roche F.** Carotid artery atherosclerosis and sleep disordered breathing in healthy elderly subjects: the Synapse cohort. *Sleep Med* 14: 66-70, 2012.
306. **Shahar E, Whitney CW, Redline S, Lee ET, Newman AB, Nieto FJ, O'Connor GT, Boland LL, Schwartz JE, and Samet JM.** Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: cross-sectional results of the Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 19-25, 2001.

307. **Shamsuzzaman AS, Winnicki M, Lanfranchi P, Wolk R, Kara T, Accurso V, and Somers VK.** Elevated C-reactive protein in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation* 105: 2462-2464, 2002.
308. **Sharabi Y, Scope A, Chorney N, Grotto I, and Dagan Y.** Diastolic blood pressure is the first to rise in association with early subclinical obstructive sleep apnea: lessons from periodic examination screening. *Am J Hypertens* 16: 236-239, 2003.
309. **Sharma SK, Agrawal S, Damodaran D, Sreenivas V, Kadhiraivan T, Lakshmy R, Jagia P, and Kumar A.** CPAP for the metabolic syndrome in patients with obstructive sleep apnea. *N Engl J Med* 365: 2277-2286, 2011.
310. **Sharma SK, Kumpawat S, Goel A, Banga A, Ramakrishnan L, and Chaturvedi P.** Obesity, and not obstructive sleep apnea, is responsible for metabolic abnormalities in a cohort with sleep-disordered breathing. *Sleep Med* 8: 12-17, 2007.
311. **Shen W, Wang Z, Punyanita M, Lei J, Sinav A, Kral JG, Imielinska C, Ross R, and Heymsfield SB.** Adipose tissue quantification by imaging methods: a proposed classification. *Obes Res* 11: 5-16, 2003.
312. **Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzamelis I, Yin H, and Flier JS.** TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116: 3015-3025, 2006.
313. **Silber MH, Ancoli-Israel S, Bonnet MH, Chokroverty S, Grigg-Damberger MM, Hirshkowitz M, Kapen S, Keenan SA, Kryger MH, Penzel T, Pressman MR, and Iber C.** The visual scoring of sleep in adults. *J Clin Sleep Med* 3: 121-131, 2007.
314. **Silverberg DS, Oksenberg A, and Iaina A.** Sleep-related breathing disorders as a major cause of essential hypertension: fact or fiction? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 7: 353-357, 1998.
315. **Silvestrini M, Rizzato B, Placidi F, Baruffaldi R, Bianconi A, and Diomedes M.** Carotid artery wall thickness in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Stroke* 33: 1782-1785, 2002.
316. **Singh JP, Larson MG, Tsuji H, Evans JC, O'Donnell CJ, and Levy D.** Reduced heart rate variability and new-onset hypertension: insights into pathogenesis of hypertension: the Framingham Heart Study. *Hypertension* 32: 293-297, 1998.
317. **Sivam S, Phillips CL, Trenell MI, Yee BJ, Liu PY, Wong KK, and Grunstein RR.** Effects of 8 weeks of continuous positive airway pressure on abdominal adiposity in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 40: 913-918, 2012.
318. **Sjostrom C, Lindberg E, Elmasry A, Hagg A, Svardsudd K, and Janson C.** Prevalence of sleep apnoea and snoring in hypertensive men: a population based study. *Thorax* 57: 602-607, 2002.
319. **Smith I, Lasserson TJ, and Wright J.** Drug therapy for obstructive sleep apnoea in adults. *Cochrane Database Syst Rev* CD003002, 2006.
320. **Smurra M, Philip P, Taillard J, Guilleminault C, Bioulac B, and Gin H.** CPAP treatment does not affect glucose-insulin metabolism in sleep apneic patients. *Sleep Med* 2: 207-213, 2001.
321. **Sobel BE, Taatjes DJ, and Schneider DJ.** Intramural plasminogen activator inhibitor type-1 and coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1979-1989, 2003.
322. **Somers VK, Dyken ME, Clary MP, and Abboud FM.** Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep apnea. *J Clin Invest* 96: 1897-1904, 1995.
323. **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.

324. **Song D, Fang G, Mao SZ, Ye X, Liu G, Gong Y, and Liu SF.** Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis by NF-kappaB-dependent mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1822: 1650-1659, 2012.
325. **Sookoian S, and Pirola CJ.** Non-alcoholic fatty liver disease is strongly associated with carotid atherosclerosis: a systematic review. *J Hepatol* 49: 600-607, 2008.
326. **Spiegel K, Knutson K, Leproult R, Tasali E, and Van Cauter E.** Sleep loss: a novel risk factor for insulin resistance and Type 2 diabetes. *J Appl Physiol* 99: 2008-2019, 2005.
327. **Spiegel K, Leproult R, and Van Cauter E.** Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function. *Lancet* 354: 1435-1439, 1999.
328. **Stanford KI, Middelbeek RJ, Townsend KL, An D, Nygaard EB, Hitchcox KM, Markan KR, Nakano K, Hirshman MF, Tseng YH, and Goodyear LJ.** Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest* 123: 215-223, 2012.
329. **Stanke-Labesque F, Back M, Lefebvre B, Tamisier R, Baguet JP, Arnol N, Levy P, and Pepin JL.** Increased urinary leukotriene E4 excretion in obstructive sleep apnea: effects of obesity and hypoxia. *J Allergy Clin Immunol* 124: 364-370, 370 e361-362, 2009.
330. **Stanke-Labesque F, Pepin JL, de Jouvencel T, Arnaud C, Baguet JP, Petri MH, Tamisier R, Jourdil JF, Levy P, and Back M.** Leukotriene B4 pathway activation and atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *J Lipid Res* 53: 1944-1951, 2012.
331. **Steinberg HO, and Baron AD.** Vascular function, insulin resistance and fatty acids. *Diabetologia* 45: 623-634, 2002.
332. **Steiropoulos P, Tsara V, Nena E, Fiteli C, Kataropoulou M, Froudarakis M, Christaki P, and Bouros D.** Effect of continuous positive airway pressure treatment on serum cardiovascular risk factors in patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Chest* 132: 843-851, 2007.
333. **Stepanova M, and Younossi ZM.** Independent association between nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease in the US population. *Clin Gastroenterol Hepatol* 10: 646-650, 2012.
334. **Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW, 2nd, DeFuria J, Jick Z, Greenberg AS, and Obin MS.** Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* 56: 2910-2918, 2007.
335. **Suganami T, Nishida J, and Ogawa Y.** A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 2062-2068, 2005.
336. **Suganami T, Yuan X, Shimoda Y, Uchio-Yamada K, Nakagawa N, Shirakawa I, Usami T, Tsukahara T, Nakayama K, Miyamoto Y, Yasuda K, Matsuda J, Kamei Y, Kitajima S, and Ogawa Y.** Activating transcription factor 3 constitutes a negative feedback mechanism that attenuates saturated Fatty acid/toll-like receptor 4 signaling and macrophage activation in obese adipose tissue. *Circ Res* 105: 25-32, 2009.
337. **Sukys-Claudino L, Moraes W, Guilleminault C, Tufik S, and Poyares D.** Beneficial effect of donepezil on obstructive sleep apnea: a double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Sleep Med* 13: 290-296, 2012.
338. **Sullivan CE, Issa FG, Berthon-Jones M, and Eves L.** Reversal of obstructive sleep apnoea by continuous positive airway pressure applied through the nares. *Lancet* 1: 862-865, 1981.
339. **Suzuki YJ, Jain V, Park AM, and Day RM.** Oxidative stress and oxidant signaling in obstructive sleep apnea and associated cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* 40: 1683-1692, 2006.
340. **Svatikova A, Olson LJ, Wolk R, Phillips BG, Adachi T, Schwartz GL, and Somers VK.** Obstructive sleep apnea and aldosterone. *Sleep* 32: 1589-1592, 2009.

341. **Taguchi K, Matsumoto T, Kamata K, and Kobayashi T.** G protein-coupled receptor kinase 2, with beta-arrestin 2, impairs insulin-induced Akt/endothelial nitric oxide synthase signaling in ob/ob mouse aorta. *Diabetes* 61: 1978-1985, 2012.
342. **Tahawi Z, Orolinova N, Joshua IG, Bader M, and Fletcher EC.** Altered vascular reactivity in arterioles of chronic intermittent hypoxic rats. *J Appl Physiol* 90: 2007-2013; discussion 2000, 2001.
343. **Tan KC, Chow WS, Lam JC, Lam B, Wong WK, Tam S, and Ip MS.** HDL dysfunction in obstructive sleep apnea. *Atherosclerosis* 184: 377-382, 2006.
344. **Tanne F, Gagnadoux F, Chazouilleres O, Fleury B, Wendum D, Lasnier E, Lebeau B, Poupon R, and Serfaty L.** Chronic liver injury during obstructive sleep apnea. *Hepatology* 41: 1290-1296, 2005.
345. **Targher G, Bertolini L, Rodella S, Tessari R, Zenari L, Lippi G, and Arcaro G.** Nonalcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased incidence of cardiovascular events in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 30: 2119-2121, 2007.
346. **Tassone F, Lanfranco F, Gianotti L, Pivetti S, Navone F, Rossetto R, Grottoli S, Gai V, Ghigo E, and Maccario M.** Obstructive sleep apnoea syndrome impairs insulin sensitivity independently of anthropometric variables. *Clin Endocrinol (Oxf)* 59: 374-379, 2003.
347. **Tatsumi K, Kasahara Y, Kurosu K, Tanabe N, Takiguchi Y, and Kuriyama T.** Sleep oxygen desaturation and circulating leptin in obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Chest* 127: 716-721, 2005.
348. **Tatsumi K, and Saibara T.** Effects of obstructive sleep apnea syndrome on hepatic steatosis and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res* 33: 100-104, 2005.
349. **Taube A, Schlich R, Sell H, Eckardt K, and Eckel J.** Inflammation and metabolic dysfunction: links to cardiovascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H2148-2165, 2012.
350. **Tazbirek M, Slowinska L, Skoczynski S, and Pierzchala W.** Short-term continuous positive airway pressure therapy reverses the pathological influence of obstructive sleep apnea on blood rheology parameters. *Clin Hemorheol Microcirc* 41: 241-249, 2009.
351. **Tchernof A, and Despres JP.** Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev* 93: 359-404, 2013.
352. **Teran-Santos J, Jimenez-Gomez A, and Cordero-Guevara J.** The association between sleep apnea and the risk of traffic accidents. Cooperative Group Burgos-Santander. *N Engl J Med* 340: 847-851, 1999.
353. **Thompson SR, Ackermann U, and Horner RL.** Sleep as a teaching tool for integrating respiratory physiology and motor control. *Adv Physiol Educ* 25: 101-116, 2001.
354. **Tilg H, and Moschen AR.** Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 6: 772-783, 2006.
355. **Trayhurn P.** Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiol Rev* 93: 1-21, 2013.
356. **Tripathy D, Mohanty P, Dhindsa S, Syed T, Ghanim H, Aljada A, and Dandona P.** Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes* 52: 2882-2887, 2003.
357. **Trzepizur W, Priou P, Paris A, Nardi J, Tual-Chalot S, Meslier N, Urban T, Andriantsitohaina R, Martinez MC, and Gagnadoux F.** Nocturnal release of leukocyte-derived microparticles in males with obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 37: 1293-1295, 2011.
358. **Tsioufis C, Vezali E, Tsiachris D, Dimitriadis K, Taxiarchou E, Chatzis D, Thomopoulos C, Syrseloudis D, Stefanadi E, Mihas C, Katsi V, Papademetriou V, and Stefanadis C.** Left

- ventricular hypertrophy versus chronic kidney disease as predictors of cardiovascular events in hypertension: a Greek 6-year-follow-up study. *J Hypertens* 27: 744-752, 2009.
359. **Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, Araujo EP, Vassallo J, Curi R, Velloso LA, and Saad MJ.** Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56: 1986-1998, 2007.
360. **Turmel J, Series F, Boulet LP, Poirier P, Tardif JC, Rodes-Cabeau J, Larose E, and Bertrand OF.** Relationship between atherosclerosis and the sleep apnea syndrome: an intravascular ultrasound study. *Int J Cardiol* 132: 203-209, 2009.
361. **Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Dejana E, Schultz DA, Engelhardt B, Cao G, DeLisser H, and Schwartz MA.** A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* 437: 426-431, 2005.
362. **van Buul JD, and Hordijk PL.** Signaling in leukocyte transendothelial migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 824-833, 2004.
363. **Van Cauter E, Plat L, and Copinschi G.** Interrelations between sleep and the somatotrophic axis. *Sleep* 21: 553-566, 1998.
364. **van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P, and Teule GJ.** Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* 360: 1500-1508, 2009.
365. **Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, Kales A, Tyson K, and Chrousos GP.** Elevation of plasma cytokines in disorders of excessive daytime sleepiness: role of sleep disturbance and obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 1313-1316, 1997.
366. **Vgontzas AN, Zoumakis E, Bixler EO, Lin HM, Follett H, Kales A, and Chrousos GP.** Adverse effects of modest sleep restriction on sleepiness, performance, and inflammatory cytokines. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2119-2126, 2004.
367. **Vgontzas AN, Zoumakis E, Lin HM, Bixler EO, Trakada G, and Chrousos GP.** Marked decrease in sleepiness in patients with sleep apnea by etanercept, a tumor necrosis factor-alpha antagonist. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 4409-4413, 2004.
368. **Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto NJ, Enerback S, and Nuutila P.** Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 360: 1518-1525, 2009.
369. **von Kanel R, Loreda JS, Ancoli-Israel S, Mills PJ, Natarajan L, and Dimsdale JE.** Association between polysomnographic measures of disrupted sleep and prothrombotic factors. *Chest* 131: 733-739, 2007.
370. **Wajchenberg BL.** Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 21: 697-738, 2000.
371. **Walden TB, Hansen IR, Timmons JA, Cannon B, and Nedergaard J.** Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302: E19-31, 2011.
372. **Wallace AM, McMahon AD, Packard CJ, Kelly A, Shepherd J, Gaw A, and Sattar N.** Plasma leptin and the risk of cardiovascular disease in the west of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS). *Circulation* 104: 3052-3056, 2001.
373. **Wang B, Wood IS, and Trayhurn P.** Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes. *Pflugers Arch* 455: 479-492, 2007.
374. **Wang D, Paz-Priel I, and Friedman AD.** NF-kappa B p50 regulates C/EBP alpha expression and inflammatory cytokine-induced neutrophil production. *J Immunol* 182: 5757-5762, 2009.
375. **Wang H, and Eckel RH.** Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E271-288, 2009.

376. **Wassmann S, Czech T, van Eickels M, Fleming I, Bohm M, and Nickenig G.** Inhibition of diet-induced atherosclerosis and endothelial dysfunction in apolipoprotein E/angiotensin II type 1A receptor double-knockout mice. *Circulation* 110: 3062-3067, 2004.
377. **Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, and Ferrante AW, Jr.** Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112: 1796-1808, 2003.
378. **Weitzberg E.** Circulatory responses to endothelin-1 and nitric oxide with special reference to endotoxin shock and nitric oxide inhalation. *Acta Physiol Scand Suppl* 611: 1-72, 1993.
379. **Welch KC, Foster GD, Ritter CT, Wadden TA, Arens R, Maislin G, and Schwab RJ.** A novel volumetric magnetic resonance imaging paradigm to study upper airway anatomy. *Sleep* 25: 532-542, 2002.
380. **West SD, Nicoll DJ, Wallace TM, Matthews DR, and Stradling JR.** Effect of CPAP on insulin resistance and HbA1c in men with obstructive sleep apnoea and type 2 diabetes. *Thorax* 62: 969-974, 2007.
381. **Whitehead JP, Richards AA, Hickman IJ, Macdonald GA, and Prins JB.** Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab* 8: 264-280, 2006.
382. **Williams G.** Withdrawal of sibutramine in Europe. *BMJ* 340: c824, 2010.
383. **Wiman B, Andersson T, Hallqvist J, Reuterwall C, Ahlbom A, and deFaire U.** Plasma levels of tissue plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor-1 complex and von Willebrand factor are significant risk markers for recurrent myocardial infarction in the Stockholm Heart Epidemiology Program (SHEEP) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 2019-2023, 2000.
384. **Worsnop CJ, Naughton MT, Barter CE, Morgan TO, Anderson AI, and Pierce RJ.** The prevalence of obstructive sleep apnea in hypertensives. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 111-115, 1998.
385. **Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, and Chen H.** Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112: 1821-1830, 2003.
386. **Yaney GC, and Corkey BE.** Fatty acid metabolism and insulin secretion in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46: 1297-1312, 2003.
387. **Yao Q, Shin MK, Jun JC, Hernandez KL, Aggarwal NR, Mock JR, Gay J, Drager LF, and Polotsky VY.** Effect of chronic intermittent hypoxia on triglyceride uptake in different tissues. *J Lipid Res* 54: 1058-1065, 2013.
388. **Ybarra J, Blanco-Vaca F, Fernandez S, Castellvi A, Bonet R, Palomer X, Ordonez-Llanos J, Trius A, Vila-Rovira R, and Perez A.** The effects of liposuction removal of subcutaneous abdominal fat on lipid metabolism are independent of insulin sensitivity in normal-overweight individuals. *Obes Surg* 18: 408-414, 2008.
389. **Yee BJ, Phillips CL, Banerjee D, Caterson I, Hedner JA, and Grunstein RR.** The effect of sibutramine-assisted weight loss in men with obstructive sleep apnoea. *Int J Obes (Lond)* 31: 161-168, 2007.
390. **Yokoe T, Alonso LC, Romano LC, Rosa TC, O'Doherty RM, Garcia-Ocana A, Minoguchi K, and O'Donnell CP.** Intermittent hypoxia reverses the diurnal glucose rhythm and causes pancreatic beta-cell replication in mice. *J Physiol* 586: 899-911, 2008.
391. **Yokoe T, Minoguchi K, Matsuo H, Oda N, Minoguchi H, Yoshino G, Hirano T, and Adachi M.** Elevated levels of C-reactive protein and interleukin-6 in patients with obstructive sleep apnea syndrome are decreased by nasal continuous positive airway pressure. *Circulation* 107: 1129-1134, 2003.

392. **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.
393. **Young T, Peppard PE, and Taheri S.** Excess weight and sleep-disordered breathing. *J Appl Physiol* 99: 1592-1599, 2005.
394. **Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Bautista L, Franzosi MG, Commerford P, Lang CC, Rumboldt Z, Onen CL, Lisheng L, Tanomsup S, Wangai P, Jr., Razak F, Sharma AM, and Anand SS.** Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet* 366: 1640-1649, 2005.
395. **Zeyda M, and Stulnig TM.** Adipose tissue macrophages. *Immunol Lett* 112: 61-67, 2007.
396. **Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, and Maeda N.** Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258: 468-471, 1992.
397. **Zhang XL, Wen L, Chen YJ, and Zhu Y.** Vascular endothelial growth factor up-regulates the expression of intracellular adhesion molecule-1 in retinal endothelial cells via reactive oxygen species, but not nitric oxide. *Chin Med J (Engl)* 122: 338-343, 2009.
398. **Zimmerman ME, Arnedt JT, Stanchina M, Millman RP, and Aloia MS.** Normalization of memory performance and positive airway pressure adherence in memory-impaired patients with obstructive sleep apnea. *Chest* 130: 1772-1778, 2006.

ANNEXE (Curriculum Vitae détaillé)

Laureline POULAIN

Doctorat en physiologie cardiovasculaire / métabolisme

4, rue Casimir Brenier
(France)
38000 Grenoble
Téléphone portable : 06 58 58 22 17
Adresse e-mail : laurelinepoulain@hotmail.com

née le 19 janvier 1986, à Annecy

DIPLOMES

2009-2013 **Doctorat**, spécialité Physiologie-Physiopathologie-Pharmacologie à l'EDCSV, Université J. Fourier – Grenoble (soutenu le 17/12/2013)

Sujet : *Syndrome d'apnées obstructives du sommeil et risque cardiovasculaire : rôle du tissu adipeux viscéral dans les troubles métaboliques et l'athérosclérose induits par l'hypoxie intermittente.*

Thèse réalisée sous la direction du Pr M. Dematteis et du Dr C. Arnaud, au sein du laboratoire Hypoxie et Physiopathologie cardiovasculaire et respiratoire (Inserm U1042, direction : Pr P. Lévy)

2007-2009 **Master Recherche** en Physiologie et Pharmacologie Cardiovasculaire (mention Bien), Université C. Bernard - Lyon

2004-2007 **Licence** en Biologie générale (mention Passable), Université J. Fourier - Grenoble

2004 **Baccalauréat** série S (mention Assez Bien), Lycée C.-L. Berthollet - Annecy

ENSEIGNEMENTS

2009-2012 Monitorat de l'enseignement supérieur (192 heures réparties sur 3 ans), rattachée à l'UFR de Pharmacie de Grenoble

Travaux dirigés :

Pharmacologie générale : 2ème, 3ème et 4ème année de Médecine/3ème année de Pharmacie/1ère année de Master

EC Endocrinologie, pathologie thyroïdienne : 3ème année de Pharmacie

APP Sens : 2ème année de Pharmacie

Travaux pratiques :

Neuropsychopharmacologie (test d'Irwin), étude de 2 psychotropes : 3ème et 4ème année de Pharmacie

Pharmacologie, réactivité vasculaire sur anneau d'aorte isolé : 2ème année de Pharmacie

Investigation pharmacologique, mesure de pression chez le rat : 2ème année de Master Recherche Chimie-Innovation Pharmacologique (ChIP)

Analyse critique de l'information biomédicale : Technologies de l'Information pour la Santé (TIS) 5ème année (Polytech Grenoble)

Investigation pharmacologique, projet médicament : 5ème année de Pharmacie

Cours :

UE Physiologie générale, « Hypoxie, inflammation et athérosclérose » (2h) : à l'attention des 1ères années de Master Ingénierie pour la Santé et le Médicament (ISM) notamment

UE Pharmacologie expérimentale, « Méthode d'études de l'athérosclérose » (2h) : à l'attention des 1ères années de Master ISM notamment

- Mise en place du TP Investigation pharmacologique dans le cadre du M2 Recherche ChIP : choix du modèle, des molécules testées et des paramètres mesurés (pression et fréquence cardiaque).

- Participation à la correction des comptes-rendus de TP et de certains examens.

2010 Encadrement d'une étudiante en 3ème année de Pharmacie (11 semaines), dans le cadre de son Master 1 : « Etude du remodelage des tissus adipeux épидидymal et sous-cutané, et des altérations métaboliques induites par l'hypoxie intermittente chronique »

2010-2011 Organisation d'un colloque pluridisciplinaire ("Le Temps", octobre 2011) dans le cadre des ateliers-projets proposés par le DFI de Grenoble

FINANCEMENTS OBTENUS

2013 Financement privé, Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (GRRC) : prolongation de thèse (6 mois)

2010-2013 Subvention de projet de recherche, Fondation Cœur et Artères (20 000€)

2010 Subvention de projet de recherche, Agir@Dom (7000€)

2009-2012 Financement public : allocation de recherche-monitorat (3 ans)

COMPETENCES SPECIFIQUES

- Techniques de physiologie animale :

Modèle murin de syndrome d'apnées du sommeil (hypoxie intermittente)

Chirurgie chez la souris : résection du tissu adipeux épидидymal

Etude de l'homéostasie glucidique : test de tolérance au glucose (IpGTT) et à l'insuline (IpITT)

- Certificat français d'autorisation d'expérimenter sur animaux vivants (2011), Université J. Fourier, Grenoble, France

- Techniques de biologie moléculaire et de biochimie :

Isolation d'ARNm et analyse par RT-PCR

ELISA sur plasma ou surnageants cellulaires

Immunohistochimie sur coupes en paraffine et coupes congelées

Lipolyse in vitro sur adipocytes isolés

- Formation théorique et pratique à la cytométrie en flux (2010), Université J. Fourier, Grenoble, France

- Outil informatique :

Pack Office (Word, Excel, Powerpoint)

Logiciels de traitement d'images : ImageJ (NIH, Etats-Unis), Lucia G et NIS Element (Laboratory Imaging, République Tchèque), Metamorph (Molecular Devices, Etats-Unis)

Logiciel d'analyse statistique : SigmaStat (Systat Software Inc., Etats-Unis)

Logiciel de gestion bibliographique : EndNote (Thomson Reuters, Etats-Unis)

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

L. Poulain, H. Mathieu, A. Thomas, AL. Borel, C. Rémy, P. Lévy, C. Arnaud, M. Dematteis. Changes in glucose homeostasis are accompanied by modifications of fat repartition after IH exposure. *European Respiratory Journal* (en rédaction).

L. Poulain, A. Thomas, J. Rieusset, L. Casteilla, P. Lévy, C. Arnaud, M. Dematteis. Visceral white fat remodeling contributes to intermittent hypoxia-induced atherogenesis. *European Respiratory Journal*, 2013 (accepté pour publication). (IF : 6,4)

C. Arnaud, **L. Poulain**, P. Lévy, M. Dematteis. Inflammation contributes to the atherogenic role of intermittent hypoxia in apolipoprotein-E knockout mice. *Atherosclerosis*, 2011;219(2):425-31. (IF : 3,7)

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

- Communications orales :

Mai 2009 L. Poulain, M. Dematteis, J-L. Pépin, P. Lévy, C. Arnaud. *Nouvelle Société Française d'Athérosclérose (NSFA)*, Avignon, France

Mars 2010 L. Poulain, P. Lévy, M. Dematteis, C. Arnaud. *Physiologie Pharmacologie et Thérapeutique (P2T)*, Bordeaux, France

Mai 2011 L. Poulain, J. Rieusset, P. Lévy, M. Dematteis, C. Arnaud. *GRRC*, Lyon, France

▪ Communications affichées :

Avril 2010 L. Poulain, P. Lévy, M. Dematteis, C. Arnaud. *GRRC*, Nantes, France

Avril 2011 L. Poulain, P. Lévy, M. Dematteis, C. Arnaud. *P2T*, Grenoble, France

Mai 2012 L. Poulain, P. Lévy, M. Dematteis, C. Arnaud. *American Thoracic Society (ATS)*, San Francisco, Etats-Unis

CENTRES D'INTERET

Sports : ski, randonnée pédestre, natation, badminton

Voyages : Etats-Unis, Suède, Espagne, Maroc, capitales européennes

Lecture, cinéma, couture

BAFA complet