



HAL
open science

Dysfonction cardiovasculaire et arythmies ventriculaires de l'ischémie-reperfusion : effets délétères de l'hypoxie intermittente et protecteurs de la supplémentation en zinc

Jessica Morand

► **To cite this version:**

Jessica Morand. Dysfonction cardiovasculaire et arythmies ventriculaires de l'ischémie-reperfusion : effets délétères de l'hypoxie intermittente et protecteurs de la supplémentation en zinc. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. NNT : 2017GREAV015 . tel-01690544

HAL Id: tel-01690544

<https://theses.hal.science/tel-01690544v1>

Submitted on 23 Jan 2018

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 LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Physiologie, Physiopathologie, Pharmacologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Jessica Morand

Thèse dirigée par le **Pr. Diane GODIN-RIBUOT**

préparée au sein du **Laboratoire Hypoxie et Physiopathologies
Cardiovasculaires et Respiratoires – INSERM 1042**
dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Dysfonction cardiovasculaire et arythmies ventriculaires de l'ischémie-reperfusion : effets délétères de l'hypoxie intermittente et protecteurs de la supplémentation en zinc.

Thèse soutenue publiquement le **31 mars 2017**,
devant le jury composé de :

Pr. Frédéric ROCHE

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

Dr. René FERRERA

IR HC Inserm, Université Lyon 1 (Rapporteur)

Pr. Irina KORICHNEVA

PU, Université de Picardie Jules Verne (Examinateur)

Dr. Sandrine MOREL

Collaborateur scientifique, Université de Genève (Examinateur)

Pr. Christophe RIBUOT

PU, Université Grenoble Alpes (Président)

Pr. Diane GODIN-RIBUOT

PU, Université Grenoble Alpes (Directrice de thèse)



Dysfonction cardiovasculaire et arythmies ventriculaires de l'ischémie-reperfusion : effets délétères de l'hypoxie intermittente et protecteurs de la supplémentation en zinc.

Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) est associé à une forte morbi-mortalité cardiovasculaire. L'hypoxie intermittente (IH), conséquence majeure des apnées, est à l'origine d'un stress oxydant, d'une activation de HIF-1 (hypoxia inducible factor 1) et d'une expression d'endothéline (ET-1), tous impliqués dans les complications cardiovasculaires liées à l'IH. Dans un premier temps, nous avons démontré que l'IH augmentait l'incidence des arythmies ventriculaires létales associées à l'ischémie myocardique. Parmi les mécanismes potentiels impliqués, l'analyse spectrale de la variabilité de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle et le dosage des catécholamines ont mis en évidence une activation sympathique chez les animaux exposés à l'IH. L'IH est également à l'origine d'altérations de la repolarisation ventriculaire (allongement du QTc et du Tpeak-Tend) et d'une dispersion du gradient transmural (allongement de la durée du potentiel d'action endocardique) associées à une augmentation de l'expression de canaux calciques de type LTCC et TRPC dans l'endocarde.

Dans la seconde partie de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux perturbations de l'homéostasie du zinc en réponse au stress oxydant causé par l'ischémie-reperfusion (I/R) ou par l'IH et aux propriétés cardioprotectives de la supplémentation en zinc dans ce contexte. Nous avons montré que l'I/R et l'IH induisaient une diminution des concentrations de zinc myocardiques et plasmatiques, respectivement. Nous avons mis en évidence les effets bénéfiques de la supplémentation en zinc vis-à-vis des arythmies ventriculaires et des altérations myocardiques induites par l'I/R. L'administration de zinc lors de la reperfusion a également permis d'abolir l'augmentation de la taille d'infarctus induite par l'exposition chronique à l'IH.

Finalement, nous avons étudié les effets de la déplétion en zinc sur des cellules endothéliales à l'aide d'un chélateur spécifique du zinc, le TPEN. Nous avons observé que l'exposition des cellules au TPEN entraînait une translocation nucléaire de HIF-1 α et une augmentation de la sécrétion d'ET-1 avec, comme conséquence, une augmentation de la capacité migratoire des cellules endothéliales. Ainsi, une déplétion en zinc semble conduire à une activation de l'axe HIF-1-ET-1 connu pour ses effets délétères lors de l'IH.

En résumé, l'exposition chronique à l'IH exacerbe les arythmies et augmente la taille d'infarctus lors de l'I/R. L'activation sympathique, le stress oxydant et l'altération de l'homéostasie du zinc pourraient être impliqués. L'utilisation d'outils pharmacologiques permettrait de confirmer leur rôle et potentiellement de prévenir les altérations cardiovasculaires liées à l'IH et au SAOS.

Mots-clés : hypoxie intermittente, ischémie-reperfusion, arythmies ventriculaires, activation sympathique, stress oxydant, zinc, HIF-1, endothéline 1

Cardiovascular dysfunction and ventricular arrhythmias associated with ischemia-reperfusion: deleterious effect of intermittent hypoxia and protective effects of zinc supplementation

Obstructive sleep apnea (OSA) is associated with increased cardiovascular morbidity and mortality. Intermittent hypoxia (IH), one of the major consequences of apneas, leads to oxidative stress, activation of HIF-1 (hypoxia inducible factor 1) and endothelin (ET-1) expression, all known to play an important role in the cardiovascular consequences of OSA.

First, we have demonstrated that IH increases the incidence of ischemia-related lethal ventricular arrhythmias. Among the potential mechanisms involved, spectral analysis of heart rate and blood pressure variability and catecholamine assay, showed a sympathetic activation in animals exposed to IH. IH was also responsible for alterations in ventricular repolarisation (increased QTc and Tpeak-Tend intervals) and dispersion of the transmural gradient (increased endocardial action potential duration). These alterations were associated with increased expression of endocardial LTCC and TRPC calcium channels.

The second part of the thesis aimed at investigating zinc homeostasis in response to the oxidative stress induced by ischemia-reperfusion (I/R) or IH as well as the beneficial effects of zinc supplementation in this context. We observed that I/R and IH induced a decrease in myocardial and plasma zinc concentrations, respectively. We also highlighted the protective effects of zinc supplementation during reperfusion against the ventricular arrhythmias and myocardial dysfunction induced by I/R. Zinc administration during reperfusion also abolished the increase in infarct size induced by chronic IH exposure.

Finally, we investigated the effects of zinc depletion in endothelial cells exposed to TPEN, a specific zinc chelator. We observed that TPEN induced a nuclear translocation of HIF-1 α and an increase in ET-1 secretion with a resulting increase in endothelial cell migration. Thus, zinc depletion appears to promote activation of the HIF-1-ET-1 axis, known for its deleterious effects upon IH.

In summary, chronic IH exposure enhances ventricular arrhythmias and increases infarct size upon myocardial I/R. Sympathetic activation, oxidative stress and alterations of zinc homeostasis appear to be contributing factors. Pharmacological targeting of these alterations should be performed in order to confirm their role as well as to potentially prevent the deleterious cardiovascular consequences of IH and OSA.

Key words: intermittent hypoxia, ischemia-reperfusion, ventricular arrhythmias, sympathetic activation, oxidative stress, zinc, HIF-1, endothelin 1

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire fondamental de l'unité mixte de recherche Hypoxie - physiopathologies cardiovasculaires et respiratoires HP2 (UMR_S UGA – Inserm U 1042) dirigée par le Pr. Jean-Louis Pépin.

Je remercie tout d'abord les institutions ayant rendu possible ce travail, à savoir la région Rhône-Alpes, l'Université Grenoble Alpes, l'Inserm et la Société Française de Recherche et Médecine du Sommeil.

J'adresse ensuite mes remerciements au Pr. Frédéric Roche et au Dr. René Ferrera pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Merci pour le temps alloué à l'évaluation de ce travail ainsi que pour vos précieuses remarques et corrections.

Je remercie également le Pr. Irina Korichneva, le Dr. Sandrine Morel et le Pr. Christophe Ribuot d'avoir examiné ce travail. Merci également pour vos conseils.

Je tiens ensuite à remercier ma directrice de thèse, le Pr. Diane Godin-Ribuot, qui depuis le stage de M2 m'a encadrée et soutenu dans ces travaux. Merci pour la confiance que tu m'as accordée dès mon arrivée et pour tout le travail accompli, souvent dans l'urgence. Ce fut un plaisir de travailler en ta compagnie.

Un grand merci à l'ensemble des membres de l'équipe fondamentale d'HP2, pour toutes ces belles rencontres. En particulier au Dr. Anne Briançon-Marjollet pour m'avoir tout appris sur la culture cellulaire ainsi que la biologie moléculaire et pour avoir co-encadré l'ensemble du projet mené sur les cellules endothéliales. Un grand merci également au Dr. Claire Arnaud qui m'a enseignée l'ensemble des expérimentations réalisées chez le rongeur, ex et in-vivo, pour tes précieux conseils à la fois expérimentaux et scientifiques qui ont abouti à ce beau travail sur les arythmies. Je tiens également à remercier le Dr Elise Belaïdi pour ton soutien et ton aide inestimables, qu'il s'agisse de science mais pas que, et ce que tu sois au labo ou en vacances, merci aussi pour les très enrichissantes « cogitations » scientifiques et leurs nombreux parchemins parsemés de hiéroglyphes.

Je remercie une seconde fois le Pr. Irina Korichneva qui, malgré la distance, a continué à suivre le projet zinc et a pu me faire bénéficier de ses connaissances sur le sujet. De la même manière je remercie également le Pr. Véronique Maupoil pour avoir accepté d'être membre de mon comité de suivi de thèse et pour avoir contribué à nos réflexions scientifiques.

Un immense merci à tout le personnel technique : Audrey et ta patience malgré les « il me faudrait ce produit pour hier stp ? », Emeline pour ta gentillesse et ta grande générosité, que ce soit au labo ou hors les murs, Sandrine et ta bienveillance, toujours là dans les moments de rush, Brigitte et ton expérience que tu prends le temps de partager, Sophie B. et ta zenitude (oui ça existe dans le Larousse !!) et tes nombreux conseils et enfin Thierry, toujours prêt à rendre service avec le sourire.

Je voudrais également remercier les co-thésards qui ont partagé avec moi ces années, et faut dire qu'en 5 ans ça commence à faire du monde (j'essaierais donc de suivre un ordre chronologique).

Tout d'abord Manue, qui une fois la glace brisée à coup de marteau-piqueur, s'est avérée être un soutien et un réconfort inconditionnel, que ce soit pour des manips ou autre, et ce même après que tu sois partie du labo pour voler vers de nouvelles contrées (franco-portugaise ;)). Je me rappelle de nos nombreux quiz postprandiaux avec Marion et ma stupéfaction quant au panel de ton registre musical. Ça reste une joie de vous voir à chaque fois que le temps le permet.

A Amandine et ton tempérament de feu, pour apporter ta part d'originalité et d'excentrisme (et de folie ?!) au labo, pour tes qualités scientifiques mais aussi (et surtout) pour ton authenticité qui fait de toi une personne incroyablement entière. Merci pour toutes ces pauses café, parfois sans café, ou ces petits apéros improvisés qui valaient mieux qu'une psychanalyse. Merci pour ces 5 années et ta présence surprise le jour fatidique !!

A Marielle, Marioule pour les intimes, avec qui j'ai partagé du début à la fin le bureau et parfois les mêmes manips. Impossible pour moi de dire si je garde un bon souvenir des manips à 6h du matin au doux son de Rammstein, je pense que la nostalgie prend le dessus et me fait perdre toute objectivité. Merci pour tous les coups de main que ce soit au labo ou en dehors, pour les consultations véto à domicile, les footings, les balades en roller, le ski, le snow, ... (liste non exhaustive). Et surtout pour que tout ceci ne se soit pas arrêté à ton départ !!

A Mélanie pour ton sourire, sans oublier ton accent du sud, d'autant plus prononcé si la moutarde te monte au nez. Merci pour tous ces instants que tu as pris, en dépit du retard que tu avais pour aller récupérer le « monstre », pour discuter de chose et d'autres, parfois juste pour vider mon sac, ou le tiens. Je reste encore admirative en te voyant jongler entre tes 2 thèses et ton rôle de maman.

Sylvain pour ton amabilité, ta courtoisie et ta jovialité quotidienne, pour toutes ces « gentilleses » et « petites » tapes sur l'épaule échangées dans les couloirs (contenu censuré).

A Sophie M., la petite dernière avant l'invasion masculine. A peine arrivée et c'était comme si tu avais toujours été là. Tu t'es parfaitement intégrée que ce soit d'un point de vue professionnel grâce à tes grandes qualités scientifiques, ou encore personnellement. En même temps on ne peut pas dire que tu n'ais pas donné de ta personne, notamment lors de la réalisation des films (chant, chorégraphie, barbouillage (difficile d'appeler ça maquillage), tenues douteuses, roller, ...). Ces dernières années de recherche, mais aussi d'enseignement, à tes côtés auront été un réel plaisir. Merci pour ton dynamisme et ta bonne humeur.

A Maximin, ton sérieux et ta rigueur scientifique. Grâce à toi les RT-qPCRs sont devenus un véritable enfer au point que j'en fasse des cauchemars mais, avec la satisfaction d'avoir de bons résultats !!

A Yann, la réincarnation du diable, avec qui les soirées ne peuvent pas finir avant 4-5h du matin, voire ne jamais finir, et par conséquent les lendemains difficiles qui vont de pair avec.

Aux autres doctorants qui sont passés par le labo en pointillé dans le cadre par exemple de co-tutelles : Wassim, Zeinab G. et Zeinab E. Merci, entre autres choses bien sur, pour ces fabuleux plats et gâteaux libanais. Ou encore Bochra et tes manips sur le cœur isolé. Ainsi que les doctorantes de l'équipe clinique d'HP2, Elodie et Laetitia.

Merci également à tous les étudiants, de la L2 au M2, qui sont passés au laboratoire à l'occasion de leur stage.

A ceux qui n'ont pas terminé, je vous souhaite à tous force et courage pour la fin de la thèse, et aux autres une grande réussite dans tous vos projets, quels qu'ils soient.

Ma thèse a également été marquée par mon installation à Grenoble. Une nouvelle ville pour une nouvelle vie. Ainsi je tiens aussi à remercier celles sans qui les 2 dernières années auraient été d'avantages marquées par les hauts et les bas qui accompagnent une fin de thèse. Celles qui m'ont offert la possibilité d'avoir des moments où le temps s'arrêtait, où les difficultés disparaissaient, où il était possible de reprendre son souffle pour repartir de plus belle. Merci à toutes les Cannibal Marmots. A toutes mes co-équipières, et tellement plus que ça. Aux « anciennes » qui m'ont tout appris du roller derby, du patinage aux règles (avec plus de 90 pages ça mérite d'être souligné), à toutes les filles de la promo 2015 avec qui j'ai « grandi », à mes wifes, Camille et Chlo, et à toutes celles qui nous ont rejoints depuis. A toutes les joueuses, de la Fresh meat à la championne WFTDA. A toutes ces filles qui viennent de divers horizons et qui se réunissent autour du track pour vivre et faire vivre leur passion, le roller derby. Pussions-nous nous hater encore et encore, jusqu'à ce que bleus s'en suivent !!

Pour terminer, je tiens à remercier tous ceux sans qui rien n'aurait été possible, ceux qui m'ont soutenu du début à la fin. Merci à tous mes proches, famille et amis.

Tout d'abord merci à mes parents pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de ces (interminables) études. Merci de m'avoir permis et aidé à me hisser jusqu'au sommet de la thèse. D'y avoir toujours cru, de m'avoir souvent encouragé, parfois réconforté. Pour m'avoir appris la persévérance et d'avoir fait de moi la personne que je suis aujourd'hui. J'espère avoir été à la hauteur et sachez que vous aurez toujours mon entière gratitude.

Merci également à mes grands-parents, de la maison d'à côté ou à 2000 km, Mémé, Pépé, Babo et Dedo qui nous a quitté. Merci d'avoir joué les supporters avec au moins autant de ferveur que devant le Tour de France. Vos regards emplis de fierté m'ont réchauffé le cœur et m'ont permis de garder en mémoire seulement le meilleur de cette expérience.

A mes deux « adorables » petites sœurs, Stéphanie et Miléna, qui à leur manière m'ont soutenues durant ces années. Hélas, j'ai l'immense regret de vous annoncer que vous ne pourrez plus m'appeler Tanguy, c'est époque est (enfin) révolue. Mais je ne doute pas de votre imagination pour trouver quelque chose de bien meilleur pour les 10 années à venir.

A ma petite Calie, le petit rayon de soleil de la famille. Tatie Wouf a hâte de pouvoir t'aider à faire tes devoirs de biologie.

A tous les membres de ma famille, oncles, tantes, et cousin(e)s qui m'ont encouragé. Je peux officiellement vous dire que « mes études sont finies ».

A Guillaume, d'abord stagiaire puis collègue de bureau, puis bien plus que ça... Tantôt coach, tantôt anxiolytique, tu as toujours répondu présent et m'a aidé à traverser les eaux parfois tourmentées de la thèse. Merci pour la bonne humeur, la gentillesse, l'écoute, la bienveillance et (surtout) la patience dont tu as fait preuve et avec lesquels tu m'as (sup)portée jusqu'au bout. Je ne pense pas que l'on puisse rêver d'une meilleure personne à ses côtés pendant cette expérience ou dans la vie tout court. A charge de revanche.

Merci les potes. Si les longues études ont bien un avantage, c'est qu'elles nous offrent l'opportunité de rencontrer pleins d'amis. Merci à toutes celles et ceux que j'ai rencontré de la maternelle à aujourd'hui et qui ont eu le courage de rester dans mon sillage.

Sommaire

LISTES DES ABREVIATIONS	14
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	16
OBJECTIFS	20
INTRODUCTION	24
1. Syndrome d'apnées obstructives du sommeil	26
1.1. Généralités	26
1.1.1. Prévalence/épidémiologie.....	26
1.1.2. Physiopathologie	27
1.1.1. Diagnostic	27
1.2. Traitements	28
1.2.1. Pression positive continue (PPC).....	28
1.2.2. Chirurgie	30
1.2.3. Orthèse d'avancée mandibulaire	30
1.2.4. Perte de poids et mode de vie.....	30
1.3. Conséquences des obstructions des voies aériennes induites par le SAOS.....	30
1.3.1. Fragmentation du sommeil	30
1.3.2. Variations de la pression intrathoracique	31
1.3.3. Hypoxie intermittente	31
2. Conséquences cardiovasculaires du SAOS et de l'HI.....	32
2.1. Hypertension artérielle	32
2.2. Dysfonction vasculaire	32
2.3. Augmentation de la prévalence et de la taille de l'infarctus du myocarde	33
2.4. Arythmies ventriculaires	34
3. Mécanismes physiopathologiques induits par l'HI.....	35
3.1. Stress oxydant	35

3.1.1.	Généralités	35
3.1.2.	Voie mitochondriale	35
3.1.3.	NADPH oxydase (NOX)	36
3.1.4.	Xanthine oxydase (XO)	36
3.1.5.	Oxyde nitrique synthase (NOS)	37
3.1.6.	Diminution des défenses antioxydantes	38
3.1.7.	Peroxydation lipidique.....	39
3.2.	Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF-1)	40
3.2.1.	Généralités	40
3.2.2.	HIF-1 et hypoxie continue	40
3.2.3.	HIF-1 et hypoxie intermittente/SAOS.....	42
3.3.	Endothéline 1 (ET-1)	44
3.3.1.	Généralités	44
3.3.2.	ET-1 et hypoxie intermittente/SAOS	44
3.4.	Boucles d'amplification de l'axe ERO-HIF-1-ET-1 dans le SAOS et l'HI.....	45
3.5.	Activation sympathique.....	46
4.	Implication des mécanismes physiopathologiques de l'HI dans les complications cardiovasculaires du SAOS	47
4.1.	Hypertension artérielle	47
4.2.	Dysfonction vasculaire	48
4.3.	Infarctus du myocarde	49
4.4.	Arythmies ventriculaires	49
5.	Ischémie-reperfusion myocardique	51
5.1.	Altérations cellulaires induites par l'ischémie sévère	51
5.1.1.	Surcharge calcique.....	51
5.1.2.	Production d'ERO	52
5.2.	Altérations myocardiques induites par l'ischémie sévère	53
5.2.1.	Dysfonction contractile	53

5.2.2.	Mort cellulaire	53
5.2.3.	Arythmies ventriculaires.....	56
5.3.	Altérations cellulaires induites par la reperfusion	57
5.3.1.	Surcharge calcique.....	57
5.3.2.	Activation de protéases.....	58
5.3.3.	Altérations mitochondriales.....	59
5.3.4.	Production d'ERO	60
5.4.	Altérations myocardiques induites par la reperfusion.....	60
5.4.1.	Sidération myocardique	60
5.4.2.	Mort cellulaire	61
5.4.3.	Arythmies ventriculaires.....	61
6.	Homéostasie du zinc, stress oxydant et myocarde	62
6.1.	Généralités	62
6.2.	Zinc et stress oxydant.....	64
6.2.1.	Effet antioxydant chronique.....	64
6.2.2.	Effet antioxydant aigu	65
6.3.	Zinc et cardioprotection	65
	MATERIELS ET METHODES	68
7.	PARTIE I : Rôle de l'hypoxie intermittente dans la survenue d'arythmies ventriculaires lors de l'ischémie myocardique et étude des mécanismes sous-jacents	70
7.1.	Article 1 « Obstructive sleep apnea and the risk of sudden cardiac death: chronic intermittent hypoxia promotes myocardial ischemia-related ventricular arrhythmias”	70
7.2.	Résultats complémentaires : Impact du stress oxydant induit par l'HI sur l'activation sympathique et les altérations de la repolarisation ventriculaire.	76
8.	PARTIE II : Homéostasie du zinc et atteintes myocardiques en réponse à un stress oxydant.....	76
9.	PARTIE III : Article 2 : Zinc deficiency up-regulates ET-1 mediated signaling through HIF-1 expression affecting endothelial cell migration	78
	RESULTATS.....	82

10.	PARTIE I : Rôle de l'hypoxie intermittente dans la survenue d'arythmies ventriculaires lors de l'ischémie myocardique et étude des mécanismes sous-jacents	84
10.1.	Article 1 : « Obstructive sleep apnea and the risk of sudden cardiac death: chronic intermittent hypoxia promotes myocardial ischemia-related ventricular arrhythmias »	84
10.2.	Résultats complémentaires : Impact du stress oxydant induit par l'HI sur l'activation sympathique et les altérations de la repolarisation ventriculaire	112
11.	PARTIE II : Homéostasie du zinc et atteintes myocardiques en réponse au stress oxydant...	115
12.	PARTIE III : Article 2 : Zinc deficiency up-regulates ET-1 mediated signaling through HIF-1 expression affecting endothelial cell migration	121
	DISCUSSION	140
13.	PARTIE I : Rôle de l'hypoxie intermittente dans la survenue d'arythmies ventriculaires lors de l'ischémie myocardique et étude des mécanismes sous-jacents	142
13.1.	Article 1 « Obstructive sleep apnea and the risk of sudden cardiac death: chronic intermittent hypoxia promotes myocardial ischemia-related ventricular arrhythmias”	142
13.1.1.	HI et canaux calciques de type L	142
13.1.2.	HI et canaux de type « transient receptor potential canonical »	144
13.1.3.	Perspectives.....	145
13.2.	Résultats complémentaires : Impact du stress oxydant induit par l'HI sur l'activation sympathique et les altérations de la repolarisation ventriculaire	146
13.2.1.	Stress oxydant et altérations cardiovasculaires induites par l'HI.....	146
13.2.1.1.	Hypertension artérielle.....	146
13.2.1.2.	Remodelage cardiaque : hypertrophie ventriculaire droite.....	147
13.2.2.	Stress oxydant et activation sympathique induite par l'HI	148
13.2.3.	Stress oxydant et altérations de la repolarisation induites par l'HI	150
13.2.4.	Perspectives.....	150
14.	PARTIE II : Homéostasie du zinc et atteintes myocardiques en réponse au stress oxydant...	151
14.1.	Ischémie-reperfusion et homéostasie du zinc	151
14.2.	HI et homéostasie du zinc	151
14.3.	Effets cardioprotecteurs de la supplémentation en zinc	152

14.4. Perspectives.....	153
15. PARTIE III : Article 2 : « Regulation of HIF-1 activity and ET-1 secretion by zinc chelation and its functional consequences in endothelial cells »	154
15.1. Conclusions de l'étude	154
15.2. Perspectives.....	154
CONCLUSION GENERALE	157
BIBLIOGRAPHIE.....	161
ANNEXES.....	192
16. Article 3 : An innovative intermittent hypoxia model in cell cultures allowing fast PO ₂ oscillations with minimal gas consumption	194
17. Revue publiée dans « Pharmacology & Therapeutich »	220

LISTES DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique	I/R : Ischémie-Reperfusion
ARNm : Acide ribonucléique messenger	ICSD3 : International Classification of Sleep disorders
ATP : Adénosine Triphosphate	IM : Infarctus du Myocarde
BH2 : dihydrobioptérine	L-NAME : L-Nitroarginine-Méthyl-Esther
BH4 : tétrahydrobioptérine	mCU : Mitochondrial Ca ²⁺ Uniporter
Cam-K : Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein Kinase	mPTP : Pore de Transition de Perméabilité mitochondriale
CBP : CREB Binding Protein	MT : Métallothionéine
DAD : Delayed After Depolarisation	mTOR : mammalian Target of Rapamycin
DC : Débit Coronaire	NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
DMSO : Diméthyl Sulfoxyde	NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
EAD : Early After Depolarisation	NCE : Echangeur Na ⁺ /Ca ²⁺
ECE : Enzyme de Conversion de l'Endothéline 1	NHE : Echangeur Na ⁺ /H ⁺
ECG : Electrocardiogramme	NO : monoxyde d'azote
EEG : Electroencéphalogramme	NOS : NO synthase
EMG : Electromyogramme	eNOS : NOS endothéliale, NOS3
EPO : Erythropoïétine	iNOS : NOS inductible, NOS2
ERN : Espèces Réactives Azotées	nNOS : NOS neurale, NOS1
ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène	NOX : NADPH Oxydase
ET_A et ET_B : Récepteur de l'endothéline 1 de type A ou B	NF-κB : Nuclear Factor Kappa B
ET-1 : Endothéline 1	ODDD : Oxygen-Dependant Degradation Domain
FC : Fréquence Cardiaque	PA : Pression Artérielle
FIH-1 : Factor Inhibiting HIF-1	PAD : PA diastolique
FiO₂ : Fraction inspirée en oxygène	PAM : PA Moyenne
FV : Fibrillation Ventriculaire	PAS : PA systolique
GPx : Gluthation Peroxydase	PDVG : Pression Développée par le VG
HI : Hypoxie Intermittente	PHD : Prolyl-4-Hydroxylase
HIF-1 : Hypoxia Inducible Factor 1	PKC : Protéine Kinase C
HMVEC : Human Micro Vascular Endothelial Cells	PLC : Phospholipase C
HRE : Hypoxia Response Element	PPC : Pression Positive Continue
HTA : Hypertension Artérielle	pVHL : facteur suppresseur de tumeur Von Hippel-Lindau
IAH : Index d'Apnées-Hypopnées	

RPP : Rate Pressure Product, FC X PAS

RS : Réticulum Sarcoplasmique

RyR : Récepteur à la Ryanodine

SAOS : Syndrome d'Apnées Obstructives du Sommeil

SERCA : Pompe ATPase présente sur le réticulum sarcoplasmique

SNP : Système Nerveux Parasymphatique

SNS : Système Nerveux Sympathique

SOD : Superoxyde Dismutase

- SOD1 : constitutive, Cu/Zn-SOD
- SOD2 : mitochondriale, inductible, Mn-SOD
- SOD3 : extracellulaire

TAD : Domaine de Transactivation

TBARS : Substances réagissant à l'acide thiobarbiturique

Tempol : 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl

TPEN : N,N,N',N'-tétrakis(2-pyridylméthyle) éthylènediamine

TV : Tachycardie Ventriculaire

VAS : Voies Aériennes Supérieures

VD : Ventricule Droit

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VG : Ventricule Gauche

WT : Wild Type

XD : Xanthine Déshydrogénase

XO : Xanthine Oxydase

Zip : Solute-linked carrier 39, SLC39

ZnT : solute-linked carrier 30, SLC30

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Exemple de tracés obtenus lors d'un examen de polysomnographie.	28
Figure 2 : Schéma illustrant l'origine du stress induit par l'HI ainsi que les défenses anti-oxydantes diminuées.	37
Figure 3 : Schéma représentant la régulation de HIF-1.....	42
Figure 4 : Schéma représentant les différentes voies de signalisation intervenant dans l'activation de HIF-1 (stabilisation et expression) en réponse à l'HI.....	43
Figure 5 : Schéma représentant les boucles d'amplification de l'axe ERO-HIF-1-ET-1.	46
Figure 6 : Schéma illustrant les mécanismes conduisant à une surcharge calcique dans les cardiomyocytes pendant l'ischémie myocardique.	52
Figure 7 : Représentations graphiques des lésions d'ischémie-reperfusion.....	54
Figure 8 : Schéma récapitulatif des mécanismes conduisant à la mort cellulaire lors de l'ischémie myocardique.....	55
Figure 9 : Schéma illustrant les phénomènes de réentrées à l'origine d'arythmies sur un circuit constitué de 2 branches.	57
Figure 10 : Schéma illustrant les mécanismes conduisant à une surcharge calcique dans les cardiomyocytes pendant la reperfusion myocardique.	58
Figure 11 : Schéma représentant les différents mécanismes impliqués dans les altérations cellulaires induites par la reperfusion.	59
Figure 12 : Schéma représentant les 2 grandes familles de transporteurs transmembranaires intervenants dans la régulation de l'homéostasie cellulaire du zinc.	63
Figure 13 : Figure représentant le phénomène de « zinc redox-switch ».....	64
Figure 14 : Dispositif d'exposition à l'HI de la plate-forme d'hypoxie du laboratoire HP2.....	71

Figure 15 : Effet du tempol sur les altérations des paramètres hémodynamiques causées par l'HI..	113
Figure 16 : Effet du tempol sur l'activation sympathique cardiaque induite par l'HI évaluée par analyse spectrale de la fréquence cardiaque (intervalle RR, RRI).....	114
Figure 17 : Effet du tempol sur les altérations de la repolarisation ventriculaire induites par l'HI. ...	114
Figure 18 : Effet d'une I/R régionale sur les concentrations en zinc (Zn) total des effluents coronaires.	115
Figure 19 : Effets du zinc sur la récupération fonctionnelle après un stress oxydant induit chimiquement.	117
Figure 20 : Effet de la supplémentation en zinc pendant la reperfusion sur la survenue des arythmies au cours des 10 premières minutes de reperfusion.	118
Figure 21 : Effet de la supplémentation en zinc pendant la reperfusion sur la survie.....	118
Figure 22 : Effet de la supplémentation en zinc pendant la reperfusion sur la récupération fonctionnelle post-ischémique.....	119
Figure 23 : Effet de la supplémentation en zinc ($2.10^{-5}M$) pendant la reperfusion sur la taille d'infarctus sur des cœurs d'animaux exposés à la normoxie (N) ou à HI pendant 14 jours.....	120
Figure 24 : Schéma illustrant les différentes sous-unités formant un canal calcique voltage-dépendant.	143
Figure 25 : Illustration représentant la structure des TRPC.	144
Figure 26 : Schéma récapitulatif des résultats et des perspectives de la PARTIE I.	146
Figure 27 : Effet du macitentan sur le l'hypertrophie ventriculaire droite.....	148
Figure 28 : Rapport LF/HF de rats exposés à la normoxie (N) ou à l'HI pendant 14 jours.	150
Figure 29 : Schéma résumant les mécanismes mis en évidence et les hypothèses émises dans la PARTIE III.	155
Figure 30 : Schéma illustrant les conclusions générales de la thèse.....	160

Table 1 : Récapitulatif des différents primers utilisés pour les RT-PCR et des cycles correspondants à chaque couple d'amorces.	75
Table 2 : Perturbations de l'homéostasie du zinc après des expositions à l'HI de 14 et 35 jours.	116

OBJECTIFS

Le SAOS est reconnu comme un facteur majeur de risque cardiovasculaire et est associé à une forte morbi-mortalité cardiovasculaire. L'hypoxie intermittente (HI), conséquence des obstructions répétées des voies aériennes supérieures, est maintenant largement reconnue comme étant la principale cause des complications cardiovasculaires du SAOS. En effet, le laboratoire a, à de nombreuses reprises, mis en évidence son rôle dans le développement de l'HTA, de la dysfonction et du remodelage vasculaire ainsi que dans l'augmentation de la taille d'infarctus.

Dans un premier temps, ce travail s'est intéressé aux effets de l'HI sur l'incidence des arythmies ventriculaires lors de l'ischémie myocardique *in vivo* et *ex vivo*. Afin de mettre en évidence les mécanismes potentiellement impliqués, nous avons évalué l'activation sympathique, les altérations électrophysiologiques ventriculaires et l'expression myocardique de différents canaux calciques.

La seconde partie de la thèse a porté sur les effets cardioprotecteurs de la supplémentation en zinc. Tout d'abord, nous avons évalué l'impact du stress oxydant sur son homéostasie lors d'une ischémie-reperfusion myocardique et d'une exposition à l'HI. Puis nous nous sommes intéressés à ses propriétés cardioprotectrices sur les arythmies ventriculaires de reperfusion et la taille d'infarctus lors d'ischémie-reperfusion chez des animaux exposés ou non à l'HI.

Finalement, la troisième partie de la thèse avait comme objectif d'observer si le déficit en zinc, tel qu'observé après HI et chez les patients apnéiques, pouvait être responsable de l'activation de l'axe HIF-1-endothéline, connu pour sa contribution aux complications cardiovasculaires liées à l'HI.

INTRODUCTION

Les troubles respiratoires du sommeil représentent un problème de santé publique, de part la morbidité qui leur est associée, mais également par les difficultés de diagnostic défavorables à la bonne prise en charge de ces patients. Depuis la fin des années 90, il existe une classification internationale des troubles du sommeil (*International Classification of Sleep Disorders, ICSD3*) (Ito et al. 2015). Ainsi, il existe 3 grands types de troubles respiratoires du sommeil qui sont, par ordre de prévalence :

- Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) caractérisé par l'obstruction répétée, partielle ou totale, des voies aériennes supérieures (VAS).
- Le syndrome d'apnées centrales du sommeil causé par un défaut de la commande respiratoire.
- Le syndrome obésité hypoventilation consécutif à l'augmentation du travail respiratoire et à des modifications neurohormonales chez le patient obèse.

1. Syndrome d'apnées obstructives du sommeil

1.1. Généralités

1.1.1. Prévalence/épidémiologie

La prévalence du SAOS, ainsi que celle des autres troubles respiratoires du sommeil, est très largement sous-évaluée. Le diagnostic est réalisé grâce à une polysomnographie, qui est un examen coûteux, contraignant le patient à passer une nuit à l'hôpital. Ainsi les personnes diagnostiquées sont en général celles présentant un SAOS sévère avec déjà d'importants symptômes. Selon une estimation, 82% des hommes et 93% des femmes présentant un SAOS ne seraient pas diagnostiqués (Young et al. 1997).

La prévalence du SAOS varie en fonction du sexe et de l'âge. Quelque soit la sévérité du syndrome, la prévalence augmente dès l'âge de 40 ans chez les hommes et de 50 chez les femmes. A âge équivalent, elle est donc plus importante chez les hommes (Young et al. 1993) et elle augmente avec l'âge bien que la sévérité, quant à elle, diminue (Bixler et al. 1998).

Dans la population générale, la prévalence du SAOS est de 3 à 7% et de 2 à 5% chez les hommes et les femmes, respectivement (Punjabi 2008). L'ensemble de ces estimations a été réalisé sur des cohortes d'études menées de 1993 à 2004. Peppard et al. se sont récemment intéressés à l'évolution de cette prévalence au cours des 20 dernières années. Ils ont montré une augmentation pouvant aller jusqu'à 55% selon le groupe observé (sexe et âge) (Peppard et al. 2013).

Finalement, la prévalence du SAOS peut également dépendre de facteurs environnementaux tels que le surpoids, l'anatomie craniofaciale, la consommation d'alcool et de tabac, la grossesse ainsi que certaines pathologies (syndrome des ovaires polykystiques, hypothyroïdie) (Punjabi 2008).

1.1.2. Physiopathologie

Le SAOS est causé par des collapsus répétés du pharynx au cours du sommeil. Les causes de ces collapsus sont nombreuses et complexes. Chez l'Homme, l'ouverture des VAS est maintenue par un ensemble de muscles et de tissus mous (Malhotra et al. 2002). Ainsi, les apnées peuvent être causées par une diminution de l'activité des muscles dilatateurs du pharynx pendant le sommeil. De nombreux autres paramètres morphologiques, anatomiques, hormonaux ou encore neurologiques interviennent également (Levy et al. 2015).

Ces collapsus sont partiels ou complets et vont être à l'origine d'hypopnées ou d'apnées. Une apnée obstructive est définie par une obstruction de plus de 90% du débit aérien avec des mouvements respiratoires persistants. L'hypopnée est caractérisée par une réduction d'au moins 30% du débit aérien accompagnée d'une désaturation en oxygène de plus de 3%. La fréquence de survenue de ces événements, mesurée sur 1 heure, permet d'établir un index d'apnées-hypopnées (IAH). Le SAOS est diagnostiqué lorsque l'IAH est supérieur ou égal à 5 et que la personne présente une fatigue diurne excessive. La sévérité du SAOS est évaluée grâce à cet index. Pour un IAH compris entre 5 et 15 on parle de SAOS léger, entre 15 et 30 le SAOS est considéré comme modéré et si l'IAH est supérieur à 30, il s'agit d'un SAOS sévère (Ito et al. 2015).

1.1.1. Diagnostic

Ces apnées répétitives ont pour conséquence une mauvaise qualité de sommeil. Les symptômes vont se manifester par d'importants ronflements, causés par l'augmentation de la résistance des VAS, et par une fatigue accrue allant jusqu'à des somnolences diurnes.

L'examen permettant d'établir la présence d'un SAOS est la polysomnographie. En général, il nécessite que le patient passe une nuit à l'hôpital ou dans un centre du sommeil. Au cours de cette nuit, de nombreux paramètres sont enregistrés : l'électroencéphalogramme (EEG), l'électromyogramme (EMG) des jambes et du menton, la saturation sanguine en oxygène, les mouvements respiratoires grâce à des ceintures d'impédance (thorax et abdomen), les ronflements, la fréquence cardiaque et la pression artérielle. Chaque apnée s'accompagne d'un signe d'éveil (EEG), de mouvements (EMG), d'une amplification des mouvements respiratoires, de ronflement et d'une élévation de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle (Figure 1) (Thompson et al. 2001).

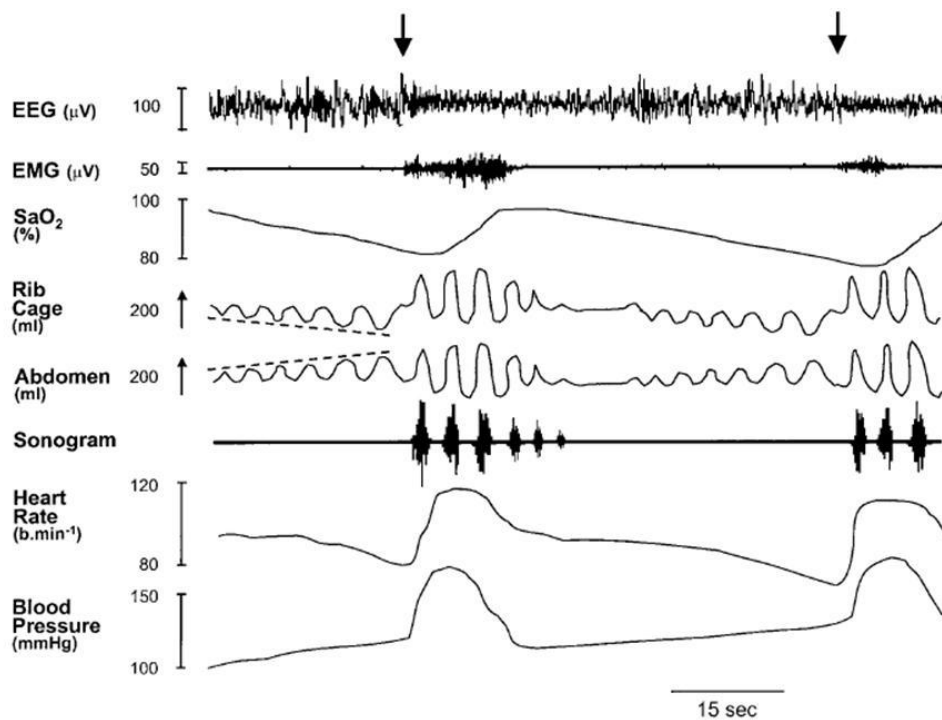


Figure 1 : Exemple de tracés obtenus lors d'un examen de polysomnographie.

Les flèches représentent la survenue d'apnées au cours du sommeil. Chaque apnée entraîne des perturbations des différents paramètres mesurés : une diminution de la saturation en oxygène, une augmentation des variations de pressions thoraciques et abdominales, de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle. D'après Thompson et al. 2001.

1.2. Traitements

1.2.1. Pression positive continue (PPC)

La PPC constitue le traitement de référence en cas de SAOS modéré à sévère. Brièvement, l'appareil de PPC est constitué de 3 parties : un masque qui recouvre soit le nez soit le nez et la bouche, un système de tuyaux à basse résistance reliant le masque à une machine générant des flux d'airs permettant de maintenir les VAS ouvertes. Elle peut être couplée à un humidificateur d'air afin de limiter la sécheresse et l'irritation du nez ou de la gorge. Les nouveaux appareils sont maintenant plus petits et légers mais également plus silencieux. Différents types d'appareils peuvent être proposés aux patients :

- PPC simple : la machine envoie une pression continue tout au long de la nuit, cette pression est la même pendant l'inspiration et l'expiration.
- PPC à 2 niveaux de pression : la pression envoyée par la machine est réduite lors de l'expiration diminuant ainsi la gêne expiratoire.
- PPC autopilotée : la machine va détecter les événements respiratoires au cours de la nuit et ajuster les pressions en fonction des besoins.

De nombreuses études ont été menées pour évaluer les effets bénéfiques de la PPC sur les symptômes du SAOS mais toutes ne parviennent pas aux mêmes conclusions.

Concernant le risque cardiovasculaire associé au SAOS, des études montrent que la PPC permet de diminuer la pression artérielle des patients (Bazzano et al. 2007; Marin et al. 2012) et que cette diminution ne dépend pas de la sévérité du SAOS (Bakker et al. 2014). La PPC peut également réduire le risque de survenue d'évènements cardiovasculaires tels que l'infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux pouvant être fatals (Marin et al. 2005). Cependant, une méta-analyse d'essais randomisés atteste de la diminution de la pression artérielle mais ne montre aucun effet significatif de la PPC sur le risque d'évènements cardiovasculaires et de mortalité (Guo et al. 2016). De même, la récente étude internationale SAVE, incluant plus de 2700 patients, a montré que la PPC ne permettait pas de prévenir la survenue d'évènements cardiovasculaires associés au SAOS (McEvoy et al. 2016).

Outre les risques cardiovasculaires, le SAOS a de lourdes conséquences sur la vie quotidienne des patients. En effet, le SAOS va être responsable d'une fatigue très importante parfois accompagnée de somnolence. Ainsi, la qualité de vie constitue un critère d'évaluation de l'efficacité du traitement. Les effets de la PPC sur ce paramètre sont également discutables. Après 3 mois de traitement et pour une même utilisation de la PPC, une grande partie des patients atteints d'un SAOS modéré ont vu leur qualité de vie s'améliorer et leur fatigue diminuer alors qu'une part non négligeable ne présentait pas d'amélioration de ces paramètres (Antic et al. 2011). Une étude récente vient de montrer que la PPC a des effets bénéfiques chez les patients avec un SAOS modéré à sévère mais en revanche, elle n'améliore pas la qualité de vie dans les cas de SAOS léger (Batool-Anwar et al. 2016). Cependant, il faut noter qu'il y a une corrélation entre la durée d'utilisation de la PPC et l'amélioration de la vie quotidienne (Weaver et al. 2007). L'étude SAVE a également montré que les patients traités par PPC présentaient moins de fatigue, d'anxiété et de dépression. Il a également été observé une amélioration de leur état physique et mental, ainsi qu'une réduction des durées d'arrêt de travail chez les patients appareillés (McEvoy et al. 2016).

La difficulté majeure de ce traitement est qu'il est contraignant pour le patient et pour le conjoint. En effet, la machine reste bruyante et le traitement présente quelques effets secondaires (problèmes cutanés causés par le masque, irritations des VAS,...). Pour ces raisons, le traitement est assez mal accepté (8 à 15% des patients refusent le traitement après une utilisation) et toléré (la compliance thérapeutique est comprise entre 65 et 80%) (Pepin et al. 1999). Les patients sont considérés compliant au traitement par PPC dès lors qu'ils l'utilisent au moins 5 fois par semaine et ce pendant une durée minimum de 4h par nuit (Kribbs et al. 1993). Ceci pourrait expliquer l'absence d'effet positif de ce traitement sur les atteintes cardiovasculaires des patients inclus dans l'étude SAVE puisque leur durée moyenne d'utilisation de la PPC était de 3,3h/nuit (McEvoy et al. 2016).

Ainsi, il est recommandé que la PPC soit combinée à d'autres alternatives thérapeutiques (comme la perte de poids ou la prise d'hypotenseurs) afin de potentialiser ses effets sur les complications cardiovasculaires et métaboliques associées au SAOS (Levy et al. 2015).

1.2.2. Chirurgie

De nombreuses chirurgies sont utilisées dans le traitement du SAOS. La chirurgie la plus utilisée est l'uvulo-palato-pharyngoplastie (Malhotra et al. 2002). Elle consiste en une résection de tissus mous de la gorge tels que la luette, les amygdales et d'une partie du palais élargissant ainsi le diamètre au niveau du pharynx. Cette opération présente un intérêt pour les patients souffrant de collapsus localisés au niveau oropharyngien, quelque soit la sévérité du SAOS. L'efficacité de l'opération semble décroître dans le temps et il est très difficile de l'évaluer car il y a, dans les études, d'importants biais de sélection des patients constituant de bons candidats pour ce type de chirurgie (Randerath et al. 2011).

1.2.3. Orthèse d'avancée mandibulaire

Il s'agit ici d'un dispositif mécanique qui peut remplacer la PPC dans des cas de SAOS peu sévères chez des patients présentant peu de surpoids. Elle est similaire à un appareil dentaire et va permettre d'avancer la mandibule et de retenir la langue. L'utilisation de cette orthèse réduit l'IAH et la fatigue mais de façon moins importante que la PPC. Comparativement à la chirurgie, il semblerait que la fatigue diurne soit initialement plus faible après chirurgie qu'avec l'orthèse, bien que l'IAH soit le même pour les 2 traitements. En revanche, après 1 an, les 2 traitements corrigent la fatigue de la même façon alors que l'IAH est plus faible avec l'utilisation de l'orthèse (Lim et al. 2006).

1.2.4. Perte de poids et mode de vie

Le surpoids est un facteur augmentant le risque de SAOS. De récentes études ont montré qu'une amélioration du mode de vie (régime alimentaire et/ou exercice physique) réduisait d'une part l'obésité mais également la sévérité du SAOS en diminuant l'IAH (Araghi et al. 2013; Thomasouli et al. 2013). Une autre étude a montré que les effets bénéfiques d'un régime étaient d'autant plus importants que le SAOS était sévère (Johansson et al. 2009). Chez la personne obèse, une perte de poids associée à la PPC va accroître la diminution de la pression artérielle, de la résistance à l'insuline et du taux de triglycérides (Chirinos et al. 2014).

1.3. Conséquences des obstructions des voies aériennes induites par le SAOS

1.3.1. Fragmentation du sommeil

La fragmentation du sommeil, causée par les microéveils accompagnant les apnées, va être à l'origine d'une diminution de la qualité de vie des patients. En effet, la fatigue excessive engendrée va réduire la vigilance des patients, augmentant le risque d'accidents. Elle va également être responsable d'une perte d'efficacité au travail à l'origine de difficultés professionnelles (Ayas et al.

2014). Finalement, la fragmentation du sommeil peut, en elle-même, entraîner des conséquences métaboliques délétères (Briancon-Marjollet et al. 2015).

1.3.2. Variations de la pression intrathoracique

Une seconde conséquence de ces obstructions est la diminution de la pression intrathoracique lors des apnées causée par des efforts inspiratoires sur les VAS fermées. Ces variations vont essentiellement être responsables, avec la fragmentation du sommeil et l'hypoxie intermittente, d'une activation sympathique et de comorbidités (Dewan et al. 2015). Par exemple, les variations de pression intrathoracique vont avoir d'importants effets mécaniques sur le cœur. Elles vont augmenter la pression transmurale (i.e. pression intracardiaque - pression intrathoracique) du ventricule gauche (VG) augmentant ainsi sa postcharge. Il y a également une augmentation du retour veineux augmentant la précharge du ventricule droit (VD). Sa postcharge est quant à elle augmentée par la vasoconstriction pulmonaire induite par l'hypoxie consécutive à l'apnée. La distension du VD et le déplacement du septum vers la gauche va gêner le remplissage du VG, donc diminuer sa précharge. L'augmentation de la postcharge et la diminution de la précharge du VG réduisent le volume d'éjection systolique et le débit cardiaque. Ces contraintes mécaniques vont être particulièrement lourdes de conséquences chez des patients insuffisants cardiaques souffrant de SAOS (Kasai et al. 2011).

1.3.3. Hypoxie intermittente

Parmi les perturbations induites par les apnées, l'hypoxie intermittente (HI) chronique apparaît comme le principal facteur responsable des atteintes cardiovasculaires rencontrées dans ce syndrome. En effet, l'augmentation du risque cardiovasculaire liée au SAOS est réduite par un traitement par PPC efficace confirmant ainsi le rôle de l'HI dans la survenue de ces événements (Marin et al. 2005). De plus, les modèles expérimentaux d'HI, chez le sujet sain et l'animal, reproduisent les altérations cardiovasculaires observées chez le patient apnéique. Il a ainsi été démontré que l'HI est responsable d'une augmentation de la pression artérielle (Tamisier et al. 2011; Ramond et al. 2013) et de la taille d'infarctus (Joyeux-Faure et al. 2005; Belaidi et al. 2016), ainsi que d'une dysfonction (Lefebvre et al. 2006) et d'un remodelage (Arnaud et al. 2011; Gras et al. 2016) vasculaires.

De nombreux mécanismes interviennent dans les altérations cardiovasculaires induites par l'HI et seront décrits dans la partie 3. Brièvement, les épisodes de désoxygénation-réoxygénation sont à l'origine d'un stress oxydant qui contribue de façon importante aux effets délétères de l'HI et du SAOS (Lavie 2003). Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) vont également activer des facteurs de transcription tels que le facteur de transcription induit par l'hypoxie (Hypoxia Inducible Factor 1, HIF-1) responsable de la réponse adaptative et mal adaptative à l'HI (Semenza 2009). Parmi les produits des gènes cibles de HIF-1, certains comme l'oxyde nitrique et le monoxyde de carbone, ont des effets

bénéfiques sur le système cardiovasculaire (Andreadou et al. 2015), alors que d'autres comme l'endothéline 1 (ET-1) vont être impliqués dans des processus physiopathologiques de maladies cardiovasculaires (Kaoukis et al. 2013). Ce paradoxe autour des effets bénéfiques ou néfastes de l'HI peut s'expliquer par des expressions géniques, variant selon le contexte, finement modulées par la durée et la sévérité de l'hypoxie au cours des cycles d'HI (Verges et al. 2015). L'HI va également entraîner une activation sympathique avec des conséquences délétères sur le système cardiovasculaire (Dematteis et al. 2009).

2. Conséquences cardiovasculaires du SAOS et de l'HI

2.1. Hypertension artérielle

Le SAOS est maintenant reconnu comme étant un facteur de risque pour le développement de l'hypertension artérielle (HTA). Il existe une relation dose-réponse entre SAOS et HTA et ce indépendamment des nombreux facteurs confondants tels que l'âge, la consommation d'alcool et/ou de tabac et l'indice de masse corporelle (Peppard et al. 2000). Il existe une relation linéaire entre l'IAH et la pression artérielle mesurée sur 24 heures (Young et al. 1997). Le rôle de l'HI dans cette relation est appuyé par une étude menée sur 12 ans qui a montré que l'HTA était d'avantage retrouvée chez les patients ayant refusés ou arrêtés leur traitement par PPC contrairement à ceux l'utilisant au moins 4h par nuit (Marin et al. 2012). De plus, il s'avère que la relation entre SAOS et HTA est d'autant plus forte que les patients sont jeunes et elle s'atténue avec l'âge (Bixler et al. 2000).

Le lien entre HI et élévation de la pression artérielle a également été mis en évidence dans de nombreux modèles animaux et humains d'HI. Chez le rat, Fletcher et al. furent les premiers à démontrer qu'une exposition de 40 jours à l'HI conduisait à une augmentation de pression artérielle (Fletcher et al. 1992) et que cette relation était abolie par une dénervation sympathique (Fletcher et al. 1992). Ce constat a été confirmé dans de nombreux autres modèles animaux d'HI et apparaît dès 5 jours d'exposition (Dematteis et al. 2009). Plus récemment, l'effet de l'HI sur la pression artérielle a pu être observé chez des sujets sains excluant ainsi tout biais par des facteurs confondants tels que l'obésité, l'hypertension ou des désordres métaboliques. Après 14 nuits passées en HI, les sujets présentent une augmentation de la pression artérielle diurne tant systolique que diastolique (de 8 et 5 mmHg, respectivement) (Tamisier et al. 2011).

2.2. Dysfonction vasculaire

L'endothélium vasculaire régule la fonction vasculaire en réponse à des stimuli physiques ou biochimiques grâce à divers médiateurs vasoactifs. Il est le régulateur majeur de l'homéostasie vasculaire et maintient l'équilibre entre vasodilatation et vasoconstriction. Il y a dysfonction endothéliale lorsque cette balance bascule en faveur de la vasoconstriction. Ce déséquilibre, causé

entre autres par une détérioration de la vasodilatation endothélium-dépendante, joue un rôle important dans la survenue de complications cardiovasculaires dans le SAOS (McNicholas et al. 2007). La fonction vasodilatatrice des vaisseaux n'est pas la seule à être altérée, il a également été montré une augmentation de la vasoconstriction en réponse à l'angiotensine II chez des patients apnéiques (Kraiczi et al. 2000). Le SAOS est associé à une dysfonction endothéliale au niveau de la micro et de la macrocirculation (Hoyos et al. 2015). Une augmentation du stress oxydant et de l'inflammation, responsables de dysfonctions endothéliales, a été observée au niveau de l'endothélium de patients apnéiques (Jelic et al. 2008). Ces paramètres ont été améliorés par 4 semaines de traitement par PPC, soulignant le rôle majeur joué par l'HI dans ces processus physiopathologiques (Jelic et al. 2009).

De nombreuses études animales ont confirmé le lien entre HI et dysfonction vasculaire. L'utilisation de modèles animaux permet d'observer l'effet de l'HI sur différents types de vaisseaux et après des durées d'exposition variables. Dès 14 jours d'exposition, Phillips et al. ont mis en évidence une altération de la vasodilatation dans des artères cérébrales et des artères issues de muscles squelettiques (Phillips et al. 2004). Pour cette même durée d'exposition, une augmentation de la vasoconstriction induite par l'ET-1 est retrouvée dans d'autres vaisseaux de résistance tels que les artères mésentériques (Allahdadi et al. 2005). Concernant la carotide, 14 jours d'exposition à l'HI ne suffisent pas à induire une dysfonction qui apparaît à partir de 21 jours et est caractérisée par une augmentation de la contraction au chlorure de potassium et une diminution de la relaxation endothélium-dépendante (Totoson et al. 2013; Krause et al. 2015). Après 35 jours, l'HI entraîne une augmentation de la contraction de la carotide en réponse à l'ET-1 (Lefebvre et al. 2006).

Ainsi, les altérations de la vasodilatation et de la vasoconstriction, et donc de la fonction endothéliale, apparaissent plus ou moins tôt selon le lit vasculaire observé.

2.3. Augmentation de la prévalence et de la taille de l'infarctus du myocarde

L'infarctus du myocarde (IM) est causé par une atteinte des vaisseaux coronaires. Dès 1999, Peker et al. ont montré une forte prévalence de SAOS chez les patients présentant des coronaropathies, faisant ainsi du SAOS un facteur de risque (Peker et al. 1999; Schafer et al. 1999). Une étude menée sur environ 5 ans a montré que chez des patients atteints de coronaropathie, le SAOS augmentait l'incidence des accidents vasculaires cérébraux et de l'IM, révélateur d'un mauvais pronostic de ces patients à long terme (Mooe et al. 2001).

En termes d'IM aigu, les patients apnéiques présentent, dans la phase précoce post-ischémique, une coronaropathie plus sévère, une ischémie myocardique plus longue, une moins bonne récupération myocardique et une altération du remodelage du VG et du VD comparativement à des patients non-apnéiques (Arzt et al. 2015). A 3 mois post-IM, les patients présentant un SAOS sévère non traité ont une moins bonne récupération myocardique, une plus petite réduction de la taille de l'infarctus, une taille d'infarctus finale plus grande et une fraction d'éjection du VG plus petite que des patients non

apnéiques (Buchner et al. 2014). A 18 mois post-IM, cette moins bonne récupération se traduit par un moins bon pronostic avec une augmentation de la survenue d'évènements cardiovasculaires parfois fatals (Lee et al. 2011). Une étude réalisée sur un suivi d'environ 6 ans a montré que les patients SAOS traités par PPC présentaient un moindre risque de survenue d'un nouveau IM comparativement aux patients non traités. La même étude a également mis en évidence que chez ces patients, la survenue d'un nouvel évènement était plus fréquente la nuit (Garcia-Rio 2014).

Grâce à de nombreuses études expérimentales, l'HI semble apparaître comme un acteur majeur de l'augmentation de la susceptibilité myocardique à l'ischémie. En effet, une exposition à l'HI de 14, 21 et 35 jours entraîne une augmentation de la taille de l'infarctus d'environ 1,7 fois après une ischémie globale de 30 minutes, suivie de 120 minutes de reperfusion, sur des cœurs isolés de rat (Joyeux-Faure et al. 2005; Ramond et al. 2013; Bourdier et al. 2016). Le même résultat a été obtenu après une ischémie régionale *ex vivo* réalisée après 4 semaines d'exposition à l'HI (Yeung et al. 2015). Finalement, une récente étude menée chez la souris a montré que 14 jours d'HI entraînaient une augmentation de la taille d'infarctus d'1,8 fois après une ischémie *in vivo* de 45 minutes suivie par 90 minutes de reperfusion (Belaidi et al. 2016).

2.4. Arythmies ventriculaires

Le SAOS et les arythmies ventriculaires sont liés. En effet, les arythmies sont fréquentes chez les personnes ayant un SAOS et leur survenue augmente avec la sévérité du syndrome (Somers et al. 2008). Il a été montré que les patients avec un SAOS sévère présentaient un risque d'arythmies pendant la nuit 2 à 4 fois plus élevé que les patients non apnéiques (Mehra et al. 2006) et que le risque de mort subite était accru dans cette population de patients, préférentiellement pendant le sommeil (Gami et al. 2013). L'IM est l'une des causes majeures de la mort subite de part la génération d'arythmies ventriculaires telles que la tachycardie ventriculaire (TV) soutenue ou irréversible et/ou la fibrillation ventriculaire (FV) dont l'issue peut être fatale. La physiopathologie des arythmies ventriculaires consécutives à une ischémie myocardique est complexe. Elles sont la conséquence d'anomalies causées par les lésions tissulaires, des modifications du système nerveux autonome et des altérations du statut métabolique (Myerburg et al. 2012). En accord avec le risque accru de mort subite pendant la nuit, l'incidence d'IM durant la nuit est plus importante chez les patients apnéiques (32%) que chez les patients non apnéiques (7%) et 91% des patients victimes d'IM pendant la nuit présentent un SAOS (Kuniyoshi et al. 2008). Le traitement par PPC diminue l'incidence et la sévérité des arythmies ventriculaires. Chez des patients souffrant de SAOS et d'insuffisance cardiaque, la PPC réduit de 58% la survenue des troubles du rythme tels que les extrasystoles ventriculaires (Ryan et al. 2005). Ceci laisse imaginer une possible implication de l'HI dans l'incidence de ces arythmies mais l'absence de données expérimentales ne permet pas de le confirmer.

3. Mécanismes physiopathologiques induits par l'HI

Tel que mentionné dans la partie 1.2, les effets bénéfiques des traitements actuels du SAOS au niveau cardiovasculaire restent discutés. Ce constat souligne l'importance de la compréhension des mécanismes physiopathologiques à l'origine des complications cardiovasculaires associées au SAOS afin de pouvoir proposer d'autres alternatives thérapeutiques aux patients.

3.1. Stress oxydant

3.1.1. Généralités

Le SAOS est depuis de nombreuses années connu pour être à l'origine d'importants troubles oxydatifs causés par les cycles répétés d'hypoxémie-réoxygénation caractérisant l'HI. Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre dans la balance pro et antioxydante et joue un rôle central dans les complications cardiovasculaires induites par le SAOS et l'HI. Il est dû à une formation massive d'ERO et d'espèces réactives azotées (ERN) qui mettent à mal les défenses antioxydantes. Ces molécules hautement réactives vont réagir avec les acides nucléiques, les lipides et les protéines et vont être à l'origine d'importants dommages cellulaires (Lavie 2003). La source majeure d'ERO dans l'organisme est la mitochondrie. Il peut également y avoir une production d'ERO par la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase (NOX), la xanthine oxydase (XO) et le découplage de l'oxyde nitrique synthase (NOS) (Lavie 2015). Ce statut pro-oxydant est également caractérisé par une diminution des défenses antioxydantes avec une diminution plasmatique de substances antioxydantes, telles que les vitamines A et E, et d'enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (Eisele et al. 2015).

3.1.2. Voie mitochondriale

En conditions normales, la mitochondrie produit des ERO qui vont servir de messagers pour différentes voies de signalisation. Cette production d'ERO est due à une fuite d'électrons au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale et va entraîner la formation d'anions superoxydes (Figure 2) (Lavie 2003).

Une étude menée sur des muscles du palais de patients apnéiques a montré une distribution anormale des mitochondries et une activité oxydative altérée (Stal et al. 2012). Chez le rongeur, 10 jours d'exposition à l'HI entraînent une diminution de 89% de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale et une diminution de 79% de l'activité de l'aconitase. Ces 2 observations sont en faveur d'une augmentation de la production d'anions superoxydes par la mitochondrie après exposition à l'HI (Peng et al. 2003).

3.1.3. NADPH oxydase (NOX)

La NOX est une enzyme membranaire exprimée dans de nombreux tissus (vaisseaux, cœur, système nerveux central) et dans les cellules sanguines. Elle va générer des anions superoxydes en transférant des électrons du NADPH vers une molécule de dioxygène (Figure 2) (Lavie 2015).

Chez les patients atteints de SAOS, il y a une augmentation de la production d'anions superoxydes par les leucocytes circulants, les granulocytes neutrophiles et les monocytes. Cette augmentation est due à une activation de la NOX et est abolie par la PPC (Schulz et al. 2000; Dyugovskaya et al. 2002). Le lien entre la NOX et le stress oxydant induit par l'HI est renforcé par l'observation qu'un polymorphisme pro-oxydant de la NOX pourrait également jouer un rôle dans la susceptibilité génétique au SAOS, indépendamment d'autres facteurs tels que l'âge, le poids ou l'hypertension (Pierola et al. 2011).

L'utilisation de modèle animaux d'HI a permis de montrer qu'une exposition de 14 jours entraîne une augmentation de l'expression de la NOX et de la production d'anions superoxydes dans le cœur (Ramond et al. 2013). L'augmentation de l'expression de la NOX a également été observée dans le foie (Jun et al. 2008), les poumons (Nisbet et al. 2009), le muscle squelettique (Williams et al. 2015) et le cerveau (Hui-guo et al. 2010).

3.1.4. Xanthine oxydase (XO)

La XO est une enzyme également responsable d'une production d'anions superoxydes (Figure 2). Elle est ubiquitaire et exprimée dans de nombreux tissus (Lavie 2015). Son rôle délétère dans la génération d'un stress oxydant a d'abord été démontré au cours de l'ischémie-reperfusion dans différents tissus (cœur, intestin, foie, reins et cerveau) grâce à l'utilisation d'inhibiteurs tels que l'allopurinol (Manning et al. 1984; McCord 1985). L'HI va exposer les organes à des stimuli proches de ceux rencontrés au cours de l'ischémie-reperfusion en termes d'hypoxie-réoxygénation. L'utilisation d'un modèle cellulaire d'exposition à l'HI a permis de montrer une augmentation de l'activité de la XO dès 5 cycles d'HI et cette activité est d'autant plus importante que le nombre de cycles augmente (Nanduri et al. 2015).

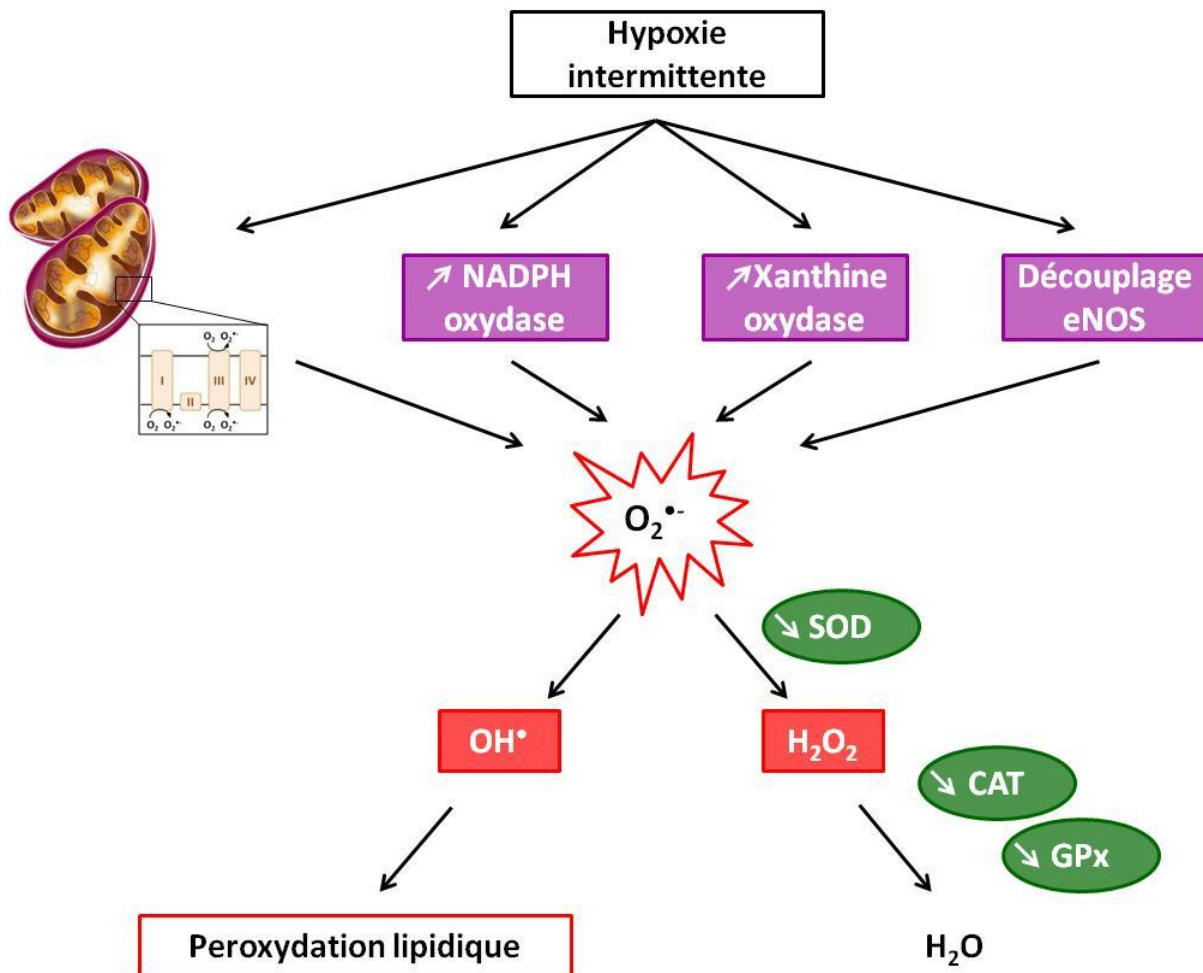


Figure 2 : Schéma illustrant l'origine du stress induit par l'HI ainsi que les défenses anti-oxydantes diminuées.

En rouge : le stress oxydant ; Violet : son origine ; vert : les défenses anti-oxydantes. $O_2^{\bullet-}$, anion superoxyde ; SOD, superoxyde dismutase ; CAT, catalase ; GPx, glutathion peroxydase ; H_2O_2 , peroxyde d'hydrogène ; OH^{\bullet} , radical hydroxyle ; H_2O , eau.

3.1.5. Oxyde nitrique synthase (NOS)

La NOS est l'enzyme responsable de la synthèse d'oxyde nitrique (NO), un composé vasoactif, à partir de la L-arginine. Libéré par les cellules endothéliales vasculaires, il va diffuser vers les cellules musculaires lisses et entraîner une vasorelaxation. En plus de ces propriétés, il possède également des propriétés anti-thrombotiques et protège les vaisseaux de l'athérosclérose.

Il existe 3 isoformes de la NOS : la NOS neurale (nNOS, NOS1) exprimée dans le cerveau et le coeur, la NOS endothéliale (eNOS, NOS3) exprimée par les cellules endothéliales et les cardiomyocytes, et la NOS inductible (iNOS, NOS2) (Andrew et al. 1999).

Dans certaines conditions, la eNOS peut être responsable de la production d'anions superoxydes au lieu du NO (Figure 2). Ce découplage de la eNOS peut être causé par un manque de substrat (L-arginine) ou de cofacteurs (tétrahydrobioptérine, BH_4), par un inhibiteur endogène (diméthylarginine

asymétrique, ADMA) ou par une S-glutathionylation. En présence d'un stress oxydant, un déficit en BH₄ peut être causé par son oxydation en dihydrobioptérine (BH₂), par l'inhibition de l'enzyme qui le synthétise ou de celle qui réduit le BH₂ en BH₄ (Li et al. 2013).

Ainsi, le stress oxydant induit par l'HI peut ainsi avoir le potentiel de découpler la eNOS pour produire des ERO, tels que l'anion superoxyde, qui auront des effets délétères sur le système cardiovasculaire (Figure 2).

Une étude récente menée sur des biopsies de tissu sous-cutané de patients apnéiques a mis en évidence une possible implication du découplage de la eNOS dans la dysfonction endothéliale. Tout d'abord, l'analyse des biopsies pré- et post-PPC montre une diminution du stress oxydant et une augmentation du NO après 12 semaines de traitement par PPC. Afin de vérifier si ces améliorations étaient dues à un retour à la normale de l'activité de la eNOS, les auteurs ont utilisé un inhibiteur, le L-Nitroarginine-Methyl-Ester (L-NAME), et un cofacteur, le BH₄, de la eNOS. Ils ont montré que le découplage de la eNOS était plus important chez les patients atteints de SAOS et que le traitement par PPC ne renversait pas totalement cet effet (Varadharaj et al. 2015).

En plus du découplage responsable d'une diminution de la biodisponibilité en NO, l'HI réduit sa production en diminuant l'expression de la eNOS dans de nombreux vaisseaux tels que les carotides (Krause et al. 2015), l'aorte thoracique et les artères mésentériques (Wang et al. 2013) ainsi que dans le cœur (Yuan et al. 2015).

3.1.6. Diminution des défenses antioxydantes

La première enzyme intervenant dans la défense antioxydante est la SOD qui va transformer l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Il existe 3 formes de SOD : une forme cytosolique constitutive (Cu/Zn-SOD, SOD1), une forme mitochondriale inductible (Mn-SOD, SOD2) et une forme extracellulaire (SOD3). L'H₂O₂ sera ensuite transformé en eau par la catalase et la glutathion peroxydase (GPx) (Figure 2). D'autres molécules non enzymatiques telles que des vitamines (C, E) et le glutathion peuvent jouer un rôle antioxydant important.

Des études menées sur des patients atteints d'un SAOS sévère ont montré une diminution des capacités antioxydantes du plasma. Cette diminution est d'autant plus importante que le SAOS est sévère, mais elle peut être corrigée par 12 mois de traitement par PPC (Christou et al. 2003; Barcelo et al. 2006; Cofta et al. 2008; Wysocka et al. 2008). L'évaluation des taux sériques en vitamines a mis en évidence une diminution de la vitamine E circulante qui n'est pas améliorée après 1 an de traitement par PPC (Barcelo et al. 2006). Chez des patients présentant un SAOS modéré à sévère, les capacités antioxydantes de l'albumine sont altérées par des modifications structurales telles que l'oxydation et la glycation. Ces altérations sont corrélées à l'IAH et corrigées après 15 mois de traitement par PPC (Faure et al. 2008). Concernant les enzymes antioxydantes, le SAOS entraîne une diminution de l'activité de la SOD1 érythrocytaire indépendamment de sa sévérité ou de la présence d'un surpoids ou d'une obésité (Cofta et al. 2008; Wysocka et al. 2008). Dans des cas de SAOS sévère,

une diminution de l'activité de la catalase et de la GPx a été observée et corrélée à l'IAH (Asker et al. 2015).

Le rôle de l'HI dans la diminution des défenses antioxydantes a été montré dans plusieurs organes grâce aux modèles animaux. Au niveau vasculaire, l'HI induit une diminution de l'activité de la Cu/Zn-SOD et une diminution de son expression ainsi que de celle de la catalase et de la GPx dans l'aorte thoracique après 14 jours d'exposition (Hung et al. 2013; Totoson et al. 2013). Concernant le myocarde, il y a une diminution de l'activité de la Cu/Zn-SOD dans le ventricule gauche après 5 semaines d'HI (Chen et al. 2005). Au niveau cérébral, l'HI entraîne une diminution de l'activité de la Cu/Zn-SOD et de la Mn-SOD. Aucune modification de l'activité de la catalase n'a été constatée alors que celle de la GPx augmente (Hui-guo et al. 2010; Quintero et al. 2013). Une diminution de l'activité de la Cu/Zn-SOD et une augmentation de celle de la GPx ont également été observées dans d'autres organes tels que les poumons et le foie après 2 semaines d'exposition. Dans le foie, on observe également une diminution de l'activité de la Mn-SOD et de la catalase (Quintero et al. 2013).

3.1.7. Peroxydation lipidique

L'une des conséquences biochimiques directes de la production d'ERO va être la peroxydation lipidique induite par le radical hydroxyle (Figure 2). L'oxydation des lipides va altérer de nombreux processus physiologiques et entraîner des dysfonctions cellulaires à l'origine des complications cardiovasculaires. Parmi les produits de la peroxydation lipidique, les substances réagissant à l'acide thiobarbiturique (TBARS) et les isoprostanes sont les composés les plus communément dosés (Lavie 2015).

Chez le patient apnéique, les niveaux de TBARS de prélèvements sanguins effectués le matin sont augmentés et cette augmentation est corrigée par le traitement par PPC (Barcelo et al. 2000; Lavie et al. 2004; El Solh et al. 2006). Les mesures des isoprostanes peuvent se faire sur différents fluides tels que le sang, l'urine ou le condensat respiratoire expiré. Au niveau plasmatique, les patients atteints de SAOS ont un taux d'isoprostanes 3 fois plus élevé que les sujets sains (Passali et al. 2015). Le taux de 8-isoprostane exhalé est augmenté le matin mais cette augmentation ne perdure pas dans la journée et est corrigée par la PPC (Carpagnano et al. 2003). Au niveau urinaire, on observe une corrélation entre l'IAH et le taux de 15-F_{2t}-isoprostane (Monneret et al. 2010).

Chez l'animal, ce sont essentiellement les TBARS qui sont quantifiés dans les fluides ou les tissus. Concernant le sang et les urines, aucune augmentation des TBARS n'a été démontrée pour des expositions à l'HI allant de 1 à 4 semaines (Jun et al. 2008; Dopp et al. 2011). Pour ce qui est des tissus, leur sensibilité est organe-dépendante. Par exemple au niveau du cerveau, la peroxydation lipidique n'est pas augmentée à 2 semaines alors qu'elle l'est à 4 semaines d'HI (Hui-guo et al. 2010; Quintero et al. 2013). Pour d'autres organes tels que l'aorte thoracique, le foie et le cœur, l'augmentation des TBARS tissulaires apparaît dès la 1^{ère} semaine d'exposition et persiste jusqu'à 4 (aorte et foie) et 8 semaines (cœur) (Chen et al. 2005; Jun et al. 2008; Hung et al. 2013; Quintero et

al. 2013; Yuan et al. 2015). Le rein, quant à lui, présente une importante peroxydation lipidique dès 3 jours d'HI qui perdure jusqu'à 8 semaines (Wu et al. 2015).

3.2. Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF-1)

3.2.1. Généralités

L'existence du facteur de transcription HIF-1 a été mise en évidence en 1992 par Semenza et Wang grâce à l'étude de la région promotrice du gène de l'érythropoïétine (EPO) exprimé en réponse à l'hypoxie (Semenza et al. 1992). Quelques années plus tard, HIF-1 a été purifié et sa structure a pu être étudiée. C'est un hétérodimère constitué d'une sous-unité HIF-1 α et d'une sous-unité HIF-1 β . La sous-unité HIF-1 β est commune à d'autres facteurs de transcription alors que la sous-unité HIF-1 α est spécifique de HIF-1 (Wang et al. 1995; Wang et al. 1995). D'un point de vue structurel, les 2 sous-unités, α et β , possèdent dans leur partie N-terminale un motif hélice-boucle-hélice indispensable à leur dimérisation et constituant le domaine de liaison à l'ADN (Jiang et al. 1996).

Sur des cellules, il a été montré qu'il y avait une très importante augmentation de HIF-1 à partir de d'une concentration d'oxygène inférieure à 6%. La quantité de HIF-1 atteint son maximum à 0,5% et une réoxygénation à 20% d'oxygène va entraîner une rapide diminution de la quantité d'HIF-1. Ces résultats mettent ainsi en évidence le rôle de HIF-1 dans l'homéostasie de l'oxygène (Jiang et al. 1996).

La dégradation rapide de la quantité de HIF-1 en conditions de normoxie est due à la dégradation par le protéasome de la sous-unité HIF-1 α après ubiquitination (Figure 3) (Hurst 2016). Cette spécificité de HIF-1 α vient de la présence d'un domaine indispensable à sa régulation par l'oxygène, le domaine de dégradation oxygène-dépendante (*Oxygen-Dependant Degradation Domain*, ODDD) (Huang et al. 1998). De plus, dans sa partie C-terminale, HIF-1 α possède 2 domaines de transactivation (TAD) jouant également un rôle dans sa régulation : TAD-N et TAD-C (Jiang et al. 1997). Cette région permet la fixation du co-activateur *CREB Binding Protein* (CBP/p300), à l'origine de la translocation nucléaire de HIF1- α et de sa dimérisation avec la sous-unité β . L'hétérodimère va se fixer sur la région promotrice de ses gènes cibles et exercer son activité transcriptionnelle (Kallio et al. 1998). Ces régions sont appelées HRE pour *Hypoxia Response Element*. Elles ont été retrouvées dans de nombreux gènes impliqués dans la fonction cardiovasculaire tels que l'EPO, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), iNOS, eNOS et l'ET-1 (Semenza et al. 1992; Arnet et al. 1996; Forsythe et al. 1996; Hu et al. 1998; Jung et al. 2000). HIF-1 va également réguler l'expression de protéines impliquées dans la régulation du métabolisme glucidique telles que l'aldolase A, l'énolase 1 et la lactate déshydrogénase (Semenza et al. 1996).

3.2.2. HIF-1 et hypoxie continue

En normoxie, les prolines P402 et P564 de HIF-1 α sont hydroxylées par des protéines appelées prolyl-4-hydroxylases (PHD) présentes sous 3 isoformes : PHD1, PHD2 et PHD3 (Figure 3). Les PHD

appartiennent à la famille des dioxygénases. Elles contiennent dans leur domaine catalytique un ion fer et utilisent l'oxygène et le α -kétoglutarate comme substrats (Bruick et al. 2001; Epstein et al. 2001).

L'hydroxylation de l'ODDD va permettre au facteur suppresseur de tumeur Von Hippel-Lindau (pVHL) de se fixer à HIF-1 α . Il va recruter la protéine ubiquitine ligase E3 qui, grâce à l'ubiquitine activatrice E1 et l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine E2, va être à l'origine de l'ubiquitination de HIF-1 α et de sa dégradation par le protéasome (Figure 3) (Jaakkola et al. 2001).

Ainsi, la diminution de la disponibilité en oxygène va entraîner, selon le niveau d'hypoxie, une diminution ou un arrêt de l'hydroxylation de HIF-1 α et donc de sa dégradation. De plus, une augmentation de production d'ERO par la mitochondrie va également diminuer l'activité des PHDs (Epstein et al. 2001; Mansfield et al. 2005).

D'autre part, il existe un inhibiteur de HIF-1 (factor inhibiting HIF-1, FIH-1) qui, une fois fixé à la région TAD-C de HIF-1 α , va entraîner une diminution de son activité transcriptionnelle. FIH-1 est une asparagine hydroxylase qui, comme les PHD, contient un ion fer dans son domaine catalytique et va utiliser l'oxygène et du 2-oxo-glutarate comme substrat (Dann et al. 2002). L'hydroxylation de l'asparagine 803 va empêcher l'interaction de HIF-1 α avec ses co-activateurs CBP/p300. De plus, le FIH-1 va interagir avec le pVHL, jouant ici le rôle de répresseur transcriptionnel (Mahon et al. 2001).

Ainsi, en hypoxie, le manque d'oxygène va réduire l'activité de FIH-1 empêchant l'hydroxylation de l'Asn-803. CBP/p300 peut alors se fixer sur HIF-1 α qui va alors exercer son activité transcriptionnelle. L'augmentation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α lors d'une hypoxie est donc causée par une diminution de sa dégradation par les PHD et une levée de son inhibition par FIH-1.

A cela s'ajoute une augmentation de sa transcription. En effet, les niveaux d'ARN messagers (ARNm) de HIF-1 α augmentent dans de nombreux organes en réponses à l'hypoxie (Wiener et al. 1996; Bergeron et al. 1999).

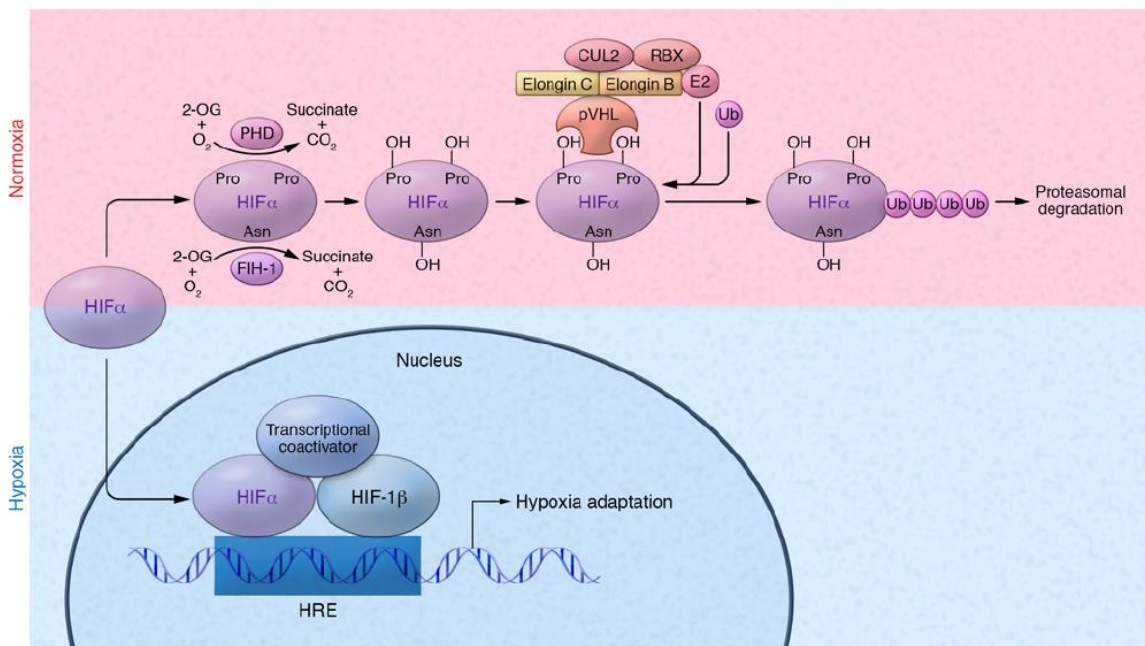


Figure 3 : Schéma représentant la régulation de HIF-1.

En conditions normoxiques (haut), la sous-unité α de HIF-1 est hydroxylée par les PHD, ubiquitinée puis dégradée par le protéasome et la dimérisation avec les autres sous-unités est inhibée par le FIH. En hypoxie, HIF-1 α n'est plus dégradé entraînant l'activation de HIF-1. HIF, Hypoxia Inducible Factor ; PHD, Prolyl-4-hydroxylase ; FIH, Factor inhibiting HIF-1 ; pVHL, facteur suppresseur de tumeur Von Hippel-Lindau ; Ub, ubiquitine ; E2, enzyme de conjugaison de l'ubiquitine ; HRE, Hypoxia Response Element ; Pro, proline ; Asn, asparagine. D'après Hurst et al. 2016.

3.2.3. HIF-1 et hypoxie intermittente/SAOS

Le potentiel impact de l'HI sur l'activité de HIF-1 a été soulevé en 2003 grâce à l'utilisation de souris partiellement invalidées pour la sous-unité HIF-1 α (Cai et al. 2003).

In vitro, l'exposition de cellules PC12 (cellules originaires d'un phéochromocytome de la médullo-surrénale de rat) à des cycles de 30 secondes d'hypoxie (1,5%) suivies de 4 minutes de normoxie (20%), répétés 10, 30, 60 et 120 fois, a mis en évidence une augmentation de HIF-1 α dans le noyau ainsi que de son activité transcriptionnelle. Cette augmentation est d'autant plus importante que le nombre de cycles est grand et est Ca²⁺-calmoduline protéine kinase (CamK) dépendante. L'activité de HIF-1 α est également 2,5 fois plus importante après 120 cycles d'HI qu'à l'issue d'une heure d'hypoxie continue (Yuan et al. 2005). Une étude réalisée quelques années après par la même équipe a pu mettre en évidence l'ensemble des voies impliquées dans l'activation de HIF-1 induite par l'HI (Figure 4). Comme mentionné précédemment, l'HI est à l'origine d'un important stress oxydant qui est, entre autre, causé par la NOX. Cette production d'ERO va conduire à l'activation de la phospholipase C (PLC) elle-même responsable de l'activation, Ca²⁺-dépendante ou via la le diacylglycérol, de la protéine kinase C (PKC) et de la CamK. D'une part, la PKC va être responsable d'une augmentation de la synthèse de HIF-1 α en activant la voie mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) et de sa stabilisation en inhibant les PHD.

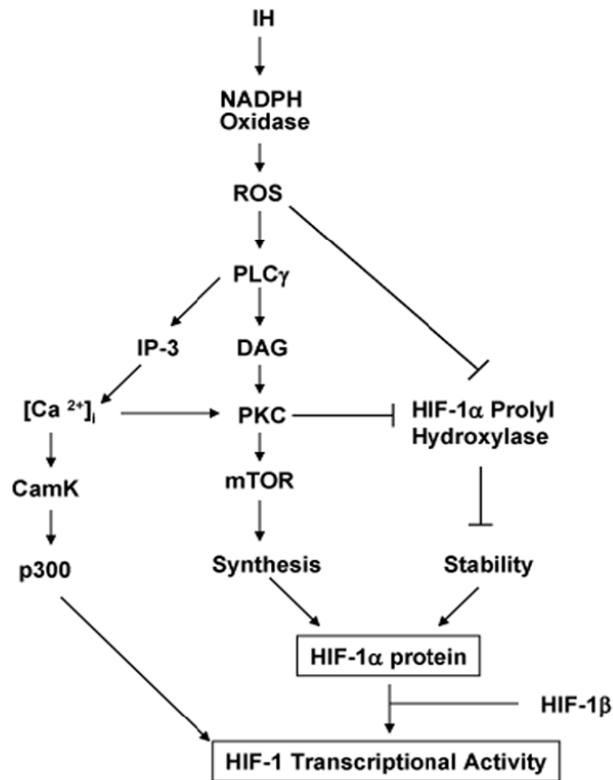


Figure 4 : Schéma représentant les différentes voies de signalisation intervenant dans l'activation de HIF-1 (stabilisation et expression) en réponse à l'HI.

ROS, Reactive Oxygen Species ; PLC, Phospholipase C ; DAG, Diacylglycérol ; PKC, Protéine Kinase C ; mTOR, mammalian Target Of Rapamycin ; CamK, protéine kinase Ca²⁺-calmoduline dépendante. D'après Yuan et al. 2008.

De son côté, la CamK favorise l'interaction entre p300 et HIF-1α qui va migrer dans le noyau, se dimériser avec la sous-unité β et activer la transcription des gènes cibles.

Ainsi, l'augmentation de la synthèse, de la migration nucléaire, de la dimérisation et de la stabilité de HIF-1α vont être à l'origine d'une augmentation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 qui sera maintenue durablement après la réoxygénation grâce à la voie mTOR (Yuan et al. 2008).

Expérimentalement, les modèles d'exposition à l'HI ont permis de mettre en évidence l'activation importante et soutenue de HIF-1 dans de nombreux organes tels que le cœur (Belaidi et al. 2009), l'aorte (Gras et al. 2016), le cerveau (Wang et al. 2009), le foie et les poumons (da Rosa et al. 2012).

Chez les patients apnéiques, une augmentation de l'expression de gènes cibles de HIF-1 a été observée. En effet, ils présentent des concentrations plasmatiques d'EPO plus importantes que des sujets sains et cette augmentation est corrigée par le traitement par PPC (Cahan et al. 1995). Les taux de VEGF circulants sont également accrus et le sont d'autant plus que la sévérité du SAOS augmente (Imagawa et al. 2001; Gozal et al. 2002; Schulz et al. 2002). La même observation a été faite pour l'ET-1 (Phillips et al. 1999).

Plus récemment, une augmentation de l'expression de HIF-1 α a été observée sur des biopsies de peau réalisées chez des patients atteints de SAOS (Kaczmarek et al. 2013).

3.3. Endothéline 1 (ET-1)

3.3.1. Généralités

L'ET-1 est un peptide vasoactif synthétisé et libéré par de nombreux types cellulaires et majoritairement par les cellules endothéliales (Yanagisawa et al. 1988). Elle est synthétisée sous la forme d'un précurseur appelé pré-pro-ET-1 qui est clivé en big-ET-1 par une endopeptidase. La big-ET-1 va à son tour être clivée en ET-1 par des métalloprotéases membranaires, les enzymes de conversion de l'ET-1 (ECE-1 et ECE-2) (Yanagisawa et al. 2000). L'ET-1 sécrétée peut se fixer sur 2 types de récepteurs membranaires, ET_A et ET_B, exprimés au niveau du système cardiovasculaire par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les cardiomyocytes et les fibroblastes.

Le récepteur ET_B est exprimé préférentiellement par les cellules endothéliales. En réponse à l'ET-1 il va entraîner la libération de NO et de prostaglandines qui auront une action vasodilatatrice. De plus, ce récepteur va être responsable de la clairance de l'ET-1. Les cellules musculaires lisses, quant à elles, expriment principalement le récepteur ET_A qui va être à l'origine d'une vasoconstriction conférant ainsi à l'ET-1 son puissant pouvoir hypertenseur. Il en est de même pour les cardiomyocytes. La balance étant en faveur du récepteur ET_A, l'ET-1 va exercer un effet inotrope positif sur le myocarde en augmentant la concentration intracellulaire de Ca²⁺ via la régulation des flux calciques. Pour terminer, les deux types de récepteurs sont exprimés de façon équivalente dans les fibroblastes où l'ET-1 exerce des effets profibrotiques (voir pour revue (Rodriguez-Pascual et al. 2011)).

3.3.2. ET-1 et hypoxie intermittente/SAOS

Comme mentionné précédemment, le gène de l'ET-1 est un des gènes-cibles de HIF-1 activé pendant l'HI (Hu et al. 1998). Chez les patients souffrant de SAOS, une étude menée au cours d'une nuit de sommeil a montré une augmentation des taux circulants d'ET-1 corrélée à celle de la pression artérielle moyenne. Ces deux paramètres étaient corrigés par l'application de la PPC (Phillips et al. 1999). Il a également été démontré qu'il existait une corrélation entre la concentration d'ET-1 mesurée pendant la nuit et l'IAH (Gjorup et al. 2007). De plus, l'augmentation des taux circulants d'ET-1 est durable puisqu'elle est aussi observée durant la journée chez les patients apnéiques (Zamarron et al. 2011).

Les mêmes observations ont été faites chez des animaux exposés à l'HI. Dès 5 jours d'exposition, les animaux présentent des taux plasmatiques d'ET-1 significativement élevés (Kanagy et al. 2001; Allahdadi et al. 2008). Au niveau tissulaire, une augmentation de l'expression de l'ET-1 et de son précurseur a également été mise en évidence au niveau cardiaque (Allahdadi et al. 2008; Belaidi et al. 2009). L'augmentation de l'expression d'ET-1 a également été observée dans les cellules

musculaires des artères pulmonaires, dans les glomérules carotidiens et dans la paroi de vaisseaux cérébraux (Rey et al. 2006; Capone et al. 2012; Wang et al. 2013).

L'étude des récepteurs de l'ET-1 a également mis en évidence des modifications de leur expression en réponse à l'HI. Au niveau vasculaire, on observe une augmentation de l'expression du récepteur ET_A dans les artères mésentériques et pulmonaires alors que l'expression du récepteur ET_B est inchangée voire diminuée dans les cellules endothéliales des artères pulmonaires (Allahdadi et al. 2008; Huang et al. 2010; Wang et al. 2013). Les mêmes observations ont été faites au niveau de différents tissus tels que le cœur, les glomérules carotidiens et le cerveau accompagnées, dans les deux derniers cas, d'une augmentation de l'activité de l'ECE-1 (Peng et al. 2003; Belaidi et al. 2009; Capone et al. 2012). Ces modifications d'expression des récepteurs s'accompagnent d'une augmentation de la réponse vasoconstrictrice à l'ET-1 dans les artères mésentériques (Allahdadi et al. 2008), coronaires (Belaidi 2009), carotidiennes (Lefebvre 2006), aortiques et pulmonaires (Wang et al. 2013).

3.4. Boucles d'amplification de l'axe ERO-HIF-1-ET-1 dans le SAOS et l'HI

La voie d'activation de cet axe ne s'effectue pas uniquement selon un mode vertical. En effet, chaque acteur va exercer sur les autres une stimulation directe ou indirecte (Figure 5).

Ainsi, la production d'ERO entraîne une augmentation de l'activité de l'ECE conduisant à une production d'ET-1 indépendante de la voie HIF-1 et de la synthèse *de novo* (Peng et al. 2013). Les ERO vont également, via l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium, activer directement la NOX, qui à son tour produira d'avantage d'ERO (Nanduri et al. 2015).

De son côté, l'ET-1 est responsable d'une augmentation de HIF-1 causée par l'augmentation de la synthèse de HIF-1 α et par une diminution de sa dégradation par les PHD (Pisarcik et al. 2013). De plus, l'ET-1 peut être à l'origine d'une production d'anions superoxydes en stimulant l'activité des NOX (Li et al. 2003). L'expression de la NOX peut également être régulée par HIF-1 puisque sa sous-unité α est indispensable à l'augmentation de l'expression de NOX induite par l'HI (Yuan et al. 2011). Ainsi, l'activation de l'axe ERO-HIF-1-ET-1 par l'HI est accompagnée de plusieurs boucles de rétrocontrôle positif qui vont potentialiser ses effets délétères sur le système cardiovasculaire

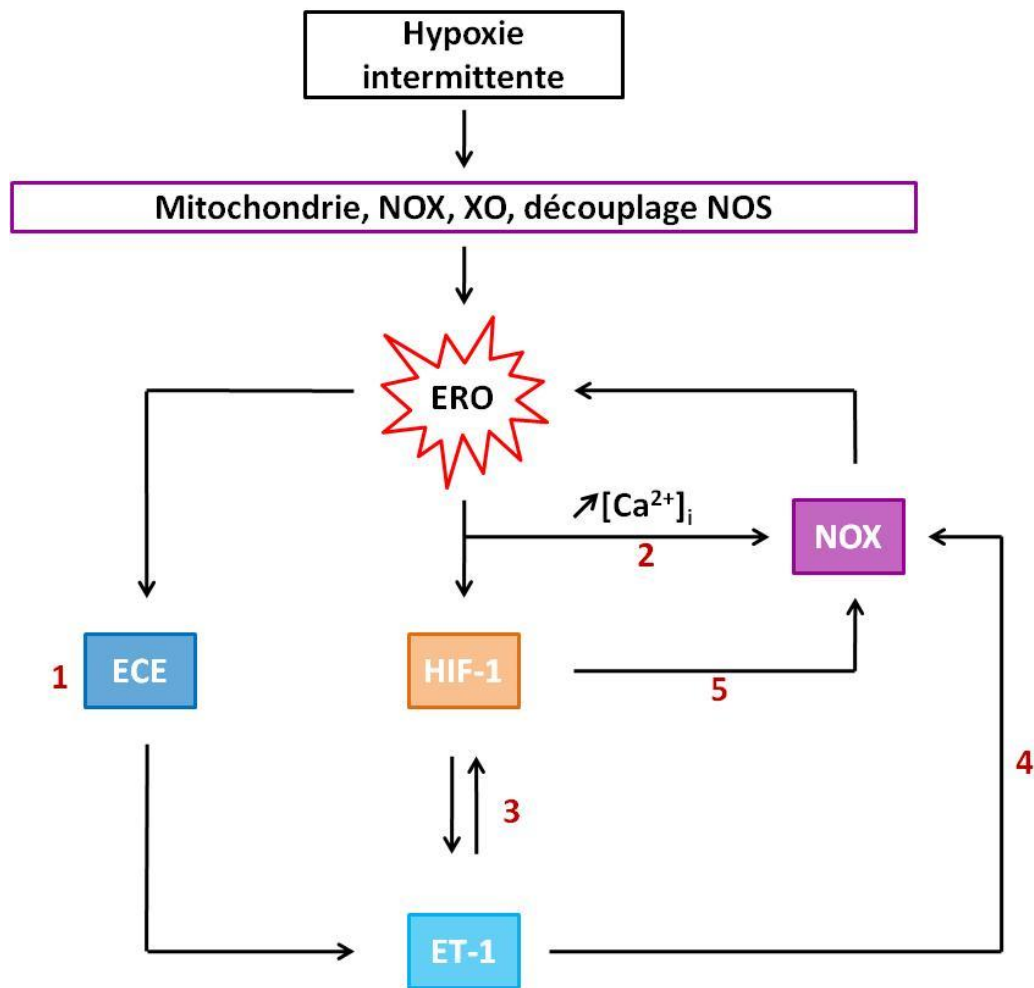


Figure 5 : Schéma représentant les boucles d'amplification de l'axe ERO-HIF-1-ET-1.

NOX, NADPH oxydase ; XO, Xanthine oxydase ; NOS, NO synthase ; ERO, espèces réactives de l'oxygène ; ET-1, endothéline 1 ; ECE, enzyme de conversion de l'ET-1.

1 : Peng et al. 2013 ; **2 :** Nanduri et al. 2015 ; **3 :** Pisarcik et al. 2013 ; **4 :** Li et al. 2003 ; **5 :** Yuan et al. 2011.

3.5. Activation sympathique

Pendant le sommeil, la balance entre les systèmes nerveux sympathique (SNS) et parasympathique (SNP) varie selon les phases de sommeil. Pendant les phases de sommeil lent l'activité parasympathique augmente alors que l'activité sympathique décroît. Lors du sommeil paradoxal c'est l'inverse qui se produit. Cet équilibre va pencher en faveur d'une activation sympathique lorsque la durée et la qualité du sommeil se détériorent, ce qui est le cas avec la fragmentation du sommeil chez les patients SAOS. De plus, chez les patients apnéiques, l'hypoxémie et l'hypercapnie causées par les obstructions vont activer les chémorécepteurs centraux et périphériques augmentant l'activation du SNS au cours du sommeil (Somers et al. 1989; Smith et al. 1998). Cette activation

sympathique, qui perdure durant la journée, s'illustre par une augmentation de l'activité nerveuse sympathique musculaire et du taux de catécholamines circulantes (Carlson et al. 1993) et est réduite par le traitement par PPC (Narkiewicz et al. 1999; Heitmann et al. 2004). Une relation directe entre l'HI et l'activation sympathique a pu être établie grâce à l'utilisation des modèles d'exposition à l'HI. Ainsi, l'exposition à l'HI permet à elle seule d'augmenter l'activité nerveuse sympathique musculaire et les taux de catécholamines circulantes chez l'animal et le sujet sain (Dematteis et al. 2009; Tamisier et al. 2011).

La médullosurrénale est responsable, en grande partie, de l'élévation des taux de catécholamines circulantes. L'utilisation des modèles animaux a permis de montrer que l'HI, via le stress oxydant qu'elle génère, entraîne une augmentation de la sécrétion de catécholamines par la glande surrénale (Kumar et al. 2006; Kuri et al. 2007). En plus d'augmenter leur libération, l'HI augmente la synthèse des catécholamines en activant la tyrosine hydroxylase, enzyme clé de cette synthèse (Kumar et al. 2003).

4. Implication des mécanismes physiopathologiques de l'HI dans les complications cardiovasculaires du SAOS

L'impact de l'HI sur les complications cardiovasculaires associées au SAOS a pu être largement exploré grâce aux nombreux modèles animaux et cellulaires d'HI. De plus, l'utilisation d'outils pharmacologiques et d'animaux génétiquement modifiés ont permis de mettre en évidence l'importance de ces cibles potentielles dans la prévention des conséquences délétères du SAOS.

4.1. Hypertension artérielle

Chez le rongeur, l'utilisation de nombreux antioxydants a permis de démontrer le rôle majeur du stress oxydant dans l'élévation de la pression artérielle induite par l'HI.

L'atorvastatine, connue pour ses propriétés hypocholestérolémiantes, exerce également une action antioxydante en inhibant la NOX (Wassmann et al. 2002). L'administration d'atorvastatine pendant 14 jours d'exposition à l'HI va entraîner une diminution de la pression artérielle systolique, comparativement aux animaux exposés non traités (Totoson et al. 2013). L'utilisation d'un inhibiteur sélectif de la NOX, l'apocynin, et de souris déficientes en NOX a donné des résultats similaires, soit une normalisation de la pression artérielle systolique pour les animaux exposés traités ou déficients (vs. exposés non traités ou wild-type, WT) après 6 semaines d'exposition (Schulz et al. 2014).

L'utilisation de piègeurs de radicaux libres, la mélatonine, ou de SOD-mimétiques, le 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl (tempol), a permis de montrer que même si la production d'ERO

a eu lieu, une supplémentation en défenses antioxydantes permet d'abolir l'élévation de la pression artérielle systolique induite par l'exposition à l'HI (Hung et al. 2013; Ramond et al. 2013).

Le rôle de HIF-1 dans l'HTA induite par l'HI a pu être mis en évidence grâce à des souris partiellement invalidées pour HIF-1 α . Après 10 jours d'HI, les souris HIF-1 α ^{+/-} ne présentent pas d'augmentation des pressions artérielles systolique, diastolique et moyenne, contrairement aux souris WT (Peng et al. 2006).

L'ET-1 est reconnue depuis de nombreuses années comme étant un puissant vasoconstricteur responsable d'une élévation de la pression artérielle (Goetz et al. 1988). Pour comprendre son implication dans l'HTA induite par l'HI, des antagonistes spécifiques ou mixtes de ses récepteurs ont été utilisés. Chez le rat, l'administration aiguë de doses croissantes d'un antagoniste non-sélectif, le PD145065, à l'issue de 11 jours d'exposition à l'HI, entraîne une diminution dose-dépendante de la pression artérielle moyenne alors qu'il n'y a aucune variation chez les animaux du groupe contrôle (Kanagy et al. 2001). D'autre part, un traitement chronique avec un autre antagoniste mixte, le bosentan, administré pendant les 14 jours d'exposition, prévient le développement de l'HTA induit par l'HI (Belaidi et al. 2009). Le rôle prédominant du récepteur ET_A a pu être mis en évidence grâce à un antagoniste sélectif, le BQ123. Une administration aiguë ou chronique de BQ123 entraîne une diminution de la pression artérielle moyenne chez les animaux hypoxiques traités vs. les animaux normoxiques ou hypoxiques non traités (Allahdadi et al. 2008).

Chez l'Homme, une seule étude a observé les effets du bosentan sur des patients apnéiques légèrement hypertendus. La comparaison des effets de 4 semaines de PPC à ceux d'un traitement par bosentan n'a pas mis en évidence un effet supérieur du bosentan sur la pression artérielle mesurée sur 24 heures. Le bosentan s'est toutefois avéré plus efficace que la PPC pour abaisser la pression artérielle mesurée au sphygmomanomètre (Joyeux-Faure et al. 2016).

Enfin, l'activation sympathique induite par l'HI semble jouer un rôle dans l'HTA. D'une part, l'utilisation d'un modèle de dénervation sympathique induite chimiquement a montré que le SNS périphérique était indispensable au développement de l'HTA en réponse à l'HI (Fletcher et al. 1992). De plus, la libération des catécholamines par la médullosurrénale semble largement impliquée dans l'hypertension artérielle associée au SAOS et à l'HI puisqu'une démédullation permet d'abolir le développement de l'hypertension chez le rat exposé à l'HI (Lesske et al. 1997).

4.2. Dysfonction vasculaire

Le SAOS et l'HI sont responsables d'atteintes vasculaires qui se manifestent par des altérations de la vasodilatation endothélium-dépendante.

L'effet du stress oxydant sur la fonction endothéliale pu être évalué grâce à l'administration aiguë ou chronique de molécules antioxydantes chez l'Homme et l'animal. Une injection intraveineuse de vitamine C, un piègeur de radicaux libres, entraîne une amélioration de la réponse vasodilatatrice de l'artère humérale chez le patient apnéique (Grebe et al. 2006). Un traitement de 2 semaines par un

inhibiteur de la XO, l'allopurinol, conduit à la même observation (El Solh et al. 2006). Chez l'animal, les effets de divers produits avec des propriétés antioxydantes tels que l'atorvastatine, la mélatonine et l'allopurinol ont pu être testés sur différents vaisseaux tels que les carotides, l'aorte thoracique et l'artère du muscle gracile, respectivement. Ces traitements ont permis d'améliorer la vasodilatation endothélium-dépendante chez les animaux exposés à l'HI (vs. animaux exposés non traités) (Dopp et al. 2011; Hung et al. 2013; Totoson et al. 2013). La mesure du flux sanguin cérébral a également mis évidence une altération de la vasodilatation endothélium-dépendante après 14 et 35 jours d'exposition à l'HI. L'utilisation d'un modèle de souris invalidées pour le gène de la NOX a également permis de confirmer l'implication du stress oxydant généré par l'HI dans cette altération (Capone et al. 2012).

D'autre part, la même étude a montré que le blocage des récepteurs ET_A par un antagoniste spécifique, le BQ123, restaurait la réponse vasodilatatrice à l'acétylcholine soulignant ainsi le rôle délétère de l'ET-1 sur la fonction endothéliale.

4.3. Infarctus du myocarde

De la même façon, l'impact du stress oxydant sur la susceptibilité à l'IM a été évalué grâce à l'administration de molécules antioxydantes pendant l'exposition à l'HI. Le traitement par l'atorvastatine, la mélatonine ou le tempol pendant l'exposition à l'HI permet d'abolir l'augmentation de la taille d'infarctus induite par l'HI, après une ischémie globale *ex vivo* (vs. animaux exposés non traités) (Ramond et al. 2013; Totoson et al. 2013). Le même résultat a pu être observé au cours d'une ischémie régionale *ex vivo* réalisée après 28 jours d'exposition à l'HI conjointement à un traitement par la mélatonine (Yeung et al. 2015).

L'utilisation de souris partiellement délétées pour HIF-1 α a également permis de démontrer le rôle de HIF-1 dans l'augmentation de la taille de l'infarctus consécutive à une ischémie régionale *in vivo* après 14 jours d'HI (Belaidi et al. 2016).

Concernant l'impact de l'ET-1, le blocage de ses récepteurs par le bosentan entraîne une normalisation de la taille d'infarctus après une ischémie globale *ex vivo* chez des animaux exposés 14 jours à l'HI (vs. animaux exposés non traités) (Belaidi et al. 2009).

4.4. Arythmies ventriculaires

Actuellement, aucune étude expérimentale n'a établi de lien entre HI et arythmies ventriculaires. Cependant, les effets bénéfiques de la PPC sur leur incidence suggèrent que l'HI, via les mécanismes décrits précédemment, pourrait favoriser leur survenue.

Dès les années 90, il a été démontré que l'administration d'un régime riche en antioxydant, tel que la vitamine E, réduisait l'incidence de FV dans les premières minutes de l'ischémie myocardique (Sebbag et al. 1994). De la même manière, 10 semaines de régime riche en sélénium, renforçant les

défenses antioxydantes en augmentant l'activité de la GPx, va entraîner une diminution de l'incidence des TV et FV soutenues (Tanguy et al. 1998).

L'utilisation aiguë d'antioxydants au cours d'épisodes d'ischémie-reperfusion a également prouvé l'impact du stress oxydant sur les arythmies ventriculaires. En effet, une injection intrapéritonéale de mélatonine 30 minutes avant une ischémie régionale de 5 minutes réduit le temps passé en TV et FV pendant la reperfusion (Lagneux et al. 2000). L'allopurinol exerce aussi un effet cardioprotecteur en termes d'arythmies ventriculaires. En effet, une administration orale et intrapéritonéale, respectivement 24 heures et 15 minutes avant l'ischémie-reperfusion, diminue l'incidence des TV à l'ischémie et la durée des TV et FV pendant la reperfusion (Manning et al. 1984).

Quant à l'ET-1, une injection proche des artères coronaires provoque des arythmies ventriculaires fatales dans les 2-3 minutes qui suivent (Yorikane et al. 1990). Un prétraitement d'une semaine avec du bosentan avant une ligature permanente de l'artère coronaire gauche protège le cœur et réduit la durée des TV observées dans les 24 heures post-IM. Ceci permet de mettre en évidence l'effet pro-arythmogène de l'ET-1 dans un contexte d'IM (Kolettis et al. 2008).

Par ailleurs, les catécholamines libérées en réponse à une exposition à l'HI pourraient également être responsables de l'incidence accrue d'arythmies ventriculaires rencontrée chez les patients apnéiques car elles sont très arythmogènes (Bhagat et al. 1980).

L'implication de l'axe ERO-HIF-1-ET-1 dans les complications cardiovasculaires du SAOS a fait l'objet d'une revue publiée dans le journal « Pharmacology & Therapeutics » à laquelle j'ai contribué dans le cadre de ma thèse. Cet article peut être consulté dans la partie annexe du manuscrit.

5. Ischémie-reperfusion myocardique

L'ischémie-reperfusion se caractérise par une interruption suivie d'une restauration du flux sanguin au sein d'un organe. L'ischémie s'accompagne donc d'une hypoxie tissulaire et d'une diminution des apports en divers substrats énergétiques. La reperfusion myocardique correspond à la restauration du flux sanguin dans la région soumise à l'ischémie, généralement par thrombolyse ou par une intervention coronarienne percutanée.

5.1. Altérations cellulaires induites par l'ischémie sévère

Au niveau du myocarde, l'ischémie est consécutive à un rétrécissement ou à l'occlusion d'une artère coronaire. La diminution (ischémie modérée) ou l'arrêt (ischémie sévère) d'apport en oxygène et en nutriment va entraîner d'importantes modifications métaboliques dans le myocarde. En effet, le cœur est l'organe qui a les plus grands besoins énergétiques et il est dépendant de la phosphorylation oxydative pour subvenir à ses besoins en ATP (adénosine triphosphate). L'ischémie va, par manque de substrat, conduire à l'activation de la glycolyse qui, en plus d'être moins rentable énergétiquement, va être responsable de l'accumulation de CO_2 , de lactates, de protons et de nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) conduisant ainsi à une diminution du pH intracellulaire (Neely et al. 1984; Khuri et al. 1985).

5.1.1. Surcharge calcique

Afin de lutter contre l'acidification intracellulaire, les cardiomyocytes vont expulser les protons accumulés dans le cytosol grâce à l'échangeur Na^+/H^+ (NHE) qui, pour la sortie d'un proton, fait entrer un sodium conduisant ainsi à une augmentation de la concentration intracellulaire de sodium (Figure 6) (Piwnica-Worms et al. 1986; Karmazyn et al. 1999). La restauration du pH cytosolique passe également par l'activation du co-transporteur $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ (Camilion de Hurtado et al. 1995; Aiello et al. 1998). Ces deux mécanismes vont être à l'origine d'une augmentation de la concentration intracellulaire de sodium. De plus, dans un contexte ischémique, le manque d'ATP va altérer le fonctionnement de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$, qui permet normalement la sortie de 3 ions Na^+ en échange de l'entrée de 2 ions K^+ , exacerbant ainsi la surcharge sodique (Beller et al. 1976; Tani et al. 1990). Afin de réduire la concentration intracellulaire en sodium, l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCE) va fonctionner en mode « reverse ». Dans ce mode, 3 ions Na^+ sortent de la cellule en échange avec un ion Ca^{2+} conduisant à une surcharge calcique cytosolique (Pott et al. 2011). La diminution de la disponibilité en ATP va également participer à la surcharge calcique en réduisant l'expulsion du Ca^{2+} par des transporteurs membranaires ATP-dépendants ainsi qu'en diminuant sa recapture par la pompe ATPase SERCA du réticulum sarcoplasmique (RS) (Krause et al. 1984; Kaplan et al. 1992).

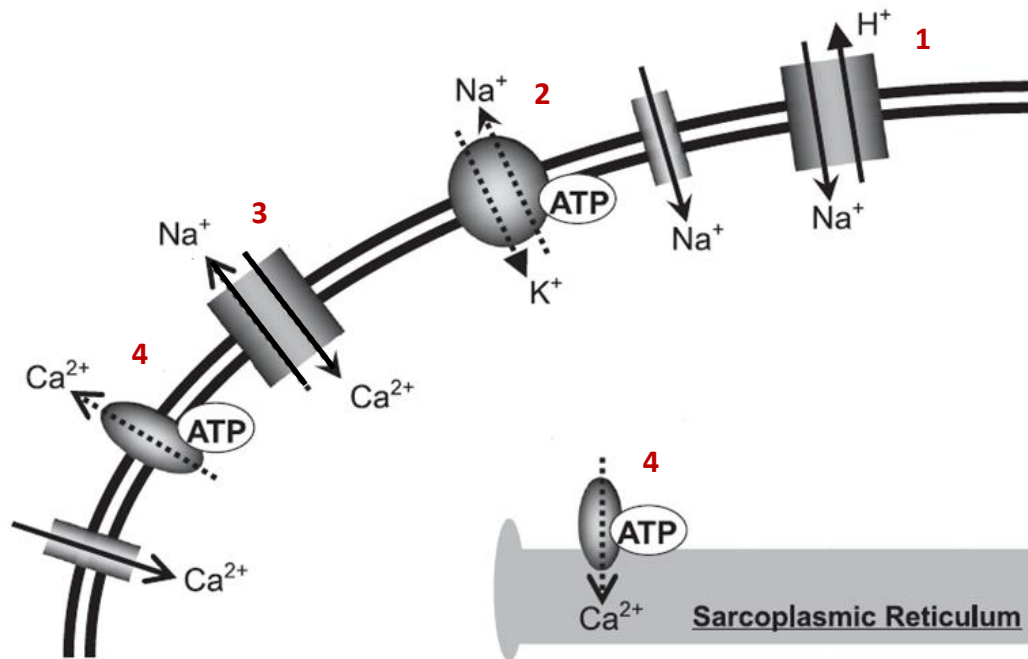


Figure 6 : Schéma illustrant les mécanismes conduisant à une surcharge calcique dans les cardiomyocytes pendant l'ischémie myocardique.

1 : la diminution du pH conduit à une excrétion des protons contre l'entrée de Na^+ par l'échangeur Na^+/H^+ ; 2 : le manque d'ATP va altérer le fonctionnement de la pompe Na^+/K^+ -ATPase conduisant à une surcharge sodique ; 3 : extrusion du sodium via le fonctionnement en mode reverse de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ conduisant à une surcharge calcique ; 4 : surcharge calcique exacerbée par la diminution de l'excrétion active de Ca^{2+} et sa recapture par le réticulum sarcoplasmique. Adapté de Sanada et al. 2011.

5.1.2. Production d'ERO

Dès la 3^{ème} minute l'ischémie, et malgré l'arrêt de l'apport d'oxygène, il y a une production d'anions superoxydes à partir de l'oxygène provenant de la myoglobine (Merx et al. 2001; Zhu et al. 2013). Bien que très faibles, ces quantités d'oxygène résiduelles vont être à l'origine d'ERO (Vanden Hoek et al. 1997). Ces ERO vont entraîner la peroxydation de certains lipides de la membrane interne mitochondriale (cardiolipides) entraînant des altérations structurelles de la mitochondrie (Lesnefsky et al. 2001). Lors de l'ischémie, les ERO sont essentiellement produits par le complexe III de la chaîne respiratoire et, dans une moindre mesure par le complexe I (Chen et al. 2003). Les anions superoxydes libérés dans l'espace inter-membranaire vont être responsables d'une perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie entraînant une libération du cytochrome c associée à une production d' H_2O_2 (Madesh et al. 2001; Pasdois et al. 2011). De plus, le cytochrome c peut, sous sa forme oxydée, constituer un important piègeur d'anions superoxydes (Korshunov et al. 1999). Ainsi, sa fuite de la mitochondrie et sa forme réduite pendant l'ischémie vont majorer la production d'anions superoxydes.

La production d'ERO au court de l'ischémie est également due à la conversion de la xanthine déshydrogénase (XD) en XO par un clivage de l'enzyme sous l'action de protéases Ca^{2+} -dépendantes (Engerson et al. 1987). L'arrêt de la phosphorylation oxydative pendant l'ischémie favorise l'hydrolyse de l'ATP en produits ayant une valeur énergétique plus faible tels que l'ADP et l'AMP. Ce dernier est ensuite transformé en hypoxanthine qui, avec l'oxygène résiduel, sera à l'origine de la production d'anions superoxydes sous l'action de la XO (Bulkley 1994).

5.2. Altérations myocardiques induites par l'ischémie sévère

5.2.1. Dysfonction contractile

L'ischémie myocardique va entraîner d'importantes dysfonctions contractiles causées par le manque d'oxygène et par l'accumulation de métabolites.

Comme mentionné précédemment, le métabolisme anaérobie au cours de l'ischémie va être à l'origine d'une production insuffisante d'ATP pour couvrir les importants besoins du cœur (Hearse 1979). De la même manière, le manque d'ATP va entraîner l'apparition de contractures dans les minutes succédant l'ischémie (Hearse et al. 1977). Cette contracture peut aussi être due à l'élévation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} , elle-même consécutive au manque d'ATP, responsable de l'arrêt des pompes calciques membranaires (Owen et al. 1990).

L'acidité engendrée par l'accumulation de métabolites tels que des protons et le lactate va également provoquer des altérations de la contraction (Cobbe et al. 1980).

5.2.2. Mort cellulaire

Au court des premières minutes de l'ischémie, les dommages cellulaires demeurent réversibles par la reperfusion. Au-delà d'une certaine durée (20 minutes chez le chien par exemple), les cardiomyocytes seront endommagés même après reperfusion. L'étendue des lésions va dépendre de la zone à risque et de la durée de l'ischémie. En effet, plus l'occlusion de l'artère coronaire aura lieu sur une partie proximale du vaisseau, plus la zone à risque, soit la zone vascularisée en aval de l'occlusion, sera grande (Reimer et al. 1985). De la même manière, plus l'ischémie est longue plus la taille de l'infarctus sera importante (Figure 7A) (Benhabbouche et al. 2011). La mort des tissus va s'étendre progressivement de l'endocarde vers l'épicarde par un phénomène est appelé *wavefront* (Figure 7B) (Reimer et al. 1979; Kloner 2003).

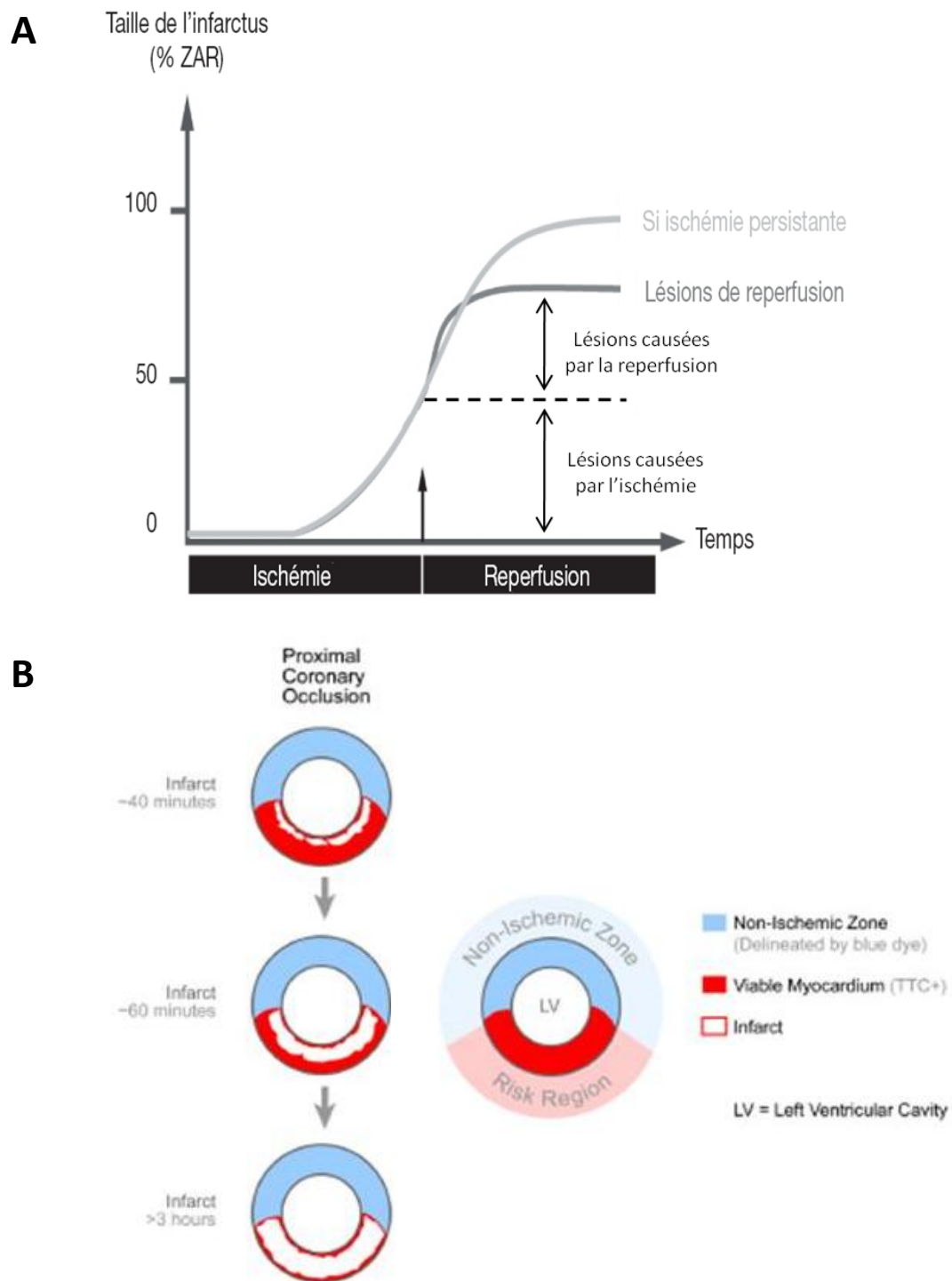


Figure 7 : Représentations graphiques des lésions d'ischémie-reperfusion.

A. Graphique montrant la progression de l'infarctus lors d'une ischémie suivie d'une reperfusion (gris foncé). Durant l'ischémie, la mort cellulaire augmente avec la durée de l'ischémie. La reperfusion va limiter cette progression mais elle va quand même être responsable d'une mort cellulaire importante dans les premières minutes de reperfusion, ce sont les lésions de reperfusion. Adapté de Benhabbouche et al. 2011. **B.** Illustration mettant en évidence le phénomène de wavefront sur des coupes transversales de cœurs soumis à une ischémie. Adapté de Kloner 2013.

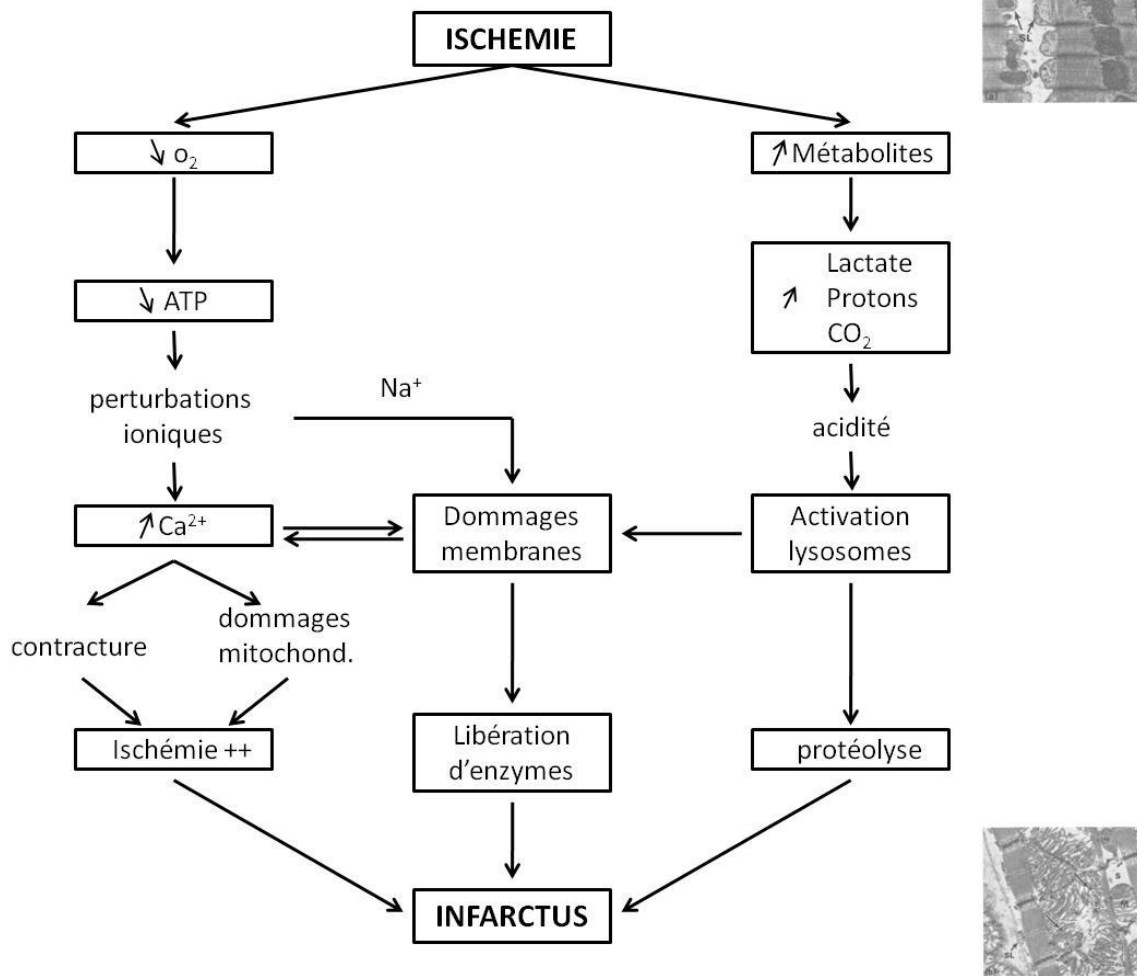


Figure 8 : Schéma récapitulatif des mécanismes conduisant à la mort cellulaire lors de l'ischémie myocardique.

Adapté de (Opie 2004)

Comme mentionné précédemment, les conséquences directes de l'ischémie vont être un manque d'apport en oxygène et l'accumulation de métabolites responsables d'une chute de la disponibilité en ATP et d'une acidification intracellulaire, respectivement (Figure 8). La surcharge calcique qui en résulte va être à l'origine d'une contracture myocardique et de dommages mitochondriaux exacerbant les effets de l'ischémie (Greenawalt et al. 1964; Steenbergen et al. 1990). De plus, cette surcharge calcique va entraîner l'activation de phospholipases conduisant à d'importants dommages au niveau de la membrane cytoplasmique (Fiskum 1983). L'intégrité membranaire des cardiomyocytes est également mise à mal par une altération de la régulation des volumes intracellulaires en faveur d'un gonflement des cellules pouvant causer la rupture des membranes. Il y a alors une libération du contenu cellulaire des cardiomyocytes dans la circulation sanguine (Jennings et al. 1986). Parmi les substances libérées dans la circulation figurent la créatine kinase MB et la troponine dont les dosages sont utilisés pour le diagnostic de l'IM. Par ailleurs, l'accumulation cytoplasmique de métabolites (lactate, protons, CO₂) et l'acidité qui en découle vont entraîner un

éclatement des lysosomes et la libération de leur contenu en enzymes protéolytiques (hydrolases) (Wildenthal 1978). Ainsi l'ischémie est responsable d'altérations métaboliques et ioniques qui vont être à l'origine d'atteintes structurelles irréversibles des cardiomyocytes conduisant à la mort du tissu de la zone à risque.

5.2.3. Arythmies ventriculaires

Les arythmies ventriculaires rencontrées au cours de l'ischémie vont des battements ectopiques à la FV en passant par la TV. Elles vont être la conséquence des perturbations ioniques qui vont modifier l'activité électrique du cœur.

La survenue des arythmies au cours de l'ischémie peut être causée par une augmentation de l'automatisme cardiaque. En effet, après l'occlusion coronaire, d'importantes modifications électrophysiologiques ont lieu. Dans les minutes qui suivent l'ischémie, l'entrée de charges positives sous forme de Na^+ et de Ca^{2+} augmente, conduisant à une dépolarisation du potentiel de repos membranaire (Downar et al. 1977; Marban et al. 1990; Yan et al. 1995). Cette augmentation du potentiel de repos va favoriser l'apparition de dépolarisations spontanées pouvant être à l'origine d'une contraction et donc d'un battement ectopique (Bassani et al. 1997). Ces phénomènes donnent naissance à des post-dépolarisations tardives (delayed afterdepolarization, DADs). Entre 2 et 3 battements prématurés on parle de salve mais au-delà de 3, il s'agit alors d'une TV (Walker et al. 1988).

Par ailleurs, l'ischémie constitue au terrain propice à la survenue de phénomènes de ré-entrée. En effet, parallèlement aux perturbations sodiques et calciques, l'homéostasie potassique est également modifiée. Le manque d'ATP va altérer le bon fonctionnement de 2 transporteurs du K^+ . Comme mentionné précédemment, l'ischémie entraîne une diminution de l'activité de la pompe Na^+/K^+ -ATPase réduisant le flux entrant de K^+ . De plus, il va lever l'inhibition des canaux K^+ sensibles à l'ATP augmentant le flux sortant potassique. Il y a donc une diminution de la concentration intracellulaire de K^+ accompagnée d'une accumulation extracellulaire causée par le défaut de perfusion (Wilde et al. 1995). Cette accumulation de potassium extracellulaire va être à l'origine d'une diminution de l'excitabilité et de la conduction (Carmeliet 1999). Ainsi, la zone ischémique constitue une zone dans laquelle la conduction est lente ce qui, lors de l'arrivée d'une impulsion proximale dans un circuit composé de 2 branches, va ralentir l'impulsion. Lorsque l'impulsion lente rejoint la partie distale, elle s'arrête puisque les fibres de la branche adjacente se trouvent en période réfractaire donc inexcitables (Figure 9A). Si la vitesse de conduction est suffisamment ralentie, l'impulsion lente va rencontrer des fibres sorties de leur période réfractaire et donc de nouveau excitables (Figure 9B). Ce retour de l'impulsion dans le circuit conduit aux phénomènes de micro-réentrées donnant naissance à la désynchronisation de la contraction des cellules cardiaques caractéristique de la FV (Figure 9C).

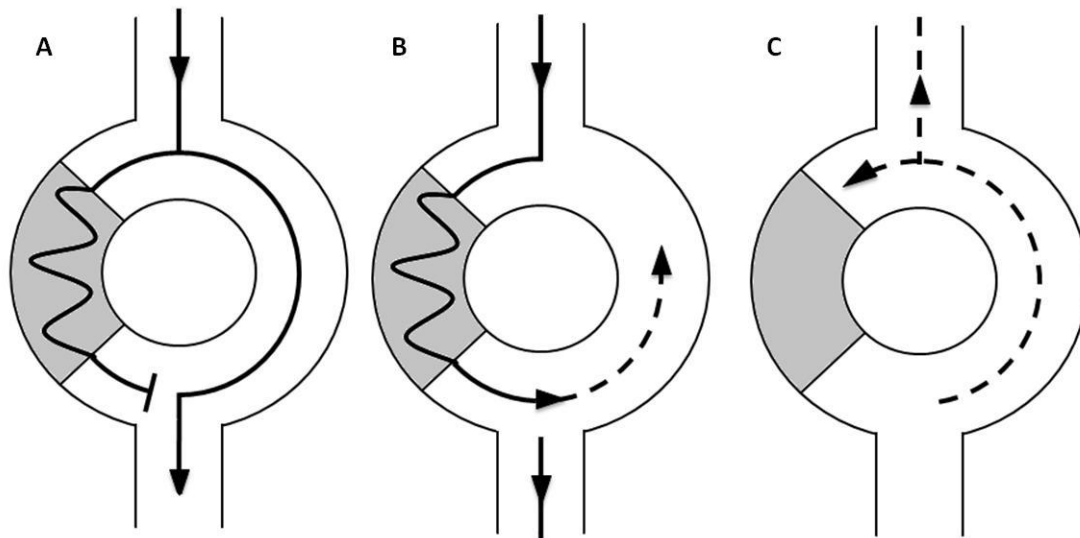


Figure 9 : Schéma illustrant les phénomènes de réentrées à l'origine d'arythmies sur un circuit constitué de 2 branches.

La zone grise représente une zone de conduction lente. **A.** L'impulsion proximale passe par chacune des 2 branches et est ralentie dans la branche gauche mais lorsqu'elle rejoint la partie distale, les cellules de la branche droite sont en période réfractaire, donc inexcitables. L'impulsion s'arrête. **B.** Lorsque l'impulsion est suffisamment ralentie, les autres fibres sont sorties de leur période réfractaire et sont de nouveau excitable conduisant à un retour de l'impulsion dans le circuit. **C.** Ce retour de l'impulsion va conduire à des réentrées désynchronisant la contraction des cardiomyocytes.

5.3. Altérations cellulaires induites par la reperfusion

Paradoxalement, et bien que nécessaire, la reperfusion va elle-aussi être à l'origine d'importants dommages cellulaires appelés lésions de reperfusion (Figure 7A). Ces lésions sont causées par la réintroduction rapide et massive de l'oxygène dans le tissu.

5.3.1. Surcharge calcique

La surcharge calcique produite par l'ischémie est exacerbée à la reperfusion. La reprise de la circulation sanguine permet l'évacuation des protons accumulés au cours de l'ischémie (Jennings et al. 1960). Le gradient de protons ainsi généré va accélérer le fonctionnement du NHE et permettre une restauration rapide pH intracellulaire (Figure 10). Pendant l'ischémie, l'augmentation intracellulaire de Na^+ entraîne un fonctionnement en mode inverse du NCE à l'origine de l'importante surcharge calcique observée à la reperfusion (Tani et al. 1989; Schafer et al. 2001). Le retour de l'oxygène et donc du métabolisme aérobie permet d'augmenter la synthèse d'ATP. Ceci va entraîner l'excrétion du Ca^{2+} par les transporteurs ATP-dépendants et permettre au RS de « tamponner » la surcharge calcique (Nakamura et al. 1999; Sanada et al. 2011). La surcharge calcique du RS va cependant entraîner une libération de Ca^{2+} via le récepteur à la ryanodine (RyR)

causant d'importantes oscillations de la concentration calcique intracellulaire à l'origine d'une contracture des cardiomyocytes (Figure 11) (Piper et al. 2004).

La surcharge calcique, concomitante à la restauration du pH intracellulaire, va également entraîner d'importants dommages via l'activation de protéases et des altérations mitochondriales.

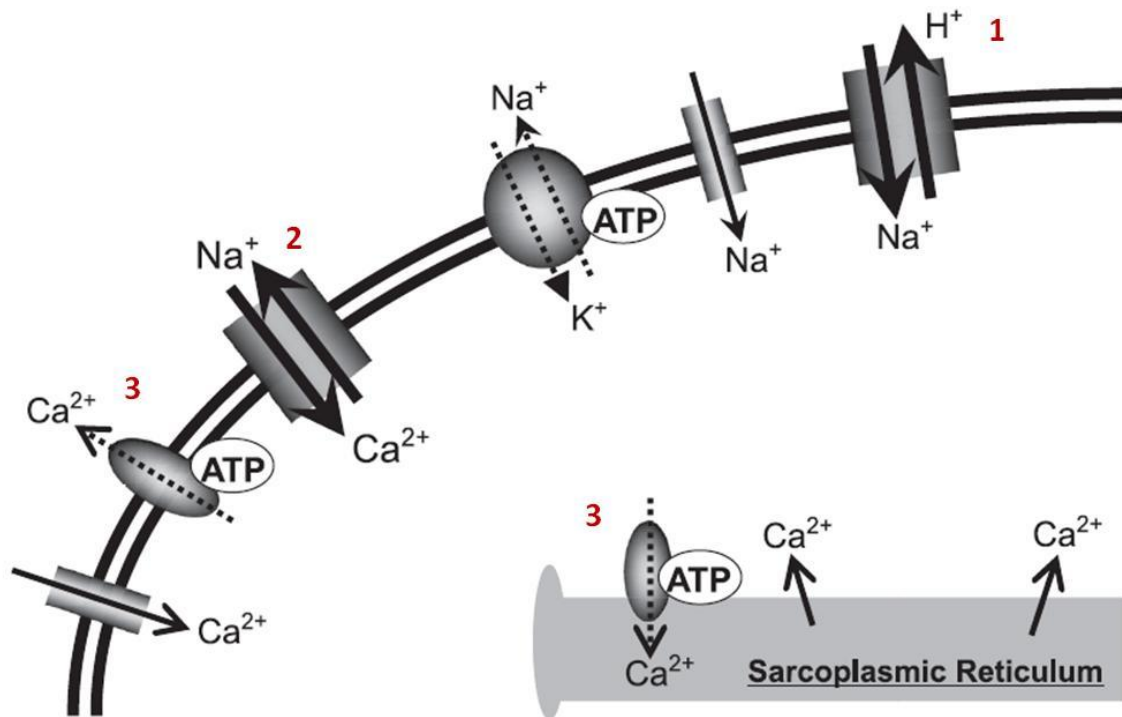


Figure 10 : Schéma illustrant les mécanismes conduisant à une surcharge calcique dans les cardiomyocytes pendant la reperfusion myocardique.

1 : augmentation de l'activité de l'échangeur Na^+/H^+ ; 2 : fonctionnement en mode « reverse » de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ pour contrer la surcharge sodique conduisant à une entrée importante de calcium ; 3 : excrétion et recapture du calcium cytosolique grâce au retour de la synthèse d'ATP. Adapté de Sanada. 2011.

5.3.2. Activation de protéases

A la reperfusion, la surcharge calcique et la restauration du pH vont entraîner l'activation de la calpaïne, une protéase Ca^{2+} -dépendante maintenue inactive pendant l'ischémie par l'acidité intracellulaire (Hernando et al. 2010). L'activation de cette protéase va avoir des conséquences structurelles puisqu'elle va, par la dégradation de protéines du cytosquelette, conduire à la fragilité de la membrane plasmique et à des dégâts au niveau des fibres contractiles (Yoshida et al. 1995; Garcia-Dorado et al. 2014). De plus, les dommages causés à la membrane plasmique vont perturber le bon fonctionnement des protéines membranaires. C'est le cas par exemple de la Na^+/K^+ -ATPase conduisant à une surcharge sodique et, par conséquent, à une exacerbation de la surcharge calcique (Inserte et al. 2005).

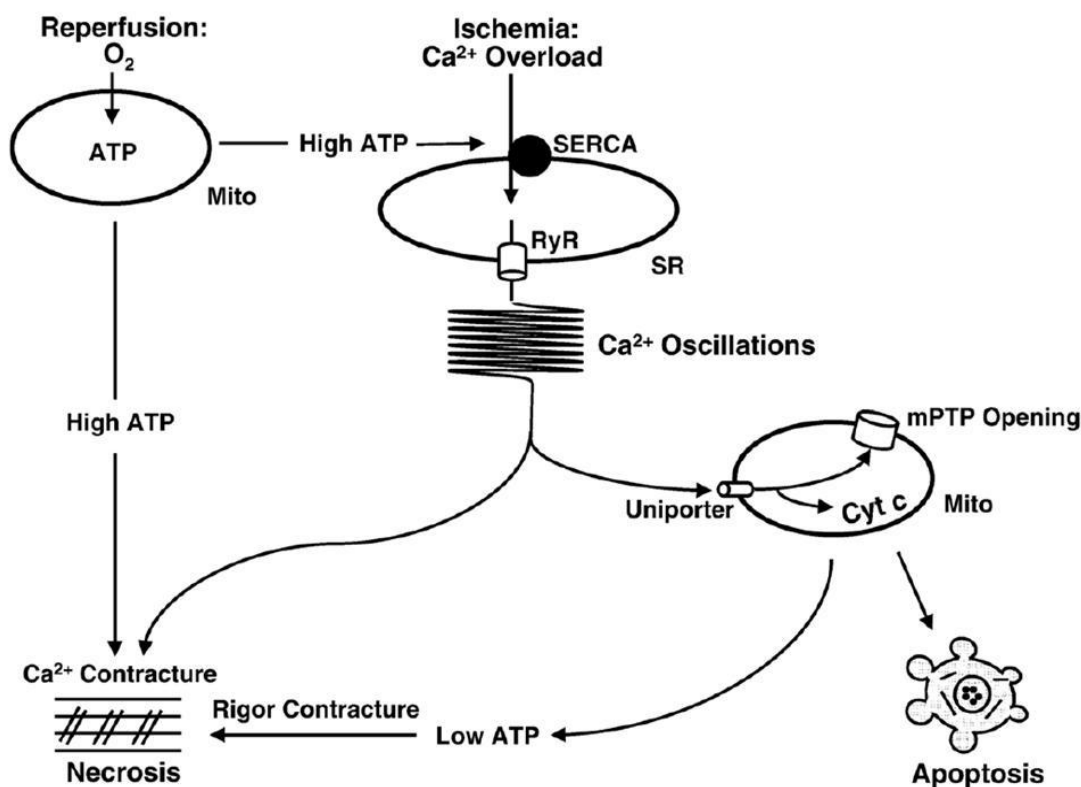


Figure 11 : Schéma représentant les différents mécanismes impliqués dans les altérations cellulaires induites par la reperfusion.

ATP, Adénosine Triphosphate ; Cyt c, cytochrome c ; SR, réticulum sarcoplasmique ; SERCA, pompe ATPase présente sur le réticulum sarcoplasmique ; RyR, récepteur à la ryanodine ; mPTP, pore de transition de perméabilité mitochondriale. D'après Piper et al. 2006.

5.3.3. Altérations mitochondriales

La surcharge calcique entraîne une entrée du calcium dans la matrice mitochondriale grâce à un canal présent dans la membrane interne de la mitochondrie : le *mitochondrial Ca²⁺ Uniporter* (mCU) (Figure 11). Le mCU permet l'entrée de Ca²⁺ en utilisant le gradient de protons généré par la reprise de la chaîne respiratoire mitochondriale à la reperfusion (Weiss et al. 2003). L'augmentation de la concentration calcique dans la matrice mitochondriale et la restauration de pH conduisent à l'augmentation de la perméabilité mitochondriale après l'ouverture d'un méga-pore : le pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) (Crompton et al. 1999; Halestrap et al. 2004). La perméabilité de la membrane mitochondriale va dissiper le gradient de protons et bloquer la chaîne respiratoire mitochondriale ce qui va conduire à une altération de la synthèse d'ATP (Baines 2009). Une entrée d'eau dans la mitochondrie peut également entraîner la rupture de la membrane externe et la libération du contenu de la matrice avec, entre autres, des facteurs pro-apoptotiques tels que le cytochrome c (Di Lisa et al. 2006).

De plus, de part leur proximité dans la cellule, il y a des échanges de signaux calciques entre le RS et la mitochondrie (Szalai et al. 2000). En effet, les oscillations de Ca^{2+} générées par le RS semblent étroitement liées à l'augmentation de la perméabilité mitochondriale (Ruiz-Meana et al. 2009).

5.3.4. Production d'ERO

La reperfusion va être à l'origine d'une réintroduction brutale d'oxygène dans les cellules qui va avoir pour conséquence une production massive de radicaux libres tels que l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène. L'utilisation d'un modèle de cœur isolé perfusé de rat a permis de montrer que l'apparition de ces ERO conduisait à des dommages cellulaires via l'augmentation de la peroxydation lipidique. La réoxygénation entraîne également une altération des défenses antioxydantes en diminuant l'activité d'enzymes telles que la SOD et la GPx (Guarnieri et al. 1980). L'utilisation de la résonance paramagnétique électronique a permis d'identifier les espèces réactives générées par la reperfusion et de mettre en évidence qu'elles proviennent de l'anion superoxyde et/ou du peroxyde d'hydrogène (Garlick et al. 1987; Bolli et al. 1989).

De la même manière que pendant l'ischémie, les mitochondries vont être le siège de la production d'ERO par la chaîne respiratoire (Ambrosio et al. 1993). L'augmentation de la concentration calcique intra-mitochondriale et les altérations structurelles vont perturber l'organisation des transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire. De plus, l'ouverture du mPTP va aussi favoriser la production d'ERO (Batandier et al. 2004). Réciproquement, l'augmentation des ERO pendant la reperfusion contribue à l'ouverture du mPTP (Halestrap et al. 2004).

La production d'ERO au cours de la reperfusion est également imputable à l'activité d'oxydases telles que la XO et la NOX. Comme mentionné précédemment, l'ischémie conduit à la conversion de la XD en XO qui va catalyser l'oxydation de l'hypoxanthine accumulée pendant l'ischémie en acide urique et anions superoxydes (Manning et al. 1984; McCord 1985). Les cellules circulantes telles que les granulocytes neutrophiles semblent également jouer un rôle dans le stress oxydant induit par la NOX lors de la reperfusion (Chakraborti et al. 2000; Babior 2004).

5.4. Altérations myocardiques induites par la reperfusion

5.4.1. Sidération myocardique

Il s'agit de la persistance d'une dysfonction myocardique après la reperfusion, indépendante de la présence de lésions irréversibles. Elle peut durer de quelques heures à quelques semaines. La sévérité et la durée de cette dysfonction va dépendre de la taille de la zone affectée et de la durée de l'ischémie (Braunwald et al. 1982). L'élévation et les oscillations de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} de même que la production d'ERO sont des éléments déterminants dans les lésions de reperfusion (Bolli et al. 1999).

5.4.2. Mort cellulaire

En termes d'infarctus, la reperfusion ne permet pas un arrêt complet de sa progression. En effet, bien qu'à la reperfusion le cœur soit à nouveau ré-oxygéné et approvisionné en substrat énergétique, l'expansion de la zone infarctée continue. On parle alors de lésion de reperfusion (Figure 7A) (Benhabbouche et al. 2011).

Les altérations cellulaires décrites dans le chapitre précédent (5.3) vont être à l'origine de la mort des cardiomyocytes par deux grandes voies de mort cellulaire : la nécrose et l'apoptose (Figure 11).

La nécrose se caractérise par un gonflement de la cellule suivi de la rupture de la membrane plasmique et d'une dégradation protéique, causées par la contracture et l'activation de protéases, ainsi que par une fragmentation de l'ADN par les espèces radicalaires (Sanada et al. 2011).

La voie de l'apoptose est un processus actif consommant de l'ATP. Elle est initiée par la libération du cytochrome c après la rupture de la membrane externe de la mitochondrie (Di Lisa et al. 2006). Le cytochrome c forme alors un apoptosome avec la pro-caspase 9 et l'apoptotic protease-activating factor-1 conduisant à l'activation de la caspase 9 (initiatrice), elle-même responsable de l'activation de la caspase 3 (effectrice) qui va spécifiquement cliver la laminine, la fodrine et la poly(ADP-ribose) polymérase (Bernardi et al. 1999). Il y a alors fragmentation de l'ADN, condensation de la chromatine et formation de corps apoptotiques qui seront ensuite phagocytés (Kroemer et al. 2007).

5.4.3. Arythmies ventriculaires

Tout comme l'ischémie, la reperfusion va être un terrain propice à la survenue d'arythmies ventriculaires plus ou moins sévères. De nombreux facteurs vont influencer la fréquence et la gravité de ces arythmies.

Tout d'abord, la durée et la sévérité de l'ischémie vont avoir un impact sur les arythmies de reperfusion. D'après Manning, la durée de l'ischémie est peut-être le facteur le plus important dans le risque de survenue d'arythmies. En effet, il y a maintenant plus de 30 ans, l'utilisation de différents modèles animaux d'ischémie-reperfusion *in vivo* a permis de montrer que l'incidence des FV variait selon la durée de l'ischémie précédant la reperfusion (Manning et al. 1984). Chez de nombreuses espèces, incluant l'Homme, la relation entre la durée de l'ischémie et l'incidence des arythmies de reperfusion forme une courbe en cloche avec un pic d'incidence pour des durées d'ischémie comprises entre 5 et 20 minutes, selon les espèces animales considérées. Pour des durées d'ischémie plus longues, la diminution de la survenue d'arythmies à la reperfusion s'explique par l'irréversibilité des lésions tissulaires entraînant une perte d'excitabilité cellulaire (Hearse 1990). De la même manière, plus la sévérité de l'ischémie (en termes de flux coronaire résiduel) est importante, moins il y aura d'arythmies ventriculaires au moment de la reperfusion (Dennis et al. 1983; Penny et al. 1983).

L'un des autres facteurs déterminant de la survenue des arythmies au moment de la reperfusion est l'exacerbation de la surcharge calcique qu'elle engendre. Comme décrit plus haut (chapitre 5.3.1),

l'entrée massive de Ca^{2+} par le NCE fonctionnant en mode « reverse » et le rétablissement de la production d'ATP conduisent à une surcharge calcique du RS à l'origine d'importantes oscillations calciques via les RyR. Ces importantes oscillations de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} entraînent à leur tour des variations du potentiel de membrane des cardiomyocytes favorisant la survenue de post-dépolarisations précoces (early afterdepolarization, EADs) (Garcia-Dorado et al. 2014). En effet, les EADs sont fréquentes à la reperfusion et précèdent les arythmies ventriculaires (Priori et al. 1990).

Les radicaux libres générés massivement à la reperfusion vont aussi contribuer à la survenue des arythmies. Dès les années 80, l'utilisation de différents antioxydants tels que le glutathion, la superoxyde dismutase, l'allopurinol et la mélatonine a permis de mettre en évidence la relation entre le stress oxydant et les arythmies de reperfusion (Manning et al. 1984; Woodward et al. 1985; Lagneux et al. 2000). L'hypothèse est que la production d'ERO va exacerber la surcharge calcique cytosolique en contribuant à l'ouverture du mPTP ou en bloquant la recapture du Ca^{2+} par le RS par inhibition des Ca^{2+} -ATPases (Xu et al. 1997; Halestrap et al. 2004). Le stress oxydant induit aussi une dépolarisation du potentiel membranaire de repos en inhibant l'activité des canaux K^+ rectifiants entrants (Nakaya et al. 1992).

L'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} et les modifications du potentiel membranaire de repos vont favoriser l'apparition de DADs. En effet, la surcharge calcique va entraîner des fuites et/ou une libération de Ca^{2+} par le RS via les RyR générant des « waves » calciques capables de dépolariser la membrane sarcoplasmique des cardiomyocytes. Ceci, additionné à l'inhibition des canaux K^+ rectifiants, va conduire à l'apparition de DADs et donc d'arythmies (Wagner et al. 2015).

6. Homéostasie du zinc, stress oxydant et myocarde

6.1. Généralités

Le zinc est un métal essentiel jouant un rôle primordial dans la fonction cellulaire. Un déficit ou un excès en zinc vont être à l'origine de nombreux troubles soulignant ainsi l'importance d'une régulation fine des niveaux de zinc intracellulaire. De nombreux acteurs moléculaires interviennent dans la régulation de l'homéostasie du zinc. Parmi eux, deux grandes familles de transporteurs transmembranaires, appelés ZnT (*solute-linked carrier 30*, SLC30) et Zip (*solute-linked carrier 39*, SLC39) vont participer à cette régulation. Chacune de ces familles a des effets qui lui sont propres. Les ZnT vont être à l'origine d'une diminution de la concentration cytosolique en zinc en favorisant la sortie de zinc de la cellule ou son entrée dans des vésicules intracellulaires telles que l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique et les endosomes. De leur côté, les Zip vont avoir des effets opposés, soit une augmentation des concentrations cytosoliques en zinc en augmentant son entrée

dans les cellules et sa libération par les différents compartiments intracellulaires (Figure 12) (Liuzzi et al. 2004; Cousins et al. 2006). L'expression de ces transporteurs va être régulée par la disponibilité en zinc mais également par de nombreux autres facteurs physiologiques tels que des hormones ou des cytokines pro-inflammatoires (Lichten et al. 2009).

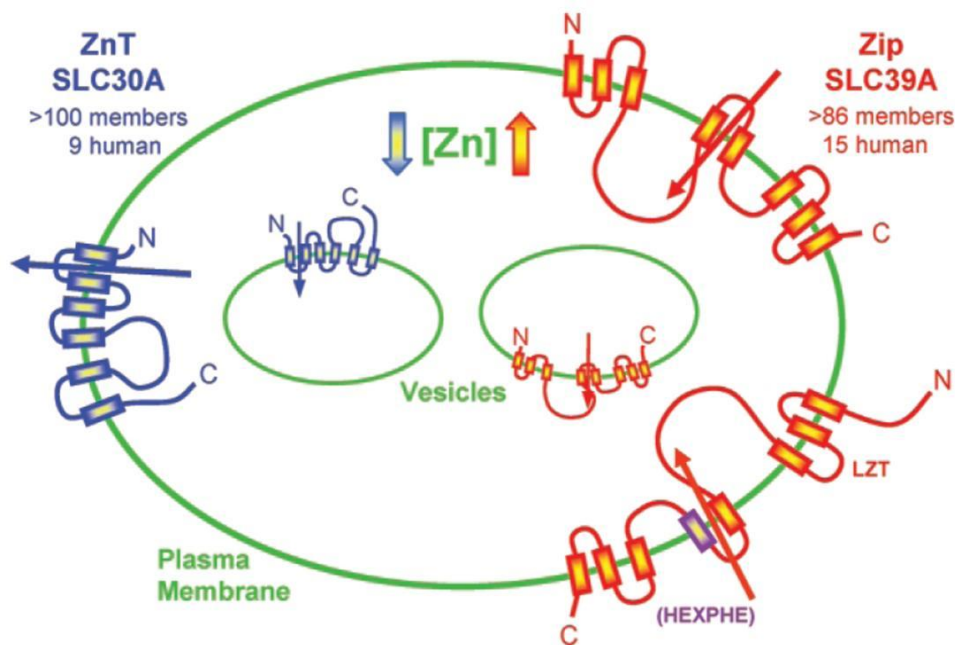


Figure 12: Schéma représentant les 2 grandes familles de transporteurs transmembranaires intervenants dans la régulation de l'homéostasie cellulaire du zinc.

Les ZnT réduisent les concentrations cytosoliques en zinc. A l'inverse, les Zip l'augmentent. D'après Liuzzi et al. 2006.

La quantité de zinc total varie de 10 à 100 $\mu\text{g/g}$ selon les organes, le cerveau et l'os présentant les concentrations les plus faibles et les plus élevées, respectivement (Palmiter et al. 1995). La concentration plasmatique en zinc est estimée à environ 1 $\mu\text{g/ml}$ et dépend de l'âge, du sexe et de l'heure à laquelle est faite la mesure (Vallee et al. 1993). La concentration intracellulaire en zinc est comprise entre 200 et 300 μM . La grande majorité du zinc intracellulaire est lié à des protéines réduisant ainsi la concentration de zinc labile qui est de l'ordre de la picomole (Krezel et al. 2006).

En effet, dans la cellule, le zinc est en grande partie lié à des protéines appelées métallothionéines (MT) qui fixent également d'autres métaux divalents tels que le cuivre, le cadmium et le mercure. Le zinc se fixe entre quatre résidus cystéines des MT. Une MT peut lier jusqu'à 7 atomes de zinc sous la forme de deux clusters. Le premier cluster, renfermant 3 atomes de zinc, se trouve dans la région N-terminale de la protéine et le second se trouvant dans la partie C-terminale peut en contenir jusqu'à 4 (Vallee et al. 1990). Le zinc peut également être stocké dans la mitochondrie ainsi que dans des vésicules riches en zinc appelées « zincosomes » (Eide 2006).

Outre son importance dans la structure des protéines, le zinc semble également jouer un rôle de second messager intracellulaire qui lui a valu l'appellation de « calcium du 21^{ème} siècle » (Frederickson et al. 2005; Hirano et al. 2008). De plus, en réponse à un stress oxydant, le zinc joue un rôle dans la régulation de l'activité de certaines protéines comme la protéine kinase C (PKC). En effet, l'activation de la PKC, causée par le diacylglycérol ou un stress oxydant, conduit à la libération d'atomes de zinc des résidus cystéines modifiant ainsi sa structure tridimensionnelle. Ce changement de conformation est nécessaire à l'initiation de l'activité catalytique de la PKC. Ce phénomène est appelé « zinc redox switch » et est illustré dans la figure 13. L'exposition de cellules fibroblastiques surexprimant la PKC à un activateur de cette dernière, le phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), ou à du peroxyde d'hydrogène conduit à la libération de zinc de la PKC, observée grâce au N-(6-methoxy)-8-quinolyl-toluene sulfonamide (TSQ), marqueur fluorescent du zinc labile intracellulaire (Korichneva et al. 2002). Ainsi, en plus de sa fonction structurale, le zinc joue un rôle de signalisation et de régulation en réponse à divers stimuli et tout particulièrement en réponse au stress oxydant.

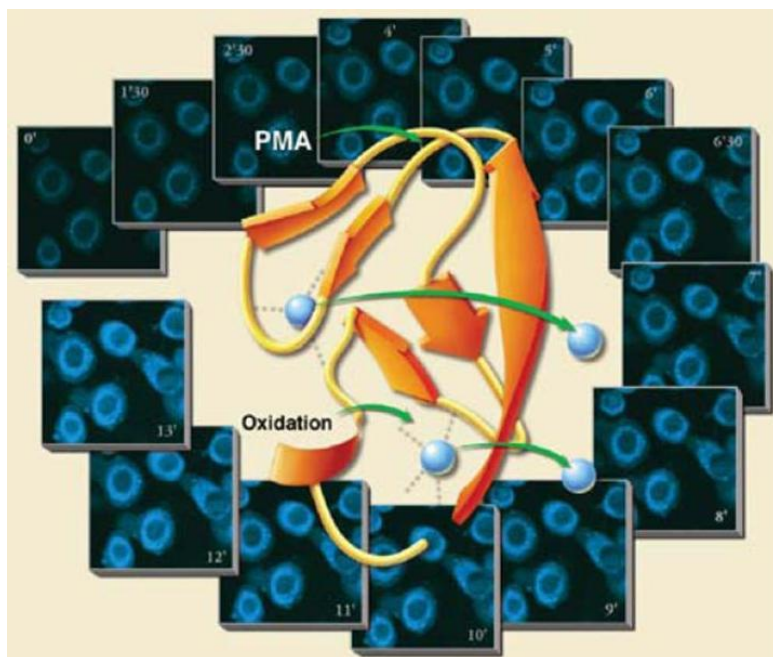


Figure 13 : Figure représentant le phénomène de « zinc redox switch ».

Les images montrent des cellules marquées au TSQ, sonde fluorescente spécifique du zinc labile, exposées 13 minutes à un stress oxydant (peroxyde d'hydrogène). On observe qu'avec le temps (rotation des images dans le sens horaire), les quantités de zinc labile, libéré de la protéine kinase C augmentent. D'après Korichneva I, 2006.

6.2. Zinc et stress oxydant

En plus de ses propriétés structurales et fonctionnelles, le zinc possède, bien qu'il soit inerte d'un point de vue redox, des propriétés antioxydantes. Cet effet antioxydant indirect est connu depuis de nombreuses années et il peut être chronique ou aigu (Powell 2000).

6.2.1. Effet antioxydant chronique

Dès la fin des années 70, des études ont mis en évidence que l'administration d'un régime pauvre en zinc, chez le rongeur, entraînait une diminution de l'activité des SOD1 et SOD3 dans les érythrocytes et le foie, respectivement (Bettger et al. 1978; Dreosti et al. 1978). A contrario, un régime enrichi en zinc de 21 semaines augmente l'activité de la SOD1 dans les globules rouges (Fischer et al. 1991).

L'impact du statut en zinc sur les capacités antioxydantes est également illustré par l'utilisation de régimes déficients en zinc. A l'issue de 3 semaines de régime pauvre en zinc, le contenu en glutathion et l'activité de la SOD1 sont diminués dans le foie et dans le plasma et sont restaurés par le retour à un régime riche en zinc. La mesure de la peroxydation lipidique permet également d'apprécier les propriétés antioxydantes du zinc. En effet, elle est augmentée lorsque les apports en zinc sont réduits (Shaheen et al. 1995). De la même manière, la production de radicaux libres dans le foie et dans les poumons est accrue après 6 semaines de régime pauvre en zinc (Kubow et al. 1986). Le zinc va également avoir des effets antioxydants indirects via les MT. En effet, ces protéines ne jouent pas uniquement un rôle de transporteur puisqu'elles possèdent des propriétés antioxydantes en piégeant des espèces radicalaires telles que l'anion superoxyde et le radical hydroxyle (Carpene et al. 2007). Diverses expériences menées *in vitro* et *in vivo* ont permis de démontrer que les MT sont régulées par la biodisponibilité du zinc. L'exposition de cellules à du zinc augmente l'expression des MT de façon dose-dépendante. L'addition d'un chélateur spécifique du zinc labile, le TPEN (N,N,N',N'-tétrakis(2-pyridylméthyle) éthylènediamine) abolit cet effet (Cao et al. 2001). Chez l'animal, la relation entre zinc et MT est la même. Une diminution de sa biodisponibilité par l'administration d'un régime pauvre en zinc va entraîner une diminution de l'expression des MT dans de nombreux organes tels que le foie, le pancréas, le sang, les reins et les intestins et inversement, un régime enrichi en zinc va augmenter l'expression tissulaire des MT (Onosaka et al. 1982; Bremner et al. 1987; Szczurek et al. 2001).

6.2.2. Effet antioxydant aigu

Parmi les effets bénéfiques d'une administration aiguë de zinc en réponse à un stress oxydant, on retrouve une protection des fonctions sulfhydryles présentes dans les groupements thiols des protéines. Cette propriété a largement été étudiée sur une enzyme appelée acide δ -aminolévulinique déshydratase puis retrouvée dans de nombreuses autres protéines (voir pour revue (Powell 2000)).

Un second mécanisme par lequel le zinc exerce un effet antioxydant aigu provient de sa compétition avec d'autres métaux tels que le fer, le nickel, le cobalt et le cuivre. En effet, ces ions sont responsables de la production d'anions superoxydes et de radicaux hydroxyles. Le zinc va ainsi agir comme un antagoniste et réduire la production d'ERO par des enzymes telles que la NOX et la XO (Girotti et al. 1985; Afanas'ev et al. 1995).

6.3. Zinc et cardioprotection

L'impact du zinc sur la fonction cardiaque a été mis en évidence dès la fin des années 70. En 1976, une étude réalisée chez des patients néozélandais admis dans une unité de soins intensifs de cardiologie a montré que les patients atteints d'un infarctus du myocarde présentaient une diminution du taux de zinc plasmatique lors des 3 premiers jours post-admission (Low et al. 1976). La mesure des concentrations plasmatiques de zinc labile ou fixé à des transporteurs (majoritairement

l'albumine) après un infarctus montre que cette diminution est essentiellement imputable à la diminution du zinc transporté par des protéines (Arnaud et al. 1994). De la même manière, une diminution des concentrations myocardiques de zinc a été observée après un infarctus (Zama et al. 1986).

L'utilisation de nombreux modèles animaux a permis de démontrer les effets bénéfiques du zinc sur le myocarde. Tout d'abord, des modèles de nécrose myocardique induite par l'isoprotérénol ont mis en évidence une diminution du zinc plasmatique et myocardique, proportionnelle aux dommages tissulaires (Chvapil et al. 1977; Mathew et al. 1978; Ahmad et al. 1980). L'administration de sulfate de zinc par voie intrapéritonéale et orale permet également de protéger le cœur de la nécrose et des arythmies induites par les injections d'isoprotérénol (Chvapil et al. 1977; Singal et al. 1982).

Le second modèle couramment utilisé est l'ischémie-reperfusion (I/R) a permis de mettre en évidence une diminution de la concentration myocardique de zinc total et de zinc labile lors de la reperfusion de cœurs isolés et perfusés (Karagulova et al. 2007; McIntosh et al. 2010). Ces deux études ont également montré l'implication du zinc intracellulaire dans les atteintes myocardiques post-ischémiques grâce à l'utilisation de l'ionophore pyrithione de zinc à la reperfusion. En effet, une augmentation du contenu intracellulaire en zinc conduit à une meilleure récupération fonctionnelle en termes de pression développée par le VG, de diminution des arythmies de la reperfusion et de réduction de la taille d'infarctus.

Ces différentes données font du zinc un outil intéressant dans la protection du myocarde face aux altérations induites par l'I/R ou par l'HI.

MATERIELS ET METHODES

7. PARTIE I : Rôle de l'hypoxie intermittente dans la survenue d'arythmies ventriculaires lors de l'ischémie myocardique et étude des mécanismes sous-jacents

7.1. Article 1 « Obstructive sleep apnea and the risk of sudden cardiac death: chronic intermittent hypoxia promotes myocardial ischemia-related ventricular arrhythmias »

Animaux

Des rats Wistar mâles, d'environ 8 semaines, ont été utilisés pour la réalisation des études menées *in vivo* et *ex vivo*. Ils étaient hébergés par cages de 3 avec des cycles jour-nuit de 12h/12h et disposaient de la nourriture et de l'eau *ad libitum*.

Protocole d'exposition à hypoxie intermittente

L'exposition à l'HI a été réalisée grâce au dispositif d'exposition pour rongeurs de la plate-forme d'hypoxie du laboratoire HP2. Le développement de ce dispositif est né d'une collaboration entre le laboratoire et un partenaire industriel (Entreprise André CROS S.A., Echirolles, France). Afin de mimer les épisodes de saturation-désaturation en oxygène causés par l'HI, le dispositif soumet les animaux à des variations de la composition en oxygène de l'air environnant, faisant ainsi varier leur fraction inspirée en oxygène (FiO_2). Pour diminuer la fraction en oxygène, de l'azote issu d'un extracteur est envoyé dans les cages grâce à un compresseur et un système d'électrovannes. L'ouverture et la fermeture de ces dernières sont entièrement automatisées grâce à un système de pilotage informatisé programmable. La FiO_2 était contrôlée tout au long de l'exposition grâce à un analyseur de gaz (ML206, ADInstruments, Oxford, United Kingdom).

Après une semaine de stabulation, les animaux utilisés dans le cadre de cette thèse ont été exposés à l'HI durant 8h consécutives durant leur période de sommeil. L'HI était constituée de cycles d'une minute alternant 30 secondes à 21% et 30 secondes à 5% de FiO_2 , soit 60 cycles/heure (Figure 14). Nous avons exposé les animaux à des durées de 14 ou 35 jours d'HI ou de normoxie (N) dans des cages ventilées par des cycles identiques d'air normoxique afin de les soumettre au même stress en termes de nuisances sonores et de flux d'air.

Mesure de la pression artérielle

Les animaux ont été anesthésiés par une injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (Ceva, 50 mg/kg). Les mesures étaient réalisées sous contrôle de la température corporelle, maintenue à 37°C, grâce à une sonde rectale connectée à un tapis chauffant (Harvard Apparatus, Les Ulis, France). La pression artérielle était mesurée par cathétérisme carotidien. Les pressions artérielles systolique (PAS), diastolique (PAD), moyenne (PAM) et différentielle (pression diastolique - pression systolique)

ainsi que la fréquence cardiaque étaient enregistrées et analysées grâce à un système d'acquisition system (Powerlab, ADInstruments). Le produit de la pression artérielle systolique et de la fréquence cardiaque (rate pressure product, RPP) a été calculé et utilisé pour estimer la consommation myocardique en oxygène (Gobel et al. 1978).

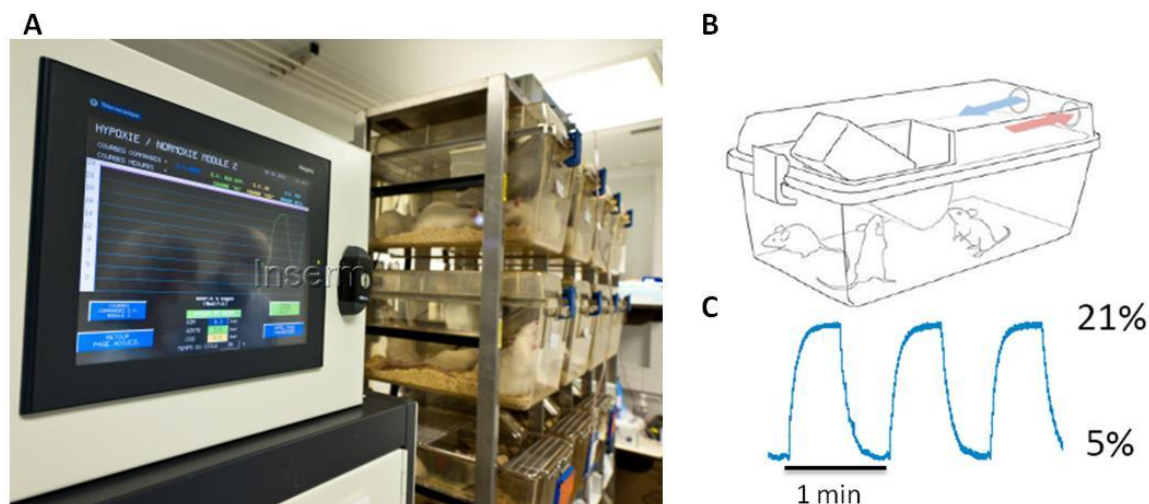


Figure 14 : Dispositif d'exposition à l'HI de la plate-forme d'hypoxie du laboratoire HP2.

A. Photographie du dispositif d'HI présent au laboratoire HP2. **B.** Illustration représentant les flux d'air dans les cages d'exposition des animaux. La flèche bleue montre les flux entrants d'air injecté dans les cages dont la composition varie entre 5 et 21% d'oxygène. La flèche rouge représente les flux d'air sortants. **C.** Exemple de tracé montrant les cycles, obtenu par la mesure des concentrations en oxygène dans les cages.

Protocole d'ischémie myocardique *in vivo*

Durant toute la procédure les animaux ont été ventilés artificiellement (10 ml/kg de volume courant à 65-70 respirations/min) avec l'air ambiant à l'aide d'un respirateur pour rongeurs (Harvard Apparatus, Les Ulis, France). L'intubation trachéale était effectuée par trachéotomie. La température était maintenue à 37°C tout au long du protocole. Un second cathéter était placé au niveau de la veine péniennne afin de maintenir l'anesthésie (pentobarbital sodique, 15 mg/kg/h).

La dérivation DII de l'ECG a été enregistrée à l'aide de 2 électrodes sous-cutanées. L'électrode négative était placée au niveau du membre antérieur droit et l'électrode positive au niveau du membre postérieur gauche. Les 2 électrodes étaient reliées à un système d'acquisition permettant l'enregistrement du signal (Animal BioAmp, ADInstruments).

Après héparinisation de l'animal par voie intra-péritonéale (200 IU/kg), le thorax était ouvert au niveau du 5^{ème} espace intercostal gauche afin d'exposer le cœur. Pour réaliser une occlusion temporaire de l'artère coronaire gauche, un fil de suture 4/0 en soie (Syneture Sofsilck, Covidien, Dublin, Ireland) était passé autour de l'artère coronaire antérieure, sur sa partie descendante, le plus proche possible de son origine. Les 2 extrémités du fil de suture étaient placées dans un petit tube de

polyéthylène. L'occlusion de l'artère coronaire était réalisée par l'application d'une tension sur ce tube. L'ischémie était confirmée par l'élévation du segment ST de l'ECG.

La pression artérielle et l'ECG ont été enregistrés tout au long du protocole d'I/R.

Protocole d'ischémie myocardique *ex vivo*

L'ischémie régionale *ex vivo* a été réalisée sur cœur isolé perfusé. Brièvement, après anesthésie et administration d'héparine, la cage thoracique était ouverte et le cœur prélevé rapidement. Il était ensuite arrêté par immersion dans du tampon Krebs-Henseleit à 4°C (en mM : 118,0 NaCl, 25,2 NaHCO₃, 1,2 KH₂PO₄, 1,2 MgSO₄, 4,7 KCl, 11,0 glucose, 2,5 CaCl₂). L'aorte était rapidement placée sur une canule afin de perfuser le cœur, de façon rétrograde en mode Langendorff à une pression constante de 75 mmHg, avec du tampon Krebs-Henseleit oxygéné par un mélange oxygène-dioxyde de carbone (Carbogen). La température du cœur était mesurée par une sonde thermique et maintenue à 37°C tout au long de l'expérimentation. Un ballonnet en latex rempli d'eau (Hugo Sachs, no. 4), couplé à un capteur de pression, était inséré dans le ventricule gauche via l'oreillette gauche. La pression ventriculaire gauche en fin de diastole était ajustée entre 8 et 12 mmHg. Le débit coronaire (DCo) était mesuré en collectant les effluents provenant du cœur et était exprimé en ml/min/g de tissu. La fréquence cardiaque (FC), les pressions ventriculaires gauches systolique (PSVG), en fin de diastole (PFDVG) et la pression développée par le ventricule gauche (PDVG = PSVG - PFDVG) ainsi que l'ECG, mesuré grâce à 2 électrodes recouvertes de téflon cousues dans l'apex et la base du cœur et connectées au système d'acquisition (Animal BioAmp), étaient mesurés tout au long de l'expérimentation (PowerLab, ADInstruments). De la même manière que pour l'ischémie *in vivo*, un fil de suture était placé autour de l'artère coronaire antérieure. Après une stabilisation de 15 minutes, une ischémie régionale de 30 minutes était réalisée comme décrit ci-dessus. L'ischémie était confirmée par une diminution d'au moins 70% du DCo et de la PDVG.

Evaluation des arythmies ventriculaires d'ischémie, *in vivo* et *ex vivo*

Les arythmies ventriculaires induites par l'ischémie myocardique régionale ont été analysées selon les directives de la convention de Lambeth (Walker et al. 1988). La fibrillation ventriculaire était déterminée par un tracé sur lequel il était impossible de visualiser les complexes QRS et mesurer une fréquence cardiaque. Chez le rat, la fibrillation ventriculaire peut être soutenue ou peut spontanément s'arrêter avec un retour du rythme sinusal. Une fibrillation ventriculaire durant plus de 5 min était considérée comme irréversible.

Dosages des catécholamines plasmatiques

Afin de doser les taux de catécholamines plasmatiques, du sang veineux a été prélevé dans la veine cave inférieure dans des tubes EDTA et centrifugé (4000 rpm, 10 minutes) afin d'obtenir le plasma. Ces prélèvements ont été réalisés sur des animaux exposés 14 jours à l'HI et n'ayant pas subi d'ischémie myocardique. Les catécholamines, adrénaline et noradrénaline, ont été dosées par dosage immunologique à l'aide du Kit ELISA CatCombi (IBL International, Hamburg, Germany). Les valeurs sont exprimées en ng/ml.

Analyse spectrale de la variabilité de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle

L'ECG et la pression artérielle ont été enregistrés en continu avec une fréquence d'échantillonnage de 1000Hz à l'aide d'un PowerLab/8s (ADInstruments) et du logiciel LabChart (v. 7.2.4, ADInstruments). Des portions de 5 minutes d'enregistrement ont été traitées par un logiciel d'analyse spectrale spécifique pour petit animal (Nevrokard SA-BPV, Ljubljana, Slovenia) de façon à obtenir les spectres fréquentiels de la variabilité de la fréquence cardiaque et des pressions artérielles systolique, diastolique, moyenne et différentielle. Après fenêtrage de Hanning (1024 points, 50% de chevauchement, résolution de 0,0195 Hz), le spectre de chaque segment a été calculé selon la transformée de Fourier. Les bandes spectrales d'intérêt (basse fréquence, LF : 0,20-0,75 Hz, haute fréquence, HF : 0,75-3,00 Hz) ont été sélectionnées selon les recommandations spécifiques du rat. Les composantes LF et HF des spectres de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle sont considérées comme des marqueurs de l'activité des systèmes nerveux sympathique ou parasympathique, respectivement (Malliani et al. 1991). Elles ont été exprimées en valeurs absolues (ms^2 et mmHg^2 , respectivement) et en unités arbitraires (pourcentage des valeurs absolues de LF et de HF par rapport à celle du spectre moins celle des très basses fréquences (0,01-0,20 Hz)) et ce, afin de minimiser l'effet de potentielles variations de la puissance totale. Finalement, le rapport LF/HF, correspondant à la balance sympatho-vagale a également été calculé (Malliani et al. 1991).

Analyse des intervalles sur les tracés d'ECG

L'ECG basal (avant thoracotomie) a été analysé à l'aide d'un programme spécifique au rat (ECG Analysis Add-On for LabChart, ADInstruments). L'intervalle QT était mesuré du début du complexe QRS jusqu'à la fin de l'onde T, c'est-à-dire lorsqu'elle croise la ligne de base. Le QTc, correspondant au QT corrigé en fonction de la fréquence cardiaque, était calculé grâce à la formule de Bazett ($\text{QTc} = \text{QT} / \sqrt{\text{VRR}}$). L'intervalle entre le sommet et la fin de l'onde T (Tpeak-Tend) était mesuré entre le voltage maximal et la fin de l'onde T, lorsqu'elle croise la ligne de base.

Enregistrement et mesure des durées des potentiels d'action monophasiques *ex vivo*

Les rats ont été anesthésiés et le cœur rapidement prélevé et perfusé en mode Langendorff tel que décrit précédemment. Avant la stabilisation, 2 électrodes étaient cousues sur le cœur, une à la base et l'autre à l'apex. Elles étaient reliées à un stimulateur (Powerlab 26T, ADInstruments), lui-même connecté à un système d'acquisition (LabChart, ADInstruments). Une fréquence cardiaque de 300 battements/min était ainsi imposée au cœur pour toute la durée de l'expérimentation. Après 15 minutes de stabilisation, les potentiels d'action monophasiques (PAM) étaient enregistrés (EP Technologies, EPT Langendorff probe) sur des portions d'épicarpe et d'endocarde adjacentes. La durée des PAM (ms) a été mesurée à 50% (APD50) et 90% (APD90) de repolarisation. Pour chaque site d'enregistrement, les durées d'au minimum six PAM ont été mesurées puis moyennées.

Extraction d'ARNm total et RT-PCR

Pour extraire l'ARNm total, les tissus ont été homogénéisés dans du TRI Reagent (1 ml/50-100 mg de tissu, Sigma Aldrich) à l'aide d'un Precellys 24 (Bertin Technologies). Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, du chloroforme a été ajouté (0,20 ml/ml de TRI Reagent) et incubé pendant 10 minutes. Après centrifugation (12 000g, 15 minutes à 4°C), 0,20ml de 2-propanol était ajouté à la phase aqueuse pendant 5 minutes. Après une nouvelle centrifugation (12 000g, 10 minutes à 4°C), le culot d'ARN était rincé 2 fois à l'éthanol 75%. Ensuite les culots étaient dissous dans 300 µl d'eau ultra-pure et conservés à -80°C. La concentration et la qualité de l'ARNm obtenu étaient mesurées au NanoDrop2000c (Thermo Scientific).

La Reverse Transcription (RT) a été effectuée avec le iScript™ Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad) et 0,5 µg d'ARN.

La PCR quantitative était réalisée à l'aide de Sso Advanced Universal™ SYBR Green (Bio-Rad) et d'un thermocycleur (C1000™ Thermal Cycler couplé à un CFX96 Real-Time System, Bio-Rad, Marne la coquette, France). Les 3 gènes de ménage utilisés étaient : Ppia, β-actin et HPRT1. Les résultats étaient normalisés aux 2 meilleurs gènes de ménages sélectionnés grâce au programme RefFinder (Xie et al. 2012). Pour chaque gène d'intérêt, les cycles et les températures ont été choisis afin d'obtenir la meilleure efficacité. Les amorces et cycles utilisés sont détaillés dans la Table 1.

Gènes	Forward primers	Reverse Primers	Cycles		
			T°	Durée	Nb cycles
Ppia	TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG	CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC	95°C	30sec	39x
			95°C	5sec	
			59°C	10sec	
β-actin	GGGTATGGAATCCTGTGGCATCC	GCTCAGGAGGAGCAATGATCTTGA	95°C	30sec	39x
			95°C	5sec	
			61°C	10sec	
Hprt1	GGGGGACATAAAAAGTTATTGGTGGGA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCTTG	95°C	30sec	39x
			95°C	5sec	
			61°C	10sec	
Trpc1	TGGTATGAAGGGTTGGAAGAC	TGCTGTTACAGAAGATGCC	95°C	10min	50x
			95°C	10sec	
			58°C	10sec	
			72°C	19sec	
Trpc2	CTCTCTCCTTCACCCAACCACA	CCTCAGACTCTTCCACATTCCG	95°C	30sec	39x
			95°C	5sec	
			60°C	10sec	
Trpc3	TTAATACCTTCACCATGCGGAG	GAACTCTTGAGGCCAACAGG	95°C	30sec	39x
			95°C	5sec	
			60°C	20sec	
Trpc4	AAGGATTAGCTTCACGGGGTG	CCTCCTCTGGGCGTGTTTC	95°C	30sec	39x
			95°C	5sec	
			60°C	20sec	
Trpc5	TGAGTCGTCAGGCAAACGGTC	TCCTGCCACATAGAGTGCTGC	95°C	3min	39x
			94°C	1min	
			60°C	1min	
			72°C	2min	
Trpc6	GATATCTTCAAATTCATGGTCATA	ATCCGCATCATCCTCAATTC	95°C	10min	50x
			95°C	10sec	
			56°C	10sec	
			72°C	19sec	
Cacna1c	ACGCCAGCTCATGCCAACA	ATACTGCTGCCGCTTCCGCT	95°C	30sec	39x
			95°C	5sec	
			65°C	10sec	
Cacna1d	CTGCGCAGGCAAACAGCCA	AGGCTGCAACGCCATGAT	95°C	5min	46x
			95°C	30sec	
			56°C	20sec	
			72°C	20sec	

Table 1 : Récapitulatif des différents primers utilisés pour les RT-PCR et des cycles correspondants à chaque couple d'amorces.

7.2. Résultats complémentaires : Impact du stress oxydant induit par l'HI sur l'activation sympathique et les altérations de la repolarisation ventriculaire.

Administration d'un traitement antioxydant pendant l'exposition à l'HI

Les animaux ont été répartis en 4 groupes expérimentaux (n=6 par groupe) :

- 2 groupes non traités exposés à 14 jours de N ou d'HI, et
- 2 groupes N et HI traités durant les 14 jours d'exposition avec du tempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetraméthyl-piperidine-1-oxyl, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) administré à raison de 1 mM dans l'eau de boisson (protégée de la lumière et renouvelée tous les jours).

Paramètres mesurés

A l'issue des 14 jours d'exposition à la normoxie ou à l'HI, avec ou sans traitement, la pression PAS, PAD, PAM, la FC et l'ECG étaient mesurés. La variabilité de la FC ainsi que les intervalles de l'ECG ont été analysés tel que décrit précédemment. Du sang était collecté dans le ventricule droit afin de mesurer l'hématocrite. Les 2 ventricules étaient séparés avant d'être pesés afin de calculer l'index de Fulton (poids de la paroi libre du ventricule droit / (poids du ventricule gauche + septum)).

8. PARTIE II : Homéostasie du zinc et atteintes myocardiques en réponse à un stress oxydant

Prélèvements et dosage du zinc total

Après exposition à 14 ou 35 jours de N ou d'HI, les animaux étaient anesthésiés et le sang veineux était directement prélevé dans le ventricule droit dans des tubes héparinés pour éléments traces (BD vacutainer). Après centrifugation, le plasma était récupéré et conservé à -80°C jusqu'au dosage. Le cœur, le foie et le fémur étaient ensuite prélevés et rapidement congelés à -80°C.

Les différents échantillons ont été traités par l'Institut de Biologie et de Pathologie (IBP, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble). Les dosages ont été réalisés par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS).

Effets de la supplémentation en zinc sur un stress oxydant induit chimiquement

Un stress oxydant a été induit par perfusion de cœurs isolés de rat pendant 5 minutes avec du peroxyde d'hydrogène 0,375 mM (H₂O₂, Sigma Aldrich) afin d'obtenir une diminution d'au moins 20% de la PDVG, tel que décrit précédemment (Tanguy et al. 2003). Après 3 minutes de perfusion avec du Krebs-Henseleit, des injections de concentrations croissantes de zinc pyrithione (Mercaptopyrindine N-oxide zinc salt, Sigma Aldrich) ou de Diméthyl sulfoxyde (DMSO, Sigma Aldrich) ont été effectuées

(10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} and 10^{-4} M). Les injections étaient réalisées toutes les 10 minutes. A chaque fois un volume de 100 μ l était injecté en 1 minute directement dans la circulation coronaire par la canule de perfusion. La PDVG et le DCo étaient mesurés tout au long de l'expérimentation.

Protocoles utilisés pour évaluer l'effet de l'ischémie-reperfusion (I/R) sur l'homéostasie du zinc et les effets cardioprotecteurs de la supplémentation en zinc

Une ischémie myocardique régionale a été réalisée sur des cœurs isolés perfusés suivie d'une reperfusion, tel que décrit précédemment. Les paramètres hémodynamiques (FC, PDVG, DCo) ont été mesurés tout au long des protocoles d'I/R. Divers protocoles d'I/R ont été utilisés :

- Pour évaluer l'effet de l'I/R sur l'homéostasie du zinc, des cœurs de rats non exposés à l'HI ont été soumis à une ischémie de 30 minutes suivie d'une reperfusion. Les effluents coronaires ont été collectés en fin de stabilisation, à 15 minutes d'ischémie et pendant les 30 premières secondes de reperfusion dans des tubes en polypropylène (Nunc, ThermoFischer scientifique) et congelés à -80°C . Le contenu en zinc total des effluents a été dosé à l'IBP selon la méthode décrite ci-dessus.
- Pour évaluer l'effet antiarythmique de la supplémentation en zinc, des cœurs de rats non exposés à l'HI ont été soumis à une ischémie de 15 minutes suivie de 10 minutes de reperfusion. La reperfusion a été effectuée avec du Krebs-Henseleit contenant du zinc pyrithione à 3 concentrations différentes ($1 \cdot 10^{-5}$, $2 \cdot 10^{-5}$ et $3 \cdot 10^{-5}$ M) ou du sodium pyrithion (2-Mercaptopyridine N-oxide sodium salt Sigma Aldrich). Zinc et sodium pyrithione étaient dilués dans du DMSO afin d'obtenir des solutions mère à des concentrations de $1 \cdot 10^{-2}$, $2 \cdot 10^{-2}$ et $3 \cdot 10^{-2}$ M. Ainsi, ces solutions étaient diluées au 1/1000^{ème} dans le liquide de Krebs-Henseleit (soit 0,1% de DMSO final).
- Pour évaluer l'effet de la supplémentation en zinc sur l'augmentation de la taille d'infarctus induite par l'HI, des cœurs de rats exposés pendant 14 jours à la N ou à l'HI ont été soumis à une ischémie de 30 minutes suivie d'une reperfusion de 120 minutes. La reperfusion a été effectuée avec du Krebs-Henseleit contenant du zinc pyrithione à $2 \cdot 10^{-5}$ M ou son véhicule (sodium pyrithione dilué dans du DMSO).

Analyse des arythmies de la reperfusion

Les arythmies ont été analysées à l'aide d'un électrogramme mesuré tout au long de l'I/R grâce à 2 électrodes cousues dans le myocarde (base et apex). Au cours de la reperfusion, le temps passé en rythme sinusal, en tachycardie ou fibrillation ventriculaire (TV, FV) à été mesuré et exprimé en secondes. Le taux de survie, correspondant à la quantité de cœurs en rythme sinusal, a également été évalué à 5 et 10 minutes de reperfusion.

Détermination de la taille d'infarctus

A la fin du protocole d'I/R, la ligature de l'artère coronaire était de nouveau resserrée. Un colorant (bleu Evans 2%) était lentement perfusé par l'aorte afin de délimiter la zone à risque. Après avoir retiré le ventricule droit, les oreillettes et les tissus conjonctifs, le cœur était congelé puis coupé transversalement en tranches d'environ 2 mm d'épaisseur de l'apex à la base (6 à 7 tranches/cœur). Les tranches étaient ensuite incubées 20 minutes à 37°C dans un tampon phosphate contenant 1% de chlorure de triphényltétrazolium (pH 7,4). Elles étaient ensuite fixées dans du formaldéhyde 10% afin d'augmenter le contraste entre les zones viables colorées des zones nécrosées restées blanches. Après 24h de fixation, les tranches étaient photographiées. La zone à risque et la taille de l'infarctus du ventricule gauche ont été déterminées à l'aide du logiciel Image J (NIH). L'analyse des zones à risque a permis de mettre en évidence l'homogénéité entre les différents groupes. Les tailles d'infarctus ont été exprimées en pourcentage de zone à risque.

9. PARTIE III : Article 2 : Zinc deficiency up-regulates ET-1 mediated signaling through HIF-1 expression affecting endothelial cell migration

Cellules endothéliales

Pour la réalisation de cette étude, des cellules endothéliales microvasculaires humaines (HMVEC pour Human Micro Vascular Endothelial Cells) issues du derme, ont été utilisées (Lonza, ref. CC-2811). Elles étaient cultivées dans leur milieu de culture EGM2-MV complet (Lonza, CC-3202) selon les recommandations du fournisseur. Après décongélation, les cellules étaient utilisées après 4 à 8 passages.

Immunofluorescence

Les cellules destinées à l'immunofluorescence étaient cultivées sur des lamelles de verre préalablement couvertes de fibronectine (1,5µg/cm², Sigma Aldrich). Après 24h d'adhésion, les cellules étaient exposées soit au véhicule (DMSO, 0,05%), soit à un chélateur perméable du zinc, le N,N,N',N'-tetrakis (2- pyridylmethyl) ethylene diamine (TPEN, 0,5 µM dans du DMSO à 0,05%, Fluka analytical). L'exposition durait 2 et 5 heures. A la fin de l'exposition, les cellules étaient fixées avec du paraformaldéhyde à 3,7% puis perméabilisées par du Triton 0,1% (chacun dilué dans du PBS 1X). L'anticorps primaire anti-HIF-1α (1:100, Ab Cam) et l'anticorps secondaire (Alexa Fluor® 546, 1:500, Invitrogen) étaient incubés à 37°C pendant 60 et 45 minutes, respectivement. Le Dapi (0,5 µg/ml) était incubé 10 minutes à température ambiante avant l'assemblage des lamelles à l'aide d'un milieu de montage (Dako, USA). Les lames étaient ensuite analysées par microscopie à fluorescence

(AxioImager, Zeiss) et la quantification du rapport noyau/cytosol était réalisée grâce à un logiciel de traitement d'image (NIH).

Protocole de transfection du siRNA de HIF-1 α

La transfection était réalisée lorsque les cellules atteignaient approximativement 70% de confluence, avec TransIT-TKO (1:200, Mirus) utilisé selon les recommandations du fournisseur. Les cellules étaient transfectées soit par un siRNA contrôle couplé à la fluorescéine soit par un mélange de 3 siRNA dirigés contre HIF-1 α (20 nM pour les 2 siARN, Santa Cruz). L'efficacité de la transfection et la diminution de l'expression de HIF-1 α ont été contrôlées par microscopie à fluorescence et par western blot.

Western blot

48 heures après la transfection, les cellules transfectées ont été récupérées à l'aide de scrapers et centrifugées (1000 rpm, 5 min, 4°C) et conservées à -80°C. L'extraction protéique était réalisée à l'aide d'un tampon RIPA (50 mM Tris HCl pH 7,2, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0,5% DOC, 0,1% SDS, 1 mM PMSF) auquel était ajouté un mélange d'inhibiteurs de protéases (Roche). La concentration en protéines totales des extraits a été mesurée par le dosage BCA de Pierce (Thermo Scientific).

Des gels SDS-PAGE 9% ont été utilisés pour séparer les protéines des extraits totales (10 μ g de protéines par puits). Après transfert sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Biosciences) et un blocage d'une heure au TBS-Tween 0,1% contenant 5% de lait en poudre, les anticorps primaires étaient incubés pour la nuit à 4°C sous légère agitation (anti-HIF-1 α et anti- β -actine, Active Motif et Sigma Aldrich, respectivement, 1:1000). Après rinçages, les membranes ont été incubées 1 heure à température ambiante sous légère agitation avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase de Raifort (1:2500, Santa Cruz et Sigma Aldrich). A la fin de l'incubation, les membranes ont été révélées en utilisant la méthode ECL (Thermo Scientific).

Migration cellulaire en réponse à une blessure

Les HMVECs étaient ensemencées à raison de 40.10^3 cellules par puits dans une plaque 48 puits (Nuclon) afin d'atteindre 100% de confluence. Après 24 heures, une blessure était réalisée en traversant le puits de part en part à l'aide de la pointe d'un cône de 10-100 μ l (Starlab, TipOne). Les cellules décollées sont retirées des puits lorsque le milieu est changé. Pour l'étude des effets de l'ET-1 et du TPEN, 3 conditions expérimentales ont été testées : véhicule, 0,01 μ M ET-1 et 0,5 μ M TPEN. Les mêmes conditions ont été réalisées en ajoutant du bosentan (1 μ M, gracieusement fourni par Actelion Pharmaceuticals, Suisse) dans le milieu de culture. 3 puits de cellules transfectées contrôle ou siARN anti-HIF-1 α ont également été ensemencés et les cellules ont été exposées aux 3 conditions décrites ci-dessus. La réparation de la blessure a été suivie grâce à un microscope

dynamique (AxioVert 200M, Zeiss). Les images ont été enregistrées toutes les 30 minutes pendant environ 16 heures à un grossissement X10 (Metamorph). L'analyse a été effectuée sur 2 positions pour chaque puits, toutes les 2 heures. La zone « réparée » est déterminée par la soustraction de la surface de la blessure à un temps donné, à la surface lésée au départ de l'expérience (Image J software). Chaque condition étaient normalisée au puits contrôle.

Dosage d'ET-1 dans le surnageant

A l'issue des expériences de réparation de blessure, les surnageants des conditions contrôle et TPEN sont collectés et conservés à -80°C. Le dosage de l'ET-1 est réalisé à l'aide d'un kit ELISA (Enzo Life Sciences).

RESULTATS

10.PARTIE I : Rôle de l'hypoxie intermittente dans la survenue d'arythmies ventriculaires lors de l'ischémie myocardique et étude des mécanismes sous-jacents

10.1. Article 1 : « Obstructive sleep apnea and the risk of sudden cardiac death: chronic intermittent hypoxia promotes myocardial ischemia-related ventricular arrhythmias »

Le SAOS, reconnu comme un facteur de risque de maladies cardiovasculaires est associé à une importante morbi-mortalité avec, entre autres, une augmentation du risque de mort subite (Marin et al. 2005; Levy et al. 2015). Ce risque est corrélé à la sévérité du SAOS et les événements surviennent 2 fois plus souvent pendant la nuit que chez les sujets non apnéiques (Gami et al. 2005; Gami et al. 2013). La principale cause de mort subite est l'ischémie myocardique qui est à l'origine d'arythmies telles que la tachycardie et la fibrillation ventriculaire (Myerburg et al. 2012). En adéquation avec les incidences nocturnes de mort subite, les patients apnéiques présentent une prévalence d'infarctus myocardique plus importante au cours de la nuit (Kuniyoshi et al. 2008).

L'objectif de cette étude était de mettre en évidence l'impact de l'HI dans la survenue des arythmies ventriculaires lors d'une ischémie myocardique et d'identifier les mécanismes pro-arythmogènes sous-jacents.

Dans cette étude nous avons montré que l'HI, en augmentant l'incidence des arythmies ventriculaires lors d'une ischémie myocardique, pouvait être associée à risque accru de mort subite lors d'un infarctus du myocarde. L'activation sympathique pourrait être impliquée, ainsi que des modifications d'expression des canaux calciques, potentiellement responsables des altérations de la repolarisation ventriculaire observées.

Europace

Obstructive sleep apnea and the risk of sudden cardiac death: chronic intermittent hypoxia promotes myocardial ischemia-related ventricular arrhythmias

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Obstructive sleep apnea and the risk of sudden cardiac death: chronic intermittent hypoxia promotes myocardial ischemia-related ventricular arrhythmias
Article Type:	Basic Science
Keywords:	Obstructive sleep apnea; intermittent hypoxia; sympathetic activation; ventricular arrhythmias; Ventricular Fibrillation; action potential duration; calcium channels
Corresponding Author:	Diane Godin-Ribuot Universite Grenoble Alpes FRANCE
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universite Grenoble Alpes
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Jessica Morand
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Jessica Morand Claire Arnaud, PhD Jean-Louis Pepin, MD, PhD Diane Godin-Ribuot
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	<p>Background. Ischemic ventricular arrhythmias are a common cause of sudden cardiac death (SCD) and increased sympathetic nervous system activity is a well-known contributing factor. Obstructive sleep apnea (OSA) is associated with IH and sympathoactivation but a link between OSA and ischemic ventricular arrhythmias remains to be established.</p> <p>Objective. To investigate the effects of chronic exposure to intermittent hypoxia (IH) on the incidence and severity of myocardial ischemia (MI)-related ventricular arrhythmias.</p> <p>Methods. Rats were exposed to 14 days of IH (60-sec cycles, 21-5 % FiO₂, 8h/day) or normoxia and submitted to a 30-min in vivo ligature of the left coronary artery. Arterial blood pressure (BP) and ECG were recorded for power spectral analysis, ECG interval measurement and arrhythmia quantification. Left ventricular monophasic action potentials duration (APD) and expression of L-type calcium channels (LTCC) and transient receptor potential channels (TRPC) were assessed in adjacent epicardial and endocardial sites.</p> <p>Results. Chronic IH enhanced the incidence of ischemic arrhythmias, in particular ventricular fibrillation (66.7% vs. 33.3% in N rats, p<0.05). IH also increased BP and plasma norepinephrine levels along with increased low-frequency (LF), decreased high-frequency (HF) and increased LF/HF ratio of heart rate and BP variability. IH prolonged QTc and Tpeak-to-Tend intervals, increased the ventricular APD gradient and upregulated endocardial but not epicardial LTCC, TRPC1 and TRPC6 (p<0.05).</p> <p>Conclusions. Chronic IH, such as that occurring in OSA, is a major risk factor for SCD upon MI through sympathoactivation and alterations in ventricular repolarization, transmural APD gradient and endocardial calcium channel expression.</p>
Additional Information:	
Question	Response

Obstructive sleep apnea and the risk of sudden cardiac death: chronic intermittent hypoxia promotes myocardial ischemia-related ventricular arrhythmias

Jessica Morand,^{1,2*} Claire Arnaud,^{1,2*} Jean-Louis Pepin,^{1,2,3} and Diane Godin-Ribuot^{1,2†}

* These authors contributed equally to this work

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

² INSERM, U1042, Grenoble, F-38042 France

³ CHU de Grenoble, Grenoble, F-38042 France

Running title: OSA, intermittent hypoxia and sudden cardiac death

Financial support: Cible grant from the Région Rhône-Alpes, Lyon, France (JM and DGR); Agir Pour les Maladies Chroniques grant, Grenoble, France (CA and DGR).

Relationship with industry: None.

Conflicts of interest for each author: None.

† Corresponding author at:

Laboratoire HP2, Inserm U1042,
Faculté de Médecine de Grenoble, BP 170,
38042 Grenoble Cedex 9, France.

Tel: +33 476 63 75 63

Fax: +33 476 63 71 78

e-mail address: diane.ribuot@univ-grenoble-alpes.fr

Abbreviations and Acronyms

APD = action potential duration

IH = intermittent hypoxia

LTCC = L-type calcium channels

MAP = monophasic action potential

MI = myocardial ischemia

N = normoxia

OSA = obstructive sleep apnea

SCD = sudden cardiac death

SNS = sympathetic nervous system

TRPC = transient receptor potential channels

VT = ventricular tachycardia

VF = ventricular fibrillation

Introduction

Obstructive sleep apnea (OSA) syndrome is a common sleep-related breathing disorder, characterized by repetitive upper airway collapses during sleep resulting in intermittent hypoxia (IH), sleep fragmentation and repetitive intrathoracic pressure changes due to increased respiratory efforts against occluded upper airways¹. OSA represents a substantial public health problem as it affects at least 10% of the general population and is recognized as an important and independent risk factor for cardiovascular disease. In particular, accumulating evidence indicates that sleep apnea is associated with hypertension, left ventricular dysfunction, coronary artery disease and cardiac rhythm disorders². OSA is also causally related to excessive cardiovascular morbi-mortality³ such as an increased risk of sudden cardiac death (SCD)⁴. The specific link between OSA and SCD is based on the observation that SCD occurs predominantly during sleep in apnoeic patients but not in the general population⁵. The severity of OSA (i.e. nocturnal hypoxemia) is also directly correlated with the risk of nocturnal SCD, independently of other well-established risk factors⁵.

Myocardial ischemia (MI) is a leading cause of SCD, in particular through lethal ventricular arrhythmias such as sustained and irreversible ventricular tachycardia and/or fibrillation (VF)⁶. The pathophysiology of ischemia-related ventricular arrhythmias is complex and includes a cascade of abnormalities resulting from tissue injury, changes in autonomic tone and alterations in metabolic status⁶. In accordance with their increased rate of nocturnal SCD⁵, apnoeic patients exhibit a high prevalence of myocardial infarction during sleeping hours⁷. This nocturnal MI incidence in apneic patients, associated with the beneficial effect of the treatment with continuous positive airway pressure (CPAP) to reduce mortality from myocardial events³, suggests a strong potential causative role of OSA in the occurrence of fatal

coronary events. Furthermore, since cardiac arrest is often the first clinical manifestation of a pre-existing coronary artery disease, it is particularly important to determine the specific mechanisms of OSA-related SCD.

Accumulating evidence from OSA patients and animal models suggest that chronic IH is probably the most important OSA-related consequence in terms of cardiovascular impact ¹. Sympathetic activation ⁸, oxidative stress and HIF-1-endothelin signalling ⁹ have been identified as important mechanisms in the development of the IH-induced cardiovascular alterations. However, the relationship between IH exposure and the incidence of MI-related ventricular arrhythmias and SCD has never been investigated.

Thus, the aims of the present study were to investigate the effects of chronic exposure to intermittent hypoxia on the incidence of MI-related ventricular arrhythmias and to identify the potential mechanisms involved with particular emphasis on sympathoactivation, alterations in ventricular electrophysiological properties and cardiac ion channel expression.

Methods

Details are provided in the online supplement.

Animals

The institutional ethics committee approved all the study protocols, which conformed to the Position of the American Heart Association on Research Animal Use. Male Wistar rats (8 weeks old) were exposed to 14 days of IH (21-5% FiO₂, 30s-30s cycles, 8h/d) or normoxia (N, similar air-air cycles), as previously described ¹. After N or IH exposure period, they were anesthetized for arterial blood pressure and ECG (lead II) recording followed by blood and tissue sampling. The rate pressure product (RPP) was calculated as the product of heart rate and systolic blood pressure.

In vivo and ex vivo assessment of ischemic ventricular arrhythmias

Regional myocardial ischemia was performed in anesthetized animal and in isolated hearts perfused in Langendorff mode. A 4/0 silk suture was placed around the left anterior descending coronary artery and a 30-min coronary occlusion was performed. Ischemic ventricular arrhythmias were analysed in accordance with the Lambeth conventions. VF lasting more than 5 minutes was considered as lethal.

Sympathetic nervous system activity

Power spectral analysis. Baseline 5-min segments of ECG and arterial pressure signals were processed using a rodent spectral analysis software (SA-BPV, Nevrokard, Ljubljana, Slovenia). Frequency domain analysis of heart rate, systolic, diastolic, mean and pulse pressure variability was performed. Power and normalized units of the low frequency (LF) and high frequency (HF) components of the resulting power spectra, as well as the LF/HF ratio, considered as general marker of sympathovagal balance, were computed.

Plasma catecholamine assay. Catecholamine content was measured by ELISA (CatCombi kit, IBL International, Hamburg, Germany) in venous samples.

ECG analysis and measurement of action potential duration

Baseline electrocardiograms were analysed using a rodent ECG analysis software (ECG Analysis Add-On for LabChart, ADInstruments). QT and Tpeak-Tend intervals were measured (Figure 3A) and the QTc interval was computed using Bazett's formula ($QTc=QT/\sqrt{RR}$). Left ventricular monophasic action potentials (MAP) were measured on isolated hearts paced at 300 beats/minute. After a 15-min stabilization period, MAP were recorded (EP Technologies, EPT Langendorff probe) on adjacent epicardial and endocardial sites. Action potential duration (ms) was measured at 50% (APD50) and 90% (APD90) repolarization as represented in Figure 3E.

Ventricular calcium channel gene expression

Total mRNA was extracted from left ventricular endocardial and epicardial samples. Cav1.2, Cav1.3 and TRPC1 to TRPC6 mRNA levels were assessed by quantitative real-time PCR. Data were normalized to common reference housekeeping genes (*Ppia*, *Actb* or *Hprt1*).

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM or median value. They were analysed using unpaired t-tests or nonparametric Mann-Whitney U tests, according to normality and variance, and by two-way ANOVA followed by *post hoc* Tukey test. A 2-sided p value <0.05 was considered statistically significant.

Results

Intermittent hypoxia causes systemic hypertension and increases cardiac workload

The hemodynamic parameters measured in N and IH rats are summarized in Table 1. Exposure to IH significantly increased haematocrit values compared to normoxia. Diastolic, systolic and mean arterial blood pressures values were significantly increased in rats exposed to IH compared to N, whereas heart rate and pulse pressure values were not different. The increase in systolic blood pressure resulted in a significantly higher RPP, indicative of an increased workload-related myocardial oxygen consumption in rats exposed to IH.

Intermittent hypoxia promotes lethal ischemia-induced ventricular arrhythmias

In vivo, arterial blood pressure and ECG were recorded throughout the 30-min myocardial ischemia period. We observed a 2-fold increase in the incidence of lethal ischemia-induced arrhythmias in animals exposed to IH compared to those exposed to normoxia (Figure 1A). The enhanced arrhythmia susceptibility was characterized by a predominant and significant increase in the overall incidence of ventricular fibrillation (VF) in IH compared to N rats (66.7% vs. 33.3%, respectively, $p < 0.05$) (Figures 1B and 1C).

Ex vivo, VF incidence during the 30-min regional myocardial ischemia was also significantly increased in isolated hearts from IH compared to N rats (34.5% vs. 4.2%, respectively, $p < 0.01$) (Figure 1D).

Intermittent hypoxia increases sympathetic nervous system activity

Sympathetic nervous system (SNS) activation was assessed indirectly through measurement of plasma catecholamine levels and spectral analysis of heart rate and arterial blood pressure variability. These data were obtained 12 to 16 hours after the end of hypoxic exposure.

As shown in Figure 2A, hypoxic rats exhibited significantly higher baseline plasma norepinephrine levels compared to normoxic animals. Plasma epinephrine levels did not significantly differ between both groups (data not shown).

Power spectral analysis of heart rate and arterial blood pressure variability revealed that, while total power was unchanged, rats exposed to IH had a significant increase in the low frequency (LF) component and a significant decrease in the high frequency (HF) component of heart rate (RR interval), systolic and diastolic blood pressure spectra compared to normoxic rats (Figures 2B and 2C and Table 2). This resulted in a significant increase in the LF/HF ratio of RR interval, systolic and diastolic blood pressure spectra (Figure 2D and Table 2).

Intermittent hypoxia alters ventricular repolarization

Whereas RR interval (155.0 ± 3.8 vs. 154.1 ± 4.7 ms in N and IH groups, respectively), P wave duration (21.7 ± 0.5 vs. 21.0 ± 0.8 ms), PR interval (48.4 ± 0.7 vs. 49.2 ± 1.3 ms) and QRS interval (21.5 ± 0.5 vs. 20.9 ± 0.5 ms) were unaffected by IH exposure, we observed a significant increase in QTc and Tpeak-Tend intervals, reflective of ventricular repolarization abnormalities and increased arrhythmogenic risk, in animals submitted to IH (Figure 3 B and C).

Intermittent hypoxia increases left ventricular transmural repolarisation gradient

We assessed transmural repolarisation through measurement of MAP duration in adjacent endocardial and epicardial sites. Endocardial APD50 values were significantly longer than epicardial APD50 values in normoxic rats (41.3 ± 0.6 vs. 36.3 ± 1.2 ms, respectively, $p < 0.05$) as well as in those exposed to IH (49.1 ± 2.2 vs. 38.6 ± 0.8 ms, respectively, $p < 0.0001$). However, while epicardial APD50 was not affected by IH exposure (38.6 ± 0.8 vs. 36.3 ± 1.2 ms in IH and N groups, respectively), we observed a significant increase in endocardial APD50 in IH-exposed compared to normoxic rats (49.1 ± 2.2 vs. 41.3 ± 0.6 ms, respectively, $p < 0.001$) (Figure 3C). Consequently, the transmural endocardial/epicardial APD gradient was significantly enhanced in animals submitted to IH compared to normoxic animals (10.5 ± 1.8 vs. 4.9 ± 1.5 ms, respectively, $p < 0.05$). Variations in APD90 values closely followed those of APD50 values (data not shown).

Intermittent hypoxia increases expression of L-type calcium and transient receptor potential channels in the left ventricular endocardium

Apart from a significant increase in transient receptor potential channel (TRPC) 4 mRNA levels (27.6% compared to N, $p < 0.05$), IH exposure appeared to have little effect on ion channel expression in the left ventricular epicardium (Figure 3F). In contrast, in the LV endocardium, IH significantly enhanced mRNA expression of L-type calcium channels (LTCC) $Ca_v1.2 \alpha_1$ subunit (35.3% increase compared to N, $p < 0.05$), TRPC1 (26.7% increase compared to N, $p < 0.05$) and TRPC6 (33.1% increase compared to N, $p < 0.05$) (Figure 3G). TRPC2, -3 and -5 mRNA levels were undetectable in both epicardial and endocardial samples.

Discussion

The present study is the first to demonstrate that chronic exposure to intermittent hypoxia, such as that occurring in severe OSA patients, is a major risk factor for SCD from MI-related ventricular arrhythmias. We also show that the pro-arrhythmogenic state promoted by intermittent hypoxia is characterized by SNS activation, altered ventricular repolarization and increased expression of LV endocardial calcium channels.

Chronic exposure to IH promotes ischemic ventricular arrhythmias and sudden cardiac death

In the present study, we demonstrate for the first time that IH exposure greatly enhances the incidence of ventricular arrhythmias, in particular of lethal VF, during the early phase of MI. This is in accordance with the literature estimating that, in humans, approximately 50% of MI-related SCD occurs during the early phase¹⁰. This result also corroborates the causative role of IH in the high prevalence of myocardial infarction⁷ and associated SCD⁵ during sleeping hours in apnoeic patients.

Potential mechanisms behind the increase in lethal ischemic ventricular arrhythmias promoted by chronic exposure to intermittent hypoxia

Chronic exposure to IH engenders systemic and cardiac sympathetic activation

The sympatho-adrenal activation induced by IH exposure is well characterized⁸. Indeed, rodents exposed to chronic IH have increased basal resting plasma norepinephrine levels and SNS activity along with increased systemic blood pressure¹. Similarly, healthy humans exposed to IH for 2 weeks develop enhanced muscle sympathetic activity and elevated blood pressure². In accordance, apnea-induced IH

is thought to be the main mechanism behind the chronic SNS activation characteristic of OSA and related systemic hypertension ². Indeed, although acute increases in SNS activity occur during apneas, a sustained activation is also seen during daytime in OSA patients characterized by enhanced daytime muscle sympathetic activity and plasma catecholamine levels ¹¹.

Power spectral analysis of heart rate and blood pressure variability is widely used to assess autonomic modulation of the heart and blood vessels. It has proved to be a reliable and reproducible technique to demonstrate sympatho-vagal imbalance in various pathophysiological conditions such as essential hypertension ¹². To our knowledge, our study is the first to perform power spectral analysis of both heart rate and blood pressure variability in IH-exposed rats. The resulting increase in LF component, decrease in HF component and increase in LF/HF ratio of heart rate, systolic and diastolic blood pressure are indicative of a cardiac and systemic sympathetic activation that is also corroborated by the increase in circulating catecholamines. In accordance with our data, various studies have reported a cardiac autonomic imbalance in moderate to severe OSA patients with an increase in LF and a decrease in HF components of heart rate variability along with an increase in LF/HF ratio ^{13, 14}.

SNS activation coupled to reentry mechanisms has been linked to early ischemic ventricular arrhythmias ¹⁰. In addition to the IH-induced sympathoactivation, efferent cardiac sympathetic fibres are reflexively activated by coronary occlusion in man ¹⁵ and animal models ¹⁶. Although the enhanced sympathetic activity is initially beneficial by providing inotropic support to maintain cardiac output and arterial pressure, it has also been directly related to the pathogenesis of ventricular arrhythmias in experimental models ¹⁶ and in patients with acute MI ¹⁵. Finally, local catecholamine release through an inversion of the reuptake mechanism also

promotes arrhythmogenesis ¹⁶. In accordance, we observed that VF incidence was increased in isolated hearts of rats exposed to IH.

Chronic exposure to IH induces arrhythmogenic ECG modifications

To the best of our knowledge, our study is the first to demonstrate that chronic IH exposure alters ventricular repolarization leading to prolonged QTc and Tpeak-Tend intervals. A prolonged QTc is considered a marker of ventricular electrical instability and a risk factor for ventricular arrhythmias and SCD ¹⁷. Prolongation of the Tpeak-Tend interval, thought to reflect transmural dispersion of ventricular repolarization ¹⁸, appears to be an even stronger predictor for arrhythmia-related SCD in patients with cardiovascular disease ¹⁹.

Whereas some authors report a prolongation of the QTc interval in OSA patients ²⁰, others did not observe significant changes ²¹. Nevertheless, CPAP withdrawal is associated with prolongation of both QTc and Tpeak-Tend intervals ²⁰ and a positive correlation has been shown between prolonged Tpeak-Tend interval and OSA severity, estimated by the apnea-hypopnea index ²¹. IH thus appears probably the most prominent arrhythmogenic factor in OSA patients since, even after accounting for co-morbidities, the main predictor of arrhythmia occurrence and severity is the level of nocturnal hypoxemia ²².

Chronic exposure to IH alters the left ventricular transmural action potential gradient

In accordance with the initial observations of Sekiya et al. on the canine heart ²³, we observed that baseline endocardial APD values were significantly longer than those recorded in adjacent ventricular epicardial sites. Exposure to 14 days of IH significantly increased MAP duration in the endocardium but not in the epicardium.

The resulting increase in the left ventricular transmural APD gradient could explain the prolongation in QTc and Tpeak-Tend intervals ¹⁸, and the associated risk of SCD. Moreover, prolongation of APD is also well known to promote early afterdepolarizations, an important trigger for ventricular arrhythmias particularly in the presence of a prolonged QT interval ²⁴.

Chronic exposure to IH alters left ventricular calcium channel expression

The left ventricular APD gradient has been linked to transmural differences in function and perfusion leading to heterogeneity in ion channel expression. Indeed, the electrophysiological characteristics of the cardiomyocytes vary from epicardium to endocardium leading to important distinctions in action potential morphology and ion currents ¹⁸. In addition, it is generally acknowledged that, under physiological conditions, subendocardial exceeds subepicardial blood flow because of the mechanically-related higher oxygen demand of the endocardium ²⁵. This high oxygen demand is one of the reasons behind the increased sensitivity of the subendocardium to ischemia ²⁶.

Based on these observations, we hypothesized that endocardial cardiomyocytes could be more susceptible to the effects of IH in a context of increased oxygen demand (increased RPP), leading to differential transmural expression of ion channels involved in APD duration. In accordance, we observed that IH significantly upregulated endocardial but not epicardial Ca_v1.2, TRPC1 and TRPC6 expression while endocardial Ca_v1.3 and TRPC4 levels did not vary. We targeted calcium channels because dysregulation in Ca²⁺ homeostasis can affect APD as well as promote ventricular arrhythmias ²⁷. More specifically, we investigated Ca_v and TRPC channels because they have been shown to be upregulated upon hypoxia by HIF-1 ^{28, 29}, a transcription factor activated by IH with deleterious consequences on the

myocardium as shown by our group ⁹. Interestingly, HIF-1 appears to promote the expression of Ca_v1.2, TRPC1 and TRPC6 but not Ca_v1.3 and TRPC4 ^{28, 29}.

Endocardial upregulation of Ca_v1.2, the ion-conducting α₁ subunit of LTCC involved in phase 2 of the cardiac AP ²⁷, could explain the selective increase in endocardial APD induced by IH exposure and the associated increase in QTc and Tpeak-Tend intervals. Moreover, since both LTCC ²⁷ and TRPC ³⁰ contribute to Ca²⁺ entry into cardiomyocytes, their upregulation is associated with Ca²⁺ overload ²⁹ thus providing an important substrate for arrhythmogenic early afterdepolarization and premature ventricular contractions ^{24, 27}. This is even more relevant in a context of SNS activation since catecholamines have the ability to increase LTCC ²⁷ and TRPC ³⁰ activity and in general, to promote calcium overload-related ventricular arrhythmias ²⁷.

Conclusion

This study is the first to demonstrate that intermittent hypoxia, a hallmark of OSA, promotes SCD upon myocardial ischemia by inducing a pro-arrhythmogenic state characterized by sympathoactivation and alterations in ventricular action potential duration and repolarization associated with overexpression of myocardial calcium channels. These results raise the following recommendations: 1) Assessment of coronary risk should be enforced in OSA patients with severe nocturnal hypoxemia along with increased QTc interval and sympathetic activity in order to prevent both MI-induced lethal ventricular arrhythmias and SCD, 2) The risk is particularly high in OSA patients with obesity and comorbidities acting synergistically to increase sympathetic activity and 3) Clinical studies should be performed to evaluate the effects of beta-blockers and calcium channel antagonists in the prevention of fatal

and non-fatal cardiovascular events in apnoeic patients at risk for coronary artery disease.

Acknowledgements

The authors are grateful to Mrs. Emeline Lemarie for her skilled technical assistance.

References

- [1] Dematteis M, Godin-Ribuot D, Arnaud C, Ribuot C, Stanke-Labesque F, Pepin JL, et al. Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding the human disease. *Ilar J* 2009; **50**: 262-281.
- [2] Lévy P, Kohler M, McNicholas WT, Barbé F, McEvoy RD, Somers VK, et al. Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nat Rev Dis Primers* 2015: 15015.
- [3] Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, 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* 2005; **365**: 1046-1053.
- [4] Gami AS, Howard DE, Olson EJ, Somers VK. Day-night pattern of sudden death in obstructive sleep apnea. *N Engl J Med* 2005; **352**: 1206-1214.
- [5] Gami AS, Olson EJ, Shen WK, Wright RS, Ballman KV, Hodge DO, et al. Obstructive sleep apnea and the risk of sudden cardiac death: a longitudinal study of 10,701 adults. *J Am Coll Cardiol* 2013; **62**: 610-616.
- [6] Myerburg RJ, Junttila MJ. Sudden cardiac death caused by coronary heart disease. *Circulation* 2012; **125**: 1043-1052.

- [7] Kuniyoshi FH, Garcia-Touchard A, Gami AS, Romero-Corral A, van der Walt C, Pusalavidyasagar S, et al. Day-night variation of acute myocardial infarction in obstructive sleep apnea. *J Am Coll Cardiol* 2008; **52**: 343-346.
- [8] Prabhakar NR, Kumar GK, Peng YJ. Sympatho-adrenal activation by chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol (1985)* 2012; **113**: 1304-1310.
- [9] Belaidi E, Morand J, Gras E, Pepin JL, Godin-Ribuot D. Targeting the ROS-HIF-1-endothelin axis as a therapeutic approach for the treatment of obstructive sleep apnea-related cardiovascular complications. *Pharmacol Ther* 2016; **168**: 1-11.
- [10] Di Diego JM, Antzelevitch C. Ischemic ventricular arrhythmias: experimental models and their clinical relevance. *Heart Rhythm* 2011; **8**: 1963-1968.
- [11] Carlson JT, Hedner J, Elam M, Eijnell H, Sellgren J, Wallin BG. Augmented resting sympathetic activity in awake patients with obstructive sleep apnea. *Chest* 1993; **103**: 1763-1768.
- [12] Pagani M, Lucini D. Autonomic dysregulation in essential hypertension: insight from heart rate and arterial pressure variability. *Auton Neurosci* 2001; **90**: 76-82.
- [13] Khoo MC, Belozeroff V, Berry RB, Sassoos CS. Cardiac autonomic control in obstructive sleep apnea: effects of long-term CPAP therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; **164**: 807-812.
- [14] Roche F, Gaspoz JM, Court-Fortune I, Costes F, Geysant A, Duverney D, et al. Alteration of QT rate dependence reflects cardiac autonomic imbalance in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Pacing Clin Electrophysiol* 2003; **26**: 1446-1453.
- [15] McAlpine HM, Morton JJ, Leckie B, Rumley A, Gillen G, Dargie HJ. Neuroendocrine activation after acute myocardial infarction. *Br Heart J* 1988; **60**: 117-124.

- [16] Brachmann J, Schömig A. *Adrenergic System and Ventricular Arrhythmias in Myocardial Infarction*: Springer Berlin Heidelberg 2012.
- [17] Moss AJ. QTc prolongation and sudden cardiac death: the association is in the detail. *J Am Coll Cardiol* 2006; **47**: 368-369.
- [18] Antzelevitch C. Cellular basis for the repolarization waves of the ECG. *Ann N Y Acad Sci* 2006; **1080**: 268-281.
- [19] Panikkath R, Reinier K, Uy-Evanado A, Teodorescu C, Hattenhauer J, Mariani R, et al. Prolonged Tpeak-to-tend interval on the resting ECG is associated with increased risk of sudden cardiac death. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2011; **4**: 441-447.
- [20] Rossi VA, Stoewhas AC, Camen G, Steffel J, Bloch KE, Stradling JR, et al. The effects of continuous positive airway pressure therapy withdrawal on cardiac repolarization: data from a randomized controlled trial. *Eur Heart J* 2012; **33**: 2206-2212.
- [21] Kilicaslan F, Tokatli A, Ozdag F, Uzun M, Uz O, Isilak Z, et al. Tp-e interval, Tp-e/QT ratio, and Tp-e/QTc ratio are prolonged in patients with moderate and severe obstructive sleep apnea. *Pacing Clin Electrophysiol* 2012; **35**: 966-972.
- [22] Rossi VA, Stradling JR, Kohler M. Effects of obstructive sleep apnoea on heart rhythm. *Eur Respir J* 2013; **41**: 1439-1451.
- [23] Sekiya S, Ichikawa S, Tsutsumi T, Harumi K. Distribution of action potential durations in the canine left ventricle. *Jpn Heart J* 1984; **25**: 181-194.
- [24] Wagner S, Maier LS, Bers DM. Role of sodium and calcium dysregulation in tachyarrhythmias in sudden cardiac death. *Circ Res* 2015; **116**: 1956-1970.

- [25] Beyar R, Sideman S. Left ventricular mechanics related to the local distribution of oxygen demand throughout the wall. *Circ Res* 1986; **58**: 664-677.
- [26] Hoffman JI. Determinants and prediction of transmural myocardial perfusion. *Circulation* 1978; **58**: 381-391.
- [27] Ter Keurs HE, Boyden PA. Calcium and arrhythmogenesis. *Physiol Rev* 2007; **87**: 457-506.
- [28] Li R, Wang Y, Yang Z, He Y, Zhao T, Fan M, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α regulates the expression of L-type voltage-dependent Ca²⁺ channels in PC12 cells under hypoxia. *Cell Stress Chaperones* 2015; **20**: 507-516.
- [29] Wang J, Weigand L, Lu W, Sylvester JT, Semenza GL, Shimoda LA. Hypoxia inducible factor 1 mediates hypoxia-induced TRPC expression and elevated intracellular Ca²⁺ in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Circ Res* 2006; **98**: 1528-1537.
- [30] Eder P, Molkentin JD. TRPC channels as effectors of cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2011; **108**: 265-272.

Figure titles and legends

Figure 1. Intermittent hypoxia (IH) enhances myocardial ischemia-related lethal ventricular arrhythmias. (A) Incidence of lethal arrhythmias occurring during myocardial ischemia in rats exposed to 14-days of normoxia (N) or IH. (B) Incidence of both reversible and irreversible ventricular fibrillation (VF) during ischemia. n=27 and 24 in N and IH groups, respectively. (C) Representative recording showing ischemia-induced SCD (irreversible VF) in a rat submitted to IH. The upper tracing represents arterial blood pressure (mmHg), and the lower tracing ECG lead II with characteristic ST-segment elevation (mV). (D) Incidence of VF occurring during a 30-min regional ischemia in isolated hearts of rats exposed to N or IH. n=24 and 29 in N and IH group, respectively. * p<0.05 vs. N. ** p<0.01 vs. N.

Figure 2. Intermittent hypoxia (IH) increases systemic and cardiac sympathetic nervous system activity. (A) Plasma norepinephrine levels in rats exposed to 14-days of normoxia (N) or IH. n=12 and 14 in N and IH groups, respectively. (B) Representative power analysis spectra of diastolic blood pressure variability after exposure to N (top) or IH (bottom). Low (LF) and high (HF) frequency bands of the spectra are highlighted in red and green, respectively. (C) LF component (normalized values, nu) and (D) LF/HF ratio obtained by frequency domain analysis of RR intervals and diastolic blood pressure in rats exposed to 14-days N or IH. n=8 and 6 in N and IH groups, respectively. Data are expressed as mean \pm SEM. * p<0.05 vs. N. ** p<0.01 vs. N.

Figure 3. Intermittent hypoxia (IH) promotes heterogeneity of ventricular repolarization, increases the transmural action potential gradient and alters the transmural expression of Ca²⁺ channels. (A) Typical ECG lead II recorded in anesthetized rats, with details of P wave, QRS complex, T wave, QT interval and Tpeak-Tend intervals. IH induced a significant increase in QTc **(B)** and Tpeak-Tend intervals (in milliseconds: ms) **(C)** compared to normoxia (N). n=14 per group. **(D)** IH exposure induced a significant increase in endocardial APD50, but not in epicardial APD50, compared to normoxia (N). n=10 and 9 in N and IH group, respectively. **(E)** Representative monophasic action potential (MAP) recording showing measurement of action potential duration at 50% (APD50) and 90% of repolarization. **(F)** Epicardial and **(G)** endocardial mRNA levels of Ca_v1.2 (*Cacnac1c*), Ca_v1.3 (*Cacnac1d*) and TRPC1/4/6 (*Trpc1/4/6*) in rats exposed to normoxia (N) or IH. n=6 per group.

Data are expressed as mean +/- SEM. * p<0.05 vs. N. ** p<0.01 vs. N. *** p<0.001 vs. N.

	N	IH	p value
Hematocrit (%)	47.3 ± 1.0	55.2 ± 1.9	<0.001
Arterial blood pressure (mmHg)			
Systolic pressure	144.9 ± 3.4	163.2 ± 5.0	<0.01
Diastolic pressure	108.7 ± 2.7	123.2 ± 2.9	<0.001
Mean pressure	120.8 ± 2.8	136.6 ± 3.4	<0.001
Heart rate (bpm)	405.4 ± 5.9	407.1 ± 10.3	0.878
RPP (bpm x mmHg)	58879 ± 1872	66510 ± 2661	<0.05

Table 1. Baseline hemodynamic parameters in rats exposed for 14 days to normoxia (N) or intermittent hypoxia (IH). n=20 and 15 in N and IH groups, respectively. Data are expressed as mean ± SEM. RPP: rate pressure product.

	N	IH	p value
RR interval			
Total power (ms ²)	2.76 ± 0.65	2.16 ± 0.48	0.506
LF power (ms ²)	0.03 ± 0.01	0.09 ± 0.03	0.059
HF power (ms ²)	2.64 ± 0.65	1.64 ± 0.28	0.213
LF power (nu)	1.60 ± 0.48	5.33 ± 1.89	<0.05
HF power (nu)	98.40 ± 0.48	94.67 ± 1.89	<0.05
LF/HF ratio	0.02 ± 0.01	0.06 ± 0.02	<0.05
Systolic blood pressure			
Total power (mmHg ²)	37.19 ± 4.94	23.94 ± 5.25	0.095
LF power (mmHg ²)	1.24 ± 0.33	2.06 ± 0.61	0.223
HF power (mmHg ²)	32.62 ± 4.68	16.45 ± 3.68	<0.05
LF power (nu)	3.81 ± 0.86	10.48 ± 2.24	<0.01
HF power (nu)	96.19 ± 0.86	89.52 ± 2.24	<0.01
LF/HF ratio	0.04 ± 0.09	0.12 ± 0.29	<0.02
Diastolic blood pressure			
Total power (mmHg ²)	7.46 ± 1.23	4.41 ± 0.72	0.073
LF power (mmHg ²)	0.46 ± 0.13	0.76 ± 0.19	0.195
HF power (mmHg ²)	5.95 ± 1.12	1.89 ± 0.45	<0.02
LF power (nu)	8.53 ± 2.19	29.17 ± 6.72	<0.01
HF power (nu)	91.47 ± 2.19	70.83 ± 6.72	<0.01
LF/HF ratio	0.10 ± 0.03	0.49 ± 0.16	<0.02

Table 2. Power spectral analysis of heart rate (RR interval) and of systolic and diastolic arterial blood pulse pressure variability in rats exposed for 14 days to normoxia (N) or intermittent hypoxia (IH). LF: low frequency; HF: high frequency; absolute (ms² and mmHg², respectively) and normalized (nu) values are presented. n=8 and 6 in N and IH groups, respectively. Data are expressed as mean ± SEM.

Figure 1

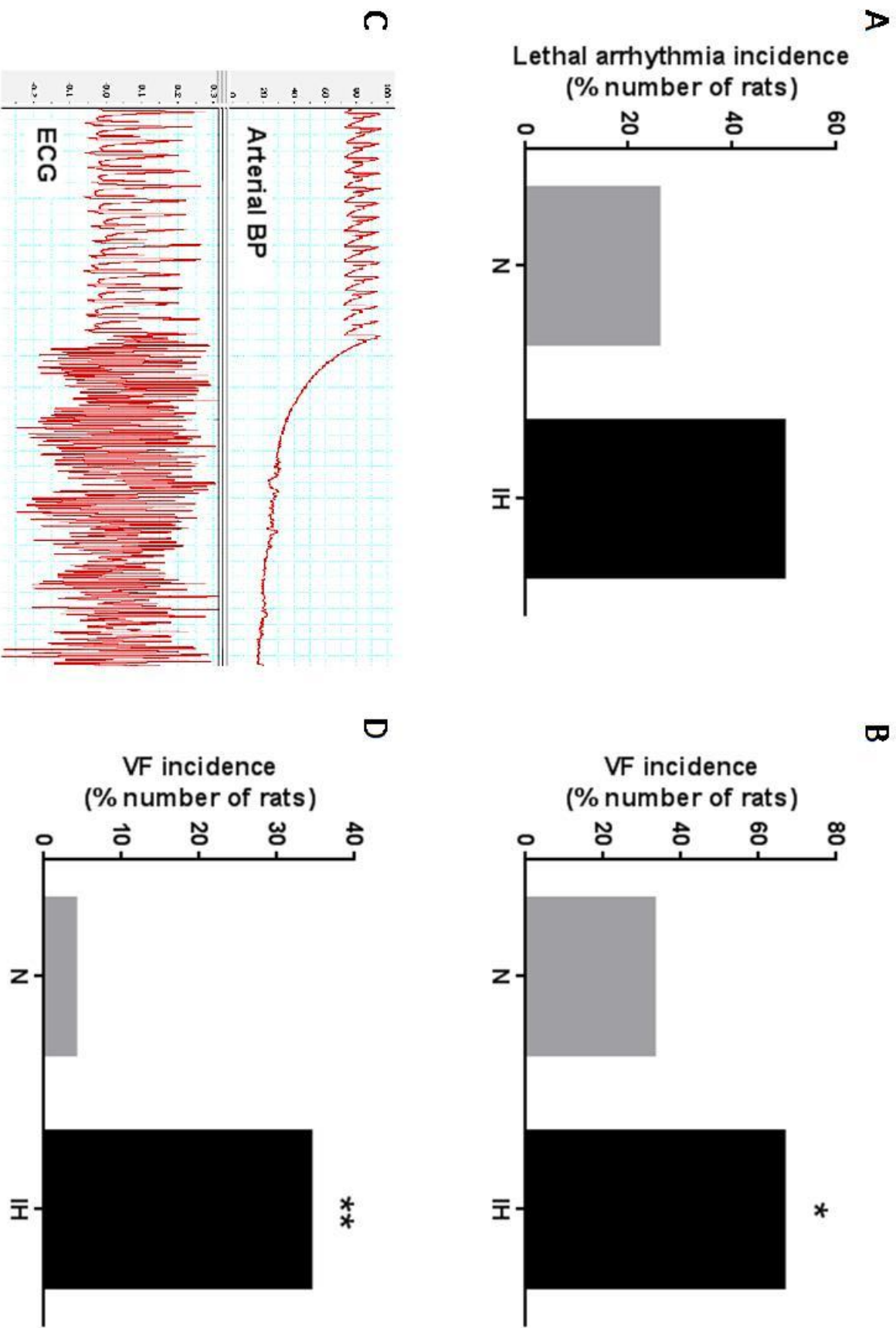


Figure 2

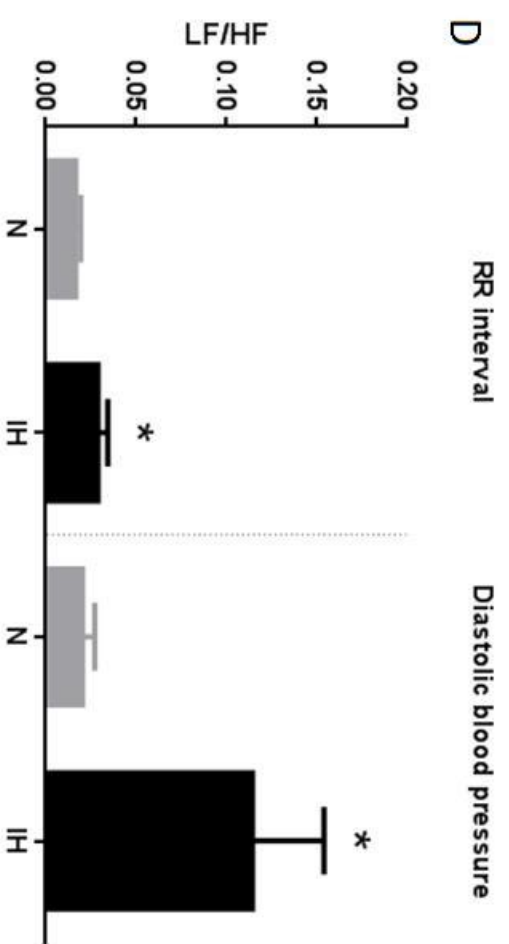
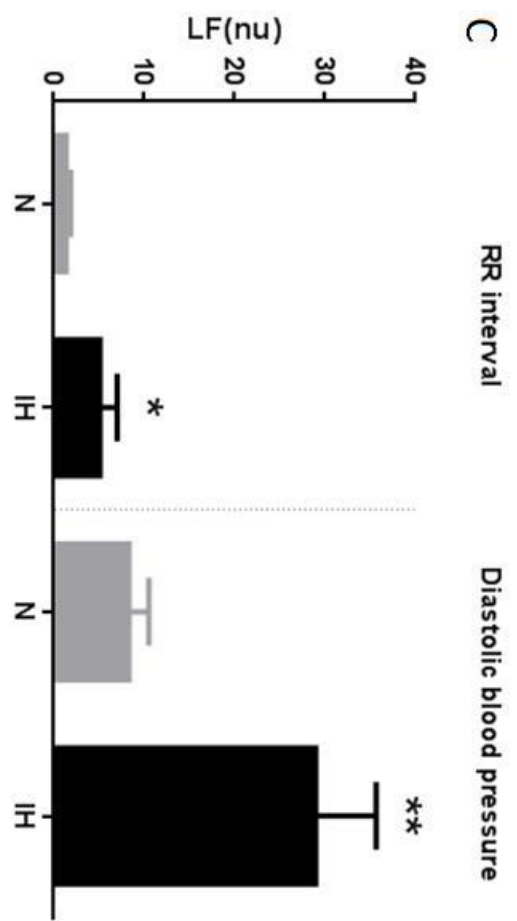
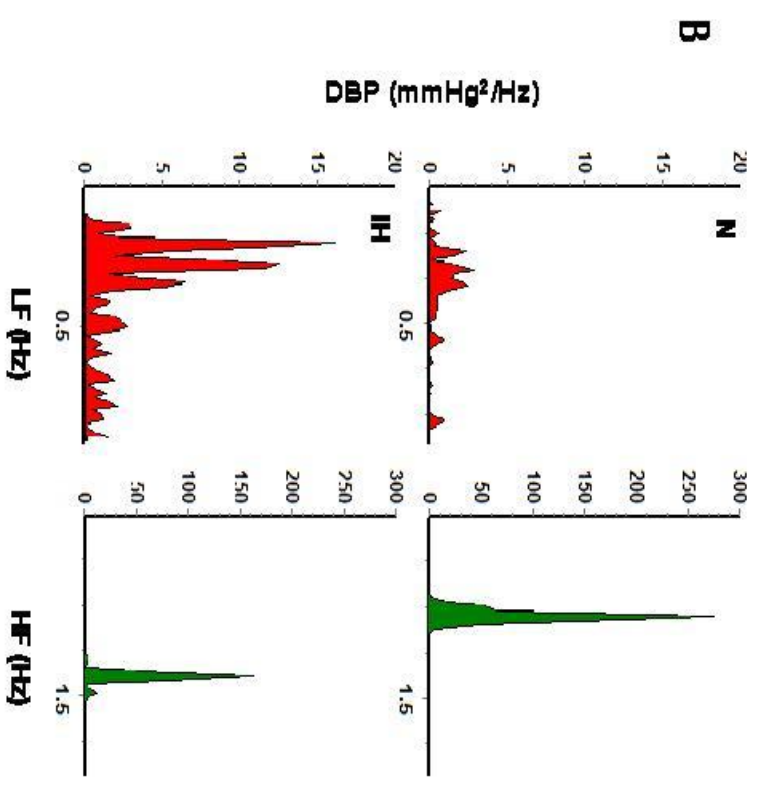
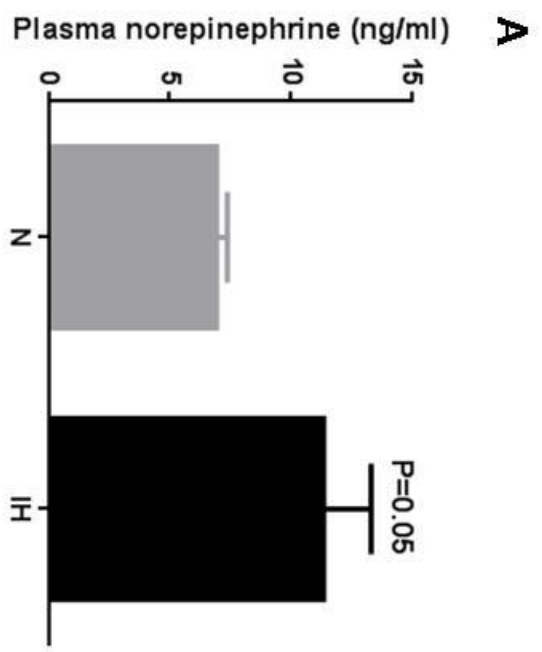
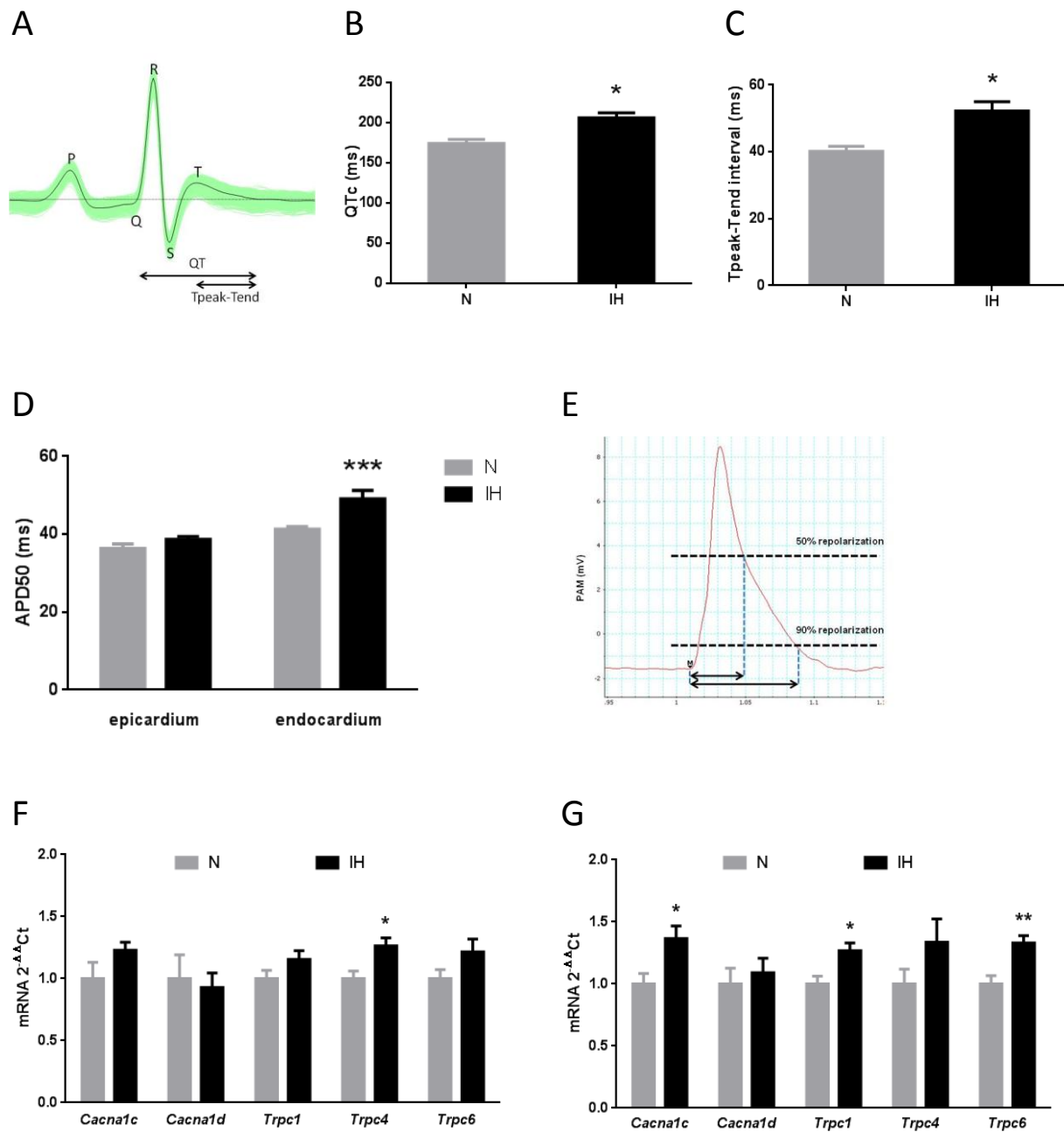


Figure 3



10.2. Résultats complémentaires : Impact du stress oxydant induit par l'HI sur l'activation sympathique et les altérations de la repolarisation ventriculaire

Le tempol est un piègeur de radicaux libres mimant l'activité de la SOD ce qui a pour conséquences de réduire la quantité d'anions superoxydes générés lors d'un stress oxydant et de prévenir leurs effets délétères (Manning et al. 2005). Ses effets bénéfiques au niveau vasculaire ont été démontrés dans plusieurs études. En effet, l'administration de tempol dans de nombreux modèles murins d'hypertension a permis de montrer qu'il diminue la quantité d'anions superoxydes vasculaires, améliore la vasodilatation dépendante du NO et réduit la pression artérielle (Simonsen et al. 2009). Dans le contexte du stress oxydant généré par l'exposition à l'HI, Troncoso Brindeiro et al. ont montré que le tempol, administré pendant 14 jours d'HI eucapnique, permettait d'abolir l'augmentation de la pression artérielle induite par l'HI (Troncoso Brindeiro et al. 2007). Nous avons par la suite montré que, pour une même durée d'exposition à l'HI et de traitement, le tempol diminue la production d'anions superoxyde dans le cœur et abolit l'augmentation de la taille d'infarctus causée par l'HI (Ramond et al. 2013).

Sur la base de ces observations, nous avons choisi d'utiliser le tempol pour évaluer la contribution du stress oxydant à l'activation sympathique et aux altérations de la repolarisation ventriculaire induites par l'HI.

Effets du tempol sur les paramètres hémodynamiques

Comme précédemment décrit dans la littérature (Ramond et al. 2013), nous avons observé que l'administration de tempol dans l'eau de boisson durant les 14 jours d'exposition à l'HI a des effets positifs sur les différents paramètres hémodynamiques mesurés à la fin de l'exposition. En effet, les animaux exposés à l'HI présentent une augmentation de la PAS, de la PAD et de la PAM comparés aux animaux exposés à la normoxie (N) ($p < 0,05$). L'administration de tempol entraîne une normalisation de la pression artérielle chez les animaux exposés à l'HI (Figure 15A, 15B et 15C). En revanche, le tempol ne prévient pas l'augmentation de l'hématocrite induite par l'HI (Figure 15E) ($p < 0,05$ vs. le groupe N contrôle) et n'a pas d'effet sur la fréquence cardiaque qui n'est pas modifiée par l'HI (Figure 15D). L'HI induit une augmentation de l'indice de Fulton (rapport du poids du ventricule droit sur celui du ventricule gauche + le septum) traduisant une hypertrophie ventriculaire droite ($p < 0,05$ vs. le groupe N contrôle) et cet effet est aboli par le tempol (Figure 15F).

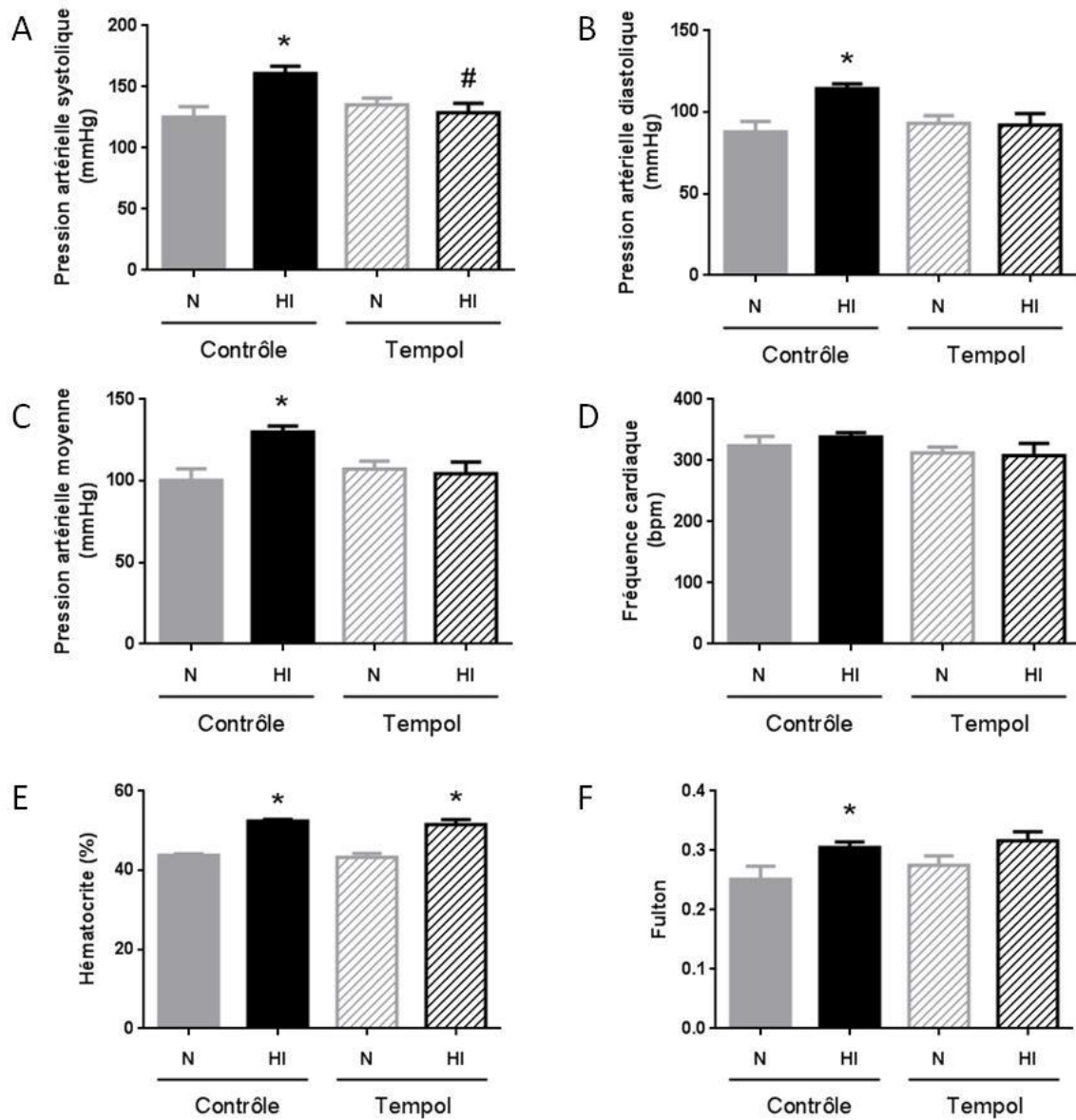


Figure 15 : Effet du tempol sur les altérations des paramètres hémodynamiques causées par l'HI.

Mesure de la pression artérielle systolique (A), diastolique (B) et moyenne (C), de la fréquence cardiaque (D), de l'hématocrite (E) et de l'indice de Fulton (F). Valeurs exprimées en moyenne \pm SEM (n=6). *p<0,05 vs. le groupe normoxique (N) contrôle, #p<0,05 vs. le groupe HI contrôle. Test non paramétrique de Kruskal-Wallis.

Effets du tempol sur l'activation sympathique évaluée par analyse spectrale

L'analyse spectrale de la fréquence cardiaque (intervalle RR) met en évidence une augmentation significative de la composante à basse fréquence des spectres (LF) (Figure 16A) et donc du rapport LF/HF (Figure 16B) chez les animaux exposés à l'HI (p<0,05 vs. le groupe N contrôle). L'administration de tempol n'a pas d'effet chez les animaux exposés à la N et n'abolit pas l'augmentation de LF et du rapport LF/HF chez ceux exposés à l'HI.

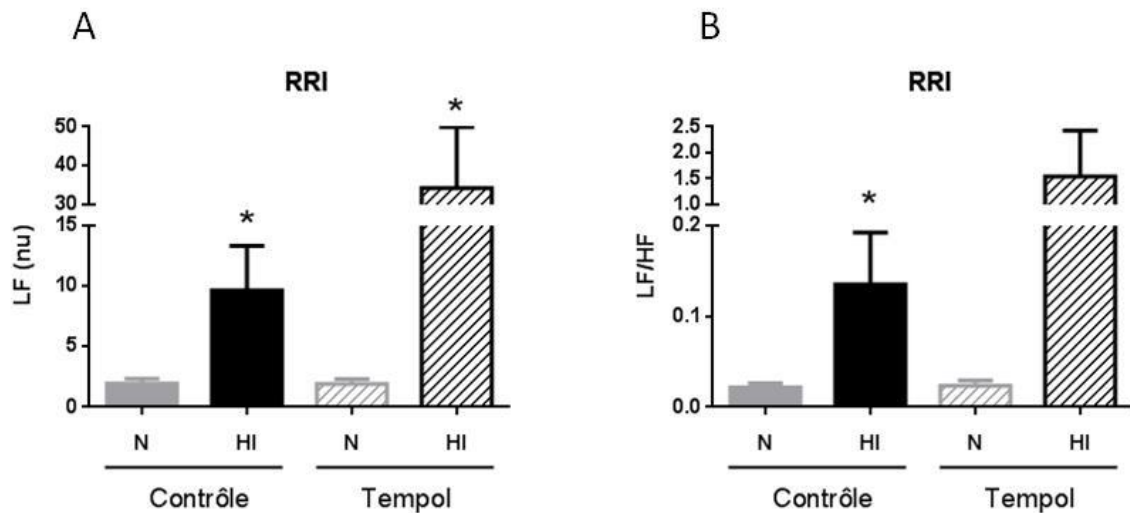


Figure 16 : Effet du tempol sur l'activation sympathique cardiaque induite par l'HI évaluée par analyse spectrale de la fréquence cardiaque (intervalle RR, RRI).

(A) Composante spectrale à basse fréquence (LF) exprimée en valeurs normalisées (nu). (B) Rapport LF/HF où HF représente la composante spectrale à haute fréquence. Valeurs exprimées en moyenne \pm SEM (n = 6). * p<0,05 vs. le groupe normoxique (N) contrôle. Test non paramétrique de Kruskal-Wallis.

Effets du tempol sur les altérations de la repolarisation ventriculaire

L'exposition à l'HI entraîne un allongement des intervalles QTc et Tpeak-Tend de l'électrocardiogramme (p<0,05 et p=0,067, respectivement, vs. le groupe N contrôle). L'administration de tempol abolit de façon significative l'allongement de ces 2 intervalles en réponse à l'HI (Figure 17A et 17B).

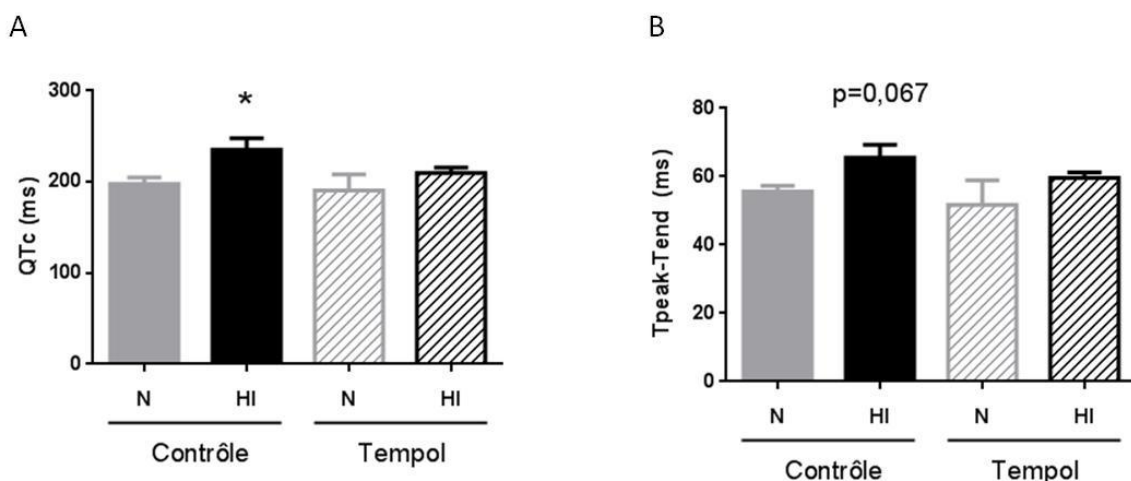


Figure 17 : Effet du tempol sur les altérations de la repolarisation ventriculaire induites par l'HI.

Le traitement au Tempol prévient l'allongement du QTc (A) et du Tpeak-Tend (B) après 14 jours d'exposition à l'HI. Valeurs exprimées en moyenne \pm SEM (n=5-6 par groupe). *p<0,05 vs. le groupe normoxique (N) contrôle. Test non paramétrique de Kruskal-Wallis.

11. PARTIE II : Homéostasie du zinc et atteintes myocardiques en réponse au stress oxydant

Le premier objectif de cette étude était d'observer les effets d'un stress oxydant aigu, l'ischémie-reperfusion, ou soutenu, l'HI chronique, sur l'homéostasie du zinc.

Puis, dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux effets cardioprotecteurs de la supplémentation en zinc dans divers contextes de stress oxydant.

Effet de l'ischémie et de la reperfusion sur l'homéostasie du zinc

Après 15 minutes d'ischémie régionale *ex-vivo* induite par ligature de l'artère coronaire gauche, nous n'observons pas de variation de la concentration en zinc total dans les effluents coronaires (vs. la valeur de stabilisation). En revanche, au cours des 30 premières secondes de la reperfusion, nous observons une augmentation significative de la concentration en zinc total dans les effluents coronaires qui atteint une valeur approximativement 1,75 fois plus élevée que celles mesurées à la stabilisation et à l'ischémie ($615,7 \pm 78,2$ nmol/L vs. $329,4 \pm 44,3$ nmol/L et $374,4 \pm 34,8$ nmol/L, respectivement, $p < 0,01$) (Figure 18).

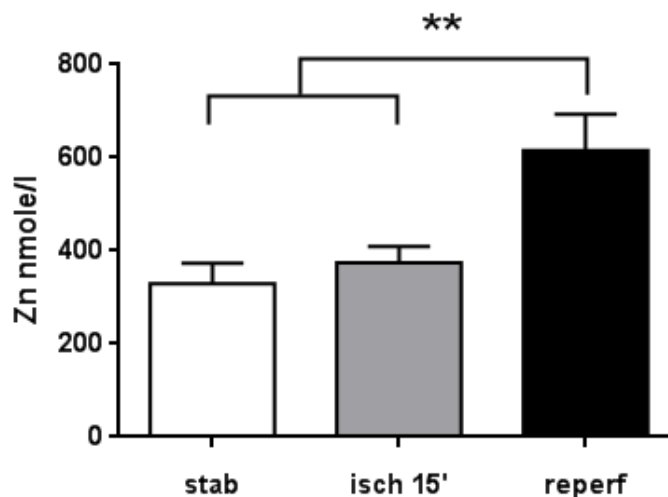


Figure 18 : Effet d'une I/R régionale sur les concentrations en zinc (Zn) total des effluents coronaires.

La reperfusion (reperf) entraîne une augmentation de la concentration en zinc total dans les effluents coronaires comparativement aux valeurs mesurées à la stabilisation (stab) et après 15 minutes d'ischémie (isch 15'). Valeurs exprimées en moyenne \pm SEM ($n=17$, 18 et 9 pour les groupes stab, isch 15' et reperf, respectivement). ** $p < 0,01$ vs. stab et isch 15'. ANOVA à une voie.

Effet de l'hypoxie intermittente sur l'homéostasie du zinc

L'exposition à l'HI pendant 14 jours ne suffit pas à altérer le taux plasmatique de zinc total. En revanche, nous constatons que lorsque l'on augmente la durée d'exposition à 35 jours nous observons une diminution significative du zinc plasmatique (Table 2).

En revanche, l'exposition à l'HI n'a pas d'impact sur les concentrations de zinc tissulaires, et ce quelque soit la durée d'exposition puisque nous observons que 14 ou 35 jours d'HI n'entraînent pas d'altération de l'homéostasie du zinc au niveau osseux, hépatique et myocardique (Table 2).

[zinc]	14 jours		35 jours	
	N	HI	N	HI
plasma (µmole/L)	11,66 ± 0,34	12,55 ± 0,38	13,01 ± 1,19	10,31 ± 0,53 *
Fémur (µg/g)	93,04 ± 5,31	93,73 ± 4,22	-	-
Foie (µg/g)	22,18 ± 0,48	21,96 ± 0,86	27,64 ± 1,10	26,30 ± 0,42
Cœur (µg/g)	-	-	15,09 ± 0,25	15,70 ± 0,21

Table 2 : Perturbations de l'homéostasie du zinc après des expositions à l'HI de 14 et 35 jours.

Au niveau plasmatique, seule une exposition de 35 jours entraîne une diminution des concentrations de zinc total. Ni 14, ni 35 jours n'altèrent les concentrations osseuses, hépatiques et myocardiques de zinc. Valeurs exprimées en moyenne ± SEM (n=7-8 pour les dosages plasmatiques, n=4 pour dosages osseux et n=7-8 pour les autres dosages). *p<0,05 vs. la valeur du groupe HI 14 jours. Test non paramétrique de Kruskal-Wallis.

Effets de la supplémentation en zinc sur un stress oxydant induit chimiquement par du peroxyde d'hydrogène

La perfusion de cœurs isolés avec du peroxyde d'hydrogène (0,375 mM) entraîne une diminution de la PDVG qui atteint environ 30% de sa valeur de base après 5 minutes de perfusion. Le débit coronaire est également diminué, mais de façon moins importante (Figure 19).

Parmi les différentes concentrations de zinc administrées, seule la concentration de 10^{-8} M semble avoir un effet bénéfique sur les altérations causées par le peroxyde d'hydrogène. En effet, à cette concentration, l'administration de zinc tend à améliorer la PDVG ($p = 0,051$) (Figure 19A). Concernant le DCo, les cœurs supplémentés en zinc récupèrent mieux que ceux ayant reçu du DMSO (Figure 19B).

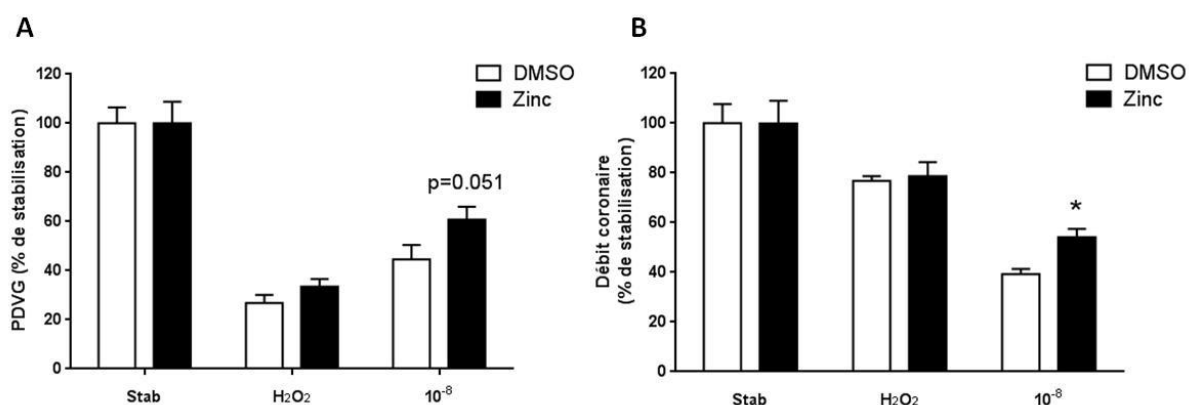


Figure 19 : Effets du zinc sur la récupération fonctionnelle après un stress oxydant induit chimiquement.

L'administration de zinc, à la concentration de 10^{-8} M, améliore la récupération fonctionnelle myocardique en termes de pression développée du ventricule gauche (PDVG) (A) et de débit coronaire (B) suite à un stress oxydant induit par une perfusion de 5 minutes de peroxyde d'hydrogène sur des cœurs isolés-perfusés de rats. Valeurs exprimées en moyenne \pm SEM (n = 4 à 7 par groupe). * $p < 0,05$ vs. la valeur du groupe DMSO 10^{-8} M. Test de Mann Whitney.

Effets de la supplémentation en zinc sur les arythmies d'ischémie-reperfusion

Les arythmies ont été analysées au cours des 10 premières minutes de reperfusion suite à une ischémie régionale *ex-vivo* de 15 minutes en présence de véhicule (sodium pyrithione) ou de zinc pyrithione à 1, 2 ou $3 \cdot 10^{-5}$ M. La concentration de $1 \cdot 10^{-5}$ M tend à augmenter et celle de $2 \cdot 10^{-5}$ M augmente de façon significative le temps passé en rythme sinusal, comparativement au groupe véhicule ($190,6 \pm 56,8$ secondes vs. $35,9 \pm 31,6$ secondes, respectivement) (Figure 20A). De plus, la reperfusion avec $1 \cdot 10^{-5}$ M et $2 \cdot 10^{-5}$ M de zinc diminue de façon significative la durée des arythmies ventriculaires sévères telles que la TV et la FV (Figure 20B). En revanche, l'administration d'une concentration plus importante de zinc ($3 \cdot 10^{-5}$ M) à la reperfusion n'a pas d'effet protecteur tant sur le temps passé en rythme sinusal que sur la durée des arythmies (Figure 20A et 20B). L'effet protecteur du zinc à l'égard des arythmies peut également être apprécié en termes de survie, caractérisée par un retour en rythme sinusal. A la dose de $2 \cdot 10^{-5}$ M, le zinc augmente significativement le nombre de cœurs en rythme sinusal à 5 minutes de reperfusion (7/17 cœurs) comparativement aux cœurs reperfusés avec le véhicule (1/17 cœurs) (Figure 21A) et cet effet tend fortement à persister à 10 minutes de reperfusion (6/17 cœurs) (Figure 21B).

Les effets antiarythmiques du zinc sont associés à une amélioration très nette de la récupération fonctionnelle en termes de PDVG et de débit coronaire. En effet, les 3 concentrations de zinc augmentent significativement le débit coronaire à 5 et 10 minutes de reperfusion (Figure 22A et 22B). Concernant la PDVG, la concentration de zinc à $1 \cdot 10^{-5}$ M tend à améliorer et celle de $2 \cdot 10^{-5}$ M de zinc améliore de façon significative la récupération myocardique en termes de contraction, alors que la concentration de $3 \cdot 10^{-5}$ M est sans effet (Figure 22C et 22D).

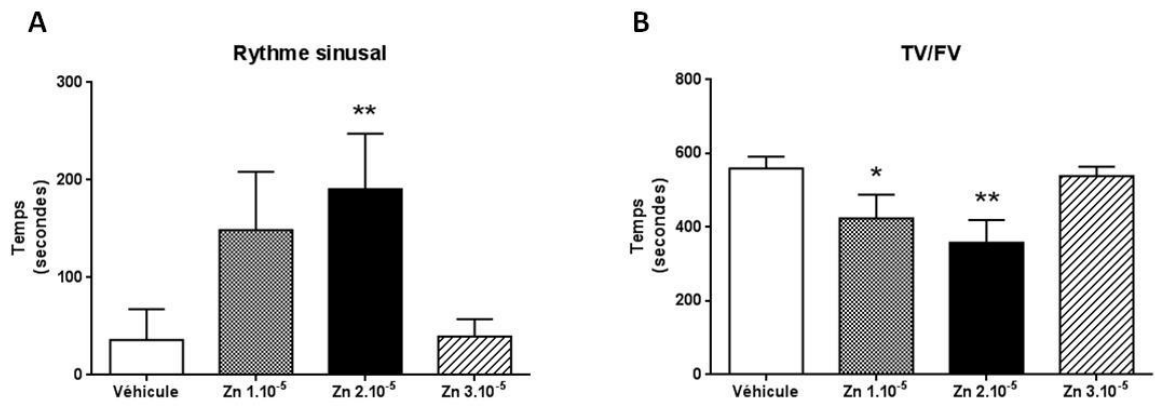


Figure 20 : Effet de la supplémentation en zinc pendant la reperfusion sur la survenue des arythmies au cours des 10 premières minutes de reperfusion.

Le temps passé en rythme sinusal (A) ou en tachycardie et fibrillation ventriculaire (TV/FV) (B) est mesuré en secondes. Valeurs exprimées en moyenne \pm SEM (n=15 ou 17 par groupe). *p<0,05 et **p<0,01 vs. véhicule. Test non paramétrique de Kruskal Wallis.

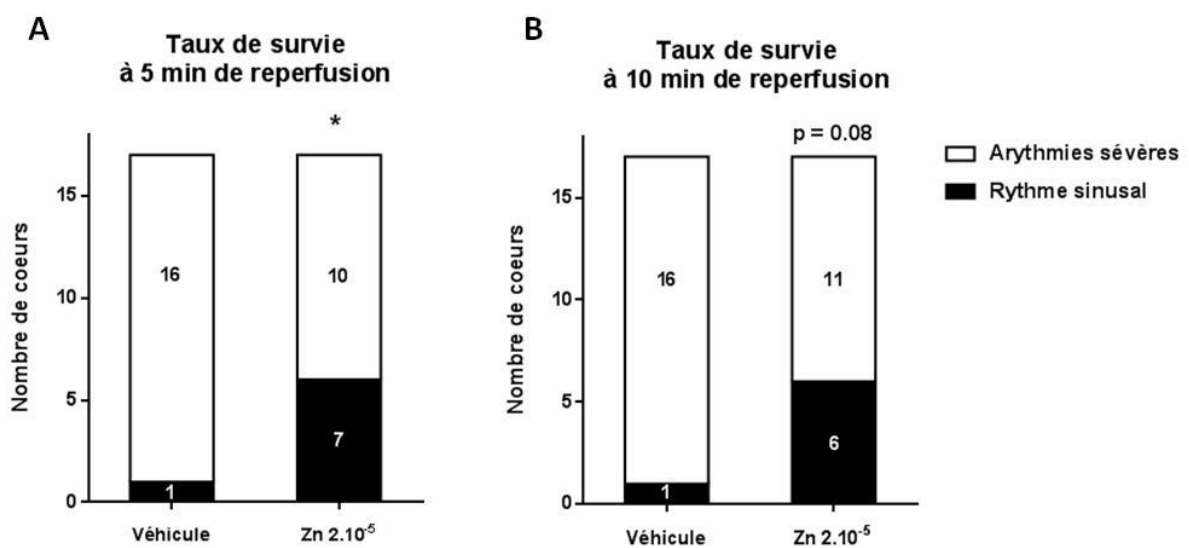


Figure 21 : Effet de la supplémentation en zinc pendant la reperfusion sur la survie.

La survie est exprimée par la proportion de cœurs en rythme sinusal vs. ceux présentant des arythmies sévères (TV/FV) après 5 minutes (A) et 10 minutes (B) de reperfusion. (n=17 par groupe). *p<0,05 vs. véhicule. Test exact de Fisher.

Effets de la supplémentation en zinc sur l'augmentation de la taille d'infarctus induite par l'hypoxie intermittente

Conformément aux résultats du laboratoire, la taille d'infarctus des cœurs isolés et perfusés avec du véhicule est augmentée chez les animaux exposés 14 jours à l'HI par rapport au groupe N ($43,9 \pm 4,1$ % vs. $29,2 \pm 4,3$ %, respectivement). L'addition de zinc ($2 \cdot 10^{-5}$ M) dans le Krebs durant les 120 minutes de reperfusion permet d'abolir l'augmentation de la taille d'infarctus induite par l'HI ($33,0 \pm 5,4$ % vs. $26,3 \pm 2,7$ % dans les groupes HI et N, respectivement) (Figure 25).

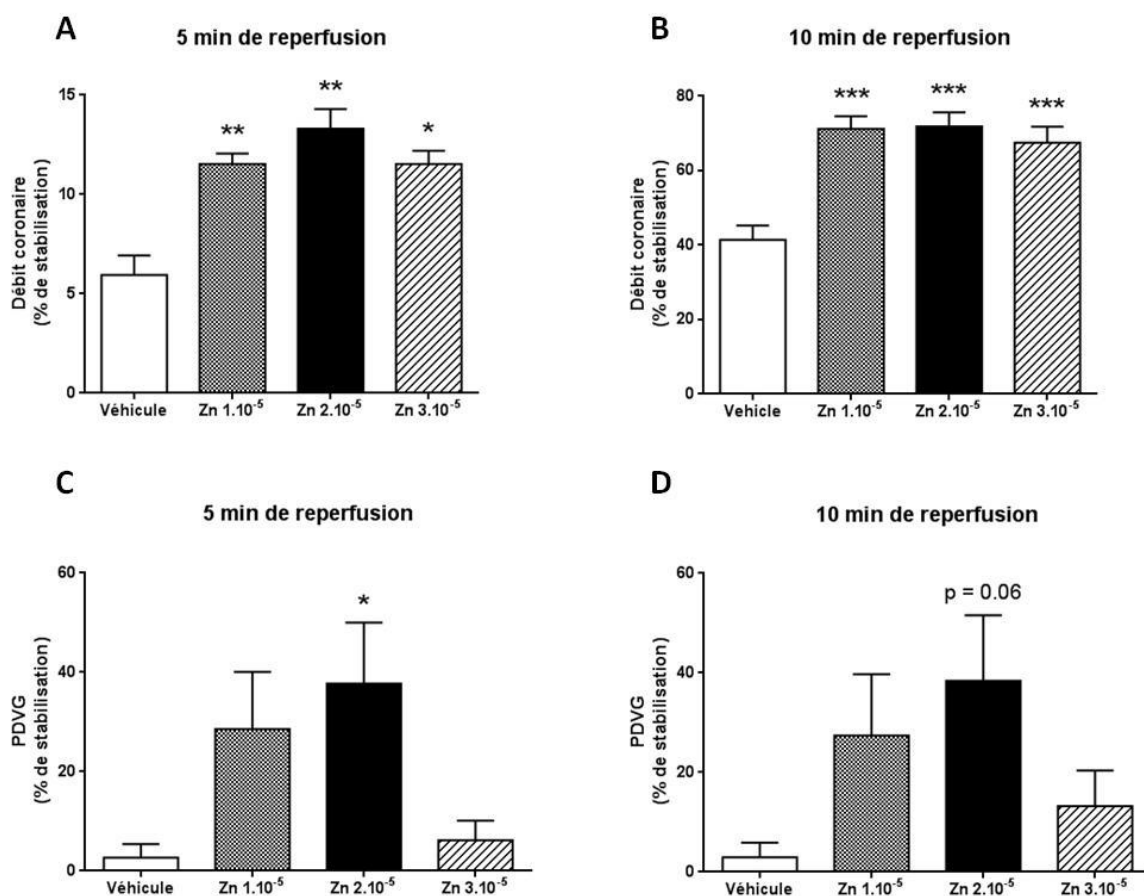


Figure 22 : Effet de la supplémentation en zinc pendant la reperfusion sur la récupération fonctionnelle post-ischémique.

Débit coronaire après 5 minutes (A) et 10 minutes de reperfusion (B); pression développée par le ventricule gauche (PDVG) après 5 minutes (C) et 10 minutes de reperfusion (D). Valeurs exprimées en moyenne \pm SEM (n=15 ou 17 par groupe). *p<0,05, **p<0,01 et ***p<0,001 vs. véhicule. Tests non paramétriques de Kruskal Wallis hormis pour le débit coronaire à 10 minutes de reperfusion (ANOVA à une voie).

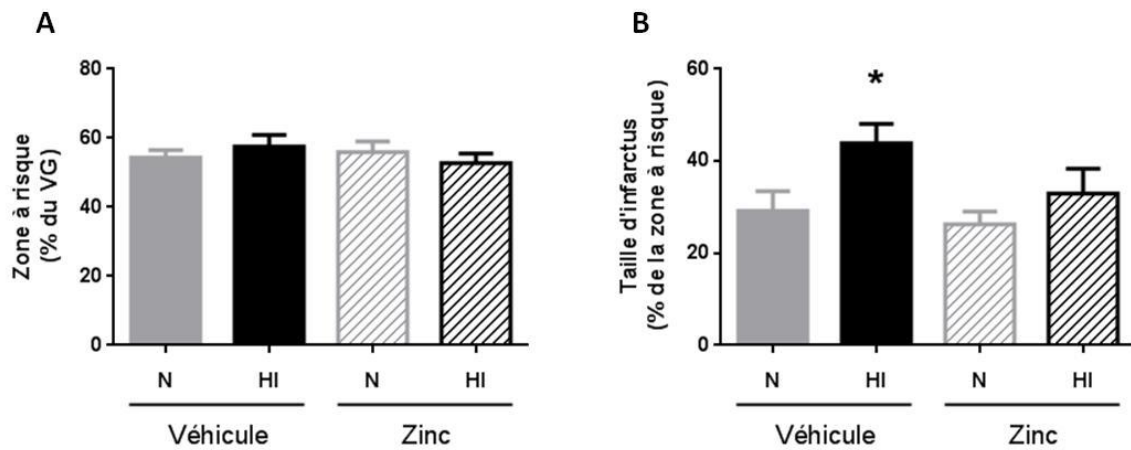


Figure 23 : Effet de la supplémentation en zinc ($2.10^{-5}M$) pendant la reperfusion sur la taille d'infarctus sur des cœurs d'animaux exposés à la normoxie (N) ou à HI pendant 14 jours.

A. Taille de la zone à risque (en % de celle du ventricule gauche, VG) générée par la ligature coronaire. **B.** Taille d'infarctus suite à une ischémie régionale de 30 minutes suivie de 120 minutes de reperfusion. Valeurs exprimées en moyenne \pm SEM (n=9-13 par groupe). * $p < 0,05$ vs. le groupe N correspondant. ANOVA à deux voies.

12.PARTIE III : Article 2 : Zinc deficiency up-regulates ET-1 mediated signaling through HIF-1 expression affecting endothelial cell migration

Au vu de la déplétion en zinc induite par l'exposition à l'hypoxie intermittente et des effets bénéfiques de sa supplémentation dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse d'un lien éventuel entre les perturbations de l'homéostasie du zinc et l'activation de l'axe HIF-1-ET-1.

Nous nous sommes donc intéressés aux effets d'une déplétion en zinc, induite chimiquement grâce à un chélateur spécifique, le TPEN, sur l'activation de cet axe dans des cellules endothéliales humaines (Karagulova et al. 2007). L'utilisation des cellules endothéliales présente ici un double intérêt. Tout d'abord, comme mentionné dans la partie II ci-dessus, ce sont les concentrations plasmatiques de zinc qui diminuent en réponse à l'HI. D'autre part, à l'échelle de l'organisme, c'est au niveau artériel que sont mesurées les plus grosses variations de SpO₂ chez des rongeurs exposés à l'HI (Reinke et al. 2011). Ainsi, hypothétiquement, ce sont les cellules endothéliales qui sont le plus exposées aux variations de concentration en zinc et en oxygène en réponse à l'HI. De plus, elles sont responsables de la sécrétion d'ET-1, gène-cible de HIF-1, jouant un rôle majeur dans l'hypertension artérielle (Yanagisawa et al. 1988; Kanagy et al. 2001) et l'aggravation de la taille d'infarctus (Belaidi JACC 2009) induites par l'HI.

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence que la déplétion en zinc par le TPEN induisait une translocation nucléaire de HIF-1 α et une sécrétion d'ET-1 avec, comme conséquence fonctionnelle, une accélération de la migration cellulaire sous le contrôle de l'axe HIF-1-ET-1.

Zinc deficiency up-regulates ET-1 mediated signaling through HIF-1 expression affecting endothelial cell migration

Jessica Morand^{1,2#}, Anne Briançon-Marjollet^{1,2#}, Emeline Lemarie^{1,2}, Josiane Arnaud^{4,5}, Irina Korichneva^{3*} and Diane Godin-Ribuot^{1,2 *†}

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

² INSERM, U1042, Grenoble, F-38042 France

³ University of Picardie Jules Verne, EA 4667, Laboratory of Cell and Molecular Physiology, Amiens, F-80000 France

⁴ CHUGA, Biochimie Hormonale et nutritionnelle, Grenoble, F-38043 France

⁵ INSERM, U1055, Grenoble, F-38000 France

These authors contributed equally to this work

* Co-senior authors

Financial support: Cible grant from the Région Rhône-Alpes, Lyon, France (JM and DGR); Agir Pour les Maladies Chroniques grant, Grenoble, France (DGR)

† Corresponding author at:

Laboratoire HP2, Inserm U1042,
Faculté de Médecine de Grenoble, BP 170,
38042 Grenoble Cedex 9, France.

Tel: +33 476 63 75 63

Fax: +33 476 63 71 78

e-mail address: diane.ribuot@univ-grenoble-alpes.fr

Abstract

Background and objective. Zinc is an important trace element regulating numerous physiological processes, particularly in conditions of oxidative stress. Amongst its various structural, catalytic and regulatory properties, zinc affects the expression and function of numerous transcription factors, including hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). HIF-1 and its target gene endothelin-1 (ET-1) are activated by intermittent hypoxia (IH), one of the main consequences of obstructive sleep apnea (OSA) syndrome, and they play a key role in the cardiovascular consequences of IH. Since OSA and IH induce oxidative stress and are associated with zinc deficiency, the main objective of this study was to investigate the effect of zinc deficiency on the HIF-1-ET-1 axis and to observe its functional consequences on endothelial cells.

Methods. Primary human microvascular endothelial cells (HMVECs) were incubated with sub-micromolar doses of a zinc-specific membrane-permeable chelator N,N,N',N'-tetrakis (2- pyridylmethyl) ethylene diamine (TPEN, 0.5 μ M) or ET-1 (0.01 μ M) with or without bosentan, an antagonist of ET-1 receptors. HIF-1 α was silenced by transfection with specific siRNA. Wound healing capacity of HMVECs was evaluated *in vitro* with a scratch assay.

Results. Zinc chelation by TPEN exposure induced the translocation of the cytosolic HIF-1 α subunit of HIF-1 to the nucleus as well as an HIF-mediated ET-1 secretion by HMVECs. Incubation with both TPEN and ET-1 increased endothelial wound-healing capacity. Bosentan and HIF-1 α silencing abolished this effect.

Conclusion. Altogether, the results suggest that zinc deficiency up-regulates ET-1 signaling through HIF-1 activation and stimulates endothelial cell migration suggesting a role for zinc in the activation of the HIF-1-ET-1 axis and its deleterious consequences in IH and OSA.

Introduction

Zinc is an essential trace element that is vital for cell function as shown by the severe consequences of zinc deficiency [1]. More specifically, zinc deficiency has been linked to various diseases associated with endothelial cell migration and defective angiogenesis such as atherosclerosis, pulmonary hypertension [2] or cancer [3]. The mechanisms by which zinc may affect endothelial cell function are multifaceted since it has structural, catalytic, signaling and regulatory properties [4]. Zinc binding or release from zinc-containing proteins can modulate their activity, as shown for protein kinase C [5], matrix metalloproteinases [6], or multiple transcription factors [4]. Moreover, zinc can regulate the activity of transcription factors that do not contain structural zinc. Hence, zinc depletion has been shown to increase the activity of NF- κ B and AP-1 leading to proinflammatory effects such as enhanced endothelial cell permeability and adhesion to monocytes [7] but also to increased expression of pro-angiogenic molecules such as VEGF, IL-8 and MMP9 by cancer cells [8].

Another transcription factor well known to play a role in normal and defective angiogenesis is HIF-1, the hypoxia sensitive transcription factor first identified in the 90's by Semenza, Kaelin, and Ratcliffe [9]. HIF-1 is a heterodimer consisting of an oxygen-sensitive HIF-1 α subunit and a constitutive HIF-1 β subunit. In well-oxygenated cells, proline hydroxylation of the HIF-1 α subunit by oxygen-dependent prolyl-hydroxylase enzymes (PHDs) leads to its proteasomal degradation. In hypoxic conditions, PHDs activity is reduced leading to HIF-1 α stabilization, translocation to the nucleus and dimerisation with the HIF- 1 β subunit leading to transcription of several angiogenic genes such as placental growth factor, TGF- β 1 an, VEGF [9].

The link between zinc homeostasis and HIF-1 regulation is suggested by the fact that the HIF-1 pathway plays a major role in diseases associated with zinc deficiency, such as atherosclerosis, pulmonary hypertension and cancer [9]. Although direct experimental evidence is scarce, zinc supplementation has been shown to promote HIF-1 α degradation and decrease expression of VEGF [10] and zinc deficiency to inhibit HIF-1 α ubiquitination and induce VEGF expression [11] in cancer cells.

Zinc deficiency is observed in obstructive sleep apnea (OSA) syndrome [12], a well known risk factor for cardiovascular disease and cancer [13], and OSA patients exhibit increased tissue expression of HIF-1 [14] and of plasma levels of HIF-1 gene products involved in endothelial dysfunction and angiogenesis such as VEGF [15] and endothelin-1 (ET-1) [16]. We have shown that HIF-1 activation and ET-1 expression are major contributors to the vascular remodeling and enhanced atherosclerosis induced by exposure to chronic intermittent hypoxia, a hallmark of OSA [17]. Interestingly, we also observed that IH exposure induces a significant decrease in plasma zinc levels (see supplementary data for details).

The present study was thus designed to investigate the effects of zinc deficiency on the HIF-1-endothelin pathway and its functional consequences in terms of endothelial cell migration. Using human microvascular endothelial cells we demonstrate that zinc deficiency caused by specific zinc chelation promotes HIF-1 translocation to the nucleus leading to HIF-1-dependent ET-1 secretion and endothelial cell migration.

Methods

Endothelial cells

Primary human adult dermal microvascular endothelial cells (HMVEC-D) (Lonza) were cultured in EGM2-MV according to the supplier's recommendations. The cells were used between passages 4 and 8.

Immunofluorescence

Cells cultured on fibronectin-coated glass slides ($1.5\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, Sigma) in 24-well dishes were exposed to vehicle (DMSO 0.05%) or to the membrane-permeable zinc chelator N,N,N',N'-tetrakis (2- pyridylmethyl) ethylene diamine (TPEN, 0.5 μM in DMSO 0.05%, Fluka Analytical) for 2 and 5 hours. They were then fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilised in PBS-0.1% Triton. HIF-1 α primary antibody (1:100, AbCam) and secondary antibody (Alexa Fluor® 546, 1:500, Invitrogen) were incubated at 37°C for 60 and 45 minutes, respectively. Dapi ($0.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) was incubated during 10 min at room temperature. Slides were assembled with fluorescence mounting medium (Dako) and analyzed by fluorescence microscopy (Axiolmager, Zeiss) or by confocal microscopy (LSM710, Zeiss). The quantification of nuclei/cytosol HIF-1 ratio was performed using ImageJ (NIH) image processing software. Positive control of HIF-1 translocation was performed using cells incubated with 200 μM of the hypoxia-mimetic agent cobalt chloride (CoCl_2 , Sigma).

HIF-1 α gene silencing by small interfering RNA (siRNA)

HMVEC were transfected with 20nM of scrambled siRNA coupled to fluorescein (Santa Cruz) or with 20nM of a pool of 3 target-specific siRNAs directed against

HIF-1 α (Santa Cruz). In accordance, transfected cells are referred to as control and HIF-1 α -neg, respectively. Transfection was performed when confluence achieved approximately 70% using TransIT-TKO (Mirus) according to the supplier's recommendations. Transfection efficiency was assessed by determining HIF-1 protein expression using Western blot analysis.

Western blot analysis

Twenty-four to 48 hours after transfection, cultured cells were collected, centrifuged (1000 rpm, 5 min, 4°C) and stored at -80°C. Protein extraction was performed in RIPA buffer (50 mM Tris HCl pH 7.2, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% DOC, 0.1% SDS, 1 mM PMSF) with a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). Protein concentration of cytosolic extracts was determined using Pierce BCA protein assay kit (Thermo Scientific). A 9% SDS-PAGE gel was used for protein separation on 10 μ g of cytosolic extracts. After transfer to a nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences) and blocking in TBS-Tween 0.1% containing 5% dried milk, overnight incubation at 4°C was performed with primary antibodies under gentle agitation. Rabbit anti-HIF-1 α (Active Motif) and mouse anti- β -actin (Sigma) antibodies were used at 1:1000 dilution in TBS-tween 0.1% with 5% dried milk. HRP-coupled anti-rabbit (Santa Cruz) and anti-mouse (Sigma) secondary antibodies were used at 1:2500 dilution in TBS-tween 0.1% containing 5% dried milk. They were applied during 1h under gentle agitation at room temperature before ECL revelation (Thermo Scientific).

Wound healing experiments

HMVECs were seeded at $40 \cdot 10^3$ cells per well in 48-well dishes (Nunclon) to reach 100% confluence. After 24 h, a scratch was performed by crossing the wells from side to side with a sterile 10-100 μ l cone (Starlab, TipOne). Detached cells were removed by changing the culture medium. Non-transfected cells were incubated overnight with vehicle, 0.01 μ M ET-1 or 0.5 μ M TPEN with or without 1 μ M bosentan (graciously provided by Actelion Pharmaceuticals, Switzerland). Control or HIF-1 α -neg cells were seeded 24h after transfection and submitted to the same conditions. Wound reparation was recorded with a dynamic microscope (AxioVert 200M, Zeiss) equipped with temperature and CO₂ controls. Pictures were taken every 30 min during 16 hours under 10x magnification (Metamorph). Two positions per well were recorded. Size of filled areas was determined by subtracting that of cell-free areas at the end of the experiment from initial cell-free areas (Image J software). Filled areas values were normalized as percentages of control wells values.

Endothelin-1 assay

Endothelin-1 was measured in the culture medium of cells exposed to TPEN for 16h using an endothelin-1 ELISA kit (Enzo Life Sciences) according to the supplier's recommendations.

Statistical analysis

Data (expressed as mean \pm SEM) were analyzed using GraphPad Prism 6 Software (San Diego, California). Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

TPEN induces the nuclear translocation of HIF-1 α in HMVEC cells

Cell exposure to TPEN led to HIF-1 α translocation from cytosol to nucleus. Indeed, the nuclear/cytosolic HIF-1 α ratio was significantly increased after 5 hours of incubation with TPEN ($p < 0.05$ vs. vehicle-exposed cells) (Figure 1).

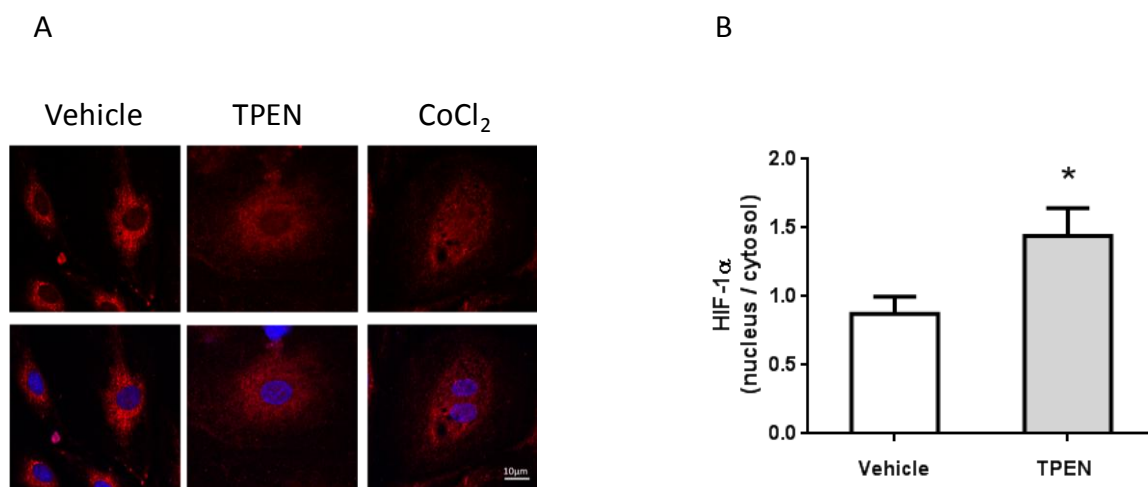


Figure 1: TPEN treatment induces HIF-1 α nuclear translocation in HMVEC cells.

A) Representative images showing HIF-1 α (red) and nuclear (Dapi, blue) staining in HMVEC cells treated for 5 hours with vehicle (DMSO 0.05%), TPEN (0.5 μ M) or CoCl₂ (200 μ M) as a positive control. B) Quantification of the HIF-1 α nucleus/cytosolic ratio, normalized to vehicle-treated cells. N=4 experiments * $p = 0.045$ vs. vehicle-treated cells at 5h, Kruskal Wallis rank sum test.

TPEN promotes endothelin secretion by HMVEC cells in a HIF-1-dependent manner

ET-1 levels were increased by 28.5% in supernatant of cells exposed to TPEN for 16h compared to those of vehicle-exposed cells ($p < 0.05$). Moreover, HIF-1 α downregulation prevented the effect of TPEN on ET-1 secretion (Figure 2).

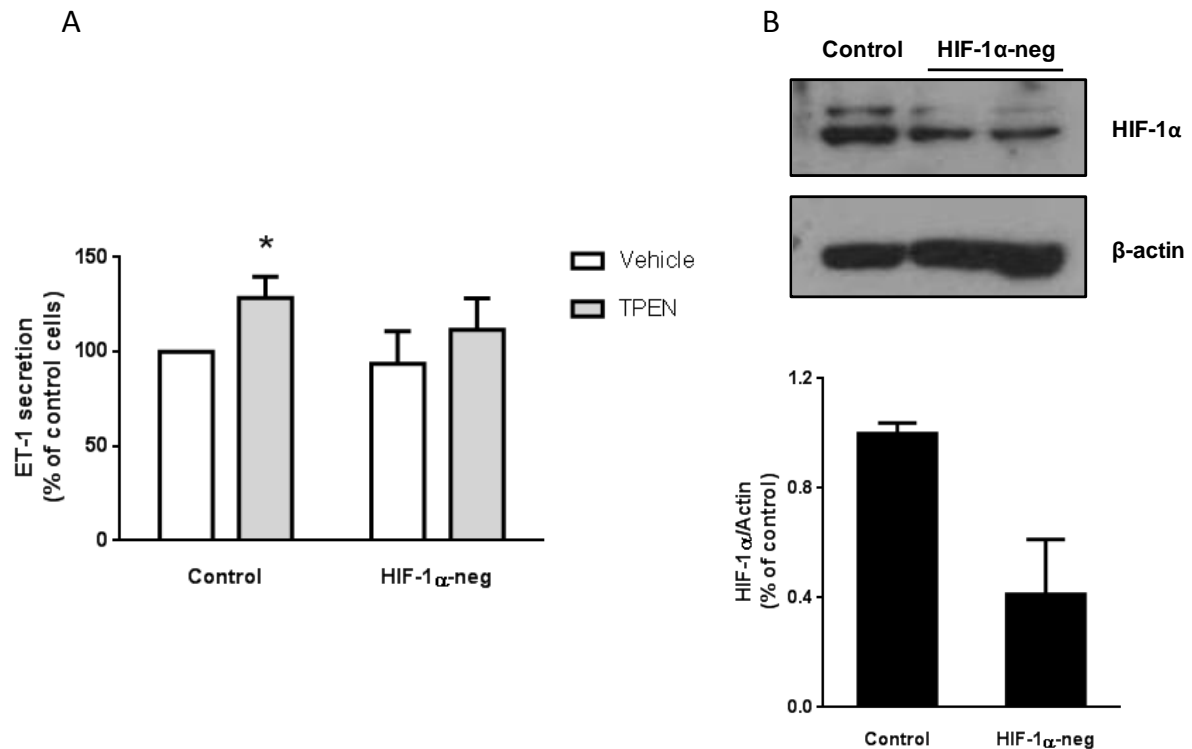


Figure 2: TPEN treatment triggers HIF-1 α -dependent ET-1 secretion by HMVEC cells. A) Effect of TPEN (0.5 μ M) on ET-1 secretion measured in culture medium of HMVEC cells transfected with scrambled (Control) or anti-HIF-1 α (HIF-1 α -neg) siRNA. N=6 experiments. * $p=0.031$ vs. vehicle-treated cells, Wilcoxon-signed rank test. B) Representative Western blots and quantification of HIF-1 α expression after transfection with scrambled or anti-HIF-1 α siRNA. N=3 independent experiments.

Endothelin and TPEN promote wound healing

Wound healing was significantly increased when cells were cultured with either ET-1 or TPEN ($p < 0.05$). The effects of ET-1 and TPEN on cell migration were similar (26.8 and 26.1% increase, respectively). Finally, while bosentan *per se* did not affect wound healing, it prevented both ET-1-induced and TPEN-induced cell migration (Figure 3).

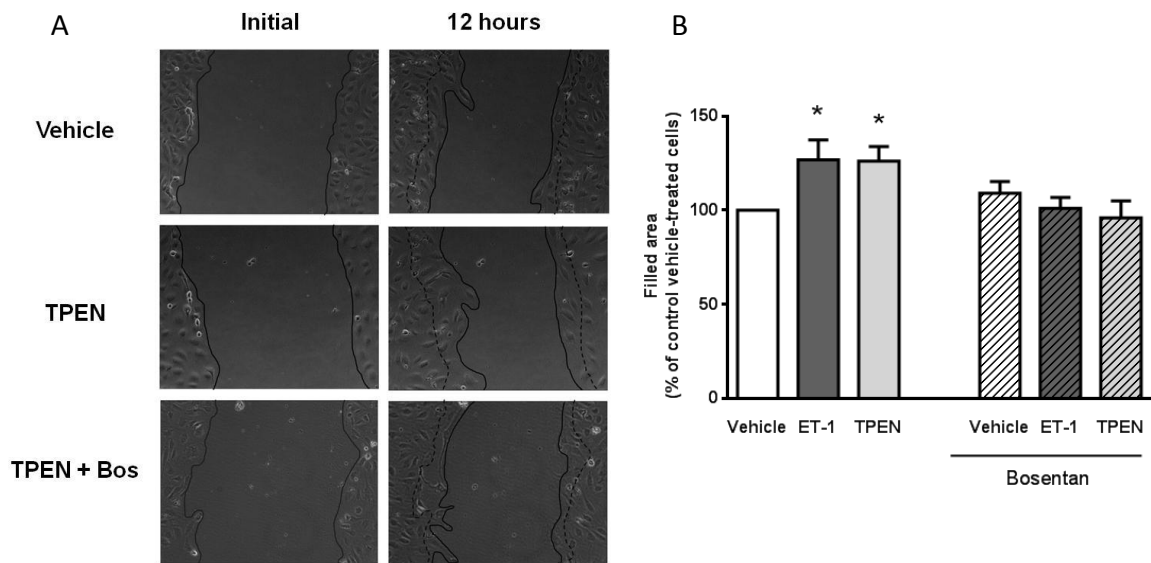


Figure 3: Endothelial cell wound closure is induced by ET-1 and TPEN and is abolished by bosentan. A) Representative pictures showing wound at t0 and wound closure after 12h for cells treated with vehicle, TPEN (0.05 μ M) or TPEN + bosentan (1 μ M). B) Quantification of wound healing normalized to control cells. N=minimum 5 experiments. * $p < 0.05$ vs. control cells, Wilcoxon signed rank test.

HIF-1 α gene silencing abolishes endothelin- and TPEN- induced wound healing

HIF-1 α downregulation by siRNAs transfection decreased wound healing by almost 40% compared to control cells ($p < 0.05$) and significantly abolished the cell migrating effects of ET-1 and TPEN ($p < 0.05$) (Figure 4).

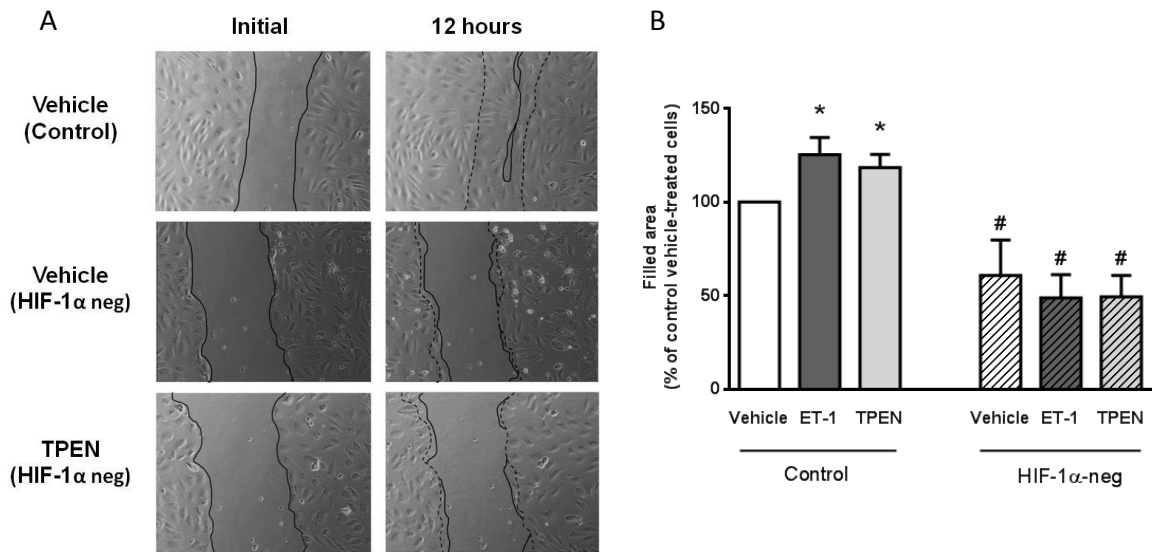


Figure 4: Endothelial cell wound closure induced by TPEN is HIF-1 α -dependent

A) Representative pictures showing initial wound at t0 and wound closure after 12h for cells transfected with anti-HIF-1 α siRNA and treated with TPEN (0.5 μ M).

B) Quantification of wound healing normalized to control cells. N=minimum 3 experiments. * $p < 0.05$ vs. control cells, Wilcoxon signed rank test, and # $p < 0.05$ vs. corresponding control cells, two-way ANOVA.

Discussion

The present study provides evidence that zinc deficiency promotes the activation of the HIF-1-endothelin axis resulting in increased migration of endothelial cells.

Translocation of the HIF-1 α sub-unit from the cytosol to the nucleus is necessary for the activation of HIF-1 and transcription of its target genes [9]. We have shown that zinc chelation by TPEN rapidly induces a nuclear translocation of HIF-1 α in HMVECs confirming that zinc signaling is involved in the regulation of HIF-1 activity in endothelial cells. Studies in cancer cells have identified some of the mechanisms behind this regulation. Hence, Choi et al. showed that zinc chelation stabilizes HIF-1 α by inhibiting its ubiquitination and by preventing the inhibitory hydroxylation of its Asp⁸⁰³ residue by FIH-1 [11]. In accordance, Nardinocchi et al. observed that zinc supplementation decreases cytosolic HIF-1 α levels by promoting its proteasomal degradation [10]. In both studies, modulation of cytosolic HIF-1 α levels was accompanied by changes in transcriptional activity of its target genes. Our study, however, is the first to confirm that stabilization of HIF-1 α by zinc chelation effectively induces its translocation to the nucleus.

Dimerization of HIF-1 α with HIF-1 β in the nucleus, along with recruitment of transcriptional co-activators, leads to HIF-1 DNA binding and transcription of numerous genes such as erythropoietin, VEGF and ET-1 [17]. In our study, TPEN-induced HIF-1 α translocation was accompanied by increased transcriptional activity since it induced an increase in ET-1 secretion that was abolished by HIF-1 α silencing. HIF-1 α down-regulation did not affect baseline ET-1 secretion by HMVECS since HIF-1 is not involved in the transcriptional control of ET-1 synthesis in standard conditions [18].

In order to evaluate the functional consequences of the increased ET-1 secretion in response to TPEN, we analyzed cell migration capacity using wound-healing scratch assays. Data showed that TPEN as well as ET-1 accelerated wound closure suggestive of increased cell migration capacity and thus of an enhanced angiogenic process [19]. Wound-healing capacity of cultured cells can be influenced by cell migration but also by cell proliferation. However, since primary HMVEC have a very slow proliferation rate and since the wound healing effects of TPEN or ET-1 appeared very rapidly, we can deduce that they were primarily due to cell migration.

While the effects of ET-1 on endothelial cell migration [20] and angiogenesis [18] are well known, our data are the first to show that zinc deficiency has similar actions. Furthermore, the effects of both ET-1 and zinc deficiency were blocked by the dual endothelin receptor antagonist, bosentan, confirming that ET-1 release by TPEN is responsible for its effects endothelial cell migration.

HIF-1 α silencing abolished TPEN-induced wound healing along with ET-1 secretion confirming that activation of the HIF-1-ET-1 axis by zinc chelation is responsible for the enhanced cell migration. Interestingly, HIF-1 α silencing also abolished ET-1-induced wound healing. In fact, there is a cross talk between HIF-1 and ET-1. Hence, ET-1 has been shown to reduce PHD2 activity and to enhance HIF-1 α synthesis and stability in various cell types including endothelial cells [21], thus promoting its secretion in a HIF-1 dependent feed-forward mechanism.

Finally, the increased HIF-1 activity induced by ET-1 could also promote cell migration through increased transcription of other HIF-1-dependent angiogenic factors such as VEGF [9]. In accordance, we recently showed that VEGF promotes wound healing in HMVEC [22].

In summary, although the exact mechanism whereby zinc regulates HIF-1 activity remains to be elucidated, the results of this study demonstrate that zinc deficiency promotes the HIF-1-endothelin axis associated with endothelial activation. Additional investigations are mandatory to evaluate whether disturbance of zinc homeostasis could explain HIF-1 activation in oxidative-stress related conditions such as IH and OSA.

References

- [1] C.T. Chasapis, A.C. Loutsidou, C.A. Spiliopoulou, M.E. Stefanidou, Zinc and human health: an update, *Archives of toxicology* 86(4) (2012) 521-34.
- [2] C.S. Lim, S. Kiriakidis, A. Sandison, E.M. Paleolog, A.H. Davies, Hypoxia-inducible factor pathway and diseases of the vascular wall, *Journal of vascular surgery* 58(1) (2013) 219-30.
- [3] A.S. Prasad, F.W. Beck, D.C. Snell, O. Kucuk, Zinc in cancer prevention, *Nutrition and cancer* 61(6) (2009) 879-87.
- [4] W. Maret, Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life, *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)* 4(1) (2013) 82-91.
- [5] I. Korichneva, B. Hoyos, R. Chua, E. Levi, U. Hammerling, Zinc release from protein kinase C as the common event during activation by lipid second messenger or reactive oxygen, *J Biol Chem* 277(46) (2002) 44327-31.
- [6] C. Piperi, A.G. Papavassiliou, Molecular mechanisms regulating matrix metalloproteinases, *Current topics in medicinal chemistry* 12(10) (2012) 1095-112.
- [7] V.L. Bodiga, S.P. Inapurapu, P.K. Vemuri, M.R. Kudle, S. Bodiga, Intracellular zinc status influences cisplatin-induced endothelial permeability through modulation of PKC α , NF- κ B and ICAM-1 expression, *European journal of pharmacology* 791 (2016) 355-368.
- [8] R.G. Uzzo, P.L. Crispen, K. Golovine, P. Makhov, E.M. Horwitz, V.M. Kolenko, Diverse effects of zinc on NF- κ B and AP-1 transcription factors: implications for prostate cancer progression, *Carcinogenesis* 27(10) (2006) 1980-90.
- [9] J.H. Hurst, William Kaelin, Peter Ratcliffe, and Gregg Semenza receive the 2016 Albert Lasker Basic Medical Research Award, *The Journal of clinical investigation* 126(10) (2016) 3628-3638.
- [10] L. Nardinocchi, V. Pantisano, R. Puca, M. Porru, A. Aiello, A. Grasselli, C. Leonetti, M. Safran, G. Rechavi, D. Givol, A. Farsetti, G. D'Orazi, Zinc downregulates HIF-1 α and inhibits its activity in tumor cells in vitro and in vivo, *PLoS One* 5(12) (2010) e15048.

- [11] S.M. Choi, K.O. Choi, Y.K. Park, H. Cho, E.G. Yang, H. Park, Clioquinol, a Cu(II)/Zn(II) chelator, inhibits both ubiquitination and asparagine hydroxylation of hypoxia-inducible factor-1alpha, leading to expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin in normoxic cells, *J Biol Chem* 281(45) (2006) 34056-63.
- [12] P.C. Chen, C.H. Guo, C.J. Tseng, K.C. Wang, P.J. Liu, Blood trace minerals concentrations and oxidative stress in patients with obstructive sleep apnea, *The journal of nutrition, health & aging* 17(8) (2013) 639-44.
- [13] P. Levy, D. Godin-Ribuot, J.L. Pepin, Sleep apnoea and cancer: the new challenge, *The European respiratory journal* 43(6) (2014) 1567-70.
- [14] E. Kaczmarek, J.P. Bakker, D.N. Clarke, E. Csizmadia, O. Kocher, A. Veves, F. Tecilazich, C.P. O'Donnell, C. Ferran, A. Malhotra, Molecular biomarkers of vascular dysfunction in obstructive sleep apnea, *PLoS One* 8(7) (2013) e70559.
- [15] L. Lavie, H. Kraiczi, A. Hefetz, H. Ghandour, A. Perelman, J. Hedner, P. Lavie, Plasma vascular endothelial growth factor in sleep apnea syndrome: effects of nasal continuous positive air pressure treatment, *American journal of respiratory and critical care medicine* 165(12) (2002) 1624-8.
- [16] P.H. Gjørup, L. Sadauskiene, J. Wessels, O. Nyvad, B. Strunge, E.B. Pedersen, Abnormally increased endothelin-1 in plasma during the night in obstructive sleep apnea: relation to blood pressure and severity of disease, *American journal of hypertension* 20(1) (2007) 44-52.
- [17] E. Belaidi, J. Morand, E. Gras, J.L. Pepin, D. Godin-Ribuot, Targeting the ROS-HIF-1-endothelin axis as a therapeutic approach for the treatment of obstructive sleep apnea-related cardiovascular complications, *Pharmacology & therapeutics* 168 (2016) 1-11.
- [18] F. Rodriguez-Pascual, O. Busnadiego, D. Lagares, S. Lamas, Role of endothelin in the cardiovascular system, *Pharmacol Res* 63(6) (2011) 463-72.
- [19] L. Lamalice, F. Le Boeuf, J. Huot, Endothelial Cell Migration During Angiogenesis, *Circulation Research* 100(6) (2007) 782-794.
- [20] F. Spinella, V. Caprara, V. Di Castro, L. Rosano, R. Cianfrocca, P.G. Natali, A. Bagnato, Endothelin-1 induces the transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-3 and modulates cell migration and vasculogenic mimicry in melanoma cells, *J Mol Med (Berl)* 91(3) (2013) 395-405.
- [21] V. Caprara, S. Scappa, E. Garrafa, V. Di Castro, L. Rosano, A. Bagnato, F. Spinella, Endothelin-1 regulates hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha stability through prolyl hydroxylase domain 2 inhibition in human lymphatic endothelial cells, *Life Sci* 118(2) (2014) 185-90.
- [22] A. Briancon-Marjollet, M. Henri, J.L. Pepin, E. Lemarie, P. Levy, R. Tamisier, Altered in vitro endothelial repair and monocyte migration in obstructive sleep apnea: implication of VEGF and CRP, *Sleep* 37(11) (2014) 1825-32.

Zinc deficiency up-regulates ET-1 mediated signaling through HIF-1 expression affecting endothelial cell migration

Jessica Morand^{1,2#}, Anne Briançon-Marjollet^{1,2#}, Emeline Lemarie^{1,2}, Josiane Arnaud^{4,5}, Irina Korichneva^{3*} and Diane Godin-Ribuot^{1,2 *†}

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

² INSERM, U1042, Grenoble, F-38042 France

³ University of Picardie Jules Verne, EA 4667, Laboratory of Cell and Molecular Physiology, Amiens, F-80000 France

⁴ CHUGA, Biochimie Hormonale et nutritionnelle, Grenoble, F-38043 France

⁵ INSERM, U1055, Grenoble, F-38000 France

These authors contributed equally to this work

* Co-senior authors

Supplementary data and methods

Methods

Intermittent hypoxia exposure.

Male Wistar rats (8 weeks old, CERJ, France) were exposed to intermittent hypoxia (IH) for 14 and 35 days. Animals were exposed daily (8 h/day) to 1-min cycles of IH (30 sec at 21% and 30 sec at 5% FiO₂) or normoxia (N similar air-air cycles). At the end of N or IH exposure, animals were anesthetized with intraperitoneal injection of pentobarbital (50 mg.kg⁻¹) and venous blood was collected directly into the right

ventricle in heparinized tubes for trace element assay (BD Vacutainer). After centrifugation, plasma samples were conserved at -80°C.

Plasma and tissue zinc assay.

Zinc was determined using a quadrupole ICP-MS Thermo X serie II (Thermo Electron, Bremen, Germany) equipped with quartz impact bead spray chamber and concentric nebulizer. The Xt interface option was used. Liquid sample were diluted in nitric acid 1% (v/V) prior to analysis. Tissues were mineralized in nitric acid and then diluted 100 fold in decontaminated water prior to analysis. ^{64}Zn and ^{66}Zn were measured and ^{71}Ga was used as internal standard. An external standard calibration curve was generated using four calibration standards (0-120-600 and 1200 nmol/l). The mean of the two stable isotopes was used as final concentration. For tissue analysis, method accuracy was assessed by analyzing NIST standard reference material 1577b (bovine liver) at least at the beginning and end of the analytical run. The limits of detection and quantification were respectively 15.5 and 51.7 nmol/l. The between run precisions was 5.45%. The average bias was equal to 0.787%.

Results

Exposure to intermittent hypoxia alters plasma but not tissue total zinc levels

While plasma total zinc levels were not affected by a 14-day exposure to IH, they were significantly decreased in animals exposed to 35 days of IH (12.5 ± 0.4 vs. 10.3 ± 0.5 μM , respectively, $p=0.028$) (Table S1). Whatever its duration, IH exposure did not affect bone, liver or myocardial zinc homeostasis (Table S1).

Table S1

	14 days		35 days	
	N	IH	N	IH
plasma ($\mu\text{mole/L}$)	11.66 ± 0.34	12.55 ± 0.38	13.01 ± 1.19	10.31 ± 0.53 *

Plasma total zinc levels of rats exposed to normoxia (N) or chronic intermittent hypoxia (IH) for 14 and 35 days. * $p < 0,05$ vs. corresponding value at 14 days. Kruskal Wallis rank sum test.

DISCUSSION

13.PARTIE I : Rôle de l'hypoxie intermittente dans la survenue d'arythmies ventriculaires lors de l'ischémie myocardique et étude des mécanismes sous-jacents

13.1. Article 1 « Obstructive sleep apnea and the risk of sudden cardiac death: chronic intermittent hypoxia promotes myocardial ischemia-related ventricular arrhythmias »

Au cours de cette étude nous avons démontré que l'HI multipliait par 2 le risque de survenue d'arythmies ventriculaires sévères au cours de l'ischémie myocardique.

Parmi les mécanismes potentiellement impliqués, nous avons confirmé que l'HI induisait une activation sympathique cardiaque et systémique connue pour ses effets pro-arythmogènes dans un contexte d'ischémie-reperfusion (Di Diego et al. 2011; Brachmann et al. 2012).

Nous avons, pour la première fois, mis en évidence un allongement des intervalles QTc et Tpeak-Tend chez les animaux exposés à l'HI. Ces allongements sont en faveur d'une altération de la repolarisation ventriculaire et sont associés à un risque accru de mort subite (Moss 2006; Panikkath et al. 2011). Afin de mieux caractériser les altérations de la repolarisation induites par l'HI, nous avons réalisé des enregistrements de potentiels d'action monophasiques (PAM) sur des sites épicaux et endocaux adjacents. Nous avons ainsi observé que l'HI induisait un allongement plus important de la durée des PAM endocaux par rapport aux PAM épicaux, avec comme conséquence une augmentation du gradient transmural de repolarisation du ventricule gauche susceptible d'expliquer les modifications électrocardiographiques observées (Antzelevitch 2007). Ceci était accompagné d'une expression accrue des canaux calciques de type L et des canaux de type « transient receptor potential canonical » (TRPC) au niveau de l'endocarde.

Le myocarde est un tissu hétérogène et les caractéristiques électrophysiologiques de la paroi ventriculaire varient de l'épicarde à l'endocarde (Abd Allah et al. 2012). Ceci se manifeste par des morphologies et durées de PAM différentes qui peuvent s'expliquer par des différences de courants ioniques (Antzelevitch et al. 1991). Le gradient transmural ventriculaire peut ainsi être affecté par des variations de l'expression et/ou de l'activité des canaux ioniques.

13.1.1. HI et canaux calciques de type L

Puisque les PAM présentent un allongement de la phase précoce de la repolarisation indiqué par une augmentation de APD50, nous nous sommes intéressés à l'expression de canaux calciques jouant un rôle au cours de cette phase à savoir les canaux calciques de type L (LTCC). Egalement connus sous le nom de canaux sensibles aux dihydropyridines, ils appartiennent à la famille des canaux calciques voltage-dépendants à haut voltage et participent aux phénomènes de couplage excitation-contraction dans les cellules musculaires. Ils sont constitués de 4 sous-unités : α_1 , $\alpha_2\delta$, β et γ . C'est la

sous-unité α_1 qui, grâce à ses 4 domaines à 6 segments transmembranaires, va former le pore par lequel vont entrer les ions Ca^{2+} (Figure 24) (Catterall 1995; Gurkoff et al. 2013). Il existe différentes isoformes de cette sous-unité dont l'expression varie en fonction du tissu considéré : Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3 et Cav1.4. Au niveau du cœur, les isoformes Cav1.2 et 1.3 sont exprimées dans les cardiomyocytes ventriculaires ou atriaux et dans les cellules pacemaker, respectivement (Catterall 1995). Les LTCC cardiaques vont être responsables de la forme du potentiel d'action cardiaque, en particulier du plateau observé lors de la repolarisation puisqu'ils sont ouverts en réponse à la dépolarisation (Lipscombe et al. 2004). Ainsi, une augmentation de leur expression va promouvoir l'allongement du potentiel d'action cardiaque (Abd Allah et al. 2012). De plus, une activité trop importante de ces canaux va, à travers la surcharge calcique, fournir un terrain propice à la survenue de post-dépolarisations précoces et donc d'arythmies (Anderson 2004). Les LTCC présentent également un intérêt particulier dans le contexte de l'HI puisqu'ils sont sensibles au statut redox de la cellule et que le stress oxydant entraîne une augmentation de leur activité (Hool 2009). Finalement, l'expression des sous-unités α_1 de Cav1.2 et Cav1.3 est augmentée en réponse à l'hypoxie et ceci, de façon HIF-1 α dépendante (Li et al. 2015).

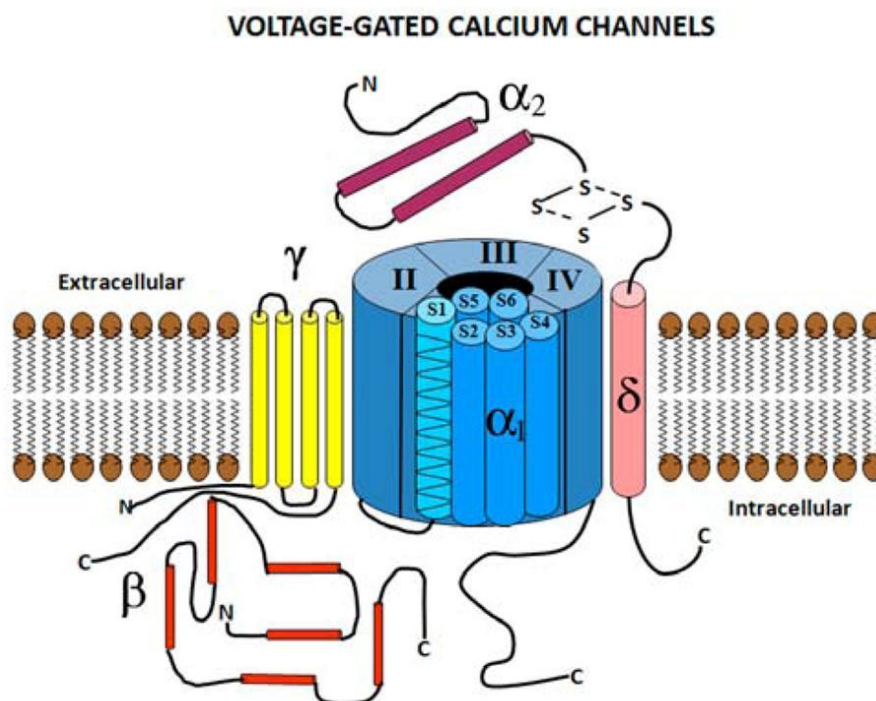


Figure 24 : Schéma illustrant les différentes sous-unités formant un canal calcique voltage-dépendant.

Les sous-unités formant le canal sont : α_1 constituant le pore par lequel le Ca^{2+} entre dans la cellule, $\alpha_2\delta$, β et γ . D'après Gurkoff et al. 2013

13.1.2. HI et canaux de type « transient receptor potential caconical »

En plus de promouvoir la survenue de post-dépolarisations précoces, la surcharge calcique augmente la probabilité d'ouverture des RyR provoquant ainsi des dépolarisations spontanées (Bers 2002). L'entrée de Ca^{2+} dans les cardiomyocytes peut avoir lieu par les canaux de type L mais également par des canaux cationiques non sélectifs tels que les TRPC, pour transient receptor potential caconical (Clapham et al. 2001). Ils sont exprimés dans de nombreux types cellulaires et comportent 7 isoformes (TRPC1 à TRPC7) (Ramsey et al. 2006). Les isoformes TRPC1, 3, 6 et 7 sont exprimées dans les cardiomyocytes, TRPC2 dans l'organe voméro-nasal, TRPC4 dans les cellules endothéliales et faiblement dans le cœur et TRPC5 dans le cerveau (Clapham et al. 2005; Rowell et al. 2010). Les TRPC sont des tétramères dont chaque sous-unité comporte 6 domaines transmembranaires (Figure 25) (Woudenberg-Vrenken et al. 2009). Ils sont activés en réponse à la stimulation d'un récepteur couplé à une protéine G et vont être activés directement par la phospholipase C ou par les produits de cette dernière, le diacylglycérol et l'inositol 3-phosphate (Eder et al. 2011).

Tout comme les LTCC, les TRPC présentent un intérêt particulier dans le cas de l'HI car une étude utilisant des souris partiellement délétées pour HIF-1 α a démontré que l'augmentation de l'expression de TRPC1 et TRPC6 induite par l'hypoxie chronique était médiée par HIF-1 α et entraînait une surcharge calcique (Wang et al. 2006). Ainsi, l'HI pourrait être à l'origine d'une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} via ces canaux constituant un substrat pour l'apparition de post-dépolarisations retardées causées par la fuite de Ca^{2+} du RS via les RyR. Ces fuites peuvent générer des vagues calciques conduisant à une dépolarisation progressive de la membrane qui, si elle est assez importante, va conduire à une contraction prématurée (Wagner et al. 2015) De plus, parmi les récepteurs couplés à une protéine G activant les TRPC figurent les récepteurs des catécholamines et de l'ET-1, dont l'expression est également augmentée par l'HI (Eder et al. 2011; Belaidi et al. 2016).

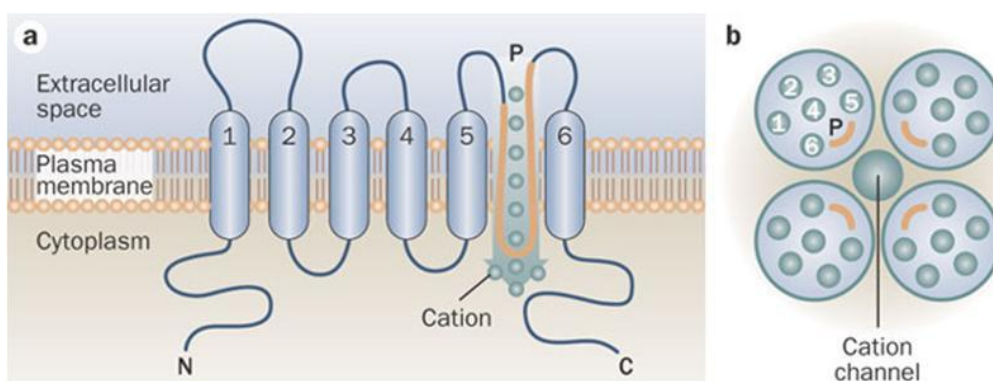


Figure 25 : Illustration représentant la structure des TRPC.

Schéma d'une sous-unité à 6 domaines transmembranaires (a) et formation d'un TRPC grâce à l'association de 4 sous-unités (b). D'après Woudenberg-Vrenken et al. 2009.

13.1.3. Perspectives

Dans cette étude, la relation entre l'activation sympathique causée par l'HI et l'incidence des arythmies ventriculaires n'est pas directement mise en évidence. Il serait intéressant d'exposer des animaux ayant subi une dénervation sympathique chimique induite par la 6-hydroxydopamine afin de confirmer l'implication de cette activation dans la survenue de ces arythmies (Fletcher et al. 1992). L'administration de β -bloquants, connus pour leurs effets bénéfiques dans ce contexte, permettrait également de confirmer cette implication de même que l'intérêt de leur administration chez les patients apnéiques à risque de maladie coronarienne (Zicha et al. 2006).

La sensibilité particulière de l'endocarde à l'HI pourrait s'expliquer par ses besoins en oxygène plus importants susceptibles d'entraîner une activation de HIF-1 et de ses gènes-cibles plus importante qu'à l'épicarde (Beyar et al. 1986). Cette hypothèse peut être vérifiée en analysant, sur des coupes de cœurs d'animaux exposés à la normoxie et à l'HI, le niveau d'hypoxie (par un marqueur tel que le pimonidazole) et de stress oxydant (par la DHE) dans l'épicarde et l'endocarde. Un marquage de HIF-1 et des canaux LTCC et TRPC tissulaires pourrait être effectué en parallèle de façon à pouvoir corréliser leur degré d'expression au niveau d'hypoxie et/ou de stress oxydant. Il serait aussi intéressant de regarder si l'HI, en plus d'augmenter l'expression de ces canaux, a un impact sur leur activité.

De plus, on ne peut exclure que l'HI puisse avoir un impact sur l'expression et/ou l'activité d'autres canaux ioniques jouant un rôle dans la durée du potentiel d'action cardiaque. Par exemple, il a été montré que l'expression des canaux Kv.4.3, qui sont responsables du courant potassique sortant (I_{to}) lent dans la première phase de repolarisation, diminuait dans les cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires prélevées sur des animaux exposés à une hypoxie chronique pendant 21 jours (Wang et al. 2005) ou exposés à 60-72h d'hypoxie in vitro (Platoshyn et al. 2001). Une diminution du courant I_{to} , conduisant à un allongement du PA, est retrouvée dans de nombreuses pathologies (Oudit et al. 2001).

Finalement, il serait intéressant d'explorer les perturbations de l'homéostasie calcique sur des cardiomyocytes isolés à partir de cœurs de rats exposés à la normoxie et à l'HI. Ceci permettrait de mettre en évidence l'impact de l'HI sur le contenu cytosolique et réticulaire en Ca^{2+} de même que sur la survenue de « sparks » et de « waves », issues du réticulum sarcoplasmique et source bien documentées d'arythmies (Ter Keurs et al. 2007).

D'un point de vue pharmacologique, puisqu'il y a une augmentation de l'expression des LTCC associée à un allongement de la durée du potentiel d'action, il serait intéressant de vérifier si un traitement par des antagonistes des canaux calciques permet de réduire cet allongement et donc, les altérations de la repolarisation ventriculaire à l'origine des arythmies. Parmi les antagonistes des canaux calciques, le diltiazem et le vérapamil représentent deux molécules intéressantes au vu de leurs effets prépondérants sur le cœur (Catterall et al. 2005; Sueta et al. 2017).

Pour conclure, l'ensemble des résultats et des mécanismes mis en évidence dans cette étude, ainsi que les perspectives thérapeutiques ciblées qu'ils ouvrent pour les patients apnéiques à risque de maladie coronarienne sont résumés dans la figure 26.

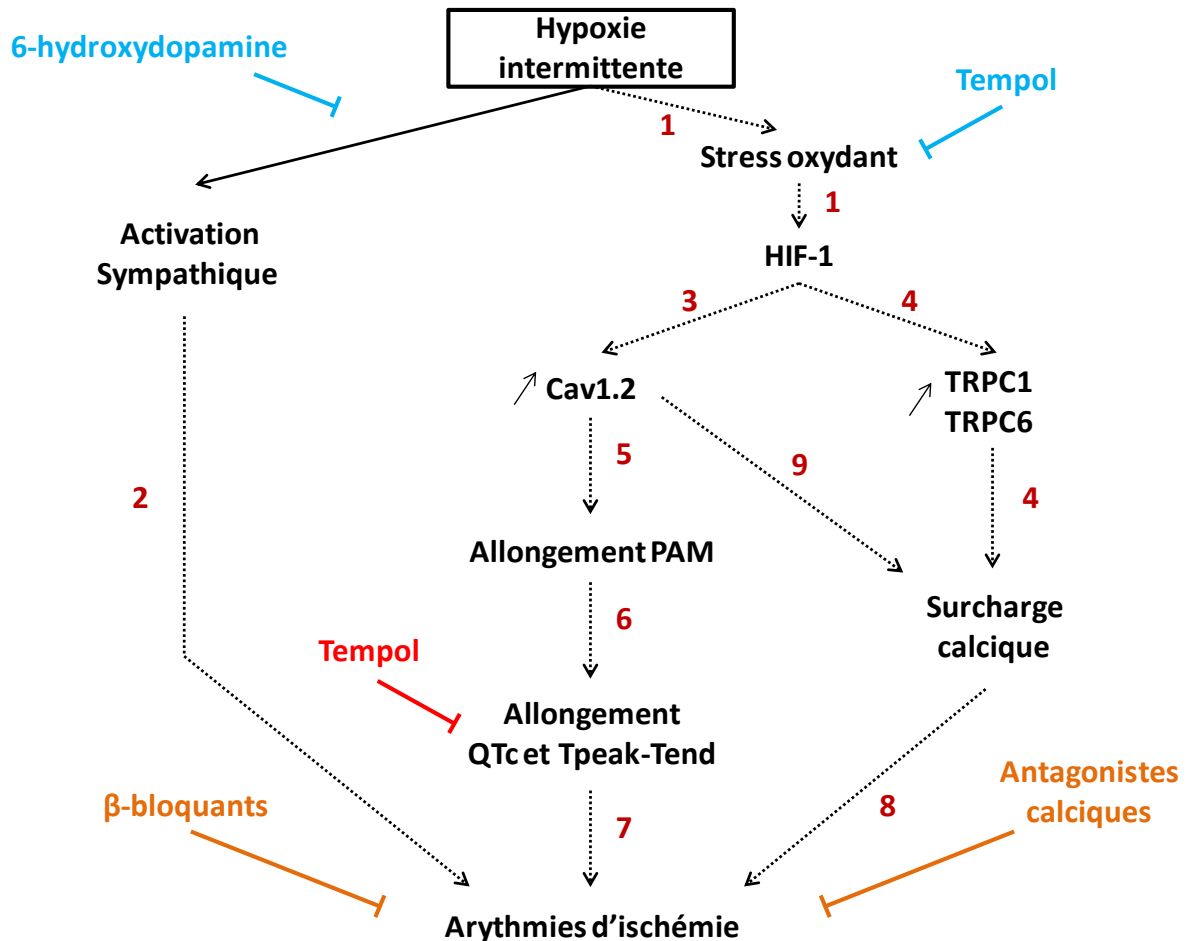


Figure 26 : Schéma récapitulatif des résultats et des perspectives de la PARTIE I.

En bleu sont représentés les outils pharmacologiques qui permettraient de mettre en évidence les mécanismes impliqués. En orange sont représentées les perspectives thérapeutiques potentielles. **1** : Yuan et al. 2008 ; **2** : Dematteis et al. 2009 ; **3** : Li et al. 2005 ; **4** : Wang et al. 2006 ; **5** : Abd Allah et al. 2012 ; **6** : Moss et al. 2006 ; Panikkath et al. 2011 ; **7** : Antzelevitch et al. 2007 ; **8** : Wagner et al. 2015 ; **9** : Anderson et al. 2004.

13.2. Résultats complémentaires : Impact du stress oxydant induit par l'HI sur l'activation sympathique et les altérations de la repolarisation ventriculaire

13.2.1. Stress oxydant et altérations cardiovasculaires induites par l'HI

13.2.1.1. Hypertension artérielle

Dans un premier temps nous avons confirmé l'effet bénéfique du tempol sur la pression artérielle moyenne, systolique et diastolique lorsqu'il est administré durant les 14 jours d'exposition à l'HI.

Comme mentionné précédemment, ces résultats ont déjà fait l'objet de publications, y compris par notre équipe (Troncoso Brindeiro et al. 2007; Ramond et al. 2013). Parmi les mécanismes permettant d'expliquer l'effet protecteur du tempol vis-à-vis de l'hypertension induite par l'HI figure l'amélioration de la réponse vasodilatatrice des vaisseaux. En effet, plusieurs études ont montré que le tempol améliorait la vasodilatation endothélium-dépendante altérée par l'HI (Simonsen et al. 2009; Totoson et al. 2013). De plus, une étude récente du laboratoire a montré que le traitement par le tempol pendant l'HI permettait de prévenir l'augmentation de la réponse contractile à l'ET-1 au niveau des artères ophtalmiques de rats exposés à 14 jours d'HI (Mentek et al., soumis au Journal of Physiology).

13.2.1.2. Remodelage cardiaque : hypertrophie ventriculaire droite

En plus des atteintes vasculaires que nous venons de mentionner, l'exposition à 14 jours d'HI entraîne une augmentation de l'index de Fulton, reflet du développement d'une hypertrophie ventriculaire droite en réponse à l'HI. Diverses études sur des modèles murins d'exposition à l'HI ont permis de démontrer que cette hypertrophie était associée à une hypertension pulmonaire (McGuire et al. 2001; Campen et al. 2005). Chez l'Homme, le lien entre SAOS et hypertrophie ventriculaire et/ou hypertension pulmonaire est plus discuté et selon les études, entre 10 à 40% des patients apnéiques présentent une hypertension pulmonaire (Guarnieri et al. 1980; Sajkov et al. 2009; Javaheri et al. 2013). Concernant l'hypertrophie ventriculaire droite, des études de la fonction cardiaque chez les patients apnéiques par échographie ont montré une augmentation de l'épaisseur de la paroi ventriculaire droite chez les patients avec un SAOS sévère (Guidry et al. 2001; Tugcu et al. 2009). Vitarelli et al. ont montré que cette augmentation était retrouvée majoritairement chez les patients apnéiques présentant une hypertension pulmonaire et que 4 mois de PPC tendaient à réduire l'épaisseur de la paroi ventriculaire droite sans toutefois la normaliser (Vitarelli et al. 2015). Diverses études du laboratoire ont permis de mettre en évidence la contribution de l'axe HIF-1-ET-1 dans ce remodelage cardiaque à l'aide de différents modèles d'animaux transgéniques et outils pharmacologiques (thèse d'Emmanuelle Gras). En effet, nous n'observons plus d'augmentation de l'index de Fulton après 2 semaines d'HI chez des souris partiellement invalidées pour le gène de la sous-unité de HIF-1 α (HIF-1 $\alpha^{+/-}$) comparativement aux souris sauvages (WT). Des mesures échographiques ont permis de montrer que cette hypertrophie ventriculaire était associée à une hypertension pulmonaire chez les souris WT mais pas chez les souris HIF-1 $\alpha^{+/-}$. Le rôle de HIF-1 α dans le remodelage ventriculaire droit est également souligné par l'étude de souris PDH1 $^{-/-}$ et PHD2 $^{+/-}$ qui présentent une moindre dégradation de HIF-1 et un index de Fulton élevé en conditions normoxiques. L'effet préventif du traitement par le bosentan, un antagoniste mixte des récepteurs de l'ET-1, pendant les 14 jours d'exposition à l'HI a permis de démontrer que l'ET-1 était également impliquée dans le développement de l'hypertrophie ventriculaire droite chez la souris. Récemment, nous avons observé un effet similaire du macitentan, un autre antagoniste mixte des récepteurs de

l'ET-1, sur le remodelage ventriculaire droit induit par l'HI chez le rat (résultats non publiés) (Figure 27). Ces résultats suggèrent que l'ET-1 contribue au développement de l'hypertension pulmonaire et de l'hypertrophie ventriculaire droite en réponse à l'HI, comme dans le cas de l'hypoxie chronique (Weigand et al. 2006).

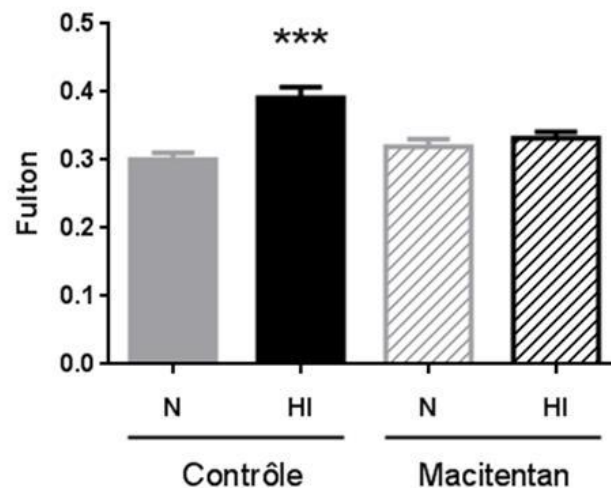


Figure 27 : Effet du macitentan sur le l'hypertrophie ventriculaire droite.

Le macitentan, antagoniste mixte des récepteurs de l'ET-1, était administré dans l'alimentation à raison de 30 mg/kg/jour pendant les 14 jours d'HI à l'issue de laquelle l'index de Fulton était calculé. Valeurs exprimées en moyenne ± SEM (n=7-8 par groupe) ***p<0,001 vs. le groupe N. Test non paramétrique de Kruskal Wallis.

Finalement, le tempol prévient l'hypertension pulmonaire et l'hypertrophie ventriculaire droite induites par l'exposition à l'hypoxie aiguë et chronique (Elmedal et al. 2004; Rashid et al. 2012).

Dans le cadre de cette thèse, nous avons montré qu'en réduisant la production d'ERO par son effet SOD mimétique, le tempol abolissait le remodelage ventriculaire droit en réponse à l'HI. L'ensemble de ces résultats nous permet donc de conclure à une implication de l'axe ERO-HIF-1-ET-1 dans le développement du remodelage cardiaque induit par l'HI.

13.2.2. Stress oxydant et activation sympathique induite par l'HI

L'analyse spectrale de la variabilité de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle n'a pas montré d'effet bénéfique du tempol sur l'augmentation de l'activité sympathique cardiaque et systémique chez les animaux traités exposés à l'HI. Cependant, il faut noter que, dans cette série expérimentale, seule l'analyse spectrale de la fréquence cardiaque a mis en évidence une activation sympathique par l'exposition à l'HI. En effet, contrairement aux résultats de l'article 1, nous n'avons pas retrouvé cette activation lors de l'analyse spectrale des pressions artérielles (résultats non

présentés). L'absence d'effet du temps et ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer d'une part par un nombre restreint d'animaux ($n = 6$ par groupe) mais également par le fait que l'anesthésie (pentobarbital) utilisée dans cette étude n'est pas optimale pour les mesures de variabilité de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle.

En effet, comparativement à d'autres anesthésiques, comme l'isoflurane, le pentobarbital diminue la fréquence cardiaque et augmente l'activité sympathique cardiaque. Il a également un effet hypotenseur en diminuant la pression artérielle systolique (Murakami et al. 2014). Afin de confirmer l'impact de l'anesthésie sur la mesure de l'activité sympathique par analyse spectrale, nous avons réalisé une analyse de la pression artérielle chez des animaux N et HI anesthésiés à l'isoflurane. Nous observons un effet très net de l'HI sur le rapport LF/HF confirmant une activation sympathique systémique chez ces animaux (Figure 28). Le rapport LF/HF est en effet multiplié par un facteur 16 par l'exposition à l'HI sous anesthésie à l'isoflurane, contre un facteur 5 sous anesthésie au pentobarbital. Ceci suggère que l'utilisation de ce dernier est à proscrire pour l'enregistrement de paramètres destinés à l'analyse spectrale puisqu'il atténue les différences entre les animaux N et HI.

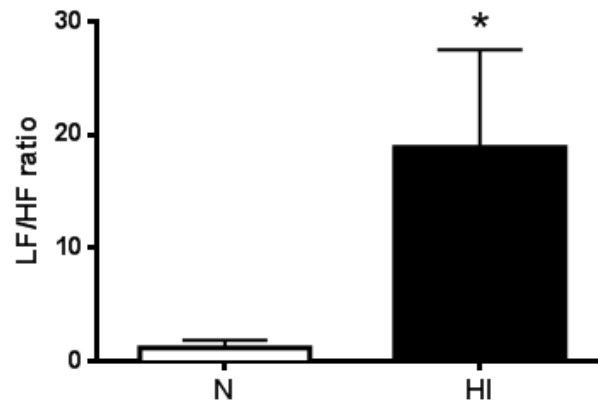


Figure 28 : Rapport LF/HF de rats exposés à la normoxie (N) ou à l'HI pendant 14 jours.

Les valeurs ont été obtenues par analyse spectrale de la variabilité de la pression artérielle diastolique sur des enregistrements réalisés sous anesthésie à l'isoflurane. Valeurs exprimées en moyenne \pm SEM (n=4-5 par groupe). * $p < 0,05$ vs. N. Test de Mann Whitney.

13.2.3. Stress oxydant et altérations de la repolarisation induites par l'HI

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'impact du stress oxydant généré par l'HI sur les altérations de la repolarisation ventriculaire. Nous avons montré qu'en réduisant le stress oxydant par administration de tempol pendant les 14 jours d'HI, nous abolissions l'allongement des intervalles QTc et Tpeak-Tend. Ceci suggère que le stress oxydant consécutif à l'HI pourrait être impliqué dans l'augmentation de l'incidence des arythmies au cours de l'ischémie myocardique.

13.2.4. Perspectives

Au vu des effets préventifs du tempol sur les altérations de la repolarisation induites par l'HI, il serait intéressant de regarder ses effets sur la survenue des arythmies sévères de l'ischémie et sur les divers mécanismes pro-arythmogènes de l'HI mis en évidence dans l'article 1. Ainsi, le rôle du stress oxydant dans l'activation sympathique induite par l'HI pourrait être confirmé par d'autres enregistrements de la PA et de la FC réalisés sous anesthésie à l'isoflurane afin d'effectuer une analyse spectrale fiable. Ces résultats pourraient également être complétés par le dosage plasmatique des catécholamines. Les observations effectuées sur les intervalles QTc et Tpeak-Tend pourraient être complétées par la mesure des durées des PAM à l'endocarde et à l'épicarde afin de voir si le tempol permet d'abolir l'augmentation du gradient transmural chez les animaux traités exposés à l'HI. Finalement, le stress oxydant augmentant l'activité de HIF-1 (Belaidi et al. 2016), il serait intéressant de voir si l'administration de tempol pendant l'HI permet de prévenir l'augmentation de l'expression des LTCC et des TRPC.

14. PARTIE II : Homéostasie du zinc et atteintes myocardiques en réponse au stress oxydant

14.1. Ischémie-reperfusion et homéostasie du zinc

Concernant les perturbations de l'homéostasie du zinc en réponse au stress oxydant induit par l'I/R, nous avons pu mettre en évidence une libération de zinc au cours des 30 premières secondes de reperfusion. D'autres études, utilisant d'autres méthodes de dosages, ont également obtenu le même résultat. En effet, Karagulova et al. ont montré une diminution du zinc labile dans le tissu myocardique après une I/R par marquage fluorescent sur des coupes de cœurs (Karagulova et al. 2007). Plus récemment, une autre équipe, utilisant la spectrométrie d'émission optique, a montré une diminution de la concentration cytosolique de zinc au cours de la reperfusion sur des cœurs isolés perfusés. Cette diminution du contenu en zinc myocardique a essentiellement lieu lors des 5 premières minutes de reperfusion (Xu et al. 2014). Ces résultats et les nôtres démontrent que la reperfusion déplete le contenu en zinc des cellules myocardiques et qu'il est éliminé dans la circulation coronaire.

14.2. HI et homéostasie du zinc

Les études qui se sont intéressées à l'homéostasie du zinc chez les patients apnéiques sont peu nombreuses et divergentes. En effet, 2 études ont mis en évidence une diminution des taux plasmatiques de zinc, diminutions qui étaient d'autant plus importantes que l'IAH était élevé (Chen et al. 2013)(Akyuz et al. 2013). Une autre étude montre quant à elle l'inverse, à savoir une augmentation des taux plasmatiques de Zn chez les patients présentant un SAOS sévère (Asker et al. 2015). Le rôle joué par l'HI dans ces perturbations a été peu étudié. Seule une étude animale a évalué les effets d'une exposition de 8 semaines à une HI de faible intensité (FiO₂ minimale de 9-11%) sur la concentration en Zn au niveau cérébral sans montrer d'effet (Veasey et al. 2013). Indépendamment du fait que le cerveau soit l'organe le moins concentré en zinc (Palmiter et al. 1995), il semblerait que l'HI n'ait pas d'effet sur les taux tissulaires de zinc puisque nous ne sommes également pas parvenus à mettre en évidence d'altérations de la concentration du zinc au niveau hépatique, myocardique et osseux après 14 et 35 jours d'exposition à une HI sévère. En revanche, bien que 14 jours d'HI ne suffisent pas à modifier les taux de zinc au niveau plasmatique, nous avons observé que 35 jours d'HI entraînent une diminution du Zn circulant. Ces divers résultats montrent que les perturbations de l'homéostasie du zinc sont dépendantes de la sévérité mais surtout de la durée de l'exposition à l'HI.

14.3. Effets cardioprotecteurs de la supplémentation en zinc

Afin d'évaluer les propriétés cardioprotectrices de l'apport de zinc vis-à-vis des atteintes induites par le stress oxydant, des cœurs isolés perfusés de rats ont été soumis à divers stress oxydants d'origine chimique ou pathologique (I/R, HI).

Tout d'abord, nous avons montré que lorsqu'un stress oxydant était induit chimiquement par une perfusion de 5 minutes de peroxyde d'hydrogène, l'administration de faibles volumes (100 µl) de zinc pyrithione à faible concentration (10^{-8} M) permettait d'améliorer la récupération myocardique en termes de pression ventriculaire gauche développée et de débit coronaire.

Ensuite, nous avons montré que l'administration de zinc pyrithione à la reperfusion après une ischémie régionale de 15 minutes avait un effet antiarythmique puissant se traduisant par une réduction du temps passé en arythmies ventriculaires sévères, telles que la tachycardie ou la fibrillation ventriculaire et par un taux de survie plus important accompagné par une meilleure récupération fonctionnelle. Ces résultats sont en adéquation avec ceux de Karagulova et al. qui avaient montré que l'administration de zinc pyrithione à la reperfusion réduisait d'au moins 2 fois l'incidence des arythmies ventriculaires et améliorait la récupération après une ischémie globale de 15 ou 30 minutes (Karagulova et al. 2007). La concentration optimale pour avoir ces effets positifs étaient la même (1.10^{-5} M) que celle obtenue dans notre étude et, tout comme dans notre étude, l'effet cardioprotecteur du zinc disparaissait à des concentrations plus élevées. Parmi les mécanismes impliqués dans la survenue des arythmies, le Ca^{2+} constitue une piste majeure afin d'expliquer les effets antiarythmiques du zinc (Wagner et al. 2015). En effet, des expériences de patch-clamp réalisées sur des cardiomyocytes ventriculaires isolés de rat et de lapin ont montré que le zinc pyrithione, à la concentration de 1.10^{-5} M, réduisait d'environ 30% l'intensité du courant calcique de type L (Turan 2003). Dix ans plus tard, à l'aide de différentes sondes fluorescentes, Yi et al. ont mis en évidence plusieurs mécanismes permettant d'expliquer la relation entre zinc et homéostasie calcique. Ainsi, l'exposition de cardiomyocytes isolés de rongeurs à du zinc entraîne une diminution de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} s'expliquant par : une inhibition compétitive de l'entrée de Ca^{2+} par les LTCC, une déphosphorylation du phospholamban réduisant la charge calcique du RS et une déphosphorylation des RyR diminuant ainsi les fuites de Ca^{2+} du RS (Yi et al. 2013).

Finalement, nous avons observé que l'administration de zinc pyrithione pendant la reperfusion abolissait l'augmentation de la taille d'infarctus induite par l'exposition à l'HI. Les propriétés antioxydantes du zinc pourraient contribuer à la réduction de la mort cellulaire liée à l'I/R. Une étude réalisée sur des cardiomyocytes néonataux isolés de rats soumis à une hypoxie-réoxygénation a montré que le zinc pyrithione, lorsqu'il était ajouté à la réoxygénation, améliorait la survie des cardiomyocytes en diminuant la production d'anions superoxydes et en réduisant l'activité de la NOX (Kasai et al. 2011). Parmi les autres mécanismes par lesquels le zinc pourrait protéger le myocarde de la mort cellulaire causée par I/R, nous pouvons mentionner l'activation de la voie de signalisation

cardioprotectrice RISK. En effet, des études ont montré que le zinc, et plus particulièrement le zinc pyrithione, activerait la voie RISK en modulant l'activité de protéines kinases telles que GS3K, Akt et ERK1/2, limitant ainsi l'ouverture du mPTP et ses conséquences délétères (Chanoit et al. 2008; Lee et al. 2009; Xu et al. 2014). Le zinc pourrait également moduler le stress du réticulum endoplasmique (RE) qui, lorsqu'il est trop important, est impliqué dans la mort cellulaire liée à l'I/R. Une étude récente a montré que la diminution du zinc intracellulaire à la reperfusion favorise l'augmentation du stress du RE et l'ouverture du mPTP suggérant que l'apport de zinc à la reperfusion pourrait limiter l'activation de cette voie conduisant à la mort cellulaire (Wang et al. 2016).

Il est à souligner que l'administration de zinc au cours de la reperfusion n'a pas eu d'effet protecteur sur la taille d'infarctus des animaux soumis à la normoxie. Ceci laisse supposer que l'effet protecteur du zinc est attribuable à une réduction des effets délétères de l'HI indépendamment de l'I/R. Cependant, deux études utilisant des modèles d'I/R *ex vivo* chez l'animal sain ont observé une diminution de la taille d'infarctus par l'administration de zinc à la reperfusion. Dans ces études, le zinc pyrithione était utilisé à une concentration de 2 μ M en combinaison avec 5 μ M de chlorure de zinc et était perfusé au cours de la première demi-heure de reperfusion (McIntosh et al. 2010; Jamwal et al. 2016). Dans notre étude, la perfusion de zinc pyrithione, seul à la concentration de 10 μ M, a été effectuée durant les 2 heures de la reperfusion. De plus, notre groupe contrôle a été perfusé par du sodium pyrithione, qui malgré l'absence d'effet antiarythmique à la reperfusion, pourrait avoir un effet cardioprotecteur potentiel en termes de survie cellulaire. Aucune étude n'a cependant été publiée à cet effet à ce jour.

14.4. Perspectives

Lors des expériences effectuées dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux effets bénéfiques de l'administration aiguë de zinc, mais il semblerait qu'une administration chronique puisse présenter un intérêt majeur dans les altérations myocardiques causées par l'HI. En effet, une étude a montré qu'un traitement de 15 jours avec du zinc sulfate réduisait les niveaux plasmatiques et cardiaques de MDA et augmentait ceux de glutathion réduit suite à une I/R *in vivo*, comparativement aux animaux non traités (Ozyildirim et al. 2016). Une autre équipe a récemment publié une étude montrant les effets bénéfiques de l'administration quotidienne de chlorure de zinc sur les altérations de la fonction ventriculaire causées par 14 jours d'exposition à l'HI. Le traitement permettait d'une part d'abolir la peroxydation lipidique et protéique induite par l'HI, et d'autre part, de restaurer les défenses antioxydantes en rétablissant l'activité d'enzymes telles que la catalase, la SOD et la GPx. D'un point de vue fonctionnel, la supplémentation en zinc permettait d'améliorer la fonction ventriculaire gauche en restaurant la fraction de raccourcissement et d'éjection (Chen et al. 2016).

En diminuant le stress oxydant et en augmentant les défenses antioxydantes, une administration chronique de zinc pourrait donc présenter un intérêt majeur dans la prévention de l'augmentation

de la taille d'infarctus et de la survenue d'arythmies sévères à l'ischémie chez les animaux exposés à l'HI.

15. PARTIE III : Article 2 : « Regulation of HIF-1 activity and ET-1 secretion by zinc chelation and its functional consequences in endothelial cells »

15.1. Conclusions de l'étude

Les résultats de l'étude menée sur des cellules endothéliales ont montré que la déplétion en zinc induite par le TPEN conduisait à une translocation de HIF-1 α dans le noyau et une sécrétion d'ET-1 HIF-1 α dépendante responsables d'une augmentation des capacités migratoires des cellules. De plus l'ET-1, connue pour ses effets sur la migration cellulaire, augmente elle aussi la migration via HIF-1 α . Ainsi, cette étude a permis de mettre en évidence le rôle de HIF-1 α dans la migration cellulaire induite par le TPEN et l'ET-1 exogène.

Finalement, la réduction de la capacité migratoire des cellules par la transfection avec un siRNA anti-HIF-1 α peut s'expliquer par la réduction de la transcription du gène de l'ET-1 mais également de celui du VEGF. En effet, les effets positifs du VEGF sur la migration des cellules endothéliales et la réparation ont été récemment mis en évidence au laboratoire (Shweiki et al. 1992; Briancon-Marjollet et al. 2014).

15.2. Perspectives

Ainsi, il semblerait qu'il existe une relation entre l'homéostasie du zinc et l'axe HIF-1-ET-1 qui pencherait en faveur de son activation dans un contexte de déplétion en zinc. Les mécanismes à l'origine de la translocation de HIF-1 α et de l'expression de l'ET-1 restent encore à être explorés.

Parmi eux, il serait intéressant de voir si le TPEN, via la régulation de HIF-1 α , entraîne une augmentation de la synthèse et/ou de la sécrétion de VEGF, qui pourrait ainsi expliquer le fait que HIF-1 α soit indispensable dans les effets du TPEN et de l'ET-1 exogène (Figure 29).

Par ailleurs, Wang et al. ont récemment montré qu'il existait une relation entre l'homéostasie du zinc et le stress du RE (Wang et al. 2016). Ceci est confirmé par une étude sur des cellules hépatiques (H4IIEC3, lignée hépatocytaire de rat) exposées au TPEN. Les auteurs ont montré que 6h de chélation du zinc entraînaient un stress du RE ainsi qu'un stress oxydant (Sun et al. 2015). Le stress du RE et le stress oxydant, tous deux bien connus pour être à l'origine d'une activation de HIF-1 (Yuan et al. 2008; Belaidi et al. 2016), représentent donc deux mécanismes potentiels pouvant expliquer la relation entre la déplétion en zinc et l'activation de l'axe HIF-1-ET-1.

Finalement, une inhibition de la PHD2 par la chélation du zinc pourrait également expliquer l'effet du TPEN sur l'axe HIF-1-ET-1. En effet, la PHD2 possède dans sa structure un domaine à doigts de zinc.

L'inhibition ou la mutation de ce domaine empêche l'hydroxylation de HIF-1 α conduisant à sa stabilisation (Arsenault et al. 2016; Arsenault et al. 2016). En chélatant le zinc de ce domaine, le TPEN pourrait ainsi causer une modification structurale de la PHD2 susceptible de bloquer son activité et d'augmenter celle de HIF-1.

En conclusion, cette étude, montrant l'impact d'une déplétion en zinc sur l'activation de l'axe HIF-1-ET-1, présente un intérêt dans notre modèle d'HI. En effet, nous avons montré dans la PARTIE II qu'une exposition longue à l'HI (35 jours) conduisait à une diminution des concentrations plasmatiques de zinc, on peut imaginer que cette diminution pourrait avoir un effet sur l'activation de HIF-1 et la sécrétion d'ET-1 dans les cellules endothéliales des animaux exposés. De fait, une supplémentation en zinc apportée par la nourriture pendant les 35 jours d'HI pourrait, en restaurant le statut zinc des animaux exposés, prévenir l'activation de cette voie HIF-1-ET-1 et limiter ses effets délétères au niveau du système cardiovasculaire.

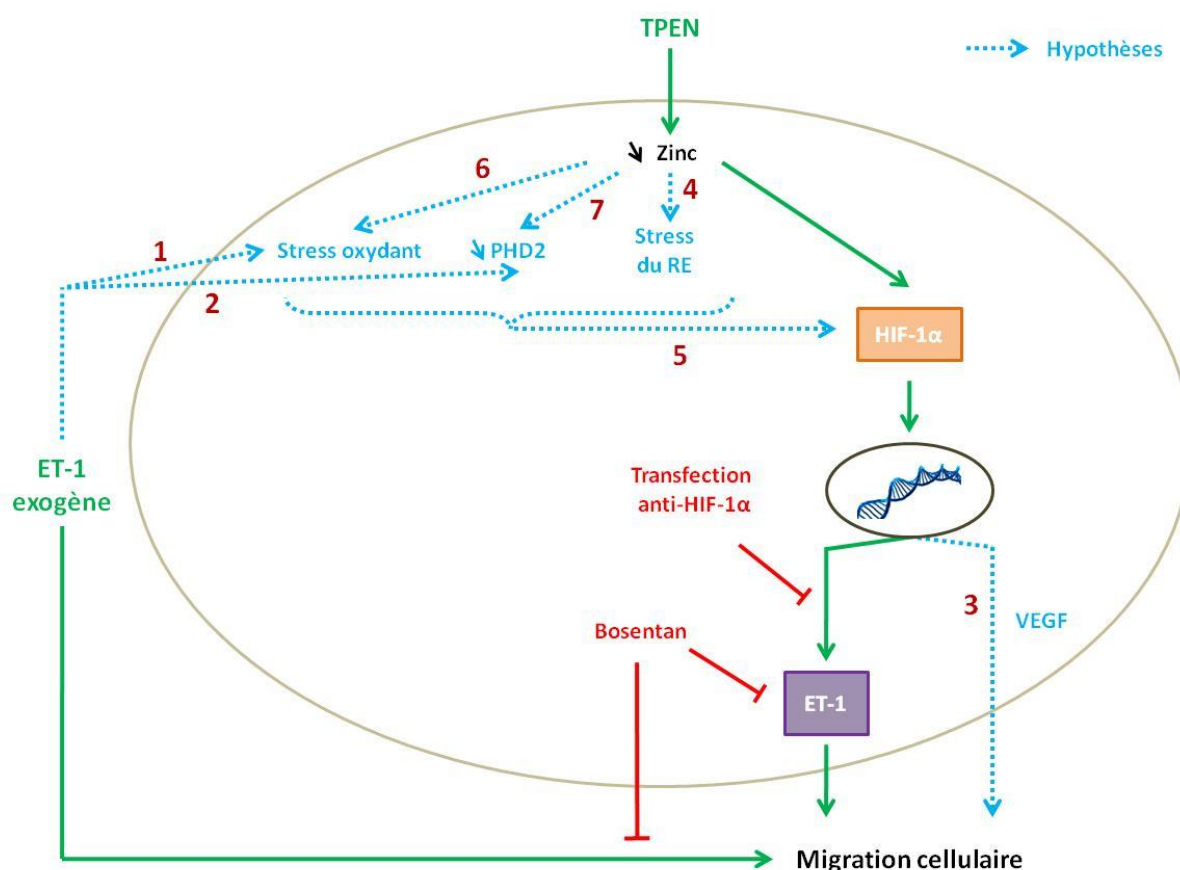


Figure 29 : Schéma résumant les mécanismes mis en évidence et les hypothèses émises dans la PARTIE III.

Les résultats obtenus sont représentés en vert et le bleu représente les hypothèses permettant d'expliquer les effets de la chélation du zinc par le TPEN sur la stabilisation de HIF-1, la sécrétion d'ET-1 et la migration des cellules endothéliales. HIF-1 α : sous-unité α de l'hypoxia inducible factor ET-1 : endothéline1 ; PHD2 : prolyl hydroxylase de type 2 ; VEGF : vascular endothelial growth factor ; bosentan : antagoniste mixte des récepteurs de l'ET-1. **1** : Dong et al. 2005 ; **2** : Caprara et al. 2014 ; **3** : Briançon-Marjollet et al. 2014 ; **4** : Sun et al. 2015 ; **5** : Belaidi et al. 2016 et Yuan et al. 2008 ; **6** : Li et al. 2017 ; **7** : Arsenault et al. 2016.

CONCLUSION GENERALE

Même s'il est toujours sous-diagnostiqué, la prévalence du SAOS a augmenté ces 20 dernières années, jusqu'à 55% selon la population observée (âge et sexe). Elle est actuellement estimée entre 9 et 17% chez les femmes et les hommes âgés de 50 à 70 ans, respectivement. Le SAOS constitue un problème majeur de santé publique dans le monde et en Europe de part la forte morbidité et mortalité cardiovasculaire qui lui sont associées. En effet, les apnées du sommeil sont étroitement corrélées à la survenue de complications cardiovasculaires telles que l'hypertension, les maladies coronariennes, les arythmies ventriculaires et auriculaires ou encore la mort subite.

Comme a pu le démontrer l'utilisation de modèles animaux ou humains, l'HI causée par les obstructions répétées des VAS est le principal facteur responsable des complications cardiovasculaires rencontrées chez les patients apnéiques. Parmi les mécanismes impliqués dans la survenue des altérations cardiovasculaires figurent le stress oxydant généré par les cycles d'hypoxie-réoxygénation qui est, entre autres, à l'origine de l'activation de HIF-1 et de la transcription de ses gènes cibles dont fait partie l'ET-1.

Le laboratoire a déjà, à plusieurs reprises, mis en évidence la relation entre l'HI et des complications cardiovasculaires telles que l'augmentation de la pression artérielle et de la taille d'infarctus, une dysfonction et un remodelage vasculaire. Pour la première fois, le rôle potentiel de l'HI dans la survenue de mort subite associée à l'ischémie myocardique a été mis en évidence. En effet, dans l'article I « Obstructive sleep apnea and the risk of sudden cardiac death: chronic intermittent hypoxia promotes myocardial ischemia-related ventricular arrhythmias », nous avons montré que l'HI augmentait l'incidence d'arythmies sévères, telle que la fibrillation ventriculaire, lors d'une ischémie myocardique et multipliait par 2 la survenue d'arythmies létales. Parmi les mécanismes pouvant expliquer ce statut pro-arythmogène, l'activation sympathique cardiaque et systémique pourrait jouer un rôle qui reste à confirmer en exposant des animaux ayant subi une dénervation sympathique chimique ou encore par l'administration de bêtabloquants. Il semblerait aussi que l'HI ait des conséquences sur la repolarisation ventriculaire, se manifestant par un allongement des intervalles QTc et Tpeak-Tend prédictif du risque de survenue d'arythmies. Les altérations de la repolarisation ont également été observées directement au niveau du myocarde avec un allongement de la durée du potentiel d'action plus important à l'endocarde des animaux exposés à l'HI, propice à la survenue d'arythmies. L'étude des canaux ioniques a montré que l'HI entraînait une augmentation de l'expression de la sous unité Cav1.2 des LTCC et de TRPC1 et 6 à l'endocarde, ce qui pourrait expliquer l'allongement du potentiel d'action et être à l'origine d'une surcharge calcique fournissant ainsi un substrat à la survenue des arythmies ventriculaires.

Les premiers résultats obtenus avec l'administration de tempol ont montré que le stress oxydant pourrait être en cause dans ces altérations de la repolarisation ventriculaire puisque les animaux exposés et traités ne présentent plus d'allongement des intervalles QTc et Tpeak-Tend.

En résumé, l'ensemble de ces résultats permet de proposer plusieurs approches pharmacologiques (antioxydants, bêtabloquants, antagonistes calciques) à tester pour la prévention des altérations de la repolarisation et du risque arythmogène lié au SAOS.

Le zinc, élément trace de l'organisme possédant des propriétés antioxydantes, présente également un intérêt dans la prévention des altérations cardiovasculaires liées à l'HI et au SAOS. En effet, comme nous l'avons montré, son homéostasie est perturbée par le stress oxydant tel que celui dégénéré par l'I/R ou par l'HI. Nous avons également démontré que sa supplémentation dans ce contexte a des effets bénéfiques tant chez le rat sain, où elle réduit la durée des arythmies sévères de reperfusion et améliore la récupération fonctionnelle, ainsi que chez le rat exposé à l'HI, où elle abolit l'augmentation de la taille d'infarctus. Puisque l'HI diminue les taux circulants de zinc et qu'une déplétion en zinc semble activer l'axe délétère HIF-1-ET-1, il serait intéressant de voir si une supplémentation chronique de zinc, tout au long de l'exposition, pourrait limiter les conséquences délétères de l'HI, tant au niveau vasculaire que myocardique, en limitant l'activation de cet axe soit directement, soit en réduisant le stress oxydant et le stress du RE générés par l'HI (Figure 30).

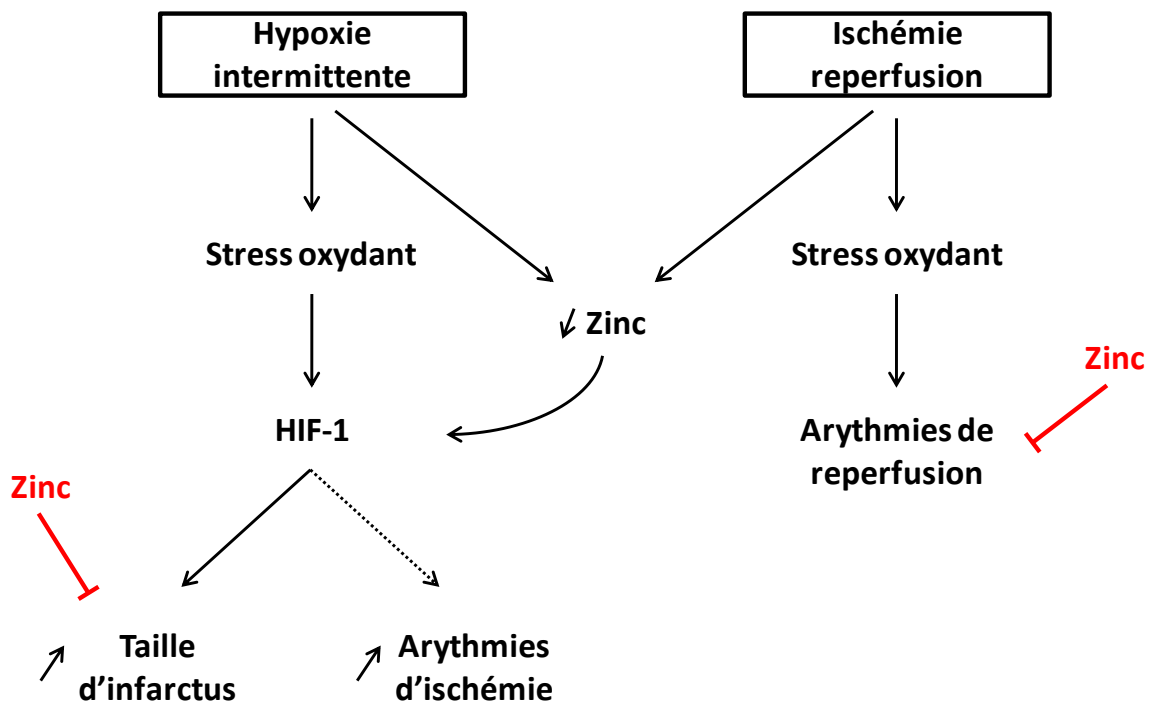


Figure 30 : Schéma illustrant les conclusions générales de la thèse.

Schéma général des différents acteurs présentés dans la thèse et potentiels mécanismes mis en jeu.

BIBLIOGRAPHIE

- Abd Allah, E. S., Aslanidi, O. V., Tellez, J. O., Yanni, J., Billeter, R., Zhang, H., Dobrzynski, H. and Boyett, M. R. (2012). "Postnatal development of transmural gradients in expression of ion channels and Ca(2)(+)-handling proteins in the ventricle." *J Mol Cell Cardiol* 53(2): 145-155.
- Afanas'ev, I. B., Suslova, T. B., Cheremisina, Z. P., Abramova, N. E. and Korkina, L. G. (1995). "Study of antioxidant properties of metal aspartates." *Analyst* 120(3): 859-862.
- Ahmad, M., Salahuddin, Mathew, B. M., Kumar, S., Seth, T. D., Hasan, M. Z. and Mahdi, S. Q. (1980). "Effect of extent of myocardial damage on the behavior of myocardial zinc in albino rats." *Adv Myocardiol* 2: 171-176.
- Aiello, E. A., Petroff, M. G., Mattiazzi, A. R. and Cingolani, H. E. (1998). "Evidence for an electrogenic Na⁺-HCO₃⁻ symport in rat cardiac myocytes." *J Physiol* 512 (Pt 1): 137-148.
- Akyuz, A., Karsli Ceppioglu, S., Yurdun, T., Pelin, Z., Akyuz, S. (2013). "Serum copper and zinc status in obstructive sleep apnea patients." *Turk J Pharm Sci* 10(3): 415-424.
- Allahdadi, K. J., Cherg, T. W., Pai, H., Silva, A. Q., Walker, B. R., Nelin, L. D. and Kanagy, N. L. (2008). "Endothelin type A receptor antagonist normalizes blood pressure in rats exposed to eucapnic intermittent hypoxia." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295(1): H434-440.
- Allahdadi, K. J., Walker, B. R. and Kanagy, N. L. (2005). "Augmented endothelin vasoconstriction in intermittent hypoxia-induced hypertension." *Hypertension* 45(4): 705-709.
- Ambrosio, G., Zweier, J. L., Duilio, C., Kuppusamy, P., Santoro, G., Elia, P. P., Tritto, I., Cirillo, P., Condorelli, M., Chiariello, M. and et al. (1993). "Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow." *J Biol Chem* 268(25): 18532-18541.
- Anderson, M. E. (2004). "Calmodulin kinase and L-type calcium channels; a recipe for arrhythmias?" *Trends Cardiovasc Med* 14(4): 152-161.
- Andreadou, I., Iliodromitis, E. K., Rassaf, T., Schulz, R., Papapetropoulos, A. and Ferdinandy, P. (2015). "The role of gasotransmitters NO, H₂S and CO in myocardial ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning and remote conditioning." *Br J Pharmacol* 172(6): 1587-1606.
- Andrew, P. J. and Mayer, B. (1999). "Enzymatic function of nitric oxide synthases." *Cardiovasc Res* 43(3): 521-531.
- Antic, N. A., Catcheside, P., Buchan, C., Hensley, M., Naughton, M. T., Rowland, S., Williamson, B., Windler, S. and McEvoy, R. D. (2011). "The effect of CPAP in normalizing daytime sleepiness, quality of life, and neurocognitive function in patients with moderate to severe OSA." *Sleep* 34(1): 111-119.
- Antzelevitch, C. (2007). "Role of spatial dispersion of repolarization in inherited and acquired sudden cardiac death syndromes." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(4): H2024-2038.

- Antzelevitch, C., Sicouri, S., Litovsky, S. H., Lukas, A., Krishnan, S. C., Di Diego, J. M., Gintant, G. A. and Liu, D. W. (1991). "Heterogeneity within the ventricular wall. Electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial, and M cells." *Circ Res* 69(6): 1427-1449.
- Araghi, M. H., Chen, Y. F., Jagielski, A., Choudhury, S., Banerjee, D., Hussain, S., Thomas, G. N. and Taheri, S. (2013). "Effectiveness of lifestyle interventions on obstructive sleep apnea (OSA): systematic review and meta-analysis." *Sleep* 36(10): 1553-1562, 1562A-1562E.
- Arnaud, C., Beguin, P. C., Lantuejoul, S., Pepin, J. L., Guillermet, C., Pelli, G., Burger, F., Buatois, V., Ribuot, C., Baguet, J. P., Mach, F., Levy, P. and Dematteis, M. (2011). "The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition." *Am J Respir Crit Care Med* 184(6): 724-731.
- Arnaud, J., Faure, H., Boulard, P., Denis, B. and Favier, A. E. (1994). "Longitudinal changes in serum zinc concentration and distribution after acute myocardial infarction." *Clin Chim Acta* 230(2): 147-156.
- Arnet, U. A., McMillan, A., Dinerman, J. L., Ballermann, B. and Lowenstein, C. J. (1996). "Regulation of endothelial nitric-oxide synthase during hypoxia." *J Biol Chem* 271(25): 15069-15073.
- Arsenault, P. R., Song, D., Bergkamp, M., Ravaschiere, A. M., Navalsky, B. E., Lieberman, P. M. and Lee, F. S. (2016). "Identification of Small-Molecule PHD2 Zinc Finger Inhibitors that Activate Hypoxia Inducible Factor." *Chembiochem* 17(24): 2316-2323.
- Arsenault, P. R., Song, D., Chung, Y. J., Khurana, T. S. and Lee, F. S. (2016). "The Zinc Finger of Prolyl Hydroxylase Domain Protein 2 Is Essential for Efficient Hydroxylation of Hypoxia-Inducible Factor alpha." *Mol Cell Biol* 36(18): 2328-2343.
- Arzt, M., Hetzenecker, A., Steiner, S. and Buchner, S. (2015). "Sleep-Disordered Breathing and Coronary Artery Disease." *Can J Cardiol* 31(7): 909-917.
- Asker, S., Asker, M., Sarikaya, E., Sunnetcioglu, A., Aslan, M. and Demir, H. (2015). "Oxidative stress parameters and their correlation with clinical, metabolic and polysomnographic parameters in severe obstructive sleep apnea syndrome." *Int J Clin Exp Med* 8(7): 11449-11455.
- Asker, S., Asker, M., Yeltekin, A. C., Aslan, M. and Demir, H. (2015). "Serum levels of trace minerals and heavy metals in severe obstructive sleep apnea patients: correlates and clinical implications." *Sleep Breath* 19(2): 547-552.
- Ayas, N. T., Hirsch, A. A., Laher, I., Bradley, T. D., Malhotra, A., Polotsky, V. Y. and Tasali, E. (2014). "New frontiers in obstructive sleep apnoea." *Clin Sci (Lond)* 127(4): 209-216.
- Babior, B. M. (2004). "NADPH oxidase." *Curr Opin Immunol* 16(1): 42-47.
- Baines, C. P. (2009). "The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury." *Basic Res Cardiol* 104(2): 181-188.

- Bakker, J. P., O'Keeffe, K. M., Neill, A. M. and Campbell, A. J. (2014). "Continuous positive airway pressure treatment for obstructive sleep apnoea: Maori, Pacific and New Zealand European experiences." *J Prim Health Care* 6(3): 221-228.
- Barcelo, A., Barbe, F., de la Pena, M., Vila, M., Perez, G., Pierola, J., Duran, J. and Agusti, A. G. (2006). "Antioxidant status in patients with sleep apnoea and impact of continuous positive airway pressure treatment." *Eur Respir J* 27(4): 756-760.
- Barcelo, A., Miralles, C., Barbe, F., Vila, M., Pons, S. and Agusti, A. G. (2000). "Abnormal lipid peroxidation in patients with sleep apnoea." *Eur Respir J* 16(4): 644-647.
- Bassani, R. A., Bassani, J. W., Lipsius, S. L. and Bers, D. M. (1997). "Diastolic SR Ca efflux in atrial pacemaker cells and Ca-overloaded myocytes." *Am J Physiol* 273(2 Pt 2): H886-892.
- Batandier, C., Leverve, X. and Fontaine, E. (2004). "Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I." *J Biol Chem* 279(17): 17197-17204.
- Batool-Anwar, S., Goodwin, J. L., Kushida, C. A., Walsh, J. A., Simon, R. D., Nichols, D. A. and Quan, S. F. (2016). "Impact of continuous positive airway pressure (CPAP) on quality of life in patients with obstructive sleep apnea (OSA)." *J Sleep Res.*
- Bazzano, L. A., Khan, Z., Reynolds, K. and He, J. (2007). "Effect of nocturnal nasal continuous positive airway pressure on blood pressure in obstructive sleep apnea." *Hypertension* 50(2): 417-423.
- Belaidi, E., Joyeux-Faure, M., Ribuot, C., Launois, S. H., Levy, P. and Godin-Ribuot, D. (2009). "Major role for hypoxia inducible factor-1 and the endothelin system in promoting myocardial infarction and hypertension in an animal model of obstructive sleep apnea." *J Am Coll Cardiol* 53(15): 1309-1317.
- Belaidi, E., Thomas, A., Bourdier, G., Moulin, S., Lemarie, E., Levy, P., Pepin, J. L., Korichneva, I., Godin-Ribuot, D. and Arnaud, C. (2016). "Endoplasmic reticulum stress as a novel inducer of hypoxia inducible factor-1 activity: its role in the susceptibility to myocardial ischemia-reperfusion induced by chronic intermittent hypoxia." *Int J Cardiol* 210: 45-53.
- Beller, G. A., Conroy, J. and Smith, T. W. (1976). "Ischemia-induced alterations in myocardial (Na⁺ + K⁺)-ATPase and cardiac glycoside binding." *J Clin Invest* 57(2): 341-350.
- Benhabbouche, S., Crola da Silva, C., Abrial, M. and Ferrera, R. (2011). "[The basis of ischemia-reperfusion and myocardial protection]." *Ann Fr Anesth Reanim* 30 Suppl 1: S2-16.
- Bergeron, M., Yu, A. Y., Solway, K. E., Semenza, G. L. and Sharp, F. R. (1999). "Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain." *Eur J Neurosci* 11(12): 4159-4170.
- Bernardi, P., Scorrano, L., Colonna, R., Petronilli, V. and Di Lisa, F. (1999). "Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues." *Eur J Biochem* 264(3): 687-701.
- Bers, D. M. (2002). "Cardiac excitation-contraction coupling." *Nature* 415(6868): 198-205.

- Bettger, W. J., Fish, T. J. and O'Dell B, L. (1978). "Effects of copper and zinc status of rats on erythrocyte stability and superoxide dismutase activity." *Proc Soc Exp Biol Med* 158(2): 279-282.
- Beyar, R. and Sideman, S. (1986). "Left ventricular mechanics related to the local distribution of oxygen demand throughout the wall." *Circ Res* 58(5): 664-677.
- Bhagat, B. D., Rao, P. S. and Dhalla, N. S. (1980). "Role of catecholamines in the genesis of arrhythmias." *Adv Myocardiol* 2: 117-132.
- Bixler, E. O., Vgontzas, A. N., Lin, H. M., Ten Have, T., Leiby, B. E., Vela-Bueno, A. and Kales, A. (2000). "Association of hypertension and sleep-disordered breathing." *Arch Intern Med* 160(15): 2289-2295.
- Bixler, E. O., Vgontzas, A. N., Ten Have, T., Tyson, K. and Kales, A. (1998). "Effects of age on sleep apnea in men: I. Prevalence and severity." *Am J Respir Crit Care Med* 157(1): 144-148.
- Bolli, R., Jeroudi, M. O., Patel, B. S., DuBose, C. M., Lai, E. K., Roberts, R. and McCay, P. B. (1989). "Direct evidence that oxygen-derived free radicals contribute to postischemic myocardial dysfunction in the intact dog." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(12): 4695-4699.
- Bolli, R. and Marban, E. (1999). "Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning." *Physiol Rev* 79(2): 609-634.
- Bourdier, G., Flore, P., Sanchez, H., Pepin, J. L., Belaidi, E. and Arnaud, C. (2016). "High-intensity training reduces intermittent hypoxia-induced ER stress and myocardial infarct size." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 310(2): H279-289.
- Brachmann, J. and Schömig, A. (2012). *Adrenergic System and Ventricular Arrhythmias in Myocardial Infarction*, Springer Berlin Heidelberg.
- Braunwald, E. and Kloner, R. A. (1982). "The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction." *Circulation* 66(6): 1146-1149.
- Bremner, I., Morrison, J. N., Wood, A. M. and Arthur, J. R. (1987). "Effects of changes in dietary zinc, copper and selenium supply and of endotoxin administration on metallothionein I concentrations in blood cells and urine in the rat." *J Nutr* 117(9): 1595-1602.
- Briancon-Marjollet, A., Henri, M., Pepin, J. L., Lemarie, E., Levy, P. and Tamisier, R. (2014). "Altered in vitro endothelial repair and monocyte migration in obstructive sleep apnea: implication of VEGF and CRP." *Sleep* 37(11): 1825-1832.
- Briancon-Marjollet, A., Weiszenstein, M., Henri, M., Thomas, A., Godin-Ribuot, D. and Polak, J. (2015). "The impact of sleep disorders on glucose metabolism: endocrine and molecular mechanisms." *Diabetol Metab Syndr* 7: 25.
- Bruick, R. K. and McKnight, S. L. (2001). "A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF." *Science* 294(5545): 1337-1340.

- Buchner, S., Satz, A., Debl, K., Hetzenecker, A., Luchner, A., Husser, O., Hamer, O. W., Poschenrieder, F., Fellner, C., Zeman, F., Riegger, G. A., Pfeifer, M. and Arzt, M. (2014). "Impact of sleep-disordered breathing on myocardial salvage and infarct size in patients with acute myocardial infarction." *Eur Heart J* 35(3): 192-199.
- Bulkley, G. B. (1994). "Reactive oxygen metabolites and reperfusion injury: aberrant triggering of reticuloendothelial function." *Lancet* 344(8927): 934-936.
- Cahan, C., Decker, M. J., Arnold, J. L., Goldwasser, E. and Strohl, K. P. (1995). "Erythropoietin levels with treatment of obstructive sleep apnea." *J Appl Physiol* (1985) 79(4): 1278-1285.
- Cai, Z., Manalo, D. J., Wei, G., Rodriguez, E. R., Fox-Talbot, K., Lu, H., Zweier, J. L. and Semenza, G. L. (2003). "Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury." *Circulation* 108(1): 79-85.
- Camilion de Hurtado, M. C., Perez, N. G. and Cingolani, H. E. (1995). "An electrogenic sodium-bicarbonate cotransport in the regulation of myocardial intracellular pH." *J Mol Cell Cardiol* 27(1): 231-242.
- Campen, M. J., Shimoda, L. A. and O'Donnell, C. P. (2005). "Acute and chronic cardiovascular effects of intermittent hypoxia in C57BL/6J mice." *J Appl Physiol* (1985) 99(5): 2028-2035.
- Cao, J., Bobo, J. A., Liuzzi, J. P. and Cousins, R. J. (2001). "Effects of intracellular zinc depletion on metallothionein and ZIP2 transporter expression and apoptosis." *J Leukoc Biol* 70(4): 559-566.
- Capone, C., Faraco, G., Coleman, C., Young, C. N., Pickel, V. M., Anrather, J., Davisson, R. L. and Iadecola, C. (2012). "Endothelin 1-dependent neurovascular dysfunction in chronic intermittent hypoxia." *Hypertension* 60(1): 106-113.
- Caprara, V., Scappa, S., Garrafa, E., Di Castro, V., Rosano, L., Bagnato, A. and Spinella, F. (2014). "Endothelin-1 regulates hypoxia-inducible factor-1 α and -2 α stability through prolyl hydroxylase domain 2 inhibition in human lymphatic endothelial cells." *Life Sci* 118(2): 185-190.
- Carlson, J. T., Hedner, J., Elam, M., Ejjell, H., Sellgren, J. and Wallin, B. G. (1993). "Augmented resting sympathetic activity in awake patients with obstructive sleep apnea." *Chest* 103(6): 1763-1768.
- Carmeliet, E. (1999). "Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias." *Physiol Rev* 79(3): 917-1017.
- Carpagnano, G. E., Kharitonov, S. A., Resta, O., Foschino-Barbaro, M. P., Gramiccioni, E. and Barnes, P. J. (2003). "8-Isoprostane, a marker of oxidative stress, is increased in exhaled breath condensate of patients with obstructive sleep apnea after night and is reduced by continuous positive airway pressure therapy." *Chest* 124(4): 1386-1392.

- Carpene, E., Andreani, G. and Isani, G. (2007). "Metallothionein functions and structural characteristics." *J Trace Elem Med Biol* 21 Suppl 1: 35-39.
- Catterall, W. A. (1995). "Structure and function of voltage-gated ion channels." *Annu Rev Biochem* 64: 493-531.
- Catterall, W. A., Goldin, A. L. and Waxman, S. G. (2005). "International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels." *Pharmacol Rev* 57(4): 397-409.
- Chakraborti, T., Mandal, A., Mandal, M., Das, S. and Chakraborti, S. (2000). "Complement activation in heart diseases. Role of oxidants." *Cell Signal* 12(9-10): 607-617.
- Chanoit, G., Lee, S., Xi, J., Zhu, M., McIntosh, R. A., Mueller, R. A., Norfleet, E. A. and Xu, Z. (2008). "Exogenous zinc protects cardiac cells from reperfusion injury by targeting mitochondrial permeability transition pore through inactivation of glycogen synthase kinase-3beta." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295(3): H1227-H1233.
- Chen, L., Einbinder, E., Zhang, Q., Hasday, J., Balke, C. W. and Scharf, S. M. (2005). "Oxidative stress and left ventricular function with chronic intermittent hypoxia in rats." *Am J Respir Crit Care Med* 172(7): 915-920.
- Chen, P. C., Guo, C. H., Tseng, C. J., Wang, K. C. and Liu, P. J. (2013). "Blood trace minerals concentrations and oxidative stress in patients with obstructive sleep apnea." *J Nutr Health Aging* 17(8): 639-644.
- Chen, Q., Vazquez, E. J., Moghaddas, S., Hoppel, C. L. and Lesnfsky, E. J. (2003). "Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III." *J Biol Chem* 278(38): 36027-36031.
- Chen, T. I. and Chen, M. Y. (2016). "Zinc Is Indispensable in Exercise-Induced Cardioprotection against Intermittent Hypoxia-Induced Left Ventricular Function Impairment in Rats." *PLoS One* 11(12): e0168600.
- Chirinos, J. A., Gurubhagavatula, I., Teff, K., Rader, D. J., Wadden, T. A., Townsend, R., Foster, G. D., Maislin, G., Saif, H., Broderick, P., Chittams, J., Hanlon, A. L. and Pack, A. I. (2014). "CPAP, weight loss, or both for obstructive sleep apnea." *N Engl J Med* 370(24): 2265-2275.
- Christou, K., Moulas, A. N., Pastaka, C. and Gourgoulanis, K. I. (2003). "Antioxidant capacity in obstructive sleep apnea patients." *Sleep Med* 4(3): 225-228.
- Chvapil, M. and Owen, J. A. (1977). "Effect of zinc on acute and chronic isoproterenol induced heart injury." *J Mol Cell Cardiol* 9(2): 151-159.
- Clapham, D. E., Julius, D., Montell, C. and Schultz, G. (2005). "International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels." *Pharmacol Rev* 57(4): 427-450.

- Clapham, D. E., Runnels, L. W. and Strubing, C. (2001). "The TRP ion channel family." *Nat Rev Neurosci* 2(6): 387-396.
- Cobbe, S. M. and Poole-Wilson, P. A. (1980). "The time of onset and severity of acidosis in myocardial ischaemia." *J Mol Cell Cardiol* 12(8): 745-760.
- Cofta, S., Wysocka, E., Piorunek, T., Rzymkowska, M., Batura-Gabryel, H. and Torlinski, L. (2008). "Oxidative stress markers in the blood of persons with different stages of obstructive sleep apnea syndrome." *J Physiol Pharmacol* 59 Suppl 6: 183-190.
- Cousins, R. J., Liuzzi, J. P. and Lichten, L. A. (2006). "Mammalian zinc transport, trafficking, and signals." *J Biol Chem* 281(34): 24085-24089.
- Crompton, M., Virji, S., Doyle, V., Johnson, N. and Ward, J. M. (1999). "The mitochondrial permeability transition pore." *Biochem Soc Symp* 66: 167-179.
- da Rosa, D. P., Forgiarini, L. F., Baronio, D., Feijo, C. A., Martinez, D. and Marroni, N. P. (2012). "Simulating sleep apnea by exposure to intermittent hypoxia induces inflammation in the lung and liver." *Mediators Inflamm* 2012: 879419.
- Dann, C. E., 3rd, Bruick, R. K. and Deisenhofer, J. (2002). "Structure of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor 1: An asparaginyl hydroxylase involved in the hypoxic response pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24): 15351-15356.
- Dematteis, M., Godin-Ribuot, D., Arnaud, C., Ribuot, C., Stanke-Labesque, F., Pepin, J. L. and Levy, P. (2009). "Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding the human disease." *ILAR J* 50(3): 262-281.
- Dennis, S. C., Yellon, D. M., Frasch, F., Anderson, G. J. and Hearse, D. J. (1983). "The effects of ischemia on metabolism and reperfusion arrhythmias." *Int J Cardiol* 2(5-6): 461-478.
- Dewan, N. A., Nieto, F. J. and Somers, V. K. (2015). "Intermittent hypoxemia and OSA: implications for comorbidities." *Chest* 147(1): 266-274.
- Di Diego, J. M. and Antzelevitch, C. (2011). "Ischemic ventricular arrhythmias: experimental models and their clinical relevance." *Heart Rhythm* 8(12): 1963-1968.
- Di Lisa, F. and Bernardi, P. (2006). "Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole." *Cardiovasc Res* 70(2): 191-199.
- Dong, F., Zhang, X., Wold, L. E., Ren, Q., Zhang, Z. and Ren, J. (2005). "Endothelin-1 enhances oxidative stress, cell proliferation and reduces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of ETB receptor, NADPH oxidase and caveolin-1." *Br J Pharmacol* 145(3): 323-333.
- Dopp, J. M., Philippi, N. R., Marcus, N. J., Olson, E. B., Bird, C. E., Moran, J. J., Mueller, S. W. and Morgan, B. J. (2011). "Xanthine oxidase inhibition attenuates endothelial dysfunction caused by chronic intermittent hypoxia in rats." *Respiration* 82(5): 458-467.

- Downar, E., Janse, M. J. and Durrer, D. (1977). "The effect of acute coronary artery occlusion on subepicardial transmembrane potentials in the intact porcine heart." *Circulation* 56(2): 217-224.
- Dreosti, I. E. and Record, I. R. (1978). "Lysosomal stability, superoxide dismutase and zinc deficiency in regenerating rat liver." *Br J Nutr* 40(1): 133-137.
- Dyugovskaya, L., Lavie, P. and Lavie, L. (2002). "Increased adhesion molecules expression and production of reactive oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients." *Am J Respir Crit Care Med* 165(7): 934-939.
- Eder, P. and Molkentin, J. D. (2011). "TRPC channels as effectors of cardiac hypertrophy." *Circ Res* 108(2): 265-272.
- Eide, D. J. (2006). "Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc." *Biochim Biophys Acta* 1763(7): 711-722.
- Eisele, H. J., Markart, P. and Schulz, R. (2015). "Obstructive Sleep Apnea, Oxidative Stress, and Cardiovascular Disease: Evidence from Human Studies." *Oxid Med Cell Longev* 2015: 608438.
- El Solh, A. A., Saliba, R., Bosinski, T., Grant, B. J., Berbary, E. and Miller, N. (2006). "Allopurinol improves endothelial function in sleep apnoea: a randomised controlled study." *Eur Respir J* 27(5): 997-1002.
- Elmedal, B., de Dam, M. Y., Mulvany, M. J. and Simonsen, U. (2004). "The superoxide dismutase mimetic, tempol, blunts right ventricular hypertrophy in chronic hypoxic rats." *Br J Pharmacol* 141(1): 105-113.
- Engerson, T. D., McKelvey, T. G., Rhyne, D. B., Boggio, E. B., Snyder, S. J. and Jones, H. P. (1987). "Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat tissues." *J Clin Invest* 79(6): 1564-1570.
- Epstein, A. C., Gleadle, J. M., McNeill, L. A., Hewitson, K. S., O'Rourke, J., Mole, D. R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M. I., Dhanda, A., Tian, Y. M., Masson, N., Hamilton, D. L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Schofield, C. J. and Ratcliffe, P. J. (2001). "C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation." *Cell* 107(1): 43-54.
- Faure, P., Tamisier, R., Baguet, J. P., Favier, A., Halimi, S., Levy, P. and Pepin, J. L. (2008). "Impairment of serum albumin antioxidant properties in obstructive sleep apnoea syndrome." *Eur Respir J* 31(5): 1046-1053.
- Fischer, P. W., Campbell, J. S. and Giroux, A. (1991). "Effects of low copper and high zinc intakes and related changes in Cu,Zn-superoxide dismutase activity on DMBA-induced mammary tumorigenesis." *Biol Trace Elem Res* 30(1): 65-79.
- Fiskum, G. (1983). "Involvement of mitochondria in ischemic cell injury and in regulation of intracellular calcium." *Am J Emerg Med* 1(2): 147-153.

- Fletcher, E. C., Lesske, J., Culman, J., Miller, C. C. and Unger, T. (1992). "Sympathetic denervation blocks blood pressure elevation in episodic hypoxia." *Hypertension* 20(5): 612-619.
- Fletcher, E. C., Lesske, J., Qian, W., Miller, C. C., 3rd and Unger, T. (1992). "Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats." *Hypertension* 19(6 Pt 1): 555-561.
- Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D. and Semenza, G. L. (1996). "Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1." *Mol Cell Biol* 16(9): 4604-4613.
- Frederickson, C. J., Koh, J. Y. and Bush, A. I. (2005). "The neurobiology of zinc in health and disease." *Nat Rev Neurosci* 6(6): 449-462.
- Gami, A. S., Howard, D. E., Olson, E. J. and Somers, V. K. (2005). "Day-night pattern of sudden death in obstructive sleep apnea." *N Engl J Med* 352(12): 1206-1214.
- Gami, A. S., Olson, E. J., Shen, W. K., Wright, R. S., Ballman, K. V., Hodge, D. O., Herges, R. M., Howard, D. E. and Somers, V. K. (2013). "Obstructive sleep apnea and the risk of sudden cardiac death: a longitudinal study of 10,701 adults." *J Am Coll Cardiol* 62(7): 610-616.
- Garcia-Dorado, D., Rodriguez-Sinovas, A., Ruiz-Meana, M. and Inserte, J. (2014). "Protection against myocardial ischemia-reperfusion injury in clinical practice." *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 67(5): 394-404.
- Garcia-Rio, F. (2014). "Recurrent acute myocardial infarction and CPAP effect in mild-severe OSA: is an independent risk factor?" *Int J Cardiol* 171(2): e19.
- Garlick, P. B., Davies, M. J., Hearse, D. J. and Slater, T. F. (1987). "Direct detection of free radicals in the reperfused rat heart using electron spin resonance spectroscopy." *Circ Res* 61(5): 757-760.
- Girotti, A. W., Thomas, J. P. and Jordan, J. E. (1985). "Inhibitory effect of zinc(II) on free radical lipid peroxidation in erythrocyte membranes." *J Free Radic Biol Med* 1(5-6): 395-401.
- Gjorup, P. H., Sadauskiene, L., Wessels, J., Nyvad, O., Strunge, B. and Pedersen, E. B. (2007). "Abnormally increased endothelin-1 in plasma during the night in obstructive sleep apnea: relation to blood pressure and severity of disease." *Am J Hypertens* 20(1): 44-52.
- Gobel, F. L., Norstrom, L. A., Nelson, R. R., Jorgensen, C. R. and Wang, Y. (1978). "The rate-pressure product as an index of myocardial oxygen consumption during exercise in patients with angina pectoris." *Circulation* 57(3): 549-556.
- Goetz, K. L., Wang, B. C., Madwed, J. B., Zhu, J. L. and Leadley, R. J., Jr. (1988). "Cardiovascular, renal, and endocrine responses to intravenous endothelin in conscious dogs." *Am J Physiol* 255(6 Pt 2): R1064-1068.
- Gozal, D., Lipton, A. J. and Jones, K. L. (2002). "Circulating vascular endothelial growth factor levels in patients with obstructive sleep apnea." *Sleep* 25(1): 59-65.

- GRAS, Emmanuelle. "Altérations cardiaques et vasculaires induites par le syndrome d'apnées obstructives du sommeil : rôle de HIF-1 et d'un de ses gènes cibles, l'endothéline-1". Th de Physiologie, Physiopathologie, Pharmacologie. Grenoble. 2014. 196p.
- Gras, E., Belaidi, E., Briancon-Marjollet, A., Pepin, J. L., Arnaud, C. and Godin-Ribuot, D. (2016). "Endothelin-1 mediates intermittent hypoxia-induced inflammatory vascular remodeling through HIF-1 activation." *J Appl Physiol* (1985) 120(4): 437-443.
- Grebe, M., Eisele, H. J., Weissmann, N., Schaefer, C., Tillmanns, H., Seeger, W. and Schulz, R. (2006). "Antioxidant vitamin C improves endothelial function in obstructive sleep apnea." *Am J Respir Crit Care Med* 173(8): 897-901.
- Greenawalt, J. W., Rossi, C. S. and Lehninger, A. L. (1964). "Effect of Active Accumulation of Calcium and Phosphate Ions on the Structure of Rat Liver Mitochondria." *J Cell Biol* 23: 21-38.
- Guarnieri, C., Flamigni, F. and Caldarera, C. M. (1980). "Role of oxygen in the cellular damage induced by re-oxygenation of hypoxic heart." *J Mol Cell Cardiol* 12(8): 797-808.
- Guidry, U. C., Mendes, L. A., Evans, J. C., Levy, D., O'Connor, G. T., Larson, M. G., Gottlieb, D. J. and Benjamin, E. J. (2001). "Echocardiographic features of the right heart in sleep-disordered breathing: the Framingham Heart Study." *Am J Respir Crit Care Med* 164(6): 933-938.
- Guo, J., Sun, Y., Xue, L. J., Huang, Z. Y., Wang, Y. S., Zhang, L., Zhou, G. H. and Yuan, L. X. (2016). "Effect of CPAP therapy on cardiovascular events and mortality in patients with obstructive sleep apnea: a meta-analysis." *Sleep Breath*.
- Gurkoff, G., Shahlaie, K., Lyeth, B. and Berman, R. (2013). "Voltage-gated calcium channel antagonists and traumatic brain injury." *Pharmaceuticals (Basel)* 6(7): 788-812.
- Halestrap, A. P., Clarke, S. J. and Javadov, S. A. (2004). "Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection." *Cardiovasc Res* 61(3): 372-385.
- Hearse, D. J. (1979). "Oxygen deprivation and early myocardial contractile failure: a reassessment of the possible role of adenosine triphosphate." *Am J Cardiol* 44(6): 1115-1121.
- Hearse, D. J. (1990). "Ischemia, reperfusion, and the determinants of tissue injury." *Cardiovasc Drugs Ther* 4 Suppl 4: 767-776.
- Hearse, D. J., Garlick, P. B. and Humphrey, S. M. (1977). "Ischemic contracture of the myocardium: mechanisms and prevention." *Am J Cardiol* 39(7): 986-993.
- Heitmann, J., Ehlenz, K., Penzel, T., Becker, H. F., Grote, L., Voigt, K. H., Peter, J. H. and Vogelmeier, C. (2004). "Sympathetic activity is reduced by nCPAP in hypertensive obstructive sleep apnoea patients." *Eur Respir J* 23(2): 255-262.
- Hernando, V., Inserte, J., Sartorio, C. L., Parra, V. M., Poncelas-Nozal, M. and Garcia-Dorado, D. (2010). "Calpain translocation and activation as pharmacological targets during myocardial ischemia/reperfusion." *J Mol Cell Cardiol* 49(2): 271-279.

- Hirano, T., Murakami, M., Fukada, T., Nishida, K., Yamasaki, S. and Suzuki, T. (2008). "Roles of zinc and zinc signaling in immunity: zinc as an intracellular signaling molecule." *Adv Immunol* 97: 149-176.
- Hool, L. C. (2009). "The L-type Ca(2+) channel as a potential mediator of pathology during alterations in cellular redox state." *Heart Lung Circ* 18(1): 3-10.
- Hoyos, C. M., Melehan, K. L., Liu, P. Y., Grunstein, R. R. and Phillips, C. L. (2015). "Does obstructive sleep apnea cause endothelial dysfunction? A critical review of the literature." *Sleep Med Rev* 20: 15-26.
- Hu, J., Discher, D. J., Bishopric, N. H. and Webster, K. A. (1998). "Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand." *Biochem Biophys Res Commun* 245(3): 894-899.
- Huang, J., Xie, T., Wu, Y., Li, X., Lusina, S., Ji, E. S., Xiang, S., Liu, Y., Gautam, S. and Weiss, J. W. (2010). "Cyclic intermittent hypoxia enhances renal sympathetic response to ICV ET-1 in conscious rats." *Respir Physiol Neurobiol* 171(2): 83-89.
- Huang, L. E., Gu, J., Schau, M. and Bunn, H. F. (1998). "Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(14): 7987-7992.
- Hui-guo, L., Kui, L., Yan-ning, Z. and Yong-jian, X. (2010). "Apocynin attenuate spatial learning deficits and oxidative responses to intermittent hypoxia." *Sleep Med* 11(2): 205-212.
- Hung, M. W., Kravtsov, G. M., Lau, C. F., Poon, A. M., Tipoe, G. L. and Fung, M. L. (2013). "Melatonin ameliorates endothelial dysfunction, vascular inflammation, and systemic hypertension in rats with chronic intermittent hypoxia." *J Pineal Res* 55(3): 247-256.
- Hurst, J. H. (2016). "William Kaelin, Peter Ratcliffe, and Gregg Semenza receive the 2016 Albert Lasker Basic Medical Research Award." *J Clin Invest* 126(10): 3628-3638.
- Imagawa, S., Yamaguchi, Y., Higuchi, M., Neichi, T., Hasegawa, Y., Mukai, H. Y., Suzuki, N., Yamamoto, M. and Nagasawa, T. (2001). "Levels of vascular endothelial growth factor are elevated in patients with obstructive sleep apnea--hypopnea syndrome." *Blood* 98(4): 1255-1257.
- Inserte, J., Garcia-Dorado, D., Hernando, V. and Soler-Soler, J. (2005). "Calpain-mediated impairment of Na+/K+-ATPase activity during early reperfusion contributes to cell death after myocardial ischemia." *Circ Res* 97(5): 465-473.
- Ito, E. and Inoue, Y. (2015). "[The International Classification of Sleep Disorders, third edition. American Academy of Sleep Medicine. Includes bibliographies and index]." *Nihon Rinsho* 73(6): 916-923.
- Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., von Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W. and Ratcliffe, P. J.

- (2001). "Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation." *Science* 292(5516): 468-472.
- Jamwal, S., Kumar, K. and Reddy, B. V. (2016). "Beneficial effect of zinc chloride and zinc ionophore pyrithione on attenuated cardioprotective potential of preconditioning phenomenon in STZ-induced diabetic rat heart." *Perfusion* 31(4): 334-342.
- Javaheri, S. and Javaheri, A. (2013). "Sleep apnea, heart failure, and pulmonary hypertension." *Curr Heart Fail Rep* 10(4): 315-320.
- Jelic, S., Lederer, D. J., Adams, T., Padeletti, M., Colombo, P. C., Factor, P. and Le Jemtel, T. H. (2009). "Endothelial repair capacity and apoptosis are inversely related in obstructive sleep apnea." *Vasc Health Risk Manag* 5: 909-920.
- Jelic, S., Padeletti, M., Kawut, S. M., Higgins, C., Canfield, S. M., Onat, D., Colombo, P. C., Basner, R. C., Factor, P. and LeJemtel, T. H. (2008). "Inflammation, oxidative stress, and repair capacity of the vascular endothelium in obstructive sleep apnea." *Circulation* 117(17): 2270-2278.
- Jennings, R. B., Reimer, K. A. and Steenbergen, C. (1986). "Myocardial ischemia revisited. The osmolar load, membrane damage, and reperfusion." *J Mol Cell Cardiol* 18(8): 769-780.
- Jennings, R. B., Sommers, H. M., Smyth, G. A., Flack, H. A. and Linn, H. (1960). "Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog." *Arch Pathol* 70: 68-78.
- Jiang, B. H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R. and Semenza, G. L. (1996). "Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1." *J Biol Chem* 271(30): 17771-17778.
- Jiang, B. H., Semenza, G. L., Bauer, C. and Marti, H. H. (1996). "Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension." *Am J Physiol* 271(4 Pt 1): C1172-1180.
- Jiang, B. H., Zheng, J. Z., Leung, S. W., Roe, R. and Semenza, G. L. (1997). "Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension." *J Biol Chem* 272(31): 19253-19260.
- Johansson, K., Neovius, M., Lagerros, Y. T., Harlid, R., Rossner, S., Granath, F. and Hemmingsson, E. (2009). "Effect of a very low energy diet on moderate and severe obstructive sleep apnoea in obese men: a randomised controlled trial." *BMJ* 339: b4609.
- Joyeux-Faure, M., Jullian-Desayes, I., Pepin, J. L., Cracowski, J. L., Baguet, J. P., Tamiel, R., Levy, P., Godin-Ribuot, D. and Launois, S. H. (2016). "Comparison of continuous positive airway pressure and bosentan effect in mildly hypertensive patients with obstructive sleep apnoea: A randomized controlled pilot study." *Respirology* 21(3): 546-552.
- Joyeux-Faure, M., Stanke-Labesque, F., Lefebvre, B., Beguin, P., Godin-Ribuot, D., Ribuot, C., Launois, S. H., Bessard, G. and Levy, P. (2005). "Chronic intermittent hypoxia increases infarction in the isolated rat heart." *J Appl Physiol* (1985) 98(5): 1691-1696.

- Jun, J., Savransky, V., Nanayakkara, A., Bevans, S., Li, J., Smith, P. L. and Polotsky, V. Y. (2008). "Intermittent hypoxia has organ-specific effects on oxidative stress." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295(4): R1274-1281.
- Jung, F., Palmer, L. A., Zhou, N. and Johns, R. A. (2000). "Hypoxic regulation of inducible nitric oxide synthase via hypoxia inducible factor-1 in cardiac myocytes." *Circ Res* 86(3): 319-325.
- Kaczmarek, E., Bakker, J. P., Clarke, D. N., Csizmadia, E., Kocher, O., Veves, A., Tecilazich, F., O'Donnell, C. P., Ferran, C. and Malhotra, A. (2013). "Molecular biomarkers of vascular dysfunction in obstructive sleep apnea." *PLoS One* 8(7): e70559.
- Kallio, P. J., Okamoto, K., O'Brien, S., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H. and Poellinger, L. (1998). "Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha." *EMBO J* 17(22): 6573-6586.
- Kanagy, N. L., Walker, B. R. and Nelin, L. D. (2001). "Role of endothelin in intermittent hypoxia-induced hypertension." *Hypertension* 37(2 Pt 2): 511-515.
- Kaoukis, A., Deftereos, S., Raisakis, K., Giannopoulos, G., Bouras, G., Panagopoulou, V., Papoutsidakis, N., Cleman, M. W. and Stefanadis, C. (2013). "The role of endothelin system in cardiovascular disease and the potential therapeutic perspectives of its inhibition." *Curr Top Med Chem* 13(2): 95-114.
- Kaplan, P., Hendriks, M., Mattheussen, M., Mubagwa, K. and Flameng, W. (1992). "Effect of ischemia and reperfusion on sarcoplasmic reticulum calcium uptake." *Circ Res* 71(5): 1123-1130.
- Karagulova, G., Yue, Y., Moreyra, A., Boutjdir, M. and Korichneva, I. (2007). "Protective role of intracellular zinc in myocardial ischemia/reperfusion is associated with preservation of protein kinase C isoforms." *J Pharmacol Exp Ther* 321(2): 517-525.
- Karmazyn, M., Gan, X. T., Humphreys, R. A., Yoshida, H. and Kusumoto, K. (1999). "The myocardial Na(+)-H(+) exchange: structure, regulation, and its role in heart disease." *Circ Res* 85(9): 777-786.
- Kasai, T. and Bradley, T. D. (2011). "Obstructive sleep apnea and heart failure: pathophysiologic and therapeutic implications." *J Am Coll Cardiol* 57(2): 119-127.
- Khuri, S. F., Kloner, R. A., Karaffa, S. A., Marston, W., Taylor, A. D., Lai, N. C., Tow, D. E. and Barsamian, E. M. (1985). "The significance of the late fall in myocardial PCO₂ and its relationship to myocardial pH after regional coronary occlusion in the dog." *Circ Res* 56(4): 537-547.
- Kloner, R. A. (2013). "Current state of clinical translation of cardioprotective agents for acute myocardial infarction." *Circ Res* 113(4): 451-463.
- Kolettis, T. M., Baltogiannis, G. G., Tsalikakis, D. G., Tzallas, A. T., Agelaki, M. G., Fotopoulos, A., Fotiadis, D. I. and Kyriakides, Z. S. (2008). "Effects of dual endothelin receptor blockade on

- sympathetic activation and arrhythmogenesis during acute myocardial infarction in rats." *Eur J Pharmacol* 580(1-2): 241-249.
- Korichneva, I., Hoyos, B., Chua, R., Levi, E. and Hammerling, U. (2002). "Zinc release from protein kinase C as the common event during activation by lipid second messenger or reactive oxygen." *J Biol Chem* 277(46): 44327-44331.
- Korichneva, I. (2006). "Zinc dynamics in the myocardial redox signaling network." *Antioxid Redox Signal* 8(9-10): 1707-1721.
- Korshunov, S. S., Krasnikov, B. F., Pereverzev, M. O. and Skulachev, V. P. (1999). "The antioxidant functions of cytochrome c." *FEBS Lett* 462(1-2): 192-198.
- Kraiczi, H., Hedner, J., Peker, Y. and Carlson, J. (2000). "Increased vasoconstrictor sensitivity in obstructive sleep apnea." *J Appl Physiol* (1985) 89(2): 493-498.
- Krause, B. J., Del Rio, R., Moya, E. A., Marquez-Gutierrez, M., Casanello, P. and Iturriaga, R. (2015). "Arginase-endothelial nitric oxide synthase imbalance contributes to endothelial dysfunction during chronic intermittent hypoxia." *J Hypertens* 33(3): 515-524; discussion 524.
- Krause, S. and Hess, M. L. (1984). "Characterization of cardiac sarcoplasmic reticulum dysfunction during short-term, normothermic, global ischemia." *Circ Res* 55(2): 176-184.
- Krezel, A. and Maret, W. (2006). "Zinc-buffering capacity of a eukaryotic cell at physiological pZn." *J Biol Inorg Chem* 11(8): 1049-1062.
- Kribbs, N. B., Pack, A. I., Kline, L. R., Smith, P. L., Schwartz, A. R., Schubert, N. M., Redline, S., Henry, J. N., Getsy, J. E. and Dinges, D. F. (1993). "Objective measurement of patterns of nasal CPAP use by patients with obstructive sleep apnea." *Am Rev Respir Dis* 147(4): 887-895.
- Kroemer, G., Galluzzi, L. and Brenner, C. (2007). "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death." *Physiol Rev* 87(1): 99-163.
- Kubow, S., Bray, T. M. and Bettger, W. J. (1986). "Effects of dietary zinc and copper on free radical production in rat lung and liver." *Can J Physiol Pharmacol* 64(10): 1281-1285.
- Kumar, G. K., Kim, D. K., Lee, M. S., Ramachandran, R. and Prabhakar, N. R. (2003). "Activation of tyrosine hydroxylase by intermittent hypoxia: involvement of serine phosphorylation." *J Appl Physiol* (1985) 95(2): 536-544.
- Kumar, G. K., Rai, V., Sharma, S. D., Ramakrishnan, D. P., Peng, Y. J., Souvannakitti, D. and Prabhakar, N. R. (2006). "Chronic intermittent hypoxia induces hypoxia-evoked catecholamine efflux in adult rat adrenal medulla via oxidative stress." *J Physiol* 575(Pt 1): 229-239.
- Kuniyoshi, F. H., Garcia-Touchard, A., Gami, A. S., Romero-Corral, A., van der Walt, C., Pusalavidyasagar, S., Kara, T., Caples, S. M., Pressman, G. S., Vasquez, E. C., Lopez-Jimenez, F. and Somers, V. K. (2008). "Day-night variation of acute myocardial infarction in obstructive sleep apnea." *J Am Coll Cardiol* 52(5): 343-346.

- Kuri, B. A., Khan, S. A., Chan, S. A., Prabhakar, N. R. and Smith, C. B. (2007). "Increased secretory capacity of mouse adrenal chromaffin cells by chronic intermittent hypoxia: involvement of protein kinase C." *J Physiol* 584(Pt 1): 313-319.
- Lagneux, C., Joyeux, M., Demenge, P., Ribuot, C. and Godin-Ribuot, D. (2000). "Protective effects of melatonin against ischemia-reperfusion injury in the isolated rat heart." *Life Sci* 66(6): 503-509.
- Lavie, L. (2003). "Obstructive sleep apnoea syndrome--an oxidative stress disorder." *Sleep Med Rev* 7(1): 35-51.
- Lavie, L. (2015). "Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia--revisited--the bad ugly and good: implications to the heart and brain." *Sleep Med Rev* 20: 27-45.
- Lavie, L., Vishnevsky, A. and Lavie, P. (2004). "Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea." *Sleep* 27(1): 123-128.
- Lee, C. H., Khoo, S. M., Chan, M. Y., Wong, H. B., Low, A. F., Phua, Q. H., Richards, A. M., Tan, H. C. and Yeo, T. C. (2011). "Severe obstructive sleep apnea and outcomes following myocardial infarction." *J Clin Sleep Med* 7(6): 616-621.
- Lee, S., Chanoit, G., McIntosh, R., Zvara, D. A. and Xu, Z. (2009). "Molecular mechanism underlying Akt activation in zinc-induced cardioprotection." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297(2): H569-575.
- Lefebvre, B., Godin-Ribuot, D., Joyeux-Faure, M., Caron, F., Bessard, G., Levy, P. and Stanke-Labesque, F. (2006). "Functional assessment of vascular reactivity after chronic intermittent hypoxia in the rat." *Respir Physiol Neurobiol* 150(2-3): 278-286.
- Lesnefsky, E. J., Slabe, T. J., Stoll, M. S., Minkler, P. E. and Hoppel, C. L. (2001). "Myocardial ischemia selectively depletes cardiolipin in rabbit heart subsarcolemmal mitochondria." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280(6): H2770-2778.
- Lesske, J., Fletcher, E. C., Bao, G. and Unger, T. (1997). "Hypertension caused by chronic intermittent hypoxia--influence of chemoreceptors and sympathetic nervous system." *J Hypertens* 15(12 Pt 2): 1593-1603.
- Levy, P., Kohler, M., McNicholas, W. T., Barbe, F., McEvoy, R. D., Somers, V. K., Lavie, L. and Pepin, J. L. (2015). "Obstructive sleep apnoea syndrome." *Nat Rev Dis Primers* 1: 15015.
- Li, H. and Forstermann, U. (2013). "Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease." *Curr Opin Pharmacol* 13(2): 161-167.
- Li, L., Chu, Y., Fink, G. D., Engelhardt, J. F., Heistad, D. D. and Chen, A. F. (2003). "Endothelin-1 stimulates arterial VCAM-1 expression via NADPH oxidase-derived superoxide in mineralocorticoid hypertension." *Hypertension* 42(5): 997-1003.

- Li, M. S., Adesina, S. E., Ellis, C. L., Gooch, J. L., Hoover, R. S. and Williams, C. R. (2017). "NADPH oxidase-2 mediates zinc deficiency-induced oxidative stress and kidney damage." *Am J Physiol Cell Physiol* 312(1): C47-C55.
- Li, R., Wang, Y., Yang, Z., He, Y., Zhao, T., Fan, M., Wang, X. and Zhu, L. (2015). "Hypoxia-inducible factor-1alpha regulates the expression of L-type voltage-dependent Ca(2+) channels in PC12 cells under hypoxia." *Cell Stress Chaperones* 20(3): 507-516.
- Lichten, L. A. and Cousins, R. J. (2009). "Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation." *Annu Rev Nutr* 29: 153-176.
- Lim, J., Lasserson, T. J., Fleetham, J. and Wright, J. (2006). "Oral appliances for obstructive sleep apnoea." *Cochrane Database Syst Rev*(1): CD004435.
- Lipscombe, D., Helton, T. D. and Xu, W. (2004). "L-type calcium channels: the low down." *J Neurophysiol* 92(5): 2633-2641.
- Liuzzi, J. P. and Cousins, R. J. (2004). "Mammalian zinc transporters." *Annu Rev Nutr* 24: 151-172.
- Low, W. I. and Ikram, H. (1976). "Plasma zinc in acute myocardial infarction. Diagnostic and prognostic implications." *Br Heart J* 38(12): 1339-1342.
- Madesh, M. and Hajnoczky, G. (2001). "VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release." *J Cell Biol* 155(6): 1003-1015.
- Mahon, P. C., Hirota, K. and Semenza, G. L. (2001). "FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity." *Genes Dev* 15(20): 2675-2686.
- Malhotra, A. and White, D. P. (2002). "Obstructive sleep apnoea." *Lancet* 360(9328): 237-245.
- Malliani, A., Pagani, M., Lombardi, F. and Cerutti, S. (1991). "Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain." *Circulation* 84(2): 482-492.
- Manning, A. S., Coltart, D. J. and Hearse, D. J. (1984). "Ischemia and reperfusion-induced arrhythmias in the rat. Effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol." *Circ Res* 55(4): 545-548.
- Manning, A. S. and Hearse, D. J. (1984). "Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention." *J Mol Cell Cardiol* 16(6): 497-518.
- Manning, R. D., Jr., Tian, N. and Meng, S. (2005). "Oxidative stress and antioxidant treatment in hypertension and the associated renal damage." *Am J Nephrol* 25(4): 311-317.
- Mansfield, K. D., Guzy, R. D., Pan, Y., Young, R. M., Cash, T. P., Schumacker, P. T. and Simon, M. C. (2005). "Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF-alpha activation." *Cell Metab* 1(6): 393-399.
- Marban, E., Kitakaze, M., Koretsune, Y., Yue, D. T., Chacko, V. P. and Pike, M. M. (1990). "Quantification of [Ca²⁺]_i in perfused hearts. Critical evaluation of the 5F-BAPTA and nuclear

- magnetic resonance method as applied to the study of ischemia and reperfusion." *Circ Res* 66(5): 1255-1267.
- Marin, F., Roldan, V., Gonzalez-Conejero, R. and Corral, J. (2005). "Pharmacogenetics in cardiovascular antithrombotic therapy." *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 3(4): 357-364.
- Marin, J. M., Agusti, A., Villar, I., Forner, M., Nieto, D., Carrizo, S. J., Barbe, F., Vicente, E., Wei, Y., Nieto, F. J. and Jelic, S. (2012). "Association between treated and untreated obstructive sleep apnea and risk of hypertension." *JAMA* 307(20): 2169-2176.
- Marin, J. M., Carrizo, S. J., Vicente, E. and Agusti, A. G. (2005). "Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study." *Lancet* 365(9464): 1046-1053.
- Mathew, B. M., Kumar, S., Ahmad, M. S., Seth, T. D., Hasan, M. Z. and Jamil, S. A. (1978). "A temporal profile of myocardial zinc changes after isoproterenol induced cardiac necrosis." *Jpn Circ J* 42(3): 353-357.
- McCord, J. M. (1985). "Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury." *N Engl J Med* 312(3): 159-163.
- McEvoy, R. D., Antic, N. A., Heeley, E., Luo, Y., Ou, Q., Zhang, X., Mediano, O., Chen, R., Drager, L. F., Liu, Z., Chen, G., Du, B., McArdle, N., Mukherjee, S., Tripathi, M., Billot, L., Li, Q., Lorenzi-Filho, G., Barbe, F., Redline, S., Wang, J., Arima, H., Neal, B., White, D. P., Grunstein, R. R., Zhong, N. and Anderson, C. S. (2016). "CPAP for Prevention of Cardiovascular Events in Obstructive Sleep Apnea." *N Engl J Med* 375(10): 919-931.
- McGuire, M. and Bradford, A. (2001). "Chronic intermittent hypercapnic hypoxia increases pulmonary arterial pressure and haematocrit in rats." *Eur Respir J* 18(2): 279-285.
- McIntosh, R., Lee, S., Ghio, A. J., Xi, J., Zhu, M., Shen, X., Chanoit, G., Zvara, D. A. and Xu, Z. (2010). "The critical role of intracellular zinc in adenosine A(2) receptor activation induced cardioprotection against reperfusion injury." *J Mol Cell Cardiol* 49(1): 41-47.
- McNicholas, W. T. and Bonsignore, M. R. (2007). "Sleep apnoea as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence, basic mechanisms and research priorities." *Eur Respir J* 29(1): 156-178.
- Mehra, R., Benjamin, E. J., Shahar, E., Gottlieb, D. J., Nawabit, R., Kirchner, H. L., Sahadevan, J. and Redline, S. (2006). "Association of nocturnal arrhythmias with sleep-disordered breathing: The Sleep Heart Health Study." *Am J Respir Crit Care Med* 173(8): 910-916.
- Merx, M. W., Flogel, U., Stumpe, T., Godecke, A., Decking, U. K. and Schrader, J. (2001). "Myoglobin facilitates oxygen diffusion." *FASEB J* 15(6): 1077-1079.

- Monneret, D., Pepin, J. L., Godin-Ribuot, D., Ducros, V., Baguet, J. P., Levy, P. and Faure, P. (2010). "Association of urinary 15-F2t-isoprostane level with oxygen desaturation and carotid intima-media thickness in nonobese sleep apnea patients." *Free Radic Biol Med* 48(4): 619-625.
- Mooe, T., Franklin, K. A., Holmstrom, K., Rabben, T. and Wiklund, U. (2001). "Sleep-disordered breathing and coronary artery disease: long-term prognosis." *Am J Respir Crit Care Med* 164(10 Pt 1): 1910-1913.
- Moss, A. J. (2006). "QTc prolongation and sudden cardiac death: the association is in the detail." *J Am Coll Cardiol* 47(2): 368-369.
- Murakami, M., Niwa, H., Kushikata, T., Watanabe, H., Hirota, K., Ono, K. and Ohba, T. (2014). "Inhalation anesthesia is preferable for recording rat cardiac function using an electrocardiogram." *Biol Pharm Bull* 37(5): 834-839.
- Myerburg, R. J. and Junttila, M. J. (2012). "Sudden cardiac death caused by coronary heart disease." *Circulation* 125(8): 1043-1052.
- Nakamura, T., Hayashi, H., Satoh, H., Katoh, H., Kaneko, M. and Terada, H. (1999). "A single cell model of myocardial reperfusion injury: changes in intracellular Na⁺ and Ca²⁺ concentrations in guinea pig ventricular myocytes." *Mol Cell Biochem* 194(1-2): 147-157.
- Nakaya, H., Takeda, Y., Tohse, N. and Kanno, M. (1992). "Mechanism of the membrane depolarization induced by oxidative stress in guinea-pig ventricular cells." *J Mol Cell Cardiol* 24(5): 523-534.
- Nanduri, J., Vaddi, D. R., Khan, S. A., Wang, N., Makarenko, V., Semenza, G. L. and Prabhakar, N. R. (2015). "HIF-1 α activation by intermittent hypoxia requires NADPH oxidase stimulation by xanthine oxidase." *PLoS One* 10(3): e0119762.
- Narkiewicz, K., Kato, M., Phillips, B. G., Pesek, C. A., Davison, D. E. and Somers, V. K. (1999). "Nocturnal continuous positive airway pressure decreases daytime sympathetic traffic in obstructive sleep apnea." *Circulation* 100(23): 2332-2335.
- Neely, J. R. and Grotyohann, L. W. (1984). "Role of glycolytic products in damage to ischemic myocardium. Dissociation of adenosine triphosphate levels and recovery of function of reperfused ischemic hearts." *Circ Res* 55(6): 816-824.
- Nisbet, R. E., Graves, A. S., Kleinhenz, D. J., Rupnow, H. L., Reed, A. L., Fan, T. H., Mitchell, P. O., Sutliff, R. L. and Hart, C. M. (2009). "The role of NADPH oxidase in chronic intermittent hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice." *Am J Respir Cell Mol Biol* 40(5): 601-609.
- Onosaka, S. and Cherian, M. G. (1982). "The induced synthesis of metallothionein in various tissues of rats in response to metals. II. Influence of zinc status and specific effect on pancreatic metallothionein." *Toxicology* 23(1): 11-20.
- Opie, L. H. (2004). *Heart Physiology: From Cell to Circulation*, Lippincott Williams & Wilkins.

- Oudit, G. Y., Kassiri, Z., Sah, R., Ramirez, R. J., Zobel, C. and Backx, P. H. (2001). "The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current (I_{to}) in normal and diseased myocardium." *J Mol Cell Cardiol* 33(5): 851-872.
- Owen, P., Dennis, S. and Opie, L. H. (1990). "Glucose flux rate regulates onset of ischemic contracture in globally underperfused rat hearts." *Circ Res* 66(2): 344-354.
- Ozyildirim, S., Baltaci, A. K., Sahna, E. and Mogulkoc, R. (2016). "Effects of Chronic and Acute Zinc Supplementation on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Rats." *Biol Trace Elem Res*.
- Palmiter, R. D. and Findley, S. D. (1995). "Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc." *EMBO J* 14(4): 639-649.
- Panikkath, R., Reinier, K., Uy-Evanado, A., Teodorescu, C., Hattenhauer, J., Mariani, R., Gunson, K., Jui, J. and Chugh, S. S. (2011). "Prolonged Tpeak-to-tend interval on the resting ECG is associated with increased risk of sudden cardiac death." *Circ Arrhythm Electrophysiol* 4(4): 441-447.
- Pasdois, P., Parker, J. E., Griffiths, E. J. and Halestrap, A. P. (2011). "The role of oxidized cytochrome c in regulating mitochondrial reactive oxygen species production and its perturbation in ischaemia." *Biochem J* 436(2): 493-505.
- Passali, D., Corallo, G., Yaremchuk, S., Longini, M., Proietti, F., Passali, G. C. and Bellussi, L. (2015). "Oxidative stress in patients with obstructive sleep apnoea syndrome." *Acta Otorhinolaryngol Ital* 35(6): 420-425.
- Peker, Y., Kraiczi, H., Hedner, J., Loth, S., Johansson, A. and Bende, M. (1999). "An independent association between obstructive sleep apnoea and coronary artery disease." *Eur Respir J* 14(1): 179-184.
- Peng, Y. J., Nanduri, J., Raghuraman, G., Wang, N., Kumar, G. K. and Prabhakar, N. R. (2013). "Role of oxidative stress-induced endothelin-converting enzyme activity in the alteration of carotid body function by chronic intermittent hypoxia." *Exp Physiol* 98(11): 1620-1630.
- Peng, Y. J., Overholt, J. L., Kline, D., Kumar, G. K. and Prabhakar, N. R. (2003). "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(17): 10073-10078.
- Peng, Y. J., Yuan, G., Ramakrishnan, D., Sharma, S. D., Bosch-Marce, M., Kumar, G. K., Semenza, G. L. and Prabhakar, N. R. (2006). "Heterozygous HIF-1 α deficiency impairs carotid body-mediated systemic responses and reactive oxygen species generation in mice exposed to intermittent hypoxia." *J Physiol* 577(Pt 2): 705-716.
- Penny, W. J. and Sheridan, D. J. (1983). "Arrhythmias and cellular electrophysiological changes during myocardial "ischaemia" and reperfusion." *Cardiovasc Res* 17(6): 363-372.
- Pepin, J. L., Krieger, J., Rodenstein, D., Cornette, A., Sforza, E., Delguste, P., Deschaux, C., Grillier, V. and Levy, P. (1999). "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(4): 1124-1129.
- Peppard, P. E., Young, T., Barnet, J. H., Palta, M., Hagen, E. W. and Hla, K. M. (2013). "Increased prevalence of sleep-disordered breathing in adults." *Am J Epidemiol* 177(9): 1006-1014.
- Peppard, P. E., Young, T., Palta, M. and Skatrud, J. (2000). "Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension." *N Engl J Med* 342(19): 1378-1384.
- Phillips, B. G., Narkiewicz, K., Pesek, C. A., Haynes, W. G., Dyken, M. E. and Somers, V. K. (1999). "Effects of obstructive sleep apnea on endothelin-1 and blood pressure." *J Hypertens* 17(1): 61-66.
- Phillips, S. A., Olson, E. B., Morgan, B. J. and Lombard, J. H. (2004). "Chronic intermittent hypoxia impairs endothelium-dependent dilation in rat cerebral and skeletal muscle resistance arteries." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286(1): H388-393.
- Pierola, J., Alemany, A., Yanez, A., de-la-Pena, M., Sanchez-de-la-Torre, M., Esquinas, C., Perez-Gutierrez, C., Burguera, B., Barbe, F. and Barcelo, A. (2011). "NADPH oxidase p22phox polymorphisms and oxidative stress in patients with obstructive sleep apnoea." *Respir Med* 105(11): 1748-1754.
- Piper, H. M., Abdallah, Y. and Schafer, C. (2004). "The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection." *Cardiovasc Res* 61(3): 365-371.
- Piper, H., Kasseckert, S., Abdallah, Y. (2016). "The sarcoplasmic reticulum as the primary target of reperfusion protection". *Cardiovasc Res* 70(2): 170-173.
- Pisarcik, S., Maylor, J., Lu, W., Yun, X., Udem, C., Sylvester, J. T., Semenza, G. L. and Shimoda, L. A. (2013). "Activation of hypoxia-inducible factor-1 in pulmonary arterial smooth muscle cells by endothelin-1." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 304(8): L549-561.
- Piwnica-Worms, D., Jacob, R., Shigeto, N., Horres, C. R. and Lieberman, M. (1986). "Na/H exchange in cultured chick heart cells: secondary stimulation of electrogenic transport during recovery from intracellular acidosis." *J Mol Cell Cardiol* 18(11): 1109-1116.
- Platoshyn, O., Yu, Y., Golovina, V. A., McDaniel, S. S., Krick, S., Li, L., Wang, J. Y., Rubin, L. J. and Yuan, J. X. (2001). "Chronic hypoxia decreases K(V) channel expression and function in pulmonary artery myocytes." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280(4): L801-812.
- Pott, C., Eckardt, L. and Goldhaber, J. I. (2011). "Triple threat: the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in the pathophysiology of cardiac arrhythmia, ischemia and heart failure." *Curr Drug Targets* 12(5): 737-747.
- Powell, S. R. (2000). "The antioxidant properties of zinc." *J Nutr* 130(5S Suppl): 1447S-1454S.
- Priori, S. G., Mantica, M., Napolitano, C. and Schwartz, P. J. (1990). "Early afterdepolarizations induced in vivo by reperfusion of ischemic myocardium. A possible mechanism for reperfusion arrhythmias." *Circulation* 81(6): 1911-1920.

- Punjabi, N. M. (2008). "The epidemiology of adult obstructive sleep apnea." *Proc Am Thorac Soc* 5(2): 136-143.
- Quintero, M., Gonzalez-Martin Mdel, C., Vega-Agapito, V., Gonzalez, C., Obeso, A., Farre, R., Agapito, T. and Yubero, S. (2013). "The effects of intermittent hypoxia on redox status, NF-kappaB activation, and plasma lipid levels are dependent on the lowest oxygen saturation." *Free Radic Biol Med* 65: 1143-1154.
- Ramond, A., Godin-Ribuot, D., Ribuot, C., Totoson, P., Koritchneva, I., Cachot, S., Levy, P. and Joyeux-Faure, M. (2013). "Oxidative stress mediates cardiac infarction aggravation induced by intermittent hypoxia." *Fundam Clin Pharmacol* 27(3): 252-261.
- Ramsey, I. S., Delling, M. and Clapham, D. E. (2006). "An introduction to TRP channels." *Annu Rev Physiol* 68: 619-647.
- Randerath, W. J., Verbraecken, J., Andreas, S., Bettega, G., Boudewyns, A., Hamans, E., Jalbert, F., Paoli, J. R., Sanner, B., Smith, I., Stuck, B. A., Lacassagne, L., Marklund, M., Maurer, J. T., Pepin, J. L., Valipour, A., Verse, T. and Fietze, I. (2011). "Non-CPAP therapies in obstructive sleep apnoea." *Eur Respir J* 37(5): 1000-1028.
- Rashid, M., Kotwani, A. and Fahim, M. (2012). "Long-acting phosphodiesterase 5 inhibitor, tadalafil, and superoxide dismutase mimetic, tempol, protect against acute hypoxia-induced pulmonary hypertension in rats." *Hum Exp Toxicol* 31(6): 626-636.
- Reimer, K. A. and Jennings, R. B. (1979). "The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow." *Lab Invest* 40(6): 633-644.
- Reimer, K. A., Jennings, R. B., Cobb, F. R., Murdock, R. H., Greenfield, J. C., Jr., Becker, L. C., Bulkley, B. H., Hutchins, G. M., Schwartz, R. P., Jr., Bailey, K. R. and et al. (1985). "Animal models for protecting ischemic myocardium: results of the NHLBI Cooperative Study. Comparison of unconscious and conscious dog models." *Circ Res* 56(5): 651-665.
- Reinke, C., Bevans-Fonti, S., Drager, L. F., Shin, M. K. and Polotsky, V. Y. (2011). "Effects of different acute hypoxic regimens on tissue oxygen profiles and metabolic outcomes." *J Appl Physiol* (1985) 111(3): 881-890.
- Rey, S., Del Rio, R. and Iturriaga, R. (2006). "Contribution of endothelin-1 to the enhanced carotid body chemosensory responses induced by chronic intermittent hypoxia." *Brain Res* 1086(1): 152-159.
- Rodriguez-Pascual, F., Busnadiago, O., Lagares, D. and Lamas, S. (2011). "Role of endothelin in the cardiovascular system." *Pharmacol Res* 63(6): 463-472.
- Rowell, J., Koitabashi, N. and Kass, D. A. (2010). "TRP-ing up heart and vessels: canonical transient receptor potential channels and cardiovascular disease." *J Cardiovasc Transl Res* 3(5): 516-524.

- Ruiz-Meana, M., Abellan, A., Miro-Casas, E., Agullo, E. and Garcia-Dorado, D. (2009). "Role of sarcoplasmic reticulum in mitochondrial permeability transition and cardiomyocyte death during reperfusion." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297(4): H1281-1289.
- Ryan, C. M., Usui, K., Floras, J. S. and Bradley, T. D. (2005). "Effect of continuous positive airway pressure on ventricular ectopy in heart failure patients with obstructive sleep apnoea." *Thorax* 60(9): 781-785.
- Sajkov, D. and McEvoy, R. D. (2009). "Obstructive sleep apnea and pulmonary hypertension." *Prog Cardiovasc Dis* 51(5): 363-370.
- Sanada, S., Komuro, I. and Kitakaze, M. (2011). "Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301(5): H1723-1741.
- Schafer, C., Ladilov, Y., Inserte, J., Schafer, M., Haffner, S., Garcia-Dorado, D. and Piper, H. M. (2001). "Role of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury." *Cardiovasc Res* 51(2): 241-250.
- Schafer, H., Koehler, U., Ewig, S., Hasper, E., Tasci, S. and Luderitz, B. (1999). "Obstructive sleep apnea as a risk marker in coronary artery disease." *Cardiology* 92(2): 79-84.
- Schulz, R., Hummel, C., Heinemann, S., Seeger, W. and Grimminger, F. (2002). "Serum levels of vascular endothelial growth factor are elevated in patients with obstructive sleep apnea and severe nighttime hypoxia." *Am J Respir Crit Care Med* 165(1): 67-70.
- Schulz, R., Murzabekova, G., Egemnazarov, B., Kraut, S., Eisele, H. J., Dumitrascu, R., Heitmann, J., Seimetz, M., Witzenrath, M., Ghofrani, H. A., Schermuly, R. T., Grimminger, F., Seeger, W. and Weissmann, N. (2014). "Arterial hypertension in a murine model of sleep apnea: role of NADPH oxidase 2." *J Hypertens* 32(2): 300-305.
- Schulz, R., Schmidt, D., Blum, A., Lopes-Ribeiro, X., Lucke, C., Mayer, K., Olschewski, H., Seeger, W. and Grimminger, F. (2000). "Decreased plasma levels of nitric oxide derivatives in obstructive sleep apnoea: response to CPAP therapy." *Thorax* 55(12): 1046-1051.
- Sebbag, L., Forrat, R., Canet, E., Renaud, S., Delaye, J. and de Lorgeril, M. (1994). "Effects of dietary supplementation with alpha-tocopherol on myocardial infarct size and ventricular arrhythmias in a dog model of ischemia-reperfusion." *J Am Coll Cardiol* 24(6): 1580-1585.
- Semenza, G. L. (2009). "Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1." *Physiology (Bethesda)* 24: 97-106.
- Semenza, G. L., Jiang, B. H., Leung, S. W., Passantino, R., Concordet, J. P., Maire, P. and Giallongo, A. (1996). "Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1." *J Biol Chem* 271(51): 32529-32537.

- Semenza, G. L. and Wang, G. L. (1992). "A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation." *Mol Cell Biol* 12(12): 5447-5454.
- Shaheen, A. A. and el-Fattah, A. A. (1995). "Effect of dietary zinc on lipid peroxidation, glutathione, protein thiols levels and superoxide dismutase activity in rat tissues." *Int J Biochem Cell Biol* 27(1): 89-95.
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. and Keshet, E. (1992). "Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis." *Nature* 359(6398): 843-845.
- Simonsen, U., Christensen, F. H. and Buus, N. H. (2009). "The effect of tempol on endothelium-dependent vasodilatation and blood pressure." *Pharmacol Ther* 122(2): 109-124.
- Singal, P. K., Kapur, N., Dhillon, K. S., Beamish, R. E. and Dhalla, N. S. (1982). "Role of free radicals in catecholamine-induced cardiomyopathy." *Can J Physiol Pharmacol* 60(11): 1390-1397.
- Smith, R. P., Veale, D., Pepin, J. L. and Levy, P. A. (1998). "Obstructive sleep apnoea and the autonomic nervous system." *Sleep Med Rev* 2(2): 69-92.
- Somers, V. K., Mark, A. L., Zavala, D. C. and Abboud, F. M. (1989). "Contrasting effects of hypoxia and hypercapnia on ventilation and sympathetic activity in humans." *J Appl Physiol* (1985) 67(5): 2101-2106.
- Somers, V. K., White, D. P., Amin, R., Abraham, W. T., Costa, F., Culebras, A., Daniels, S., Floras, J. S., Hunt, C. E., Olson, L. J., Pickering, T. G., Russell, R., Woo, M. and Young, T. (2008). "Sleep apnea and cardiovascular disease: an American Heart Association/american College Of Cardiology Foundation Scientific Statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on Clinical Cardiology, Stroke Council, and Council On Cardiovascular Nursing. In collaboration with the National Heart, Lung, and Blood Institute National Center on Sleep Disorders Research (National Institutes of Health)." *Circulation* 118(10): 1080-1111.
- Stal, P. S. and Johansson, B. (2012). "Abnormal mitochondria organization and oxidative activity in the palate muscles of long-term snorers with obstructive sleep apnea." *Respiration* 83(5): 407-417.
- Steenbergen, C., Murphy, E., Watts, J. A. and London, R. E. (1990). "Correlation between cytosolic free calcium, contracture, ATP, and irreversible ischemic injury in perfused rat heart." *Circ Res* 66(1): 135-146.
- Sueta, D., Tabata, N. and Hokimoto, S. (2017). "Clinical roles of calcium channel blockers in ischemic heart diseases." *Hypertens Res*.
- Sun, Q., Zhong, W., Zhang, W., Li, Q., Sun, X., Tan, X., Dong, D. and Zhou, Z. (2015). "Zinc deficiency mediates alcohol-induced apoptotic cell death in the liver of rats through activating ER and

- mitochondrial cell death pathways." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 308(9): G757-766.
- Szalai, G., Csordas, G., Hantash, B. M., Thomas, A. P. and Hajnoczky, G. (2000). "Calcium signal transmission between ryanodine receptors and mitochondria." *J Biol Chem* 275(20): 15305-15313.
- Szczurek, E. I., Bjornsson, C. S. and Taylor, C. G. (2001). "Dietary zinc deficiency and repletion modulate metallothionein immunolocalization and concentration in small intestine and liver of rats." *J Nutr* 131(8): 2132-2138.
- Tamisier, R., Pepin, J. L., Remy, J., Baguet, J. P., Taylor, J. A., Weiss, J. W. and Levy, P. (2011). "14 nights of intermittent hypoxia elevate daytime blood pressure and sympathetic activity in healthy humans." *Eur Respir J* 37(1): 119-128.
- Tanguy, S., Boucher, F., Besse, S., Ducros, V., Favier, A. and de Leiris, J. (1998). "Trace elements and cardioprotection: increasing endogenous glutathione peroxidase activity by oral selenium supplementation in rats limits reperfusion-induced arrhythmias." *J Trace Elem Med Biol* 12(1): 28-38.
- Tanguy, S., de Leiris, J., Besse, S. and Boucher, F. (2003). "Ageing exacerbates the cardiotoxicity of hydrogen peroxide through the Fenton reaction in rats." *Mech Ageing Dev* 124(2): 229-235.
- Tani, M. and Neely, J. R. (1989). "Role of intracellular Na⁺ in Ca²⁺ overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H⁺-Na⁺ and Na⁺-Ca²⁺ exchange." *Circ Res* 65(4): 1045-1056.
- Tani, M. and Neely, J. R. (1990). "Na⁺ accumulation increases Ca²⁺ overload and impairs function in anoxic rat heart." *J Mol Cell Cardiol* 22(1): 57-72.
- Ter Keurs, H. E. and Boyden, P. A. (2007). "Calcium and arrhythmogenesis." *Physiol Rev* 87(2): 457-506.
- Thomasouli, M. A., Brady, E. M., Davies, M. J., Hall, A. P., Khunti, K., Morris, D. H. and Gray, L. J. (2013). "The impact of diet and lifestyle management strategies for obstructive sleep apnoea in adults: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials." *Sleep Breath* 17(3): 925-935.
- Thompson, S. R., Ackermann, U. and Horner, R. L. (2001). "Sleep as a teaching tool for integrating respiratory physiology and motor control." *Adv Physiol Educ* 25(1-4): 101-116.
- Totoson, P., Fhayli, W., Faury, G., Korichneva, I., Cachot, S., Baldazza, M., Ribuot, C., Pepin, J. L., Levy, P. and Joyeux-Faure, M. (2013). "Atorvastatin protects against deleterious cardiovascular consequences induced by chronic intermittent hypoxia." *Exp Biol Med (Maywood)* 238(2): 223-232.

- Troncoso Brindeiro, C. M., da Silva, A. Q., Allahdadi, K. J., Youngblood, V. and Kanagy, N. L. (2007). "Reactive oxygen species contribute to sleep apnea-induced hypertension in rats." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(5): H2971-2976.
- Tugcu, A., Guzel, D., Yildirimturk, O. and Aytakin, S. (2009). "Evaluation of right ventricular systolic and diastolic function in patients with newly diagnosed obstructive sleep apnea syndrome without hypertension." *Cardiology* 113(3): 184-192.
- Turan, B. (2003). "Zinc-induced changes in ionic currents of cardiomyocytes." *Biol Trace Elem Res* 94(1): 49-60.
- Vallee, B. L. and Auld, D. S. (1990). "Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins." *Biochemistry* 29(24): 5647-5659.
- Vallee, B. L. and Falchuk, K. H. (1993). "The biochemical basis of zinc physiology." *Physiol Rev* 73(1): 79-118.
- Vanden Hoek, T. L., Li, C., Shao, Z., Schumacker, P. T. and Becker, L. B. (1997). "Significant levels of oxidants are generated by isolated cardiomyocytes during ischemia prior to reperfusion." *J Mol Cell Cardiol* 29(9): 2571-2583.
- Varadharaj, S., Porter, K., Pleister, A., Wannemacher, J., Sow, A., Jarjoura, D., Zweier, J. L. and Khayat, R. N. (2015). "Endothelial nitric oxide synthase uncoupling: a novel pathway in OSA induced vascular endothelial dysfunction." *Respir Physiol Neurobiol* 207: 40-47.
- Veasey, S. C., Lear, J., Zhu, Y., Grinspan, J. B., Hare, D. J., Wang, S., Bunch, D., Doble, P. A. and Robinson, S. R. (2013). "Long-term intermittent hypoxia elevates cobalt levels in the brain and injures white matter in adult mice." *Sleep* 36(10): 1471-1481.
- Verges, S., Chacaroun, S., Godin-Ribuot, D. and Baillieux, S. (2015). "Hypoxic Conditioning as a New Therapeutic Modality." *Front Pediatr* 3: 58.
- Vitarelli, A., Terzano, C., Saponara, M., Gaudio, C., Mangieri, E., Capotosto, L., Pergolini, M., D'Orazio, S., Continanza, G. and Cimino, E. (2015). "Assessment of Right Ventricular Function in Obstructive Sleep Apnea Syndrome and Effects of Continuous Positive Airway Pressure Therapy: A Pilot Study." *Can J Cardiol* 31(7): 823-831.
- Wagner, S., Maier, L. S. and Bers, D. M. (2015). "Role of sodium and calcium dysregulation in tachyarrhythmias in sudden cardiac death." *Circ Res* 116(12): 1956-1970.
- Walker, M. J., Curtis, M. J., Hearse, D. J., Campbell, R. W., Janse, M. J., Yellon, D. M., Cobbe, S. M., Coker, S. J., Harness, J. B., Harron, D. W. and et al. (1988). "The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion." *Cardiovasc Res* 22(7): 447-455.
- Wang, B., Yan, B., Song, D., Ye, X. and Liu, S. F. (2013). "Chronic intermittent hypoxia down-regulates endothelial nitric oxide synthase expression by an NF-kappaB-dependent mechanism." *Sleep Med* 14(2): 165-171.

- Wang, G., Huang, H., Zheng, H., He, Y., Zhang, Y., Xu, Z., Zhang, L. and Xi, J. (2016). "Zn²⁺ and mPTP Mediate Endoplasmic Reticulum Stress Inhibition-Induced Cardioprotection Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury." *Biol Trace Elem Res* 174(1): 189-197.
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. and Semenza, G. L. (1995). "Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(12): 5510-5514.
- Wang, G. L. and Semenza, G. L. (1995). "Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1." *J Biol Chem* 270(3): 1230-1237.
- Wang, J., Weigand, L., Lu, W., Sylvester, J. T., Semenza, G. L. and Shimoda, L. A. (2006). "Hypoxia inducible factor 1 mediates hypoxia-induced TRPC expression and elevated intracellular Ca²⁺ in pulmonary arterial smooth muscle cells." *Circ Res* 98(12): 1528-1537.
- Wang, J., Weigand, L., Wang, W., Sylvester, J. T. and Shimoda, L. A. (2005). "Chronic hypoxia inhibits Kv channel gene expression in rat distal pulmonary artery." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288(6): L1049-1058.
- Wang, Z., Li, A. Y., Guo, Q. H., Zhang, J. P., An, Q., Guo, Y. J., Chu, L., Weiss, J. W. and Ji, E. S. (2013). "Effects of cyclic intermittent hypoxia on ET-1 responsiveness and endothelial dysfunction of pulmonary arteries in rats." *PLoS One* 8(3): e58078.
- Wang, Z. F., Kang, J. and Dai, B. (2009). "[Expression and activation of hypoxia inducible factor-1 α and iNOS in the brain of rats with chronic intermittent hypoxia]." *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 32(10): 739-743.
- Wassmann, S., Laufs, U., Muller, K., Konkol, C., Ahlbory, K., Baumer, A. T., Linz, W., Bohm, M. and Nickenig, G. (2002). "Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(2): 300-305.
- Weaver, T. E., Maislin, G., Dinges, D. F., Bloxham, T., George, C. F., Greenberg, H., Kader, G., Mahowald, M., Younger, J. and Pack, A. I. (2007). "Relationship between hours of CPAP use and achieving normal levels of sleepiness and daily functioning." *Sleep* 30(6): 711-719.
- Weigand, L., Sylvester, J. T. and Shimoda, L. A. (2006). "Mechanisms of endothelin-1-induced contraction in pulmonary arteries from chronically hypoxic rats." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290(2): L284-290.
- Weiss, J. N., Korge, P., Honda, H. M. and Ping, P. (2003). "Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease." *Circ Res* 93(4): 292-301.
- Wiener, C. M., Booth, G. and Semenza, G. L. (1996). "In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1." *Biochem Biophys Res Commun* 225(2): 485-488.
- Wilde, A. A. and Aksnes, G. (1995). "Myocardial potassium loss and cell depolarisation in ischaemia and hypoxia." *Cardiovasc Res* 29(1): 1-15.

- Wildenthal, K. (1978). "Lysosomal alterations in ischemic myocardium: result or cause of myocellular damage?" *J Mol Cell Cardiol* 10(7): 595-603.
- Williams, R., Lemaire, P., Lewis, P., McDonald, F. B., Lucking, E., Hogan, S., Sheehan, D., Healy, V. and O'Halloran, K. D. (2015). "Chronic intermittent hypoxia increases rat sternohyoid muscle NADPH oxidase expression with attendant modest oxidative stress." *Front Physiol* 6: 15.
- Woodward, B. and Zakaria, M. N. (1985). "Effect of some free radical scavengers on reperfusion induced arrhythmias in the isolated rat heart." *J Mol Cell Cardiol* 17(5): 485-493.
- Woudenberg-Vrenken, T. E., Bindels, R. J. and Hoenderop, J. G. (2009). "The role of transient receptor potential channels in kidney disease." *Nat Rev Nephrol* 5(8): 441-449.
- Wu, H., Zhou, S., Kong, L., Chen, J., Feng, W., Cai, J., Miao, L. and Tan, Y. (2015). "Metallothionein deletion exacerbates intermittent hypoxia-induced renal injury in mice." *Toxicol Lett* 232(2): 340-348.
- Wysocka, E., Cofta, S., Cymerys, M., Gozdzik, J., Torlinski, L. and Batura-Gabryel, H. (2008). "The impact of the sleep apnea syndrome on oxidant-antioxidant balance in the blood of overweight and obese patients." *J Physiol Pharmacol* 59 Suppl 6: 761-769.
- Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L. and Zhang, B. (2012). "miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs." *Plant Mol Biol*.
- Xu, K. Y., Zweier, J. L. and Becker, L. C. (1997). "Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase function by direct attack on the ATP binding site." *Circ Res* 80(1): 76-81.
- Xu, Z., Kim, S. and Huh, J. (2014). "Zinc plays a critical role in the cardioprotective effect of postconditioning by enhancing the activation of the RISK pathway in rat hearts." *J Mol Cell Cardiol* 66: 12-17.
- Yan, G. X., Park, T. H. and Corr, P. B. (1995). "Activation of thrombin receptor increases intracellular Na⁺ during myocardial ischemia." *Am J Physiol* 268(4 Pt 2): H1740-1748.
- Yanagisawa, H., Hammer, R. E., Richardson, J. A., Emoto, N., Williams, S. C., Takeda, S., Clouthier, D. E. and Yanagisawa, M. (2000). "Disruption of ECE-1 and ECE-2 reveals a role for endothelin-converting enzyme-2 in murine cardiac development." *J Clin Invest* 105(10): 1373-1382.
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Goto, K. and Masaki, T. (1988). "A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels." *J Hypertens Suppl* 6(4): S188-191.
- Yeung, H. M., Hung, M. W., Lau, C. F. and Fung, M. L. (2015). "Cardioprotective effects of melatonin against myocardial injuries induced by chronic intermittent hypoxia in rats." *J Pineal Res* 58(1): 12-25.
- Yi, T., Vick, J. S., Vecchio, M. J., Begin, K. J., Bell, S. P., Delay, R. J. and Palmer, B. M. (2013). "Identifying cellular mechanisms of zinc-induced relaxation in isolated cardiomyocytes." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 305(5): H706-715.

- Yorikane, R. and Koike, H. (1990). "The arrhythmogenic action of endothelin in rats." *Jpn J Pharmacol* 53(2): 259-263.
- Yoshida, K., Inui, M., Harada, K., Saido, T. C., Sorimachi, Y., Ishihara, T., Kawashima, S. and Sobue, K. (1995). "Reperfusion of rat heart after brief ischemia induces proteolysis of caldesmon (nonerythroid spectrin or fodrin) by calpain." *Circ Res* 77(3): 603-610.
- Young, T., Evans, L., Finn, L. and Palta, M. (1997). "Estimation of the clinically diagnosed proportion of sleep apnea syndrome in middle-aged men and women." *Sleep* 20(9): 705-706.
- Young, T., Palta, M., Dempsey, J., Skatrud, J., Weber, S. and Badr, S. (1993). "The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults." *N Engl J Med* 328(17): 1230-1235.
- Young, T., Peppard, P., Palta, M., Hla, K. M., Finn, L., Morgan, B. and Skatrud, J. (1997). "Population-based study of sleep-disordered breathing as a risk factor for hypertension." *Arch Intern Med* 157(15): 1746-1752.
- Yuan, G., Khan, S. A., Luo, W., Nanduri, J., Semenza, G. L. and Prabhakar, N. R. (2011). "Hypoxia-inducible factor 1 mediates increased expression of NADPH oxidase-2 in response to intermittent hypoxia." *J Cell Physiol* 226(11): 2925-2933.
- Yuan, G., Nanduri, J., Bhasker, C. R., Semenza, G. L. and Prabhakar, N. R. (2005). "Ca²⁺/calmodulin kinase-dependent activation of hypoxia inducible factor 1 transcriptional activity in cells subjected to intermittent hypoxia." *J Biol Chem* 280(6): 4321-4328.
- Yuan, G., Nanduri, J., Khan, S., Semenza, G. L. and Prabhakar, N. R. (2008). "Induction of HIF-1 α expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca²⁺ signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR." *J Cell Physiol* 217(3): 674-685.
- Yuan, X., Zhu, D., Guo, X. L., Deng, Y., Shang, J., Liu, K. and Liu, H. G. (2015). "Telmisartan attenuates myocardial apoptosis induced by chronic intermittent hypoxia in rats: modulation of nitric oxide metabolism and inflammatory mediators." *Sleep Breath* 19(2): 703-709.
- Zama, N. and Towns, R. L. (1986). "Cardiac copper, magnesium, and zinc in recent and old myocardial infarction." *Biol Trace Elem Res* 10(3): 201-208.
- Zamarron, C., Riveiro, A. and Gude, F. (2011). "Circulating levels of vascular endothelial markers in obstructive sleep apnoea syndrome. Effects of nasal continuous positive airway pressure." *Arch Med Sci* 7(6): 1023-1028.
- Zhu, X. and Zuo, L. (2013). "Characterization of oxygen radical formation mechanism at early cardiac ischemia." *Cell Death Dis* 4: e787.
- Zicha, S., Tsuji, Y., Shiroshita-Takeshita, A. and Nattel, S. (2006). "Beta-blockers as antiarrhythmic agents." *Handb Exp Pharmacol*(171): 235-266.

ANNEXES

16. Article 3 : An innovative intermittent hypoxia model in cell cultures allowing fast PO₂ oscillations with minimal gas consumption

En revision à l'American Journal of Physiology - Cell Physiology

Mélanie Minoves^{1,2}, Jessica Morand^{1,2}, Frédéric Perriot^{1,2}, Morgane Chatard³, Brigitte Gonthier^{1,2}, Emeline Lemarié^{1,2}, Jean-Baptiste Menut⁴, Jan Polak⁵, Jean-Louis Pépin^{1,2,6}, Diane Godin-Ribuot^{1,2}, and Anne Briançon-Marjollet^{1,2,§}

¹ Univ Grenoble Alpes, HP2 Laboratory, F-38041 Grenoble Cedex, France

² INSERM U1042, F-38041 Grenoble Cedex, France

³ Univ Lyon, UJM-Saint-Etienne, SNA-EPIS, EA4607, F-42023, Saint-Etienne, France

⁴ SMTEC, Chemin des Vignes, Nyon, Switzerland

⁵ Center for Research on Diabetes, Metabolism and Nutrition Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

⁶ CHU Grenoble, F-38041 Grenoble Cedex, France

§ Corresponding author

Anne Briançon-Marjollet

Laboratoire HP2, Institut Jean Roget

Faculté de Médecine de Grenoble, BP 170

38042 Grenoble Cedex 9, France

Tel: +33 476 63 74 75

Fax: +33 476 63 71 78

E-mail: anne.briancon@univ-grenoble-alpes.fr

Running title: A new cellular intermittent hypoxia model

Abstract

Performing hypoxia-reoxygenation cycles in cell culture with a cycle duration accurately reflecting what occurs in obstructive sleep apnea (OSA) patients is a difficult but crucial technical challenge. Our goal was to develop a novel device to expose multiple cell culture dishes to intermittent hypoxia (IH) cycles relevant to OSA with limited gas consumption.

With gas flows as low as 200 mL/min, our combination of plate holders with gas-permeable cultureware generates rapid normoxia-hypoxia cycles. Cycles alternating 1 minute at 20% O₂ followed by 1 minute at 2% O₂ result in pO₂ values ranging from 124 to 44mmHg. Extending hypoxic and normoxic phases to 10 minutes allows pO₂ variations from 120 to 25mmHg. The volume of culture medium or the presence of cells only modestly affected the pO₂ variations. In contrast, the nadir of the hypoxia phase increased when measured at different heights above the membrane. We validated the physiological relevance of this model by showing that HIF-1 α expression was significantly increased by IH exposure in human aortic endothelial cells (HAoEC), murine breast carcinoma (4T1) cells as well as in a blood-brain barrier model (2.5, 1.5 and 6-fold increases, respectively).

In conclusion, we have established a new device to perform rapid intermittent hypoxia cycles in cell cultures, with minimal gas consumption and the possibility to expose several culture dishes simultaneously. This device will allow functional studies of the consequences of IH and deciphering of the molecular biology of IH at the cellular level using oxygen cycles that are clinically relevant to OSA.

INTRODUCTION

Intermittent hypoxia (IH) is the hallmark of obstructive sleep apnea (OSA), a common chronic disease affecting 5-20% of the general population and characterized by recurrent collapses of the upper airway leading to the repetitive occurrence of oxygen desaturation/reoxygenation sequences (14). OSA is recognized as an important and independent risk factor for hypertension, coronary heart disease and stroke, and could also be associated with mild cognitive dysfunction (16). Moreover, recent studies suggest that the excess mortality in OSA could be at least partly due to an increased risk of cancer (5, 19). The molecular pathways underlying the deleterious consequences of OSA are under investigation (8, 10, 26) but cellular and molecular mechanisms remain poorly understood. Moreover, clinical research is limited by confounding factors that make it difficult to distinguish between the respective effects of intermittent hypoxia and comorbidities. Since stroke and coronary heart disease are common OSA-associated comorbidities, increased knowledge of the effects of IH exposure of endothelial cells and blood brain barrier appears to be crucial. Finally, IH is also observed in tumors and exposure of tumor microenvironment to IH might promote tumor growth and metastatic activity (1).

In this context, significant efforts were recently made in several leading laboratories in the field to obtain relevant models of IH in cell cultures. The achievement of rapid oxygen cycles in standard culture dishes is flawed by the very slow oxygen diffusion in culture medium in the absence of mixing (2). Moreover, thermally-induced convective mixing of the media is not sufficient to ensure rapid oxygen equilibration across the height of medium (2, 17, 20) thus limiting the development of relevant IH systems. For instance, one of the first cellular IH model, based on air flushing in a Lucite chamber, generated cycles alternating 15 seconds of 1% O₂ and 3 minutes of 21% O₂ that allowed only limited (between 50 and 70 mmHg) fluctuations in pO₂ in the culture medium (12). This highlights the challenge of oxygen diffusion for effective cell exposure to IH. Longer cycles have allowed cycling between 2% O₂ and 15% O₂, but with cycle durations of one (11) and 1.5 (28) hour, that are not clinically relevant in the context of OSA-related IH. Another strategy has consisted in using pre-equilibrated culture medium (2, 24, 27). In these systems, the use of preconditioned medium does ensure instantaneous oxygen changes at the cell level. However, repeated changes in medium complicate the measurement of soluble factor secretion and can induce an important shear stress that could impact cell activity and metabolism. More recently, a team

has proposed a system in which gas was directly injected in the culture flask (23). They alternated 5 minutes of 16% O₂ and 5 minutes with 0% O₂ resulting in 6 cycles per hour which was the best compromise to achieve sufficient oxygen variation amplitude.

Finally, the last type of system described in the literature uses gas permeable dishes in order to obtain rapid and accurate cycles at the cell level (18, 22). In this system, variations between 16% and 1% O₂ lead to similar oxygen variations in the culture medium within minutes, allowing a frequency of 6 cycles per hour without any change in medium or bubbling. The major disadvantage of this elegant setting is the high gas consumption necessary to replace the air volume of the cabinet incubator hosting the dishes. Achievement of the control normoxic exposure also relies on expensive pre-mixed gas bottles (16% O₂, 5% CO₂ and 79% N₂). Recently, a variant of this system, based on air circulation underneath highly-permeable PDMS (polydimethylsiloxane) membranes for cell culture, achieved very fast oxygen cycles at the cell level in a system adapted for direct microscopy imaging (4). The major limitation of this model relies on its small size (4-mm diameter dishes) and thus in the low number of exposed cells, preventing large scale studies or the collection of cells for biochemical or molecular biology studies.

Therefore, our objective was to set up a cost-effective and rapid-cycling model producing IH cycles able to mimic the tissue oxygenation characteristics of OSA. We aimed at developing and characterizing a device that would allow rapid oxygen cycling, minimal gas consumption, avoiding the use of expensive premixed gas bottles, and allowing exposure of multiwell plates and larger culture plates. The originality of this system is that it generates rapid cycles in culture media while minimizing gas consumption by using gas-permeable cell cultureware and custom made holders in which the air is renewed only below the dishes.

MATERIALS AND METHODS

Gas-permeable dishes and plate holders.

Gas-permeable dishes were either from Sarstedt (Lumox® 55-mm dishes, 24- and 96-well plates, Sarstedt, Germany) or from Zell-Kontakt (Fluorocarbon Imaging plates, 24- and 96-well plates, Zell-Kontakt GmbH, Germany). The thickness of the membrane is 25 µm for Zell-Kontakt plates and Sarstedt dishes, while it is 50 µm for Sarstedt plates. Since poor cell

adhesion was observed with both types of membranes, they were coated with type I collagen (0.2 mg/ml for 1 h at 37°C) before seeding cells.

Transwells with either 0.4 µm or 8 µm pores (Corning) were placed in 24-well Zell-Kontakt plates. Transwells and plate wells were filled with 200 µL and 600 µL of culture medium, respectively.

The plate holders were custom-made (SMTEC, Nyon, Switzerland) to accommodate either 55-mm dishes or 24- or 96-well plates (Figure 1). The dishes or plates are attached to the holders with clips in order to minimize air leakage. The air volume under the plate or dish is as low as 15-20 ml thus allowing very rapid flushing, even with flows as low as 200 ml/min, and very low gas consumption.

Gas supply.

Compressed air and >98% nitrogen are provided by a nitrogen extractor and a gas compressor and carbon dioxide is supplied by a gas bottle. The three gas inputs are connected to a gas blender (Gas Blender 100, MCQ Instruments, Rome, Italy) that can mix gases in any desired fraction with a maximum output flow of 250 ml/minute. The gas mixture is heated in a water bath set at 37°C and travels through a 5-meter long plastic tube to allow temperature equilibration before being transmitted to culture plate holders hosted in a standard cell culture incubator.

Oxygen measurements.

Oxygen in air was measured with a gas analyzer (ADInstruments, Oxford, United Kingdom). Dissolved oxygen in culture medium was measured with fluorescent oxygen sensors (pO₂ E-Series Sensor) coupled to an Oxylite device (Oxford Optronix, Oxford, United Kingdom). The pO₂ sensors were maintained by a holder equipped with a micrometric screw, allowing the vertical movement of the sensor by 60-µm steps from the membrane level (pericellular environment) up to the top of the culture medium. Data were recorded using an acquisition system (Powerlab, ADInstruments, Oxford, United Kingdom).

Experimental intermittent hypoxia protocols.

Different pO₂ cycling protocols were programmed to characterize the behavior of the model (Table 1). The IH protocols alternated a 20% or 16% normoxic phase and a 5% or 2% hypoxic

phase. The 16% oxygen value of normoxic phase was chosen according to the mean arterial pO₂ value of healthy humans, as in other IH models (22, 23). We programmed IH protocols with 5% (5% 2'-2' and 3'-3') and 2% (2% 30''-30'', 1'-1', 2'-2', 3'-3', 3'-5' and 5'-5') hypoxic phases named according to the duration (in seconds or minutes) of the normoxic and hypoxic phases, respectively. Following hypoxia, a brief 20% O₂ phase was used to accelerate the return towards the normoxic 16% plateau. Similarly, a 1-minute burst of 3% pO₂ was added to rapidly attain a stable 5% hypoxic plateau. No burst was used to attain the 2% hypoxic plateau, since 2% is the minimum oxygen content of our gas supply (98% pure nitrogen).

Cell culture and HIF-1 α quantification.

Human aortic endothelial cells (HAoEC, Cascade Biologics) were cultured in M200 medium, supplemented with large vessel endothelial supplement (LVES) as recommended by the manufacturer, and used after 6-8 population doubling. Human breast carcinoma cells (4T1, graciously provided by V. Josserand, IAB, Grenoble) were cultured in RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics. The blood-brain barrier (BBB) model is composed of bEnd.3 endothelial cells (ATCC, USA) combined to C6 astrocytes (ATCC, USA) cultured in transwells with 0.4 μ m pores, as previously described (6).

HAoEC and 4T1 cells were exposed to 6 hours of IH (protocol 2% 5'-5'). BBB model was exposed to 2h of IH (protocol 2% 5'-5') followed by 6 hours of normoxia (16% O₂), repeated 3 times for a total of 24 hours.

At the end of IH exposure, supernatants were collected and frozen (-80°C), while the cells were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 minutes and kept at 4°C until use. HIF-1 α expression was measured with a cell-based Elisa assay (R&D Systems) on PFA-fixed cells.

Statistical analysis.

Data (expressed as mean \pm SEM) were analyzed using GraphPad Prism 6 Software (San Diego, California). The statistical tests performed are detailed in figure legends. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Rapid intermittent hypoxia cycles with appropriate amplitude were achieved with the model.

Fig. 2 and Table 2 depict typical oxygen cycles observed in 55-mm dishes, filled with 5 ml of PBS, with the various protocols tested (see Table 1 for details of gas settings).

Short cycles composed of 30 seconds at 20% followed by 30 seconds at 2% resulted in oxygen cycling between 105.8 ± 1.3 and 58.5 ± 2.2 mmHg in the culture medium (Fig. 2A). Increasing the duration of the normoxic and hypoxic phases enhanced the nadir-to-peak amplitude, with cycles between 124.3 ± 2.4 and 44.3 ± 1.5 mmHg (nadir-to-peak amplitude: 79.9 ± 3.6 mmHg) with protocol 2% 1'-1' (Fig. 2B), and between 118.8 ± 2.4 and 33.8 ± 0.3 mmHg (nadir-to-peak amplitude: 84.4 ± 1.9 mmHg) with protocol 2% 2'-2' (Fig. 2C). Protocols with a 2-min normoxic phase resulted in a pO₂ plateau around 120 mmHg and pO₂ values > 110 mmHg were achieved within a mean time of 52.1 ± 2.2 seconds. Protocols with 5% O₂ generated a hypoxic plateau around 40 mmHg (Fig. 2D and Table 2). For protocols with 2% O₂, a hypoxic plateau was more difficult to achieve, even with a 5-minute hypoxia duration (Fig. 2E and 2F) and time to reach pO₂ values < 50 mmHg and < 40 mmHg was 47.2 ± 4.5 and 89.0 ± 9.1 seconds, respectively. pO₂ values < 30 mmHg were reached after 3 minutes of hypoxia with protocols 2% 3'-3' and 2% 5'-5' while the minimum value of 25 mmHg could only be attained after 5 minutes of hypoxia (Fig. 2F, 2G and Table 2). On the other hand, decreasing the duration of normoxia from 5 to 3 minutes resulted in identical peak and nadir pO₂ values (Fig. 2F and Table 2).

Since our 55-mm dish holder is designed for 3 dishes, we measured the cycles in the 3 dishes and did not observe any difference in cycle pattern or pO₂ range (Fig. 2H).

Effects of cultureware type and membrane thickness on intermittent hypoxia cycles.

We compared the impact of support type and membrane thickness on the nadir-to-peak amplitude of the cycles generated by protocols 2% 3'-3' and 2% 5'-5'. Whatever the protocol, we did not observe any difference on nadir-to-peak cycle amplitude between 25 μm-thick 24-well or 96-well plates and 55-mm dishes. Hence, typical cycles generated by protocol 2% 5'-5' in 24-well plates were between 26 and 113 mmHg (Fig. 3A), similar to those observed in 96-well plates and 55-mm dishes. We serially connected three 96-well plates in order to compare the typical aspect of the pO₂ cycles. We did not observe a difference in pO₂ cycles between the three plates (Fig. 3B).

However, there was a significant difference in nadir values and nadir-to-peak amplitude of the cycles measured in 25 μm -thick and 50 μm -thick 24-well plates (Fig. 3C). Hence, nadir values were significantly lower in 25 μm -thick plates compared to 50 μm -thick plates (27.0 ± 1.9 vs. 55.4 ± 2.3 mmHg, respectively, $P = 0.008$) while peak pO_2 values were not affected (118.6 and 114.6 mmHg, respectively). Therefore, nadir-to-peak amplitude was 91.8 ± 2.9 mmHg in 25 μm -thick plates but only 59.2 ± 2.9 mmHg in 50 μm -thick plates ($P = 0.008$).

Culture medium volume modestly alters the intermittent hypoxia cycles.

Overall, culture medium volume had a significant impact on the cycles ($P = 0.037$) (Table 3). In particular, the lowest nadir value was obtained with a volume of 5 ml (27.2 ± 2.4 mmHg vs. 36.7 ± 2.9 mmHg with a 3 ml volume, $P = 0.019$). However, the nadir-to-peak amplitude was not significantly affected by culture medium volume (101.3 ± 2.9 , 103.2 ± 1.6 and 104.7 ± 0.3 mmHg for 3, 5 and 7 ml, respectively).

Presence of cells decreases the amplitude of intermittent hypoxia cycles.

The presence of cells induced a significant decrease in the nadir-to-peak amplitude of the IH cycles (from 95.6 ± 3.0 to 86.5 ± 1.5 mmHg, $P = 0.004$) (Table 4). More precisely, the presence of cells decreased the maximum pO_2 value (from 124.4 ± 0.9 to 113.1 ± 3.5 mmHg, $P < 0.01$) without affecting the minimum value.

Amplitude of intermittent hypoxia cycles decreases from bottom to top of culture medium.

To test the homogeneity of the cycles throughout the culture medium, we recorded oxygen cycles from the membrane up to the top of the liquid layer using protocols 2% 3'-3' and 2% 5'-5'. To estimate the effect of gas exchange with ambient air we also measured pO_2 gradient with protocol 2% 5'-5' in dishes sealed with tape. Whatever the distance from the membrane and the IH protocol, the maximum pO_2 value remained stable. However, as expected, the minimum pO_2 value linearly increased when the O_2 probe was moved away from the membrane and the nadir-to-peak amplitude therefore concomitantly decreased (Fig. 4A). Moreover, AUC obtained with sealed-plates was significantly higher than that recorded in unsealed plates ($P = 0.012$) (Fig. 4B).

Finally, to evaluate the possibility of using transwells for co-cultures or for permeability or migration assays under IH, we measured cycles in transwell inserts placed in 24-well

permeable plates. The nadir-to-peak amplitude of IH cycles measured in transwells increased with pore diameter. Indeed, amplitudes of 49 mmHg (nadir and peak pO₂ values of 78 and 127 mmHg) and 59 mmHg (nadir and peak pO₂ values of 66 and 125 mmHg values) (Fig. 4C) were measured in transwells with 0.4 μm and 8 μm pores, respectively.

Gas permeable dishes allow optimal cell oxygenation under normoxic conditions.

Baseline culture medium pO₂ values measured in plastic dishes with 4T1 cells were significantly lower than those measured in permeable dishes independently of cell confluence (Fig. 5). At 70% confluence, pO₂ values of 123.3 ± 3.4 and 140.8 ± 3.6 mmHg were measured in plastic and permeable dishes, respectively ($P = 0.016$). At 100% confluence, pO₂ values of 101.8 ± 14.2 and 153.6 ± 5.2 mmHg were measured in plastic and permeable dishes, respectively ($P = 0.008$). Interestingly, no difference between plastic and permeable dishes was observed with 100% confluent HAoEC cells.

Intermittent hypoxia exposure increases HIF-1α expression in cells.

Six hours of cell exposure to IH with protocol 2% 5'-5' resulted in a significant increase in HIF-1α expression compared to normoxia (2.6 and 1.5 fold-increase in HAEC and 4T1 cells, respectively, $P < 0.05$) (Fig. 6A).

Moreover, repeated IH exposure over 24h of a cell BBB model resulted in a very significant increase in HIF-1α expression compared to normoxia (6.1 fold-increase, $P < 0.01$) (Fig. 6B).

DISCUSSION

In this paper, we describe an innovative system aiming to perform exposure of cells cultures to intermittent hypoxia with a pattern accurately mimicking that occurring in sleep apnea patients. This system is adapted from commercial gas-permeable dishes and uses custom-made plate holders. The small volume of air in the holders is easily renewed even with low gas flow, thus allowing low gas consumption and fast cycling. Our system is working with gas sources (air, CO₂ and N₂) either from commercial bottles (CO₂) or produced by gas extractor and compressor, thus avoiding expensive premixed gas bottles described elsewhere (22). We were able to connect up to 3 holders in series, thus allowing the simultaneous exposure of three multiwell plates (24-well or 96-well) or up to nine 55-mm dishes, or combinations of

multiwell plates and 55-mm dishes. This low cost system effectively produced short IH cycles in culture medium and allowed the exposure of a large number of cells. This should help the field to address molecular biology of IH exposure with a relevant physiological model.

We characterized the oxygen cycles obtained with various settings, with normoxic phases between 20 and 12% oxygen and hypoxic phases between 5% and 2%. With 16%-2% cycling at a frequency of 6 to 8 cycles per hour, we obtained nadir-to-peak amplitudes of about 95 mmHg, cycling between 25-30 mmHg and 120 mmHg. Although a nadir value of 25-30 mmHg is not as low as those attained with other systems (4, 23), it is relevant to OSA physiopathology since 30 mmHg roughly corresponds to the lowest arterial blood saturation level (60% oxygen saturation) recorded in severe sleep apnea patients during hypoxic episodes (15). Similarly, the peak can be chosen at any value up to 125 mmHg, which was chosen to be slightly higher than the mean value of arterial pO₂ in healthy humans, as done in other IH models (22, 23). Therefore, our system can reproduce patterns of hypoxia-reoxygenation relevant to severe human OSA by cycling between 30 and 100-120mmHg or to moderate OSA by cycling between 40-45mmHg and 100-120mmHg. This is a major advantage to appropriately assess the dose-response relationship between the amount of IH and its deleterious or preconditioning outcomes (13, 14).

Although similar cycles were observed in Lumox® dishes and in fluorocarbon plates which have 25µm-thick membranes, cycles measured in plates with 50µm-thick Lumox® membranes presented high nadir values and decreased nadir-to-peak amplitudes. This suggests that Lumox® membrane thickness can affect gas diffusion. In contrast, similar cycles were recorded with 10µm- and 37.5µm- thick PDMS membranes in another IH system (4). This discrepancy could be due to different chemical composition and/or thickness of the membranes.

Uncoated gas-permeable membranes result in poor cell adhesion and were recently shown to profoundly affect cell morphology and function (21). We thus established that fibronectin, collagen or Matrigel® coating did not significantly alter the cycles measured in the culture medium (data not shown). We also observed that the presence of cells modestly decreased peak values and amplitude of the cycles, whereas nadir values were unchanged. The difference in cycles in the presence of cells could be due to oxygen consumption and/or to impaired gas diffusion through the cell layer. Nevertheless, since the impact of the presence of cells was modest (<10% decrease in cycle amplitude), we can conclude that the

membrane maintains good gas permeability even in the presence of a confluent cell monolayer.

Variations in culture medium volume also modestly affected the IH cycles. While peak values and nadir-to-peak amplitude were not significantly altered, nadir values measured in 55-mm dishes were lower at high (5mL) compared to low (3mL) medium volume. This could be explained by oxygen retrodiffusion from air above the medium since low volumes result in thin thickness (approximately 1 mm with 3ml vs. 2 mm with 5ml in 55-mm dishes). Thus, it appears mandatory to always use the same amount of culture medium in order to ensure reproducibility of the IH cycles.

A drawback of some IH systems is the limited number of dishes or plates that can be exposed simultaneously, resulting in insufficient amount of cells for biochemical analysis or molecular biology. In order to minimize gas consumption, we did not choose to perform IH cycles directly in the cell incubator as in other systems (22), but we wanted to be able to expose at least several 55-mm dishes or multiwell plates. Our use of custom-designed plate holders branched in series enabled us to obtain similar cycles in up to 3 multiwell plates or nine 55-mm dishes (or combinations of multiwell plates and 55-mm dishes) simultaneously exposed to IH. This setup ensures that several experiments can be performed simultaneously and that a sufficient quantity of cells can be collected for biochemical analysis or molecular biology.

However, since gases are diffusing from below the plate, we expected that the cycles would perform well at the membrane level only. This is perfectly suitable for adherent cells but represents a limitation for non-adherent cell cultures, such as monocytes or PBMC, or for co-culture systems such as transwell inserts. Indeed, while the peak value was unchanged, we observed that the nadir of the IH cycles gradually increased when measured away from the membrane so that the cycles almost disappeared at the top of the liquid layer. However, adequate IH cycles oscillating between 50 and 110 mmHg were still measured 500 μm above the membrane. Moreover, cycles measured inside 8 μm -pore transwells, commonly used for cell migration or permeability assays, oscillated between 65 and 125 mmHg, suggesting that our system can be used to study the effects of moderate IH on cell migration. Furthermore, our system was successfully used to induce a clear increase of HIF-1 expression in cells cultured in 0.4 μm -pore transwell.

Indeed, HIF-1 α expression was increased by more than 6 fold in a BBB model composed of endothelial cells and astrocytes cultured in transwells and exposed to IH. In addition to transwells, we observed that HIF-1 α expression was increased by 2.6 and 1.5 fold, in primary endothelial and in tumor cells, respectively, after 6h of IH exposure. In accordance with various other studies, we chose to use HIF-1 α expression as a marker of hypoxia sensing to validate IH exposure of our cells. Hence, Yuan et al. reported an increase in HIF-1 protein level in nuclear extracts together with an increase in HIF-1 reporter genes in PC12 cells after 60 cycles of IH (4min-30sec, 20%-1.5%) (31), and more recently Campillo et al. observed a 1.5 fold increase in HIF-1 α nuclear translocation in mesenchymal stem cells exposed to 4h of IH (30sec-30sec, 20%-1%) (4). In a very different system, exposure of endothelial cells to long IH cycles (1h-30 min, 20%-1%,) did not increase HIF-1 gene expression but increased its nuclear translocation and DNA binding activity (29). Nevertheless, other studies have failed to observe changes in HIF-1 expression or transcriptional activity with different paradigms of IH exposure (22-24). Thus, despite numerous studies in animal models showing that HIF-1 is activated by intermittent hypoxia in various organs (3, 7, 30), the determinants of HIF-1 activation in cells exposed to IH remain to be assessed, with particular emphasis on the characteristics of the IH cycles (minimal and maximal pO₂, duration of normoxic and hypoxic phases, total duration of exposure or number of cycles) and on the metabolic activity of the cells exposed.

Finally, we compared standard plastic dishes and permeable dishes under normoxic condition. We measured a difference of up to 50 mmHg between standard plastic and semi-permeable dishes, depending on cell type and confluence rate. Indeed the biggest difference was observed for metabolically active cancer cells. These results are consistent with previous data showing different levels of culture medium hypoxia with more or less metabolically active cells (17, 22). In particular, Polak et al. showed that HIF-1 activity was much higher in standard than in permeable plates, probably due to poor oxygenation of culture medium in plastic plates along with O₂ consumption by cells (22). Despite the fact that oxygen tension during standard cell culture is often a neglected factor, these results suggest that it could be of interest to use gas permeable plates even in routine use under normoxic conditions, in order to ensure real and reproducible normoxia at different stages of cell culture and confluence levels.

It should be pointed that the pO_2 measurements performed in the present study were recorded with probes having a 90% response time of 20 seconds, which is not negligible compared to the rise and decay duration of our IH cycles. Therefore, one can assume that the oxygen cycles performed by our system are actually faster than those measured and that the rise and decay durations are overestimated. Moreover, pO_2 values measured for short cycles that did not reach plateau values might be inaccurate so that the nadir-to-peak amplitude might actually be larger than reported. Nevertheless, we can suggest that the peak and nadir pO_2 values measured for longer IH cycles (3'-3' or 5'-5') were estimated with a good accuracy since we were able to attain plateau phases at in both cases.

In summary, we have developed a new low-cost device to perform rapid intermittent hypoxia cycles at the cellular level characterized by very low gas consumption and good cell throughput for biochemistry or molecular biology analysis. This device can be used to mimic the cellular impact of OSA but also that of other pathological conditions in which rapid hypoxia-reoxygenation cycles are observed, such as ischemia-reperfusion events in heart, brain or other organs, or tumor development where oxygen variations can be observed independently of OSA, due to structural abnormalities of the vascular network (9, 25). This device thus presents a new alternative to existing techniques for laboratories that plan to perform cellular IH or simply want to precisely control oxygen tension in their cell cultures.

GRANTS

This work was funded by INSERM, University Grenoble Alpes and Agir pour les Maladies Chroniques (APMC) foundation. It was also partly supported by the French National Research Agency in the framework of the "Investissements d'avenir" program (ANR-15-IDEX-02).

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.M., J.P., D.G-R. and A.B-M. conceived and designed the model; M.M., J.M., F.P., M.C., B.G., E.L., J-B.M. and A.B-M. performed experiments, analyzed data and interpreted results of experiments; A.B-M. and M.M. prepared figures; M.M., J.M., and A.B-M. drafted manuscript; J.P., J-L.P. and D.G-R. edited and revised manuscript; all authors approved the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Emmanuel Barbier and Benjamin Lemasson (Grenoble Institute of Neurosciences) for sharing the Oxylite device and to Véronique Josserand (Institute for Advanced Biosciences, Grenoble) for kindly providing the 4T1 cells. We also would like to thank Mathis Soubeyrand and Alexandre Frémont for their technical assistance.

REFERENCES

1. Almendros I, Montserrat JM, Torres M, Dalmases M, Cabanas ML, Campos-Rodriguez F, Navajas D, and Farre R. Intermittent hypoxia increases melanoma metastasis to the lung in a mouse model of sleep apnea. *Respir Physiol Neurobiol* **186**: 303-307, 2013.
2. Baumgardner JE and Otto CM. In vitro intermittent hypoxia: challenges for creating hypoxia in cell culture. *Respir Physiol Neurobiol* **136**: 131-139, 2003.
3. 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.
4. Campillo N, Jorba I, Schaedel L, Casals B, Gozal D, Farre R, Almendros I, and Navajas D. A Novel Chip for Cyclic Stretch and Intermittent Hypoxia Cell Exposures Mimicking Obstructive Sleep Apnea. *Front Physiol* **7**: 319, 2016.
5. Campos-Rodriguez F, Martinez-Garcia MA, Martinez M, Duran-Cantolla J, Pena Mde L, Masdeu MJ, Gonzalez M, Campo F, Gallego I, Marin JM, Barbe F, Montserrat JM, and Farre R. Association between obstructive sleep apnea and cancer incidence in a large multicenter Spanish cohort. *Am J Respir Crit Care Med* **187**: 99-105, 2013.
6. Chatard M, Puech C, Roche F, and Perek N. Hypoxic Stress Induced by Hydralazine Leads to a Loss of Blood-Brain Barrier Integrity and an Increase in Efflux Transporter Activity. *PLoS One* **11**: e0158010, 2016.
7. da Rosa DP, Forgiarini LF, Baronio D, Feijo CA, Martinez D, and Marroni NP. Simulating sleep apnea by exposure to intermittent hypoxia induces inflammation in the lung and liver. *Mediators of inflammation* **2012**: 879419, 2012.
8. 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 journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* **50**: 262-281, 2009.
9. Dewhirst MW, Braun RD, and Lanzen JL. Temporal changes in PO₂ of R3230AC tumors in Fischer-344 rats. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **42**: 723-726, 1998.
10. 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.

11. 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.
12. Kumar GK, Kim DK, Lee MS, Ramachandran R, and Prabhakar NR. Activation of tyrosine hydroxylase by intermittent hypoxia: involvement of serine phosphorylation. *J Appl Physiol (1985)* **95**: 536-544, 2003.
13. Lavie L. Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia--revisited--the bad ugly and good: implications to the heart and brain. *Sleep Med Rev* **20**: 27-45, 2015.
14. Levy P, Kohler M, McNicholas WT, Barbe F, McEvoy RD, Somers VK, Lavie L, and Pepin JL. Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nat Rev Dis Primers* **1**: 15015, 2015.
15. Levy P, Pepin JL, Deschaux-Blanc C, Paramelle B, and Brambilla C. Accuracy of oximetry for detection of respiratory disturbances in sleep apnea syndrome. *Chest* **109**: 395-399, 1996.
16. Martin MS, Sforza E, Roche F, Barthelemy JC, and Thomas-Anterion C. Sleep breathing disorders and cognitive function in the elderly: an 8-year follow-up study. the proof-synapse cohort. *Sleep* **38**: 179-187, 2015.
17. Metzen E, Wolff M, Fandrey J, and Jelkmann W. Pericellular PO₂ and O₂ consumption in monolayer cell cultures. *Respir Physiol* **100**: 101-106, 1995.
18. Murphy AM, Thomas A, Crinion SJ, Kent BD, Tambuwala MM, Fabre A, Pepin JL, Roche HM, Arnaud C, and Ryan S. Intermittent hypoxia in obstructive sleep apnoea mediates insulin resistance through adipose tissue inflammation. *Eur Respir J* **49**, 2017.
19. Nieto FJ, Peppard PE, Young T, Finn L, Hla KM, and Farre R. Sleep-disordered breathing and cancer mortality: results from the Wisconsin Sleep Cohort Study. *Am J Respir Crit Care Med* **186**: 190-194, 2012.
20. Otto CM and Baumgardner JE. Effect of culture PO₂ on macrophage (RAW 264.7) nitric oxide production. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**: C280-287, 2001.
21. Pavlikova N, Weissenstein M, Pala J, Halada P, Seda O, Elkalaf M, Trnka J, Kovar J, and Polak J. The effect of cultureware surfaces on functional and structural components of differentiated 3T3-L1 preadipocytes. *Cell Mol Biol Lett* **20**: 919-936, 2015.
22. Polak J, Studer-Rabeler K, McHugh H, Hussain MA, and Shimoda LA. System for exposing cultured cells to intermittent hypoxia utilizing gas permeable cultureware. *Gen Physiol Biophys* **34**: 235-247, 2015.
23. Polotsky VY, Savransky V, Bevans-Fonti S, Reinke C, Li J, Grigoryev DN, and Shimoda LA. Intermittent and sustained hypoxia induce a similar gene expression profile in human aortic endothelial cells. *Physiol Genomics* **41**: 306-314, 2010.
24. 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.
25. Sorg BS, Hardee ME, Agarwal N, Moeller BJ, and Dewhirst MW. Spectral imaging facilitates visualization and measurements of unstable and abnormal microvascular oxygen transport in tumors. *J Biomed Opt* **13**: 014026, 2008.
26. Tamisier R, Briancon-Marjollet A, Levy P, and Pepin JL. Animal and physiological settings of IH exposure. In: *ERS Monograph: Obstructive Sleep Apnea*, 2015, p. 1-8.
27. Taylor CT, Kent BD, Crinion SJ, McNicholas WT, and Ryan S. Human adipocytes are highly sensitive to intermittent hypoxia induced NF- κ B activity and subsequent inflammatory gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* **447**: 660-665, 2014.
28. Toffoli S, Delaive E, Dieu M, Feron O, Raes M, and Michiels C. NDRG1 and CRK-I/II are regulators of endothelial cell migration under Intermittent Hypoxia. *Angiogenesis* **12**: 339-354, 2009.
29. Toffoli S, Roegiers A, Feron O, Van Steenbrugge M, Ninane N, Raes M, and Michiels C. Intermittent hypoxia is an angiogenic inducer for endothelial cells: role of HIF-1. *Angiogenesis* **12**: 47-67, 2009.
30. Wang ZF, Kang J, and Dai B. [Expression and activation of hypoxia inducible factor-1 α and iNOS in the brain of rats with chronic intermittent hypoxia]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* **32**: 739-743, 2009.
31. Yuan G, Nanduri J, Bhasker CR, Semenza GL, and Prabhakar NR. Ca²⁺/calmodulin kinase-dependent activation of hypoxia inducible factor 1 transcriptional activity in cells subjected to intermittent hypoxia. *J Biol Chem* **280**: 4321-4328, 2005.

Table 1.

Gas settings and duration (in seconds or minutes) of the normoxic and hypoxic phases of the various protocols tested.

Protocol	20%	16%	3%	5%	2%
2% 30"-30"	0.5				0.5
2% 1'-1'	1				1
2% 2'-2'	1	1			2
2% 3'-3'	1	2			3
2% 3'-5'	1	2			5
2% 5'-5'	1	4			5
5% 2'-2'	1	1	1	1	
5% 3'-3'	1	2	1	2	

Table 2.

Nadir and peak pO₂ values and cycle amplitude (calculated delta value) measured in 55-mm dishes submitted to the intermittent hypoxia protocols depicted in *Table 1*. Data (in mmHg) are means ± SEM. * *P* = 0.05 and ***P* < 0.01 vs. 2% 5'-5' protocol, two-way ANOVA.

Protocol	Nadir	Peak	Delta
2% 30"-30"	58.5 ± 2.2 **	105.8 ± 1.3 *	47.3 ± 3.0 **
2% 1'-1'	44.3 ± 1.5 **	124.3 ± 2.4	79.9 ± 3.6 *
2% 2'-2'	33.8 ± 0.3	118.2 ± 2.4	84.4 ± 1.9
2% 3'-3'	30.3 ± 1.4	115.4 ± 4.4	85.1 ± 3.7
2% 3'-5'	24.9 ± 2.0	120.4 ± 4.5	95.5 ± 3.3
2% 5'-5'	25.5 ± 1.2	120.6 ± 1.9	95.1 ± 1.6
5% 2'-2'	38.0 ± 3.1 *	123.3 ± 3.3	85.3 ± 6.4
5% 3'-3'	39.7 ± 5.5 *	126.0 ± 8.0	86.3 ± 4.5

Table 3.

Impact of culture medium volume on intermittent hypoxia cycles. Nadir and peak pO₂ values and cycle amplitude (calculated delta value) measured in 55-mm dishes filled with different volumes of culture medium and submitted to protocol 2% 5'-5'. Data (in mmHg) are means ± SEM. *n* = 3 independent experiments. Medium volume significantly alters the cycles (*P* = 0.037, two-way ANOVA). * *P* = 0.019 vs. nadir at 5ml, two-way ANOVA.

Volume	Nadir	Peak	Delta
3 ml	36.7 ± 2.9 *	138.0 ± 0.1	101.3 ± 2.9
5 ml	27.2 ± 2.4	130.3 ± 0.9	103.2 ± 1.6
7 ml	29.3 ± 3.0	134.0 ± 3.1	104.7 ± 0.3

Table 4.

Impact of the presence of cells on intermittent hypoxia cycles. Nadir and peak pO₂ values and cycle amplitude (calculated delta value) measured in 55-mm dishes filled with 4ml of culture medium with or without a confluent layer of 4T1 cells, and exposed to protocol 2% 5'-5'. The presence of cells does not change nadir values but lowers peak and delta values. Data (in mmHg) are means ± SEM. *n* = 3 independent experiments performed in duplicates. ** *P* < 0.01 vs. corresponding values without cells, two-way ANOVA.

	Nadir	Peak	Delta
Without cells	28.8 ± 2.4	124.4 ± 0.9	95.6 ± 2.9
With cells	26.7 ± 2.7	113.1 ± 3.5 **	86.5 ± 1.5 **

Figure legends

Fig. 1.

Pictures showing the holders for 55-mm dishes (first lane) and for 24-well and 96-well plates (second lane). The dishes or plates are maintained with forceps in order to avoid air leakage.

Fig. 2.

Characterization of pO₂ cycles in 55-mm dishes containing 5ml of culture medium without cells. A-F show typical cycles measured with the following intermittent hypoxia protocols: 2% 30''-30'' (A), 2% 1'-1' (B), 2% 2'-2' (C), 5% 2'-2' (D), 2% 3'-3' (E) and 2% 5'-5' (F). G shows peak and nadir pO₂ values and amplitude of pO₂ variation for each protocol. Data are from at least 3 independent measurements and for over 10 independent experiments for protocol 2% 5'-5'. H shows cycles measured in three 55-mm dishes exposed simultaneously in holder to protocol 5% 2'-2'.

Fig. 3.

Characterization of pO₂ cycles in 24-well plates. A: Typical cycles measured in 24-well plates (filled with 500 µl PBS) with protocol 2% 5'-5'. Cycles measured in 96-well plates were similar. B: Typical measurements in 3 plate holders serially connected (protocol 2% 5'-5'), nadir and peak pO₂ values and cycle amplitude (calculated delta value) for the 3 consecutive plate holders. Cycles were only very slightly attenuated, with no significant difference. C: Nadir and peak pO₂ values and cycle amplitude (calculated delta value) in gas-permeable 24-well plates with 50 µm-thick (Sarstedt) or 25 µm-thick (Zell-kontakt) membranes using protocol 2% 5'-5'. *n* = at least 5 independent measurements. ** *P* < 0.01 for nadir and cycle amplitude vs. 25 µm-thick membranes, Mann-Whitney rank sum tests.

Fig. 4.

Evolution of the cycles throughout the culture medium and in transwells. A: Typical nadir and peak pO₂ values and cycle amplitude (calculated delta value) at different heights above the membrane. Measurements were performed with protocol 2% 5'-5' in 55-mm dishes. Similar results were observed in 96-well dishes. Data (in mmHg) are means ± SEM. *n* = at least 3 independent experiments. B: Cycle amplitude (calculated delta value) at different heights above the membrane in unsealed and sealed 55-mm dishes, and corresponding

calculated Area Under the Curve (AUC). Measurements were performed with protocols 2% 3'-3' (diamonds) and 2% 5'-5' (squares) in unsealed dishes and with protocol 2% 5'-5' (triangles) in dishes sealed with tape to limit gas exchanges with incubator air. Data are means \pm SEM. n = at least 3 independent experiments. * Area under the curve vs. protocol 2% 3'-3' in unsealed dishes, $P = 0.012$ (one-way ANOVA). There was no significant difference in cycle amplitude between unsealed and sealed plates at membrane level (probe height = 0). C: Cycles measured with protocol 2% 5'-5' inside a 8 μ m-pore transwell with 100 μ l of medium placed in a 24-well plate (Zell-kontakt) filled with 600 μ L of culture medium.

Fig. 5.

Comparison of pO₂ values in standard and permeable dishes under normoxia. pO₂ values were measured at the level of the cell layer in standard plastic or gas-permeable 55-mm dishes plated with HAOEC or 4T1 cells at different cell confluences and incubated under normoxia. Cultures were pre-equilibrated at 21% O₂ in a standard incubator, placed under normoxia (21% O₂ + 5% CO₂) in the intermittent hypoxia device and allowed to equilibrate for at least 30 minutes before pO₂ measurements. Data are means \pm SEM. n = at least 5 measures from 3 independent experiments. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. gas permeable plates, Mann-Whitney rank sum test.

Fig. 6.

Intermittent hypoxia increases HIF-1 α expression. A: Expression of HIF-1 α in HAOEC and 4T1 cells after 6 hours of exposure to protocol 2% 5'-5', expressed as a ratio of HIF-1 α expression in cells exposed to 6 hours of normoxia (16% O₂). * $P < 0.05$ vs. normoxia, Mann-Whitney rank sum test. B: Expression of HIF-1 α in a blood brain barrier model composed of b. End3 endothelial cells and C6 astrocytes after 24 hours of IH (2h of 2% 5'-5' and 6h of normoxia, repeated 3 times). Data are means \pm SEM. $n = 3$ independent experiments, ** $P < 0.01$ vs. normoxia, Mann-Whitney rank sum test.

Fig. 1

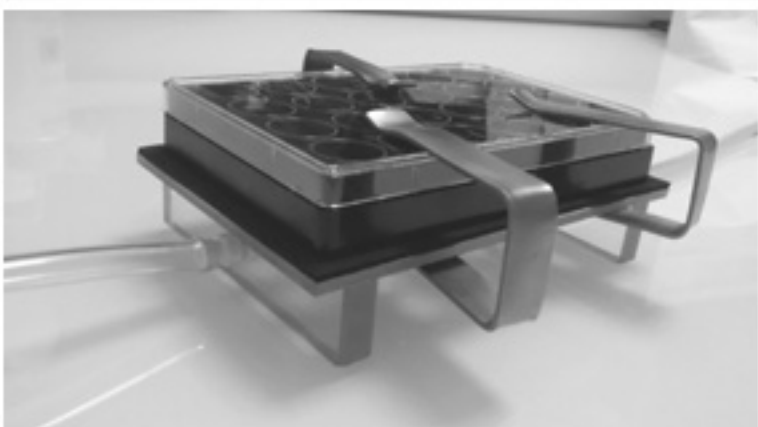
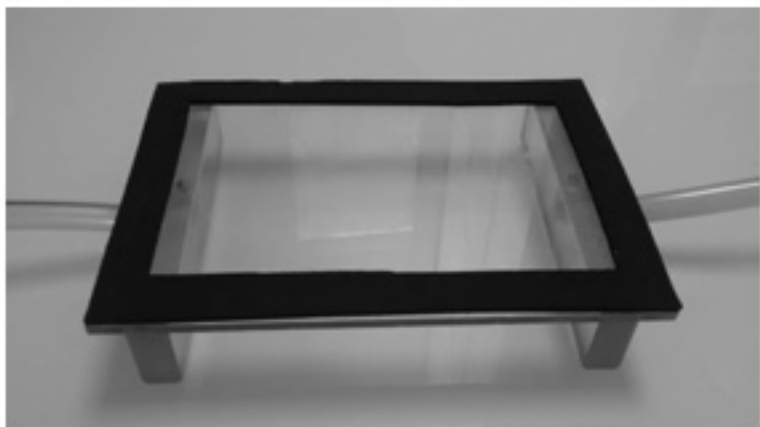


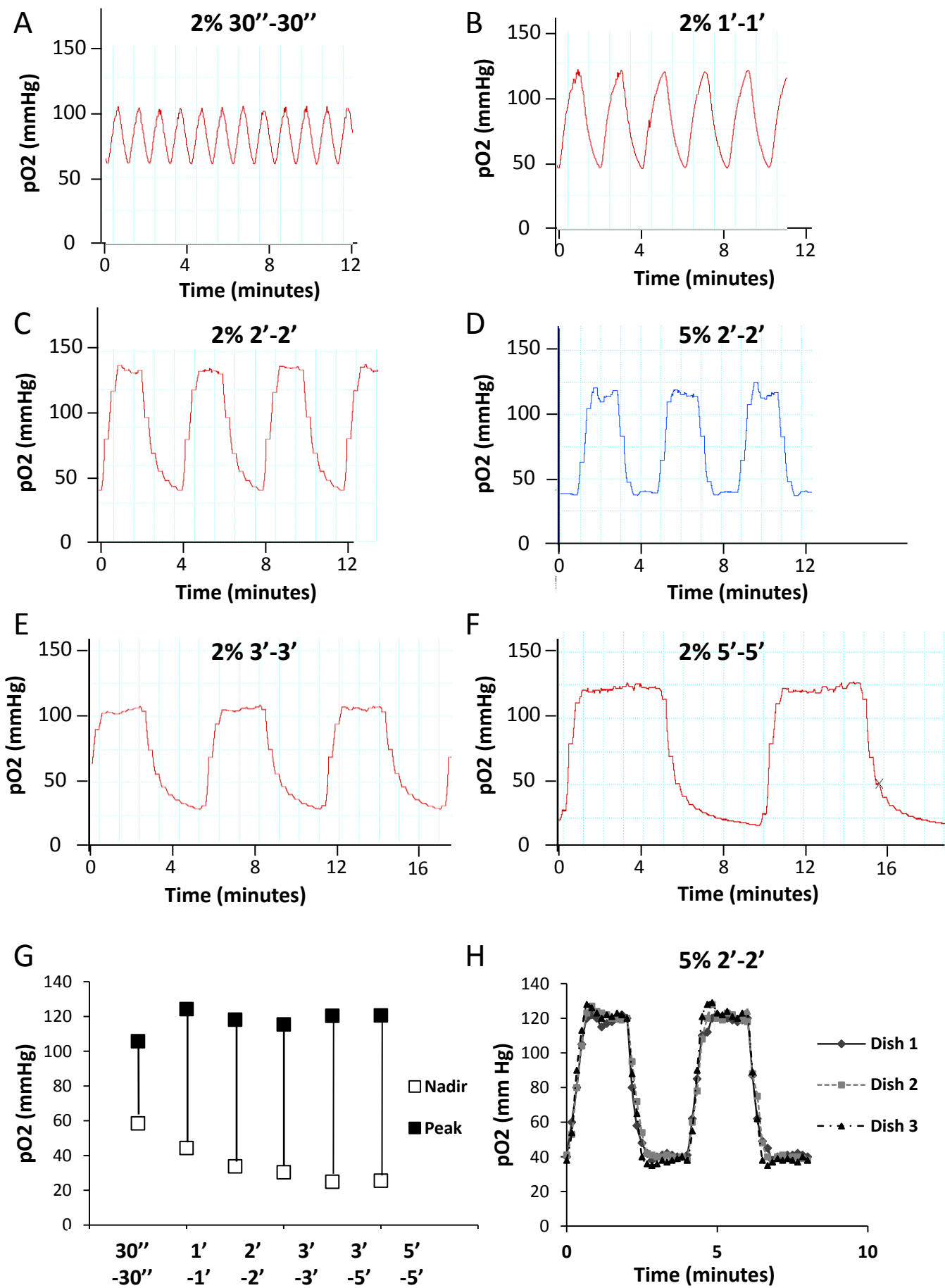
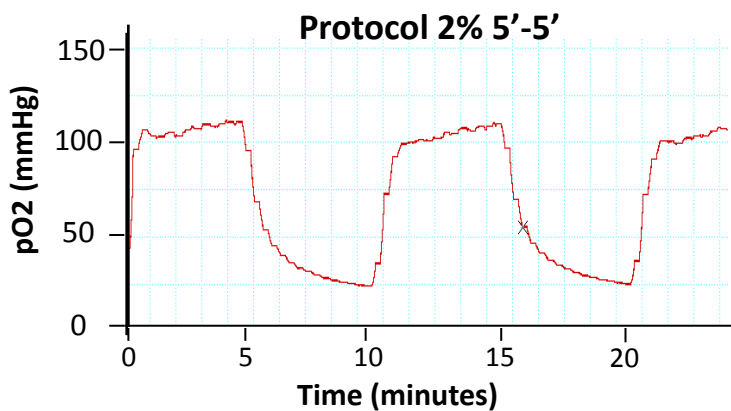
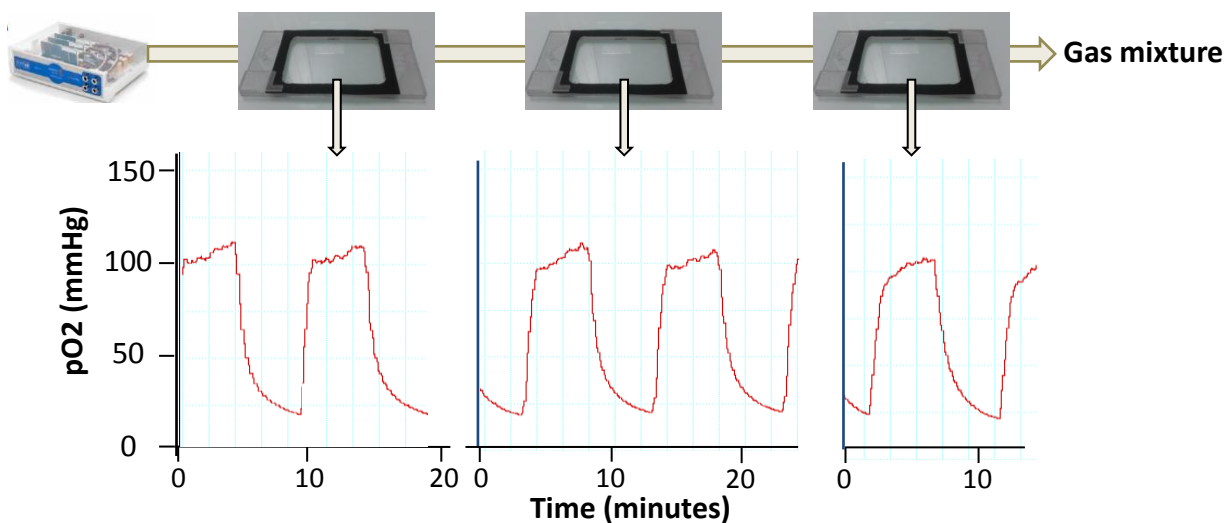
Fig. 2

Fig. 3

A



B



	Nadir	Peak	Delta
First plate	27.0 ± 1.9	118.8 ± 3.6	91.8 ± 2.9
Second plate	26.3 ± 3.2	118.7 ± 6.4	92.3 ± 3.5
Third plate	30.7 ± 4.3	122.7 ± 8.1	92.0 ± 4.4

C

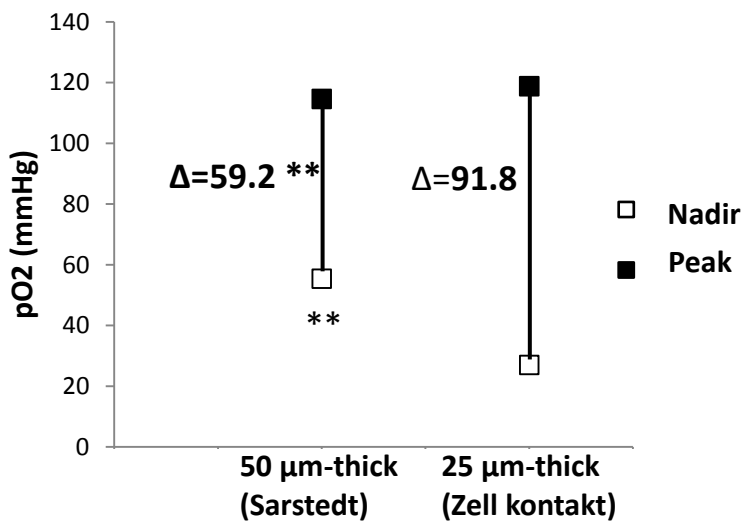
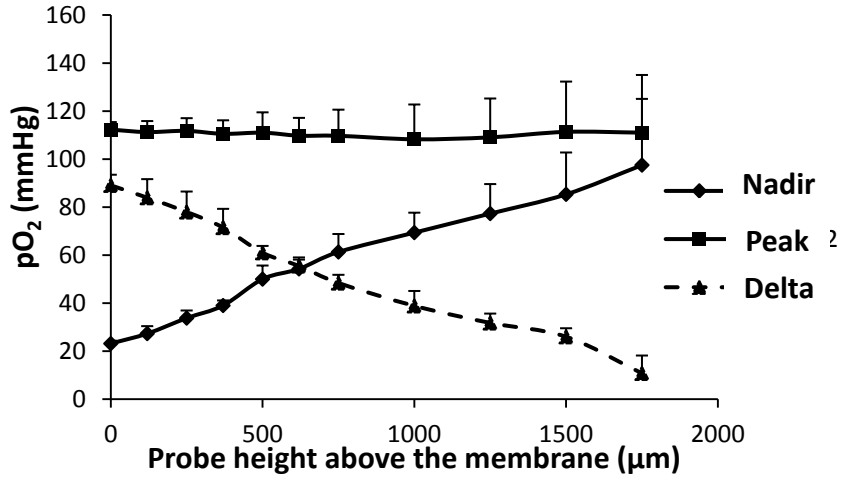
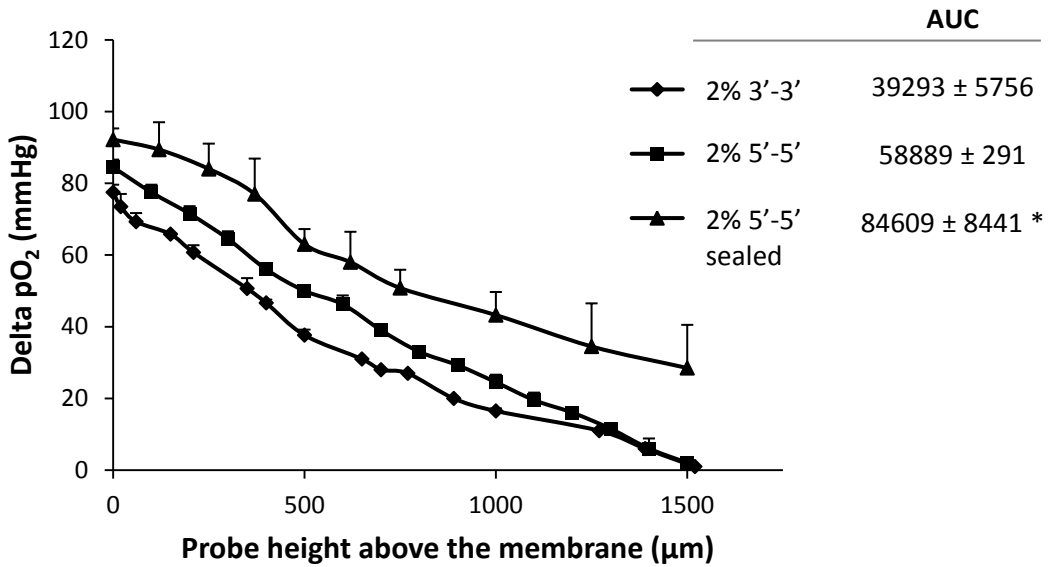


Fig. 4

A



B



C

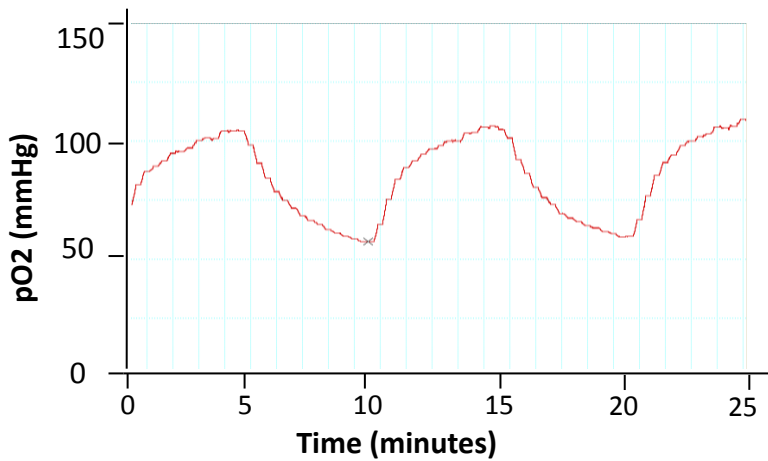


Fig. 5

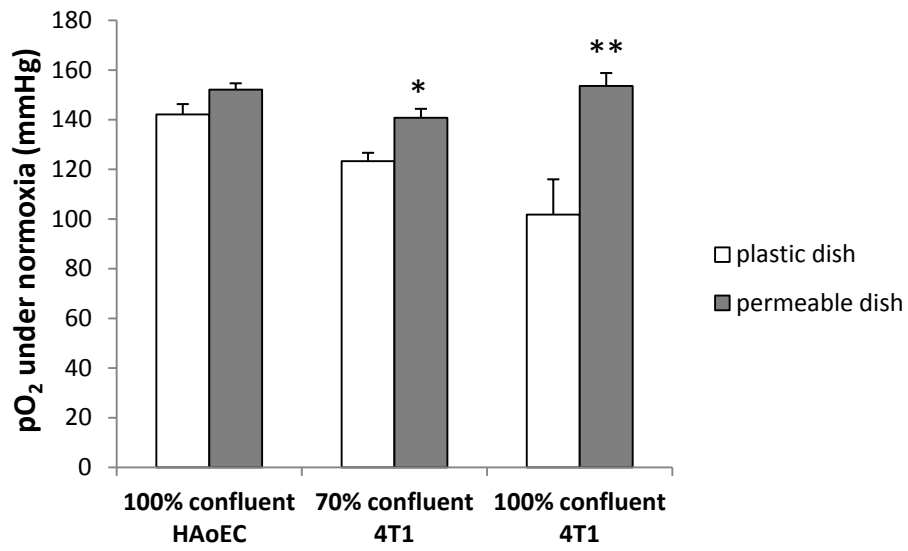
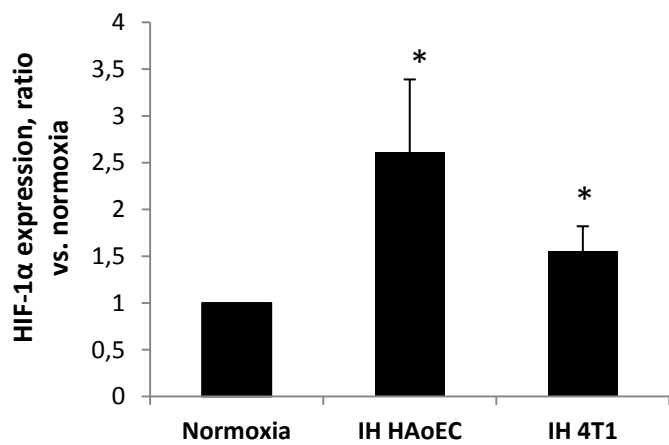
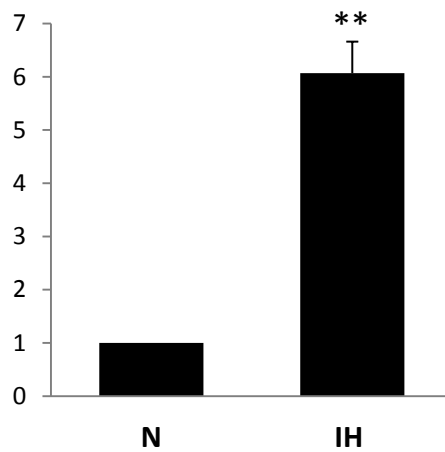


Fig. 6

A



B



17. Revue publiée dans « Pharmacology & Therapeutic »



Associate editor: N. Frossard

Targeting the ROS-HIF-1-endothelin axis as a therapeutic approach for the treatment of obstructive sleep apnea-related cardiovascular complications

Elise Belaidi ^{a,b}, Jessica Morand ^{a,b}, Emmanuelle Gras ^{a,b}, Jean-Louis Pépin ^{a,b,c}, Diane Godin-Ribuot ^{a,b,*}^a Université Grenoble Alpes, Laboratoire HP2, Grenoble F-38042, France^b INSERM U1042, Grenoble F-38042, France^c CHU de Grenoble, Grenoble F-38042, France

ARTICLE INFO

Available online 2 August 2016

Keywords:

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

ABSTRACT

Obstructive sleep apnea (OSA) is now recognized as an independent and important risk factor for cardiovascular diseases such as hypertension, coronary heart disease, heart failure and stroke. Clinical and experimental data have confirmed that intermittent hypoxia is a major contributor to these deleterious consequences. The repetitive occurrence of hypoxia–reoxygenation sequences generates significant amounts of free radicals, particularly in moderate to severe OSA patients. Moreover, in addition to hypoxia, reactive oxygen species (ROS) are potential inducers of the hypoxia inducible transcription factor-1 (HIF-1) that promotes the transcription of numerous adaptive genes some of which being deleterious for the cardiovascular system, such as the endothelin-1 gene. This review will focus on the involvement of the ROS-HIF-1-endothelin signaling pathway in OSA and intermittent hypoxia and discuss current and potential therapeutic approaches targeting this pathway to treat or prevent cardiovascular disease in moderate to severe OSA patients.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Obstructive sleep apnea (OSA) is characterized by repetitive upper airway occlusions during sleep leading to intermittent hypoxia. Factors promoting OSA include functional or anatomical anomalies of the upper airways, obesity, age over 60 years, smoking and alcohol consumption (Young et al., 2002). According to recent estimates, the prevalence of the disease has more than doubled in the last 20 years and is now estimated to be between 9 and 17% in women and men, respectively, aged 50 to 70 years (Peppard et al., 2013). It is a major public health concern worldwide and in Europe since it is associated with high cardiovascular morbidity and mortality (Baguet et al., 2012; Lévy et al., 2015). Intermittent hypoxia (IH), the landmark of OSA, induces oxidative stress and consequently promotes low-grade inflammation, endothelial dysfunction

and cardiometabolic co-morbidities. Thus, effective treatment of OSA is expected to represent an important target for improving cardiometabolic risk.

Continuous positive airway pressure (CPAP) is the first line therapy for OSA. While CPAP therapy clearly improves vigilance and cognitive function, it is still debated whether CPAP alone may substantially reduce the rate of new cardiovascular events (Barbe et al., 2012). One of the major barriers to CPAP efficacy is patient adherence. Indeed, 15% of OSA patients initially refuse the treatment and 20% of those treated discontinue or use it irregularly or suboptimally. Moreover, the response to CPAP therapy, in terms of cardiovascular and metabolic outcomes, is obtained only in CPAP compliers (Bratton et al., 2015) and differs in non-obese and obese OSA patients. Thus, in obese OSA patients, CPAP alone has a limited effect, compared to weight loss, on blood pressure, insulin sensitivity, lipid profile and inflammation (Chirinos et al., 2014). The failure of CPAP to improve cardiometabolic and inflammatory markers in obese OSA patients (Jullian-Desayes et al., 2015) emphasizes the need for combined therapeutic strategies (Pepin et al., 2012). Hence, angiotensin II receptor blockers (ARBs) are more effective than CPAP to lower blood pressure (BP), but there is an added benefit of combining both treatments especially on nighttime BP (Pepin et al., 2010; Thunstrom et al., 2016). Therefore, it is important to identify the best pharmacological approach to counteract the key intermediary mechanisms responsible for OSA-related cardiovascular alterations, namely oxidative stress, sympathetic activation and inflammation.

Abbreviations: AHI, apnea–hypopnea index; ARBs, angiotensin II receptor blockers; BP, blood pressure; CAD, coronary artery disease; CamK, calcium–calmodulin kinase; CPAP, continuous positive airway pressure; ET-1, endothelin-1; ET-A, type A endothelin receptor; F1H, factor inhibiting HIF-1; HF, heart failure; HIF-1, hypoxia inducible factor-1; IH, intermittent hypoxia; LV, left ventricle; mTOR, mammalian target of rapamycin; miRNA, micro-ribonucleic acid; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NO, nitric oxide; NOX, NADPH oxidase; OSA, obstructive sleep apnea syndrome; PHDs, HIF-1 prolyl-hydroxylases; PKC, protein kinase C; PLC, phospholipase C; ROS, reactive oxygen species.

* Corresponding author at: Laboratoire HP2, Inserm U1042, Faculté de Médecine-Pharmacie, Université Grenoble Alpes, BP 170, 38042 Grenoble Cedex 9, France. Fax: +33 476 63 71 78.

E-mail address: diane.ribuot@univ-grenoble-alpes.fr (D. Godin-Ribuot).

As previously described (Dematteis et al., 2009), IH is a major consequence of OSA in terms of impact on the cardiovascular system, in particular through the generation of reactive oxygen species (ROS) (Lévy et al., 2015). Indeed, ROS enhance the stabilization and activity of the hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) transcription factor well known to promote adaptive and maladaptive responses to hypoxia (Semenza, 2009). Among the various HIF-1 target gene products, some have beneficial effects on the cardiovascular system, such as nitric oxide and carbon monoxide (Andreadou et al., 2015), while others, like endothelin-1 (ET-1), are involved in several pathophysiological pathways associated with cardiovascular disease (Kaoukis et al., 2013). Differential modulation of these gene pathways could account for the dual aspect of IH, which has been shown to be protective or deleterious according to the duration and severity of the hypoxia-reoxygenation cycles (Verges et al., 2015).

In the present review, we will focus on the involvement of the ROS-HIF-1-endothelin signaling pathway in the deleterious cardiovascular consequences induced by the rapid IH cycles and low desaturation levels encountered in moderate to severe OSA patients (Fig. 1). We will propose new therapeutic avenues targeting this pathway to treat or prevent the OSA-related cardiovascular complications. We will discuss the rationale for innovative clinical trials based on the mechanistic insights presented in this review.

2. Cardiovascular impact of obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia

2.1. Systemic hypertension

It is now well established that OSA and intermittent hypoxia cause arterial hypertension (Pepin et al., 2014; Torres et al., 2015). There is indeed

a linear relationship between the severity of sleep-disordered breathing, determined by the apnea-hypopnea index (AHI), and blood pressure elevation, independent of confounding factors (Young et al., 1997).

Fletcher et al. were the first to demonstrate that intermittent hypoxia was one of the landmark features of OSA, showing its role in the development of hypertension (Fletcher et al., 1992). This has been confirmed in several rodent models of IH (Dematteis et al., 2009) as well in healthy human volunteers exposed exclusively to intermittent hypoxia (Tamisier et al., 2011).

2.2. Vascular dysfunction and remodeling, atherosclerosis

OSA promotes endothelial dysfunction (Hoyos et al., 2015), vascular remodeling (Baguet et al., 2005) and atherosclerosis (Drager et al., 2011; Stanke-Labesque et al., 2014; Trzepizur et al., 2014). Similarly, IH exposure results in endothelial dysfunction in various vascular territories (Phillips et al., 2004; Totoson et al., 2013; Krause et al., 2015), in inflammatory and fibrotic vascular remodeling (Yang et al., 2011; Arnaud et al., 2011a; Castro-Grattoni et al., 2016; Gras et al., 2016) and in accelerated atherosclerosis (Savransky et al., 2008; Arnaud et al., 2011b; Drager et al., 2013).

2.3. Myocardial infarction and stroke

Moderate to severe OSA is associated by an enhanced risk of coronary heart disease (CAD) (Arzt et al., 2015) and stroke (Arzt et al., 2005; Dong et al., 2013). OSA patients with acute myocardial infarction have more severe CAD, prolonged myocardial ischemia and less salvaged myocardium than non-apneic patients (Arzt et al., 2015). Thus, a high AHI is independently associated with a larger infarct size

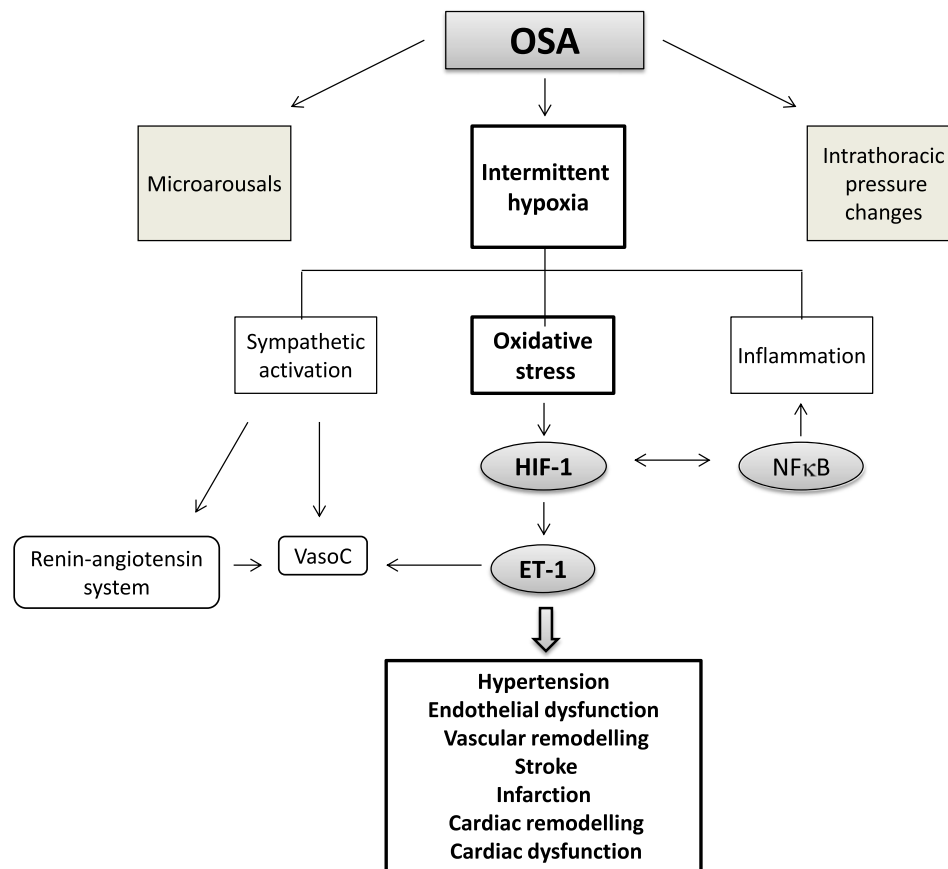


Fig. 1. Among the consequences of obstructive sleep apnea (OSA), intermittent hypoxia plays a major role in the development of associated cardiovascular pathologies. More specifically, intermittent hypoxia is well recognized to induce oxidative stress with subsequent activation of the hypoxia inducible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

3 months after acute myocardial infarction (Buchner et al., 2014). IH appears to be a major contributor since several experimental studies have demonstrated an increase in myocardial infarct size following IH exposure (Joyeux-Faure et al., 2005; Belaidi et al., 2009; Ramond et al., 2013; Yeung et al., 2015; Belaidi et al., 2016; Bourdier et al., 2016). Cerebral infarct size and neuronal excitotoxicity (an index of stroke vulnerability) are also increased by IH (Jackman et al., 2014; Jagadapillai et al., 2014).

2.4. Cardiac dysfunction and heart failure

Left ventricular dysfunction and remodeling have been reported in OSA patients prior to the development of hypertension or other cardiovascular diseases (Baguet et al., 2012; Aslan et al., 2013). Following acute myocardial infarction, cardiac dysfunction and remodeling are worsened in OSA compared to non-apneic patients (Arzt et al., 2015). Thus, not only is OSA a significant risk factor for the development of incident heart failure (Gottlieb et al., 2010), but it also enhances mortality in heart failure patients (Wang et al., 2007; Khayat et al., 2015).

In rodent models, prolonged IH exposure results in left ventricular dysfunction (Chen et al., 2008), fibrotic ventricular remodeling (Hayashi et al., 2008; Ding et al., 2014) and cardiac hypertrophy (Chen et al., 2010).

Regarding heart failure (HF), a recent study in rats has shown that a 4-week IH exposure exacerbated myocardial remodeling and cardiac dysfunction in a pressure overload-induced HF model (Li et al., 2015).

3. The reactive oxygen species–hypoxia inducible transcription factor-1–endothelin pathway in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia and its role in the cardiovascular alterations

3.1. Why the reactive oxygen species–hypoxia inducible transcription factor-1–endothelin pathway?

OSA is widely recognized as an oxidative stress disorder (Lavie & Lavie, 2009; Badran et al., 2014; Eisele et al., 2015; Lavie, 2015). As recently reviewed by Eisele et al., OSA patients present with increased superoxide anion release by circulating leucocytes associated with an upregulation of NADPH oxidase (NOX), reduced nitric oxide bioavailability reflected by a decrease in total nitrate and nitrite, increased lipid peroxidation and reduced antioxidant status characterized by lower plasma levels of antioxidant substances, such as vitamin A and E, or antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase and catalase (Eisele et al., 2015). Accordingly, lipid peroxidation products, such as thiobarbituric reactive substances (Barcelo et al., 2000; Lavie et al., 2004) or isoprostanes (Carpagnano et al., 2003; Biltagi et al., 2008; Monneret et al., 2010; Del Ben et al., 2012) are increased in OSA patients and their levels are correlated with sleep apnea severity (Lavie et al., 2004; Biltagi et al., 2008; Monneret et al., 2010). Few studies have investigated the correlation of OSA-related oxidative stress with cardiovascular disease markers but we have demonstrated a direct relationship between urinary 15-F2t-isoprostane levels and carotid intima-media thickness in non-obese OSA patients, in support for a role of oxidative stress in the early atherosclerotic process (Monneret et al., 2010). Indeed, there is a linear relationship between oxidative stress and sleep apnea severity (Franco et al., 2012). Thus the lowest antioxidant status and the highest ROS production by circulating leucocytes are observed in the most severe OSA patients (Mancuso et al., 2012; Pilkauskaitė et al., 2013). In accordance, the severity of the cardiometabolic alterations is correlated to that of hypoxemia, with alterations most significant in patients with severe nocturnal hypoxia (He et al., 2010; Gami et al., 2013; Cakmak et al., 2015). In a recent retrospective follow-up study on 1068 men originally referred to night polysomnography due to suspected OSA, Muraja-Murro et al. conclude that adjusting AHI with severity of obstruction events enhances the detection of patients with the highest risk of cardiovascular morbidity or mortality (Muraja-Murro et al., 2014).

Animal models of chronic short-cycling IH exposure closely reproduce the desaturation pattern and cardiovascular alterations seen in moderate to severe OSA patients (Dematteis et al., 2009). Chronic cyclic IH exposure also induces an oxidative stress in the brain, lung and liver, in proportion to hypoxia intensity (Quintero et al., 2013) while a 3-day exposure is sufficient to produce oxidative stress-related kidney damage (Wu et al., 2015). Likewise, others and we have shown that IH induces an important oxidative stress in cardiovascular tissues (Chen et al., 2005; Troncoso Brindeiro et al., 2007; Ramond et al., 2013; Friedman et al., 2014). Moreover, animals exposed to IH experience the same alterations in oxidant status than OSA patients, namely increased NOX expression and decreased catalase activity (Totoson et al., 2013).

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

In well-oxygenated cells, proline hydroxylation of the HIF-1 α subunit by prolyl-hydroxylase enzymes (PHDs) leads to binding of the von Hippel–Lindau (VHL) protein, recruitment of an E3-ubiquitin protein ligase complex with subsequent ubiquitination and proteasomal degradation. Moreover, the factor inhibiting HIF-1 (FIH) negatively regulates HIF-1 transactivation by asparagine hydroxylation, which blocks HIF-1 binding on its co-activator CBP/p300 (Fig. 2).

In sustained hypoxia, there is a general consensus that oxygen deprivation is the main mechanism behind HIF-1 activation with an ongoing debate on a potential role of mitochondrial ROS (Hagen, 2012; Movafagh et al., 2015). In contrast, ROS production by the repetitive desaturation–reoxygenation sequences induced by IH appears to play a major role in up-regulating HIF-1 activity through complex mechanisms involving prolyl-hydroxylase inactivation and HIF-1 transcription and transactivation (Fig. 3). Briefly, repetitive apneas and intermittent hypoxia trigger nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase-dependent production of ROS, mostly superoxide anions, which in turn activate phospholipase C (PLC) leading to calcium-calmodulin kinase (CamK) and protein kinase C (PKC) activation. PKC stimulates mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent synthesis of HIF-1 α and inhibits PHD-dependent HIF-1 α degradation (Prabhakar & Semenza, 2012). CamK also promotes the interaction between HIF-1 α and its co-activator p300, thereby leading to increased transcriptional activation upon dimerization with HIF-1 β . While HIF-1 α is rapidly degraded ($t_{1/2} < 5$ min) upon reoxygenation following sustained hypoxia, HIF-1 α levels remain elevated following intermittent hypoxia due to the persistent activation of mTOR (Semenza, 2009).

Although *in vitro* studies established that the pro-inflammatory transcription factor nuclear factor- κ B (NF- κ B) plays a more important role than HIF-1 in the response to IH (Ryan et al., 2005; Polotsky et al., 2010; Taylor et al., 2014), we and others have observed that chronic *in vivo* exposure to IH leads to a strong and sustained activation of HIF-1 in the heart (Belaidi et al., 2008, 2009, 2016), aorta (Gras et al., 2016), brain (Wang et al., 2009; Chou et al., 2013) and liver (da Rosa et al., 2012). Nevertheless, the important role of pro-inflammatory pathways is in accordance with these observations since there is a strong crosstalk and synergistic activity between NF- κ B and HIF-1 (Gorlach & Bonello, 2008; Bruning et al., 2012) (Fig. 1). An interesting aspect of HIF-1 activation by IH is that it persists when the animals are

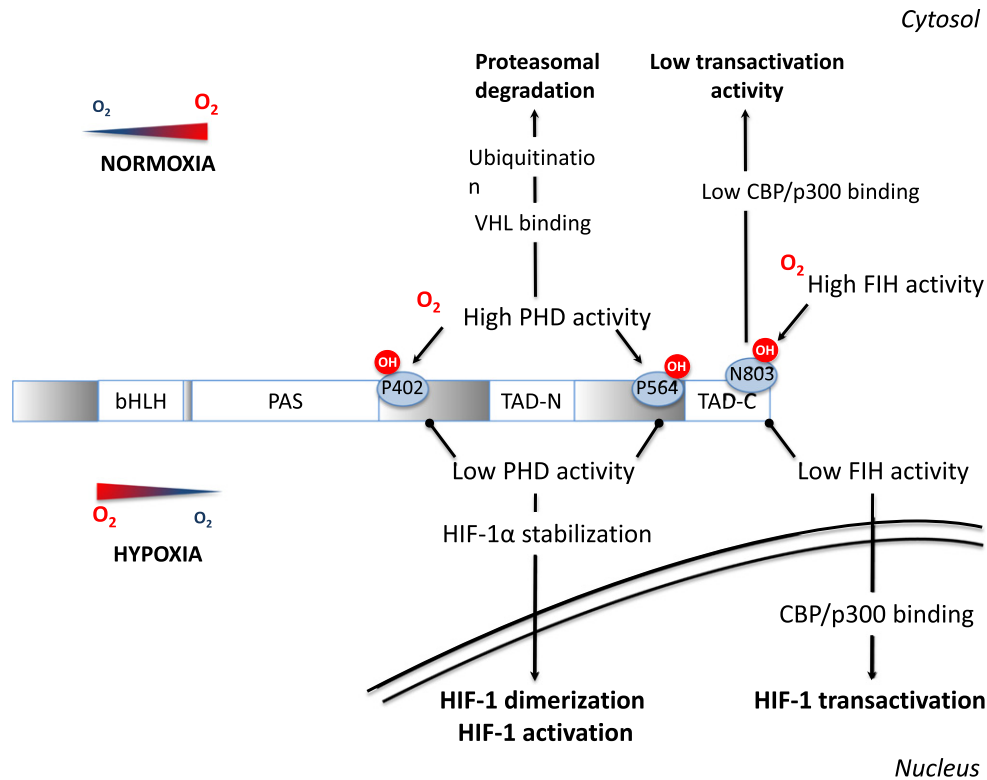


Fig. 2. Signal transduction pathways by which a reduction in O₂ concentration inhibits prolyl-4-hydroxylases (PHDs) and factor inhibiting HIF-1 (FIH), leading to HIF-1 α stabilization and activation. See text for detailed description and additional abbreviations.

back in normoxic conditions. This is in agreement with in vitro observations showing that HIF-1 activity remains lastingly elevated after termination of IH (Yuan et al., 2008) and can explain the long-lasting HIF-1 levels and activity observed hours after termination of IH in experimental animals. Although data in OSA patients are scarce, Kazmarek et al. have confirmed that HIF-1 α and target genes mRNA are increased in skin biopsies from severe OSA patients and concluded that HIF-1 expression profile may correlate with disease severity and could possibly be used to predict cardiovascular risk (Kaczmarek et al., 2013).

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

- Through its vasoconstrictive, growth promoting and pro-inflammatory properties, ET-1 has been implicated in several pathophysiological pathways associated with cardiovascular disease (Ohkita et al., 2012; Kaoukis et al., 2013).
- Plasma big ET-1 and ET-1 are increased in OSA patients (Saarelainen et al., 1997; Phillips et al., 1999; Gjorup et al., 2007; Karkoulis et al., 2010; Zamarron et al., 2011), in correlation with BP values (Phillips et al., 1999; Anunciato et al., 2013), and in plasma and tissues of animals exposed to IH (Kanagy et al., 2001; Belaidi et al., 2009; Capone et al., 2012; Peng et al., 2012).
- Endothelin receptors, in particular ET-A receptors, are upregulated by IH and the vascular response to ET-1 is increased (Allahdadi et al., 2005; Lefebvre et al., 2006; Rey et al., 2007; Belaidi et al., 2009; Pawar et al., 2009; Snow et al., 2011; Wang et al., 2013; Friedman et al., 2014).
- ET-1 has the ability to increase NADPH oxidase activity and HIF-1 expression in part through its ET-A receptors (Li et al., 2003; Pisarcik

et al., 2013), thus further promoting superoxide production and HIF-1 activity in a feed-forward mechanism (Fig. 3).

In the following sections, we will present the experimental pharmacological evidence in favor of an inhibition of the ROS-HIF-1-endothelin axis in the prevention of the cardiovascular complications induced by IH.

3.2. Role in systemic hypertension

Numerous experimental studies have confirmed that reduction in oxidative stress level, either by NOX-2 deficiency (Schulz et al., 2014) or antioxidant treatments (Hung et al., 2013; Ramond et al., 2013) prevents the development of hypertension in response to intermittent hypoxia exposure. Endothelin receptor antagonists have also been shown to be very effective in preventing or reversing hypertension in rodents exposed to IH (Kanagy et al., 2001; Allahdadi et al., 2008; Belaidi et al., 2009; de Frutos et al., 2010).

3.3. Role in vascular dysfunction and remodeling

In rats exposed to intermittent hypoxia, allopurinol treatment (through its xanthine oxidase-inhibiting property) attenuated the impairment in acetylcholine-mediated vasodilation (Dopp et al., 2011). In a comprehensive study in mice, Capone et al. confirmed the role of both oxidative stress and ET-1 on the impairment in cerebrovascular endothelial-dependent relaxation induced by IH. Hence, cerebrovascular dysfunction was abolished in mice lacking the NOX2 subunit of NADPH oxidase as well as by local perfusion with Mn(III)tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin chloride (a free radical scavenger) or with BQ-123 (a selective ET-A receptor antagonist) (Capone et al., 2012). We have recently demonstrated that oxidative stress was responsible for the IH-induced vascular dysfunction in the rat ophthalmic artery, in particular regarding the increased contractile response to ET-1 (Mentek et al., 2016).

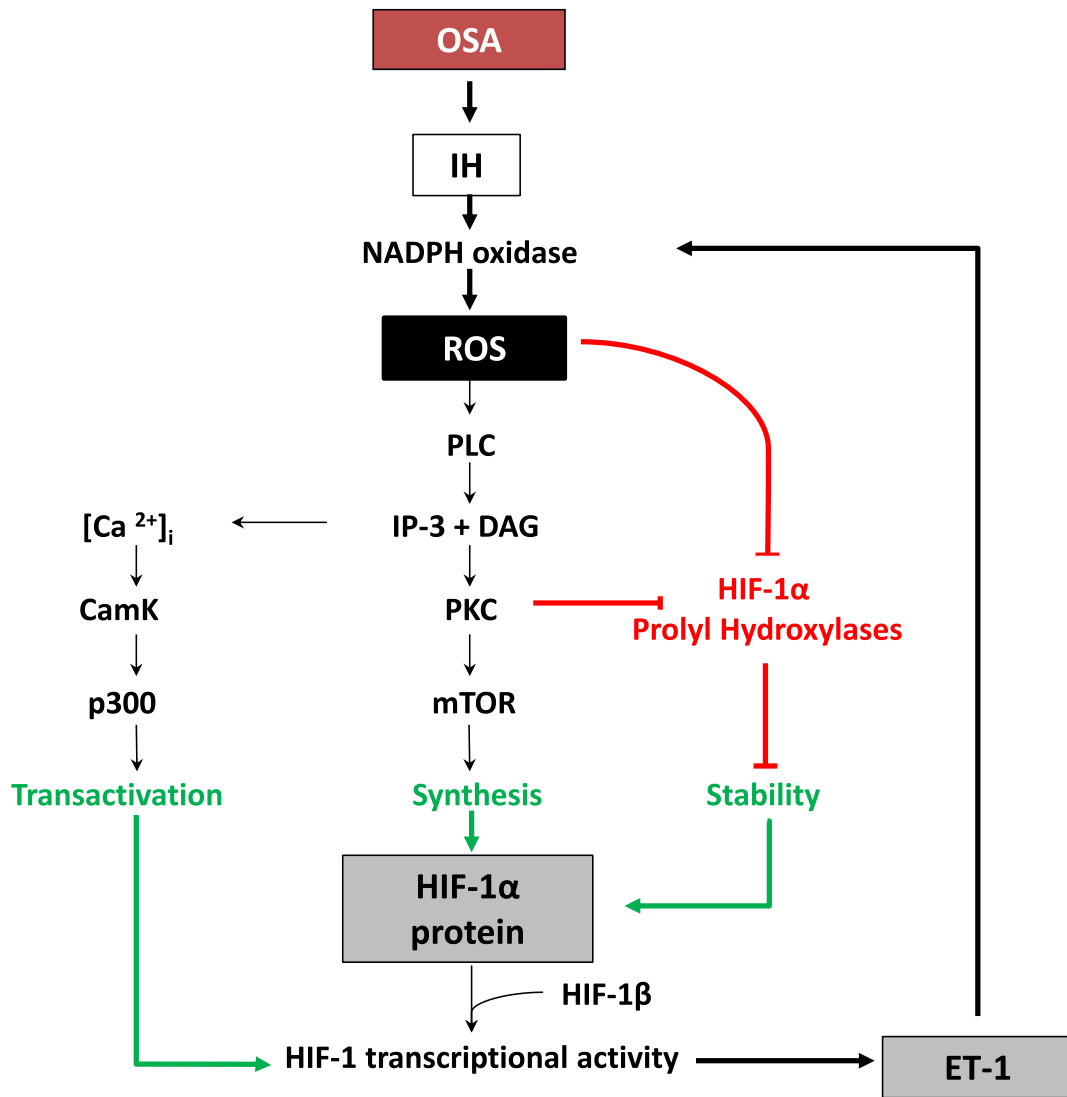


Fig. 3. Signal transduction pathways by which obstructive sleep apnea (OSA), intermittent hypoxia (IH) and reactive oxygen species (ROS) induce HIF-1 α protein stability, synthesis and transactivation and the promoting effect of endothelin-1 (ET-1) (adapted with permission from Semenza, 2009). See text for detailed description and additional abbreviations.

In the case of vascular remodeling, de Frutos et al. demonstrated in mice that IH-induced remodeling of mesenteric arteries could be prevented by the mixed endothelin receptor antagonist bosentan (de Frutos et al., 2010). Finally, we have recently established that ET-1 was involved in the inflammatory vascular remodeling induced by IH, through a feed-forward mechanism implicating HIF-1 and its crosstalk with NF- κ B (Gras et al., 2016).

3.4. Role in myocardial infarction and stroke

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

The cardiac endothelin system is activated by HIF-1 in rats exposed to IH, resulting in increased tissue ET-1 levels, upregulation of coronary ET-A receptors and enhanced vasoconstriction. The deleterious impact of these effects on the myocardium is evidenced by the ability of

bosentan to completely prevent the related increase in infarct size (Belaidi et al., 2009). Similar effects on the brain's susceptibility to ischemia remain to be demonstrated. However, Capone et al. have observed that alterations of the cerebral circulation induced by chronic IH in mice were prevented by the selective ET-A receptor antagonist BQ123 (Capone et al., 2012). In a recent study, we have shown that endoplasmic reticulum (ER) stress and HIF-1 were responsible for the infarct size expansion induced by IH (Belaidi et al., 2016).

3.5. Role in myocardial dysfunction and remodeling

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

There is ample evidence that activation of the endothelin system promotes cardiac hypertrophy and HF. Hence, plasma and myocardial ET-1 levels (Cavero et al., 1990; Margulies et al., 1990; Yorikane et al., 1993) and ET-1 receptors (Sakai et al., 1996b) are increased in animal models of congestive HF and in HF patients (McMurray et al., 1992;

Table 1
Summary of experimental studies demonstrating the beneficial effects of targeting reactive oxygen species (ROS), HIF-1 and the endothelin-1 (ET-1) system in animal models of cardiovascular complications associated with intermittent hypoxia (IH). Gp91phox: MnTBAP; Mn(III)tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin chloride; NOX2: gp91phox subunit of NADPH oxidase.

Cardiovascular disease	IH model	Target	Treatment/models	References
Systemic hypertension	Rat	ROS	Melatonin (10 mg/kg/day)	Hung et al., 2013
	Rat	ROS	Tempol (1 mM in water)	Ramond et al., 2013
	Rat	ET-1	PD145065 (1–1000 nmol/kg)	Kanagy et al., 2001
	Rat	ET-1	BQ-123 (10–1000 nmol/kg)	Allahdadi et al., 2008
	Rat	ET-1	Bosentan (100 mg/kg/day)	Belaidi et al., 2009
	Mouse	ROS	Apocynin (30 mg/kg/day)/NOX-2 deficiency	Schulz et al., 2014
Vascular dysfunction	Mouse	ET-1	Bosentan (30 mg/kg/day)/PD155080 (50 µg/kg/day)	de Frutos et al., 2010
	Rat	ROS	Allopurinol (65 mg/kg/day)	Dopp et al., 2011
	Rat	ROS	Atorvastatin (10 mg/kg/day)	Totoson et al., 2013
	Rat	ET-1	BQ-123 (10 µM perfusion)	Mentek et al., 2016
	Mouse	ROS	MnTBAP (100 µM perfusion)	Capone et al., 2012
	Mouse	ET-1	BQ-123 (10 µM perfusion)	Capone et al., 2012
Vascular remodeling	Mouse	ET-1	Bosentan (30 mg/kg/day)/PD155080 (50 µg/kg/day)	de Frutos et al., 2010
	Mouse	ET-1	Bosentan (100 mg/kg/day)	Gras et al., 2016
	Mouse	HIF-1	HIF-1 deficiency	Gras et al., 2016
Cardiac dysfunction	Rat	ROS	Allopurinol (1% in water)	Williams et al., 2010
Cardiac remodeling	Mouse	ROS	NOX2 deficiency	Hayashi et al., 2008
Myocardial infarction	Rat	ROS	Melatonin (100 mg/L)/tempol (1 mM in water)	Ramond et al., 2013
	Rat	ET-1	Bosentan (100 mg/kg/day)	Belaidi et al., 2009
	Mouse	HIF-1	HIF-1 deficiency	Belaidi et al., 2016
Stroke	Mouse	ROS	MnTBAP (100 µM perfusion)/NOX2 deficiency	Capone et al., 2012
	Mouse	ET-1	BQ-123 (10 µM perfusion)	Capone et al., 2012

Zolk et al., 1999). Moreover, ET-1 receptor antagonists (Fracarollo et al., 1997; Mulder et al., 1997; Mishima et al., 2000) have been shown to improve LV dysfunction and remodeling and to enhance survival (Sakai et al., 1996a; Mulder et al., 1997) in HF models. Nevertheless, the role of ET-1 in the development of cardiac remodeling and HF in response to IH still remains to be investigated.

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

4. Targeting the reactive oxygen species–hypoxia inducible transcription factor-1–endothelin axis as a novel therapeutic approach in obstructive sleep apnea

The experimental evidence presented above clearly underscores the therapeutic potential of interventions targeting this axis in the prevention and/or reduction of cardiovascular alterations in moderate to severe OSA patients. While large-scale clinical investigations specifically designed to address this issue are still pending, we have identified several potentially interesting pharmacological agents that have already been tested clinically or are in pre-clinical development.

4.1. Antioxidant treatment

As mentioned earlier, there is an emerging consensus that OSA is an oxidative stress disorder. In accordance, various studies have shown that reversal of apneas by CPAP therapy can reduce OSA-related oxidative stress markers (Eisele et al., 2015; Jullian-Desayes et al., 2015). However, other studies report limited effects (Barceló et al., 2006; Del Ben et al., 2012; Jullian-Desayes et al., 2015) and a recent sham-controlled randomized study specifically designed to test the effect of CPAP treatment on primary markers of lipid peroxidation failed to observe significant effects (Sivam et al., 2015). These data, plus the fact that a significant proportion of OSA patients are unable or unwilling to use CPAP therapy, represent a strong argument in favor of studies investigating the effects of antioxidants in OSA patients. Still, apart from some reports of beneficial effects of acute intravenous vitamin C injection (Grebe et al., 2006; Buchner et al., 2011) or of oral allopurinol treatment (El Solh et al., 2006), no large-scale clinical studies have been performed. The reason behind this discrepancy could be that while antioxidants have proven effective in

preventing or reverting oxidative stress-related cardiovascular alterations in experimental models, they have generally yielded disappointing results when translated to human clinical practice, as recently reviewed in this journal (Fariás et al., 2016).

Nevertheless, the fact that part of the effectiveness of medications such as statins, angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors or ARBs is due to their pleiotropic antioxidant and anti-inflammatory properties (Siti et al., 2015) supports the use of these agents in the prevention or treatment of the cardiovascular complications associated with OSA (Pepin et al., 2010; Thunstrom et al., 2016). This is strengthened by the fact that these drugs interfere with NADPH oxidase activation and expression, a therapeutic strategy potentially more efficient than non-selective ROS scavenging (Schramm et al., 2012), particularly in the context of IH and OSA.

Hence, we have shown that the IH-induced vascular remodeling and increase in blood pressure and infarct size were prevented by atorvastatin along with a decrease in NADPH oxidase upregulation and a preservation of superoxide dismutase activity (Totoson et al., 2013). In OSA patients, 3 months of atorvastatin treatment lowered blood pressure and improved lipid profile (Joyeux-Faure et al., 2014). Also, increased internalization of endothelial CD59 in IH appears to be cholesterol-dependent and is reversed by statins in a CD59-dependent manner (Emin et al., 2016).

In accordance, we have shown that valsartan induced a fourfold greater decrease in mean 24-hour BP compared to CPAP in a small cohort of untreated hypertensive OSA patients (Pepin et al., 2010). In view of the antioxidant, anti-inflammatory and anti-hypertensive actions of statins, ACE inhibitors and ARBs, their beneficial effects in OSA patients should definitely be confirmed in large-scale clinical trials.

Another interesting therapeutic candidate appears to be melatonin, a circadian rhythm regulating hormone with potent pleiotropic antioxidant properties (Tan et al., 2015) and whose secretion profile is altered in OSA patients (Zirlik et al., 2013). We were among the first to report the potent cardioprotective effects of melatonin against ischemia–reperfusion injuries (ventricular arrhythmias and infarct size) (Lagneux et al., 2000). More recently, others and we have shown that melatonin administration throughout IH exposure was very effective in preventing the development of myocardial susceptibility to infarction, hypertension and endothelial dysfunction (Hung et al., 2013; Ramond et al., 2013; Yeung et al., 2015). These effects were also associated with a reduction in IH-induced NADPH oxidase expression and with an increase in antioxidant

enzyme activity (Hung et al., 2013). Of particular relevance to the topic of present review, melatonin also has the ability to inhibit HIF-1 activity and target gene expression, possibly through its antioxidant actions (Vriend & Reiter, 2016).

Finally, the novel therapeutic concept of replacing antioxidant supplementation by activation of endogenous antioxidants was recently addressed in this journal (Chan & Chan, 2015). This approach is particularly interesting in the context of OSA where antioxidant defenses are lowered. Moreover, this could be achieved by non-pharmacological means such as exercise. In a recent study, moderate exercise was shown to increase endogenous antioxidant levels in healthy as well as in diabetic patients and to reduce oxidative DNA damage (Pittaluga et al., 2015). In that respect, we have recently shown that high-intensity training during IH exposure reduces pro-apoptotic ER stress and prevents the development of hypertension and the increase in infarct size (Bourdier et al., 2016).

4.2. Endothelin system antagonism

Although the major role of endothelin and its receptors in the development of systemic and pulmonary hypertension, coronary atherosclerosis, myocardial infarction and heart failure is well documented (Ohkita et al., 2012), endothelin receptor antagonists are currently mainly used for the treatment of pulmonary hypertension where they have proven effective in decreasing pulmonary vascular resistance and increasing cardiac index (Channick et al., 2001). Yet, mixed receptor antagonists like bosentan (Krum et al., 1998), or selective ET-A receptor antagonists like darusentan (Nakov et al., 2002; Black et al., 2007), have been shown to significantly decrease blood pressure in patients with essential or resistant arterial hypertension. Bosentan improved peripheral (Rafnsson et al., 2012) and the ET-A receptor antagonist atrasentan improved coronary (Reriani et al., 2010) endothelial function in patients with type-2 diabetes and early atherosclerosis, respectively. Finally, in a study in patients with heart failure resistant to standard therapy, bosentan treatment increased cardiac output and decreased systemic and pulmonary vascular resistance (Sutsch et al., 1998) although subsequent clinical trials with mixed and ET-A antagonists have failed to show clear clinical benefits

(Kaoukis et al., 2013). Moreover, the safety profile of these drugs has been disappointing due to a high incidence of hepatotoxicity, headache and edema. Nevertheless, a new generation of endothelin system antagonists is emerging such as ET-converting enzyme inhibitors, mixed ECE and neutral endopeptidase inhibitors, ET-B receptor agonists or new potent non-toxic mixed antagonists, such as macitentan (Maguire & Davenport, 2014). These promising agents should definitely be tested in experimental IH models in order to compare their efficacy to that of bosentan or ET-A receptor antagonists.

Some authors argue that selective ET-A receptor antagonists are better suited than mixed antagonists for the prevention or treatment of cardiovascular diseases (Nasser & El-Mas, 2014) but this remains to be confirmed by specifically-designed clinical studies, particularly in the context of OSA since the deleterious effects of IH are mainly due to ET-A receptor upregulation (Allahdadi et al., 2008; Belaidi et al., 2009; de Frutos et al., 2010; Capone et al., 2012; Briancon-Marjollet et al., 2016; Mentek et al., 2016).

In a small randomized controlled pilot study in OSA patients ($n = 16$) with mild untreated hypertension (clinical BD of 142/85 mm Hg), we recently showed that a 4-week bosentan treatment resulted in a 3 mm Hg greater decrease in 24-hour DBP than CPAP, but this effect was minimal and not significant compared to baseline (Joyeux-Faure et al., 2015). This could be due to the fact that these patients were not severe enough in terms of hypertension and sleep apnea level. Hence, in view of the clear involvement of the ET-1 system in the severe IH-induced cardiovascular alterations and of the dramatic effects of ET-1 receptor antagonists in this context (Belaidi et al., 2009; Briancon-Marjollet et al., 2016; Gras et al., 2016), large-scale clinical investigations of ET-1 system antagonism in moderate to severe OSA patients are undoubtedly warranted.

4.3. Hypoxia inducible transcription factor-1 inhibition

Since both ROS and ET-1 have the ability to promote HIF-1 activity in a feed-forward manner (Fig. 3), HIF-1 appears to be a pivotal target to reverse the deleterious cardiovascular consequences of chronic IH and OSA. Various novel molecular and pharmacological interventions to reduce HIF-1 expression or activity have reached the phase of clinical translation, mostly in the field of cancer research (Fig. 4). These could

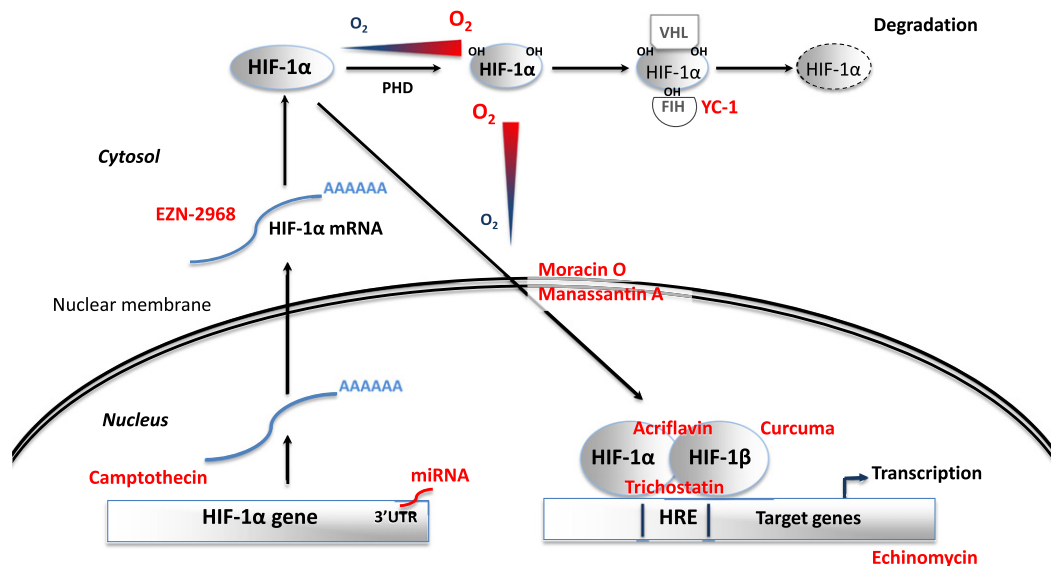


Fig. 4. Stabilization of the O₂-sensitive cytosolic alpha subunit of the hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) transcription factor is determinant for HIF-1 activity. In normoxia, proline hydroxylation (OH) of HIF-1 α leads to its recognition by the Von Hippel-Lindau (VHL) ubiquitylation complex and subsequent proteasomal degradation. Intermittent hypoxia, by inhibiting prolyl-hydroxylase (PHD) activity, induces HIF-1 α stabilization followed by translocation to the nucleus, dimerization with HIF-1 β to form HIF-1, transactivation and binding to hypoxia response elements (HRE) in the promoter of target genes. HIF-1 content and transcriptional activity can be reduced by various therapeutic strategies: miRNA and camptothecin inhibit its traduction; YC-1 activates FIH; EZN-2968 inhibits its transcription; moracin O and manassantin A inhibit its translocation to the nucleus; acriflavin and curcuma prevent its dimerization with HIF-1 β ; echinomycin prevents its binding to HRE; trichostatin prevents its transactivation.

potentially be investigated in OSA patients after prior pre-clinical studies evaluating the most appropriate therapeutic approaches to prevent excessive HIF-1 activation without suppressing its essential physiological actions.

4.3.1. Genetic strategies to decrease hypoxia inducible transcription factor-1 α protein levels

MicroRNAs (miRNAs) are a class of single-stranded non-coding RNAs that negatively regulate eukaryotic gene expression at the post-transcriptional and translational levels. Several miRNAs, named hypoxamiRs, are upregulated by hypoxia through various transcription factors including HIF-1 and NF- κ B (Nallamshetty et al., 2013; Cottrill et al., 2014). Among them, miR-210 is a ubiquitous HIF-1 target gene that has been identified has a major prognostic and therapeutic target in a number of hypoxia-related diseases such as tumor progression, myocardial infarction and pulmonary hypertension (Cottrill et al., 2014).

Reciprocally, miR-210 and other hypoxamiRs engage in regulatory feedback loops with HIF-1. Hence, miR-210 and miR-424 have the ability to promote HIF-1 stabilization through suppression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like enzyme and cullin 2, respectively (Nallamshetty et al., 2013). Moreover, miR-210 appears to be involved in the ROS-mediated HIF-1 stabilization (Nallamshetty et al., 2013; Movafagh et al., 2015).

On the other hand, targeting of the 3' untranslated region (3' UTR) of *Hif1a* by miR-155 (Bruning et al., 2011), miR-519 (Cha et al., 2010), miR-20b (Lei et al., 2009) or the miR-17/92 cluster (Taguchi et al., 2008) decreases HIF-1 α protein levels.

Thus delivery of miRNA antagonists (miR-210, miR-424) or mimics (miR-155, miR-519, miR-20b, miR17/92) represents a promising new approach to reduce HIF-1 activity that should be tested in pre-clinical IH models. Translation to clinical studies is possible in view of the rapid development of miRNA-based therapy and of its apparent lack of adverse effects (Bader et al., 2011).

4.3.2. Chemical inhibitors

Several anti-cancer agents acting at different levels of HIF-1 signaling have been tested in clinical trials, or are being investigated in pre-clinical studies. These molecules inhibit HIF-1 activity by interfering with HIF-1 α mRNA expression, translation, dimerization with HIF-1 β and DNA binding or by promoting HIF-1 α degradation (Xia et al., 2012). Below is presented a selection of small molecular HIF-1 inhibitors along with some experimental data in favor of their potential use in the prevention or treatment of IH- and OSA-induced cardiovascular alterations.

Camptothecin, a natural inhibitor of topoisomerase I, prevents HIF-1 α transcription and has proven beneficial in phase I and II clinical studies (Rapisarda et al., 2004). Interestingly, camptothecin also has the ability to decrease HIF-1 expression and activity by up-regulating miR-155 expression (Bertozzi et al., 2014).

Antisense oligodeoxynucleotide HIF-1 α mRNA inhibitors, such as EZN-2968, have been shown to reduce the expression of its target genes in cell and animal models (Greenberger et al., 2008) as well as in cancer patients (Jeong et al., 2014).

YC-1, 3-(5-hydroxymethyl-2-furyl)-1-benzyl indazole, first described as a platelet guanylate cyclase activator (Ko et al., 1994), is an approved cancer drug that prevents HIF-1 α from interacting with the transcriptional co-activators p300/CBP by activating FIH (Li et al., 2008). In cardiomyocytes, HIF-1 inhibition by YC-1 effectively represses VEGF induction (Hui et al., 2012).

Acriflavine, a cutaneous antibacterial and antiviral agent, prevents HIF-1 dimerization by binding to the PAS subdomain of HIF-1 α , thereby inhibiting HIF-1 DNA-binding and transcriptional activity (Lee et al., 2009). Moreover, acriflavine prevents HIF-1 activity in C2C12 mouse myocytes exposed to IH (Cai et al., 2013).

Echinomycin is an antibiotic that can bind DNA in a sequence-specific fashion and that interferes with HIF-1-induced gene transcription by binding to its hypoxia response elements (Kong et al., 2005).

Finally, the antifungal antibiotic trichostatin, a class I and II histone deacetylase inhibitor, promotes the proteasomal degradation of HIF-1 α (Kong et al., 2006; Geng et al., 2012). It was recently shown to repress HIF-1-VEGF signaling and to inhibit choroidal angiogenesis in vivo (Chan et al., 2015).

4.3.3. Natural inhibitors

Various natural substances possess HIF-1 inhibiting activities. Moracin O, from *Morus alba* also known as white mulberry, inhibits HIF-1 translocation and activity due to its particular structure containing a 2-arylbenzofuran ring (Xia et al., 2011). Curcumin, a yellow spice from *Curcuma longa*, is known to repress HIF-1 activity via its action on HIF-1 β (Choi et al., 2006). And finally, Manassantin A, from the water plant *Saururus chinensis*, prevents HIF-1 α nuclear translocation (Hossain et al., 2005).

5. Conclusion

Although continuous positive airway pressure treatment, the first line therapy for OSA, clearly improves quality of life and sleepiness, positive response to CPAP in terms of cardiovascular and metabolic outcome is hampered by poor patient adherence, suboptimal use or limited efficacy. Novel therapeutic strategies are thus required to help counteract the key mechanisms responsible for OSA-related cardiovascular consequences. These therapeutic agents could be used in OSA patients unable or unwilling to use CPAP or in combination with CPAP in order to increase its efficacy.

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

Conflicts of interest

None.

References

- Allahdadi, K. J., Cherng, T. W., Pai, H., Silva, A. Q., Walker, B. R., Nelin, L. D., et al. (2008). Endothelin type A receptor antagonist normalizes blood pressure in rats exposed to eucapnic intermittent hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295, H434–H440.
- Allahdadi, K. J., Walker, B. R., & Kanagy, N. L. (2005). Augmented endothelin vasoconstriction in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension* 45, 705–709.
- Andreadou, I., Iliodromitis, E. K., Rassaf, T., Schulz, R., Papapetropoulos, A., & Ferdinandy, P. (2015). The role of gasotransmitters NO, H₂S and CO in myocardial ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning and remote conditioning. *Br J Pharmacol* 172, 1587–1606.
- Anunciato, I. F., Lobo, R. R., Coelho, E. B., Verri, W. A., Jr., Eckeli, A. L., Evora, P. R., et al. (2013). Big endothelin-1 and nitric oxide in hypertensive elderly patients with and without obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Arq Bras Cardiol* 101, 344–351.
- Arnaud, C., Beguin, P. C., Lantuejoul, S., Pepin, J. L., Guillemet, C., Pelli, G., et al. (2011a). The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition. *Am J Respir Crit Care Med* 184, 724–731.
- Arnaud, C., Poulain, L., Levy, P., & Dematteis, M. (2011b). Inflammation contributes to the atherogenic role of intermittent hypoxia in apolipoprotein-E knock out mice. *Atherosclerosis* 219, 425–431.
- Arzt, M., Hetzenecker, A., Steiner, S., & Buchner, S. (2015). Sleep-disordered breathing and coronary artery disease. *Can J Cardiol* 31, 909–917.
- Arzt, M., Young, T., Finn, L., Skatrud, J. B., & Bradley, T. D. (2005). Association of sleep-disordered breathing and the occurrence of stroke. *Am J Respir Crit Care Med* 172, 1447–1451.
- Aslan, K., Deniz, A., Cayli, M., Bozdemir, H., Sarica, Y., & Seydaoglu, G. (2013). Early left ventricular functional alterations in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Cardiol J* 20, 519–525.
- Bader, A. G., Brown, D., Stoudemire, J., & Lammers, P. (2011). Developing therapeutic microRNAs for cancer. *Gene Ther* 18, 1121–1126.
- Badran, M., Ayas, N., & Laher, I. (2014). Cardiovascular complications of sleep apnea: role of oxidative stress. *Oxidative Med Cell Longev* 2014, 10.
- Baguet, J. P., Barone-Rochette, G., Tamisier, R., Levy, P., & Pepin, J. L. (2012). Mechanisms of cardiac dysfunction in obstructive sleep apnea. *Nat Rev Cardiol* 9, 679–688.
- Baguet, J. P., Hammer, L., Levy, P., Pierre, H., Launois, S., Mallion, J. M., et al. (2005). The severity of oxygen desaturation is predictive of carotid wall thickening and plaque occurrence. *Chest* 128, 3407–3412.

- Barbe, F., Duran-Cantolla, J., Sanchez-de-la-Torre, M., Martinez-Alonso, M., Carmona, C., Barcelo, A., et al. (2012). Effect of continuous positive airway pressure on the incidence of hypertension and cardiovascular events in nonsleepy patients with obstructive sleep apnea: a randomized controlled trial. *JAMA* 307, 2161–2168.
- Barceló, A., Barbé, F., de la Peña, M., Vila, M., Pérez, G., Piérola, J., et al. (2006). Antioxidant status in patients with sleep apnoea and impact of continuous positive airway pressure treatment. *Eur Respir J* 27, 756–760.
- Barcelo, A., Miralles, C., Barbe, F., Vila, M., Pons, S., & Agusti, A. G. (2000). Abnormal lipid peroxidation in patients with sleep apnoea. *Eur Respir J* 16, 644–647.
- Belaidi, E., Beguin, P. C., Levy, P., Ribout, C., & Godin-Ribuot, D. (2008). Prevention of HIF-1 activation and iNOS gene targeting by low-dose cadmium results in loss of myocardial hypoxic preconditioning in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, H901–H908.
- Belaidi, E., Joyeux-Faure, M., Ribout, C., Launois, S. H., Levy, P., & Godin-Ribuot, D. (2009). Major role for hypoxia inducible factor-1 and the endothelin system in promoting myocardial infarction and hypertension in an animal model of obstructive sleep apnea. *J Am Coll Cardiol* 53, 1309–1317.
- Belaidi, E., Thomas, A., Bourdier, G., Moulin, S., Lemarie, E., Levy, P., et al. (2016). Endoplasmic reticulum stress as a novel inducer of hypoxia inducible factor-1 activity: its role in the susceptibility to myocardial ischemia-reperfusion induced by chronic intermittent hypoxia. *Int J Cardiol* 210, 45–53.
- Bertozzi, D., Marinello, J., Manzo, S. G., Fornari, F., Gramantieri, L., & Capranico, G. (2014). The natural inhibitor of DNA topoisomerase I, camptothecin, modulates HIF-1alpha activity by changing miR expression patterns in human cancer cells. *Mol Cancer Ther* 13, 239–248.
- Bitagi, M. A., Maguid, M. A., Ghafar, M. A., & Farid, E. (2008). Correlation of 8-isoprostane, interleukin-6 and cardiac functions with clinical score in childhood obstructive sleep apnoea. *Acta Paediatr* 97, 1397–1405.
- Black, H. R., Bakris, G. L., Weber, M. A., Weiss, R., Shahawy, M. E., Marple, R., et al. (2007). Efficacy and safety of darusentan in patients with resistant hypertension: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled dose-ranging study. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 9, 760–769.
- Bourdier, G., Flore, P., Sanchez, H., Pepin, J. L., Belaidi, E., & Arnaud, C. (2016). High-intensity training reduces intermittent hypoxia-induced ER stress and myocardial infarct size. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 310, H279–H289.
- Bratton, D. J., Gaisl, T., Wons, A. M., & Kohler, M. (2015). CPAP vs mandibular advancement devices and blood pressure in patients with obstructive sleep apnea: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 314, 2280–2293.
- Briancon-Marjolle, A., Monneret, D., Henri, M., Hazane-Puch, F., Pepin, J. L., Faure, P., et al. (2016). Endothelin regulates intermittent hypoxia-induced lipolytic remodelling of adipose tissue and phosphorylation of hormone-sensitive lipase. *J Physiol* 594, 1727–1740.
- Bruning, U., Cerone, L., Neufeld, Z., Fitzpatrick, S. F., Cheong, A., Scholz, C. C., et al. (2011). MicroRNA-155 promotes resolution of hypoxia-inducible factor 1alpha activity during prolonged hypoxia. *Mol Cell Biol* 31, 4087–4096.
- Bruning, U., Fitzpatrick, S. F., Frank, T., Birtwistle, M., Taylor, C. T., & Cheong, A. (2012). NFkappaB and HIF display synergistic behaviour during hypoxic inflammation. *Cell Mol Life Sci* 69, 1319–1329.
- Buchner, N. J., Quack, I., Woznowski, M., Stahle, C., Wenzel, U., & Rump, L. C. (2011). Microvascular endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea is caused by oxidative stress and improved by continuous positive airway pressure therapy. *Respiration* 82, 409–417.
- Buchner, S., Satz, A., Debl, K., Hetzenacker, A., Luchner, A., Husser, O., et al. (2014). Impact of sleep-disordered breathing on myocardial salvage and infarct size in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 35, 192–199.
- Cai, Z., Luo, W., Zhan, H., & Semenza, G. L. (2013). Hypoxia-inducible factor 1 is required for remote ischemic preconditioning of the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 17462–17467.
- Cakmak, E., Duksal, F., Altinkaya, E., Acibucu, F., Dogan, O. T., Yonem, O., et al. (2015). Association between the severity of nocturnal hypoxia in obstructive sleep apnea and non-alcoholic fatty liver damage. *Hepat Mon* 15, e32655.
- Capone, C., Faraco, G., Coleman, C., Young, C. N., Pickel, V. M., Anrather, J., et al. (2012). Endothelin 1-dependent neurovascular dysfunction in chronic intermittent hypoxia. *Hypertension* 60, 106–113.
- Carpagnano, G. E., Kharitonov, S. A., Resta, O., Foschino-Barbaro, M. P., Gramiccioni, E., & Barnes, P. J. (2003). 8-Isoprostane, a marker of oxidative stress, is increased in exhaled breath condensate of patients with obstructive sleep apnea after night and is reduced by continuous positive airway pressure therapy. *Chest* 124, 1386–1392.
- Castro-Grattoni, A. L., Alvarez, R., Torres, M., Farre, R., Montserrat, J. M., Dalmases, M., et al. (2016). Intermittent hypoxia-induced cardiovascular remodeling is reversed by normoxia in a mouse model of sleep apnea. *Chest*.
- Cavero, P. G., Miller, W. L., Heublein, D. M., Margulies, K. B., & Burnett, J. C., Jr. (1990). Endothelin in experimental congestive heart failure in the anesthetized dog. *Am J Phys* 259, F312–F317.
- Cha, S. T., Chen, P. S., Johansson, G., Chu, C. Y., Wang, M. Y., Jeng, Y. M., et al. (2010). MicroRNA-519c suppresses hypoxia-inducible factor-1alpha expression and tumor angiogenesis. *Cancer Res* 70, 2675–2685.
- Chan, J. Y., & Chan, S. H. (2015). Activation of endogenous antioxidants as a common therapeutic strategy against cancer, neurodegeneration and cardiovascular diseases: a lesson learnt from DJ-1. *Pharmacol Ther* 156, 69–74.
- Chan, N., He, S., Spee, C. K., Ishikawa, K., & Hinton, D. R. (2015). Attenuation of choroidal neovascularization by histone deacetylase inhibitor. *PLoS One* 10, e0120587.
- Channick, R. N., Simonneau, G., Sitbon, O., Robbins, I. M., Frost, A., Tapson, V. F., et al. (2001). Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet* 358, 1119–1123.
- Chen, L., Einbinder, E., Zhang, Q., Hasday, J., Balke, C. W., & Scharf, S. M. (2005). Oxidative stress and left ventricular function with chronic intermittent hypoxia in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 172, 915–920.
- Chen, L., Zhang, J., Gan, T. X., Chen-Zhu, Y., Hasday, J. D., Karmazyn, M., et al. (2008). Left ventricular dysfunction and associated cellular injury in rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol (1985)* 104, 218–223.
- Chen, L., Zhang, J., Hu, X., Philipson, K. D., & Scharf, S. M. (2010). The Na⁺/Ca²⁺ exchanger-1 mediates left ventricular dysfunction in mice with chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol (1985)* 109, 1675–1685.
- Chirinos, J. A., Gurubhagavata, L., Teff, K., Rader, D. J., Wadden, T. A., Townsend, R., et al. (2014). CPAP, weight loss, or both for obstructive sleep apnea. *N Engl J Med* 370, 2265–2275.
- Choi, H., Chun, Y. S., Kim, M. S., Kim, M. S., & Park, J. W. (2006). Curcumin inhibits hypoxia-inducible factor-1 by degrading aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator: a mechanism of tumor growth inhibition. *Mol Pharmacol* 70, 1664–1671.
- Chou, Y. T., Zhan, G., Zhu, Y., Fenik, P., Panossian, L., Li, Y., et al. (2013). C/EBP homologous binding protein (CHOP) underlies neural injury in sleep apnea model. *Sleep* 36, 481–492.
- Cottrill, K. A., Chan, S. Y., & Loscalzo, J. (2014). Hypoxamirs and mitochondrial metabolism. *Antioxid Redox Signal* 21, 1189–1201.
- da Rosa, D. P., Forgiarini, L. F., Baronio, D., Feijo, C. A., Martinez, D., & Marroni, N. P. (2012). Simulating sleep apnea by exposure to intermittent hypoxia induces inflammation in the lung and liver. *Mediat Inflamm* 2012, 879419.
- de Frutos, S., Caldwell, E., Nitta, C. H., Kanagy, N. L., Wang, J., Wang, W., et al. (2010). NFATc3 contributes to intermittent hypoxia-induced arterial remodeling in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299, H356–H363.
- Del Ben, M., Fabiani, M., Loffredo, L., Polimeni, L., Carnevale, R., Baratta, F., et al. (2012). Oxidative stress mediated arterial dysfunction in patients with obstructive sleep apnoea and the effect of continuous positive airway pressure treatment. *BMC Pulm Med* 12, 1–8.
- Dematteis, M., Godin-Ribuot, D., Arnaud, C., Ribout, C., Stanke-Labesque, F., Pepin, J. L., et al. (2009). Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding the human disease. *ILAR J* 50, 262–281.
- Ding, W. X., Dong, Y. B., Ding, N., Zhang, X. F., Zhang, S. J., Zhang, X. L., et al. (2014). Adiponectin protects rat heart from left ventricular remodeling induced by chronic intermittent hypoxia via inhibition of TGF-beta/smad2/3 pathway. *J Thorac Dis* 6, 1278–1284.
- Dong, J. Y., Zhang, Y. H., & Qin, L. Q. (2013). Obstructive sleep apnea and cardiovascular risk: meta-analysis of prospective cohort studies. *Atherosclerosis* 229, 489–495.
- Dopp, J. M., Philippi, N. R., Marcus, N. J., Olson, E. B., Bird, C. E., Moran, J. J., et al. (2011). Xanthine oxidase inhibition attenuates endothelial dysfunction caused by chronic intermittent hypoxia in rats. *Respiration* 82, 458–467.
- Drager, L. F., Polotsky, V. Y., & Lorenzi-Filho, G. (2011). Obstructive sleep apnea: an emerging risk factor for atherosclerosis. *Chest* 140, 534–542.
- Drager, L. F., Yao, Q., Hernandez, K. L., Shin, M. K., Bevans-Fonti, S., Gay, J., et al. (2013). Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis via activation of adipose angiopoietin-like 4. *Am J Respir Crit Care Med* 188, 240–248.
- Eisele, H. -J., Markart, P., & Schulz, R. (2015). Obstructive sleep apnea, oxidative stress, and cardiovascular disease: evidence from human studies. *Oxid Med Cell Longev* 2015, 9.
- El Solh, A. A., Saliba, R., Bosinski, T., Grant, B. J., Berbary, E., & Miller, N. (2006). Allopurinol improves endothelial function in sleep apnoea: a randomised controlled study. *Eur Respir J* 27, 997–1002.
- Emin, M., Wang, G., Castagna, F., Rodriguez-Lopez, J., Wahab, R., Wang, J., et al. (2016). Increased internalization of complement inhibitor CD59 may contribute to endothelial inflammation in obstructive sleep apnea. *Sci Transl Med* 8, 320ra321.
- Fariás, J. G., Herrera, E. A., Carrasco-Pozo, C., Sotomayor-Zárate, R., Cruz, G., Morales, P., et al. (2016). Pharmacological models and approaches for pathophysiological conditions associated with hypoxia and oxidative stress. *Pharmacol Ther* 158, 1–23.
- Fletcher, E. C., Lesske, J., Culman, J., Miller, C. C., & Unger, T. (1992). Sympathetic denervation blocks blood pressure elevation in episodic hypoxia. *Hypertension* 20, 612–619.
- Fracarollo, D., Hu, K., Galuppo, P., Gaudron, P., & Ertl, G. (1997). Chronic endothelin receptor blockade attenuates progressive ventricular dilation and improves cardiac function in rats with myocardial infarction: possible involvement of myocardial endothelin system in ventricular remodeling. *Circulation* 96, 3963–3973.
- Franco, C. M., Lima, A. M., Ataíde, L., Jr., Lins, O. G., Castro, C. M., Bezerra, A. A., et al. (2012). Obstructive sleep apnea severity correlates with cellular and plasma oxidative stress parameters and affective symptoms. *J Mol Neurosci* 47, 300–310.
- Friedman, J. K., Nitta, C. H., Henderson, K. M., Codianni, S. J., Sanchez, L., Ramiro-Diaz, J. M., et al. (2014). Intermittent hypoxia-induced increases in reactive oxygen species activate NFATc3 increasing endothelin-1 vasoconstrictor reactivity. *Vascul Pharmacol* 60, 17–24.
- Gami, A. S., Olson, E. J., Shen, W. K., Wright, R. S., Ballman, K. V., Hodge, D. O., et al. (2013). Obstructive sleep apnea and the risk of sudden cardiac death: a longitudinal study of 10,701 adults. *J Am Coll Cardiol* 62, 610–616.
- Geng, H., Liu, Q., Xue, C., David, L. L., Beer, T. M., Thomas, G. V., et al. (2012). HIF1alpha protein stability is increased by acetylation at lysine 709. *J Biol Chem* 287, 35496–35505.
- Gjorup, P. H., Sadauskienė, L., Wessels, J., Nyvad, O., Strunge, B., & Pedersen, E. B. (2007). Abnormally increased endothelin-1 in plasma during the night in obstructive sleep apnea: relation to blood pressure and severity of disease. *Am J Hypertens* 20, 44–52.
- Gorlach, A., & Bonello, S. (2008). The cross-talk between NF-kappaB and HIF-1: further evidence for a significant liaison. *Biochem J* 412, e17–e19.

- Gottlieb, D. J., Yenokyan, G., Newman, A. B., O'Connor, G. T., Punjabi, N. M., Quan, S. F., et al. (2010). Prospective study of obstructive sleep apnea and incident coronary heart disease and heart failure: the sleep heart health study. *Circulation* 122, 352–360.
- Gras, E., Belaidi, E., Briancon-Marjollet, A., Pepin, J. L., Arnaud, C., & Godin-Ribuot, D. (2016). Endothelin-1 mediates intermittent hypoxia-induced inflammatory vascular remodeling through HIF-1 activation. *J Appl Physiol* (1985) 120, 437–443.
- Grebe, M., Eisele, H. J., Weissmann, N., Schaefer, C., Tillmanns, H., Seeger, W., et al. (2006). Antioxidant vitamin C improves endothelial function in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 173, 897–901.
- Greenberger, L. M., Horak, I. D., Filipula, D., Saprà, P., Westergaard, M., Frydenlund, H. F., et al. (2008). A RNA antagonist of hypoxia-inducible factor-1 α , EZN-2968, inhibits tumor cell growth. *Mol Cancer Ther* 7, 3598–3608.
- Hagen, T. (2012). Oxygen versus reactive oxygen in the regulation of HIF-1 α : the balance tips. *Biochem Res Int* 2012, 436981.
- Hayashi, T., Yamashita, C., Matsumoto, C., Kwak, C. J., Fujii, K., Hirata, T., et al. (2008). Role of gp91 phox-containing NADPH oxidase in left ventricular remodeling induced by intermittent hypoxic stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, H2197–H2203.
- He, Q. Y., Feng, J., Zhang, X. L., Liang, Z. A., Huang, S. G., Kang, J., et al. (2010). Relationship of daytime blood pressure and severity of obstructive sleep apnea among Chinese: a multi-center investigation in China. *Chin Med J* 123, 18–22.
- Hossain, C. F., Kim, Y. P., Baerson, S. R., Zhang, L., Bruick, R. K., Mohammed, K. A., et al. (2005). Saururus cernuus lignans—potent small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor-1. *Biochem Biophys Res Commun* 333, 1026–1033.
- Hoyos, C. M., Melehan, K. L., Liu, P. Y., Grunstein, R. R., & Phillips, C. L. (2015). Does obstructive sleep apnea cause endothelial dysfunction? A critical review of the literature. *Sleep Med Rev* 20, 15–26.
- Hui, Y., Zhao, Y., Ma, N., Peng, Y., Pan, Z., Zou, C., et al. (2012). M3-mAChR stimulation exerts anti-apoptotic effect via activating the HIF-1 α /HO-1/VEGF signaling pathway in H9c2 rat ventricular cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 60, 474–482.
- Hung, M. W., Kravtsov, G. M., Lau, C. F., Poon, A. M., Tipoe, G. L., & Fung, M. L. (2013). Melatonin ameliorates endothelial dysfunction, vascular inflammation, and systemic hypertension in rats with chronic intermittent hypoxia. *J Pineal Res* 55, 247–256.
- Inamoto, S., Yoshioka, T., Yamashita, C., Miyamura, M., Mori, T., Ukimura, A., et al. (2010). Pitavastatin reduces oxidative stress and attenuates intermittent hypoxia-induced left ventricular remodeling in lean mice. *Hypertens Res* 33, 579–586.
- Jackman, K. A., Zhou, P., Faraco, G., Peixoto, P. M., Coleman, C., Voss, H. U., et al. (2014). Dichotomous effects of chronic intermittent hypoxia on focal cerebral ischemic injury. *Stroke* 45, 1460–1467.
- Jagadapillai, R., Mellen, N. M., Sachleben, L. R., Jr., & Gozal, E. (2014). Ceftriaxone preserves glutamate transporters and prevents intermittent hypoxia-induced vulnerability to brain excitotoxic injury. *PLoS One* 9, e100230.
- Jeong, W., Rapisarda, A., Park, S. R., Kinders, R. J., Chen, A., Melillo, G., et al. (2014). Pilot trial of EZN-2968, an antisense oligonucleotide inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), in patients with refractory solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 73, 343–348.
- Joyeux-Faure, M., Jullian-Desayes, I., Pepin, J. L., Cracowski, J. L., Bague, J. P., Tamisier, R., et al. (2015). Comparison of continuous positive airway pressure and bosentan effect in mildly hypertensive patients with obstructive sleep apnoea: a randomized controlled pilot study. *Respirology*.
- Joyeux-Faure, M., Stanke-Labesque, F., Lefebvre, B., Beguin, P., Godin-Ribuot, D., Ribouot, C., et al. (2005). Chronic intermittent hypoxia increases infarction in the isolated rat heart. *J Appl Physiol* (1985) 98, 1691–1696.
- Joyeux-Faure, M., Tamisier, R., Bague, J. P., Dias-Domingos, S., Perrig, S., Leftheriotis, G., et al. (2014). Response to statin therapy in obstructive sleep apnea syndrome: a multicenter randomized controlled trial. *Mediators Inflamm* 2014, 423120.
- Jullian-Desayes, I., Joyeux-Faure, M., Tamisier, R., Launois, S., Borel, A. L., Levy, P., et al. (2015). Impact of obstructive sleep apnea treatment by continuous positive airway pressure on cardiometabolic biomarkers: a systematic review from sham CPAP randomized controlled trials. *Sleep Med Rev* 21, 23–38.
- Kaczmarek, E., Bakker, J. P., Clarke, D. N., Cszizmadia, E., Kocher, O., Veves, A., et al. (2013). Molecular biomarkers of vascular dysfunction in obstructive sleep apnea. *PLoS One* 8, e70559.
- Kanagy, N. L., Walker, B. R., & Nelin, L. D. (2001). Role of endothelin in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension* 37, 511–515.
- Kaoukis, A., Deferreos, S., Raisakis, K., Giannopoulos, G., Bouras, G., Panagopoulou, V., et al. (2013). The role of endothelin system in cardiovascular disease and the potential therapeutic perspectives of its inhibition. *Curr Top Med Chem* 13, 95–114.
- Karkoulas, K., Lykouras, D., Sampsonas, F., Drakatos, P., Canova, S., Tsoukalas, G., et al. (2010). The role of endothelin-1 in obstructive sleep apnea syndrome and pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and endothelin-1 antagonists. *Curr Med Chem* 17, 1059–1066.
- Khayat, R., Jarjoura, D., Porter, K., Sow, A., Wannemacher, J., Dohar, R., et al. (2015). Sleep disordered breathing and post-discharge mortality in patients with acute heart failure. *Eur Heart J* 36, 1463–1469.
- Ko, F. N., Wu, C. C., Kuo, S. C., Lee, F. Y., & Teng, C. M. (1994). YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. *Blood* 84, 4226–4233.
- Kong, X., Lin, Z., Liang, D., Fath, D., Sang, N., & Caro, J. (2006). Histone deacetylase inhibitors induce VHL and ubiquitin-independent proteasomal degradation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Mol Cell Biol* 26, 2019–2028.
- Kong, D., Park, E. J., Stephen, A. G., Calvani, M., Cardellino, J. H., Monks, A., et al. (2005). Echinomycin, a small-molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity. *Cancer Res* 65, 9047–9055.
- Krause, B. J., Del Rio, R., Moya, E. A., Marquez-Gutierrez, M., Casanello, P., & Iturriga, R. (2015). Arginase-endothelial nitric oxide synthase imbalance contributes to endothelial dysfunction during chronic intermittent hypoxia. *J Hypertens* 33, 515–524 discussion 524.
- Krum, H., Viskoper, R. J., Lacourciere, Y., Budde, M., & Charlon, V. (1998). The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. Bosentan Hypertension Investigators. *N Engl J Med* 338, 784–790.
- Lagneux, C., Joyeux, M., Demenge, P., Ribouot, C., & Godin-Ribuot, D. (2000). Protective effects of melatonin against ischemia-reperfusion injury in the isolated rat heart. *Life Sci* 66, 503–509.
- Lavie, L. (2015). Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia—revisited—the bad ugly and good: implications to the heart and brain. *Sleep Med Rev* 20, 27–45.
- Lavie, L., & Lavie, P. (2009). Molecular mechanisms of cardiovascular disease in OSAHS: the oxidative stress link. *Eur Respir J* 33, 1467–1484.
- Lavie, L., Vishnevsky, A., & Lavie, P. (2004). Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. *Sleep* 27, 123–128.
- Lee, K., Zhang, H., Qian, D. Z., Rey, S., Liu, J. O., & Semenza, G. L. (2009). Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 17910–17915.
- Lefebvre, B., Godin-Ribuot, D., Joyeux-Faure, M., Caron, F., Bessard, G., Levy, P., et al. (2006). Functional assessment of vascular reactivity after chronic intermittent hypoxia in the rat. *Respir Physiol Neurobiol* 150, 278–286.
- Lei, Z., Li, B., Yang, Z., Fang, H., Zhang, G. M., Feng, Z. H., et al. (2009). Regulation of HIF-1 α and VEGF by miR-20b tunes tumor cells to adapt to the alteration of oxygen concentration. *PLoS One* 4, e7629.
- Lévy, P., Kohler, M., McNicholas, W. T., Barbé, F., McEvoy, R. D., Somers, V. K., et al. (2015). Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nat Rev Dis Prim* 1, 15015.
- Li, S., Feng, J., Wei, S., Qian, X., Cao, J., & Chen, B. (2015). Delayed neutrophil apoptosis mediates intermittent hypoxia-induced progressive heart failure in pressure-overloaded rats. *Sleep Breath*.
- Li, L., Fink, G. D., Watts, S. W., Northcott, C. A., Galligan, J. J., Pagano, P. J., et al. (2003). Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin(A)-NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension. *Circulation* 107, 1053–1058.
- Li, S. H., Shin, D. H., Chun, Y. S., Lee, M. K., Kim, M. S., & Park, J. W. (2008). A novel mode of action of YC-1 in HIF inhibition: stimulation of FIH-dependent p300 dissociation from HIF-1 α . *Mol Cancer Ther* 7, 3729–3738.
- Maguire, J. J., & Davenport, A. P. (2014). Endothelin α 25 — new agonists, antagonists, inhibitors and emerging research frontiers: IUPHAR Review 12. *Br J Pharmacol* 171, 5555–5572.
- Mancuso, M., Bonanni, E., LoGerfo, A., Orsucci, D., Maestri, M., Chico, L., et al. (2012). Oxidative stress biomarkers in patients with untreated obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep Med* 13, 632–636.
- Margulies, K. B., Hildebrand, F. L., Jr., Lerman, A., Perrella, M. A., & Burnett, J. C., Jr. (1990). Increased endothelin in experimental heart failure. *Circulation* 82, 2226–2230.
- McMurray, J. J., Ray, S. G., Abdullah, I., Dargie, H. J., & Morton, J. J. (1992). Plasma endothelin in chronic heart failure. *Circulation* 85, 1374–1379.
- Mentek, M., Baldazza, M., Morand, J., Faury, G., Aptel, F., Godin-Ribuot, D., et al. (2016). Effects of intermittent hypoxia on rat ophthalmic artery reactivity: role of endothelin 1, oxidative stress and endothelium derived hyperpolarizing factors. *Arch Cardiovasc Dis Suppl* 8, 216.
- Mishima, T., Tamimura, M., Suzuki, G., Todor, A., Sharov, V. G., Goldstein, S., et al. (2000). Effects of long-term therapy with bosentan on the progression of left ventricular dysfunction and remodeling in dogs with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 35, 222–229.
- Monneret, D., Pepin, J. L., Godin-Ribuot, D., Ducros, V., Bague, J. P., Levy, P., et al. (2010). Association of urinary 15-F $_{2t}$ -isoprostane level with oxygen desaturation and carotid intima-media thickness in nonobese sleep apnea patients. *Free Radic Biol Med* 48, 619–625.
- Movafagh, S., Crook, S., & Vo, K. (2015). Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by reactive oxygen species: new developments in an old debate. *J Cell Biochem* 116, 696–703.
- Mulder, P., Richard, V., Derumeaux, G., Hogue, M., Henry, J. P., Lallemand, F., et al. (1997). Role of endogenous endothelin in chronic heart failure: effect of long-term treatment with an endothelin antagonist on survival, hemodynamics, and cardiac remodeling. *Circulation* 96, 1976–1982.
- Muraja-Murro, A., Kulkas, A., Hiltunen, M., Kupari, S., Hukkanen, T., Tiihonen, P., et al. (2014). Adjustment of apnea-hypopnea index with severity of obstruction events enhances detection of sleep apnea patients with the highest risk of severe health consequences. *Sleep Breath* 18, 641–647.
- Nakov, R., Pfarr, E., & Eberle, S. (2002). Darusentan: an effective endothelinA receptor antagonist for treatment of hypertension. *Am J Hypertens* 15, 583–589.
- Nallamshetty, S., Chan, S. Y., & Loscalzo, J. (2013). Hypoxia: a master regulator of microRNA biogenesis and activity. *Free Radic Biol Med* 64, 20–30.
- Nasser, S. A., & El-Mas, M. M. (2014). Endothelin ETA receptor antagonism in cardiovascular disease. *Eur J Pharmacol* 737, 210–213.
- Ohkita, M., Tawa, M., Kitada, K., & Matsumura, Y. (2012). Pathophysiological roles of endothelin receptors in cardiovascular diseases. *J Pharmacol Sci* 119, 302–313.
- Park, A. M., & Suzuki, Y. J. (2007). Effects of intermittent hypoxia on oxidative stress-induced myocardial damage in mice. *J Appl Physiol* (1985) 102, 1806–1814.
- Pawar, A., Nanduri, J., Yuan, G., Khan, S. A., Wang, N., Kumar, G. K., et al. (2009). Reactive oxygen species-dependent endothelin signaling is required for augmented hypoxic sensory response of the neonatal carotid body by intermittent hypoxia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296, R735–R742.
- Peng, Y. J., Nanduri, J., Zhang, X., Wang, N., Raghuraman, G., Seagard, J., et al. (2012). Endothelin-1 mediates attenuated carotid baroreceptor activity by intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* (1985) 112, 187–196.
- Pepin, J. L., Borel, A. L., Tamisier, R., Bague, J. P., Levy, P., & Dauvilliers, Y. (2014). Hypertension and sleep: overview of a tight relationship. *Sleep Med Rev*.

- Pepin, J. L., Tamisier, R., Barone-Rochette, G., Launois, S. H., Levy, P., & Baguet, J. P. (2010). Comparison of continuous positive airway pressure and valsartan in hypertensive patients with sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 182, 954–960.
- Pepin, J. L., Tamisier, R., & Levy, P. (2012). Obstructive sleep apnoea and metabolic syndrome: put CPAP efficacy in a more realistic perspective. *Thorax* 67, 1025–1027.
- Peppard, P. E., Young, T., Barnet, J. H., Palta, M., Hagen, E. W., & Hla, K. M. (2013). Increased prevalence of sleep-disordered breathing in adults. *Am J Epidemiol* 177, 1006–1014.
- Phillips, B. G., Narkiewicz, K., Pesek, C. A., Haynes, W. G., Dyken, M. E., & Somers, V. K. (1999). Effects of obstructive sleep apnea on endothelin-1 and blood pressure. *J Hypertens* 17, 61–66.
- Phillips, S. A., Olson, E. B., Morgan, B. J., & Lombard, J. H. (2004). Chronic intermittent hypoxia impairs endothelium-dependent dilation in rat cerebral and skeletal muscle resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286, H388–H393.
- Pilkaukaite, G., Miliauskas, S., & Sakalauskas, R. (2013). Reactive oxygen species production in peripheral blood neutrophils of obstructive sleep apnea patients. *ScientificWorldJournal* 2013, 421763.
- Pisarcik, B., Maylor, J., Lu, W., Yun, X., Underem, C., Sylvester, J. T., et al. (2013). Activation of hypoxia-inducible factor-1 in pulmonary arterial smooth muscle cells by endothelin-1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 304, L549–L561.
- Pittaluga, M., Sgadari, A., Dimauro, I., Tavazzi, B., Parisi, P., & Caporossi, D. (2015). Physical exercise and redox balance in type 2 diabetics: effects of moderate training on biomarkers of oxidative stress and DNA damage evaluated through comet assay. *Oxid Med Cell Longev* 2015, 981242.
- Polotsky, V. Y., Savransky, V., Bevans-Fonti, S., Reinke, C., Li, J., Grigoryev, D. N., et al. (2010). Intermittent and sustained hypoxia induce a similar gene expression profile in human aortic endothelial cells. *Physiol Genomics* 41, 306–314.
- Prabhakar, N. R., & Semenza, G. L. (2012). Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiol Rev* 92, 967–1003.
- Quintero, M., Gonzalez-Martin Mdel, C., Vega-Agapito, V., Gonzalez, C., Obeso, A., Farre, R., et al. (2013). The effects of intermittent hypoxia on redox status, NF-kappaB activation, and plasma lipid levels are dependent on the lowest oxygen saturation. *Free Radic Biol Med* 65, 1143–1154.
- Rafnsson, A., Bohm, F., Settergren, M., Gonon, A., Brismar, K., & Pernow, J. (2012). The endothelin receptor antagonist bosentan improves peripheral endothelial function in patients with type 2 diabetes mellitus and microalbuminuria: a randomised trial. *Diabetologia* 55, 600–607.
- Ramond, A., Godin-Ribuot, D., Ribuot, C., Totoston, P., Korichneva, I., Cachot, S., et al. (2013). Oxidative stress mediates cardiac infarction aggravation induced by intermittent hypoxia. *Fundam Clin Pharmacol* 27, 252–261.
- Rapisarda, A., Uranchimeg, B., Sordet, O., Pommier, Y., Shoemaker, R. H., & Melillo, G. (2004). Topoisomerase I-mediated inhibition of hypoxia-inducible factor 1: mechanism and therapeutic implications. *Cancer Res* 64, 1475–1482.
- Reriani, M., Raichlin, E., Prasad, A., Mathew, V., Pummer, G. M., Nelson, R. E., et al. (2010). Long-term administration of endothelin receptor antagonist improves coronary endothelial function in patients with early atherosclerosis. *Circulation* 122, 958–966.
- Rey, S., Corthorn, J., Chacon, C., & Iturriga, R. (2007). Expression and immunolocalization of endothelin peptides and its receptors, ETA and ETB, in the carotid body exposed to chronic intermittent hypoxia. *J Histochem Cytochem* 55, 167–174.
- Ryan, S., Taylor, C. T., & McNicholas, W. T. (2005). Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation* 112, 2660–2667.
- Saarelainen, S., Seppala, E., Laasonen, K., & Hasan, J. (1997). Circulating endothelin-1 in obstructive sleep apnea. *Endothelium* 5, 115–118.
- Sakai, S., Miyauchi, T., Kobayashi, M., Yamaguchi, I., Goto, K., & Sugishita, Y. (1996a). Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature* 384, 353–355.
- Sakai, S., Miyauchi, T., Sakurai, T., Kasuya, Y., Ihara, M., Yamaguchi, I., et al. (1996b). Endogenous endothelin-1 participates in the maintenance of cardiac function in rats with congestive heart failure. Marked increase in endothelin-1 production in the failing heart. *Circulation* 93, 1214–1222.
- Savransky, V., Jun, J., Li, J., Nanayakkara, A., Fonti, S., Moser, A. B., et al. (2008). Dyslipidemia and atherosclerosis induced by chronic intermittent hypoxia are attenuated by deficiency of steroloyl coenzyme A desaturase. *Circ Res* 103, 1173–1180.
- Schramm, A., Matusik, P., Osmenda, G., & Guzik, T. J. (2012). Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology. *Vascul Pharmacol* 56, 216–231.
- Schulz, R., Murzabekova, G., Egemnazarov, B., Kraut, S., Eisele, H. J., Dumitrascu, R., et al. (2014). Arterial hypertension in a murine model of sleep apnea: role of NADPH oxidase 2. *J Hypertens* 32, 300–305.
- Semenza, G. L. (2009). Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology (Bethesda)* 24, 97–106.
- Siti, H. N., Kamisah, Y., & Kamsiah, J. (2015). The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascul Pharmacol* 71, 40–56.
- Sivam, S., Witting, P. K., Hoyos, C. M., Maw, A. M., Yee, B. J., Grunstein, R. R., et al. (2015). Effects of 8 weeks of CPAP on lipid-based oxidative markers in obstructive sleep apnea: a randomized trial. *J Sleep Res* 24, 339–345.
- Snow, J. B., Gonzalez Bosc, L. V., Kanagy, N. L., Walker, B. R., & Resta, T. C. (2011). Role for PKCbeta in enhanced endothelin-1-induced pulmonary vasoconstrictor reactivity following intermittent hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 301, L745–L754.
- Stanke-Labesque, F., Pepin, J. L., Gautier-Veyret, E., Levy, P., & Back, M. (2014). Leukotrienes as a molecular link between obstructive sleep apnoea and atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 101, 187–193.
- Sutsch, G., Kiowski, W., Yan, X. W., Hunziker, P., Christen, S., Strobel, W., et al. (1998). Short-term oral endothelin-receptor antagonist therapy in conventionally treated patients with symptomatic severe chronic heart failure. *Circulation* 98, 2262–2268.
- Taguchi, A., Yanagisawa, K., Tanaka, M., Cao, K., Matsuyama, Y., Goto, H., et al. (2008). Identification of hypoxia-inducible factor-1 alpha as a novel target for miR-17-92 microRNA cluster. *Cancer Res* 68, 5540–5545.
- Tamisier, R., Pepin, J. L., Remy, J., Baguet, J. P., Taylor, J. A., Weiss, J. W., et al. (2011). 14 nights of intermittent hypoxia elevate daytime blood pressure and sympathetic activity in healthy humans. *Eur Respir J* 37, 119–128.
- Tan, D. X., Manchester, L. C., Esteban-Zubero, E., Zhou, Z., & Reiter, R. J. (2015). Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: synthesis and metabolism. *Molecules* 20, 18886–18906.
- Taylor, C. T., Kent, B. D., Crinion, S. J., McNicholas, W. T., & Ryan, S. (2014). Human adipocytes are highly sensitive to intermittent hypoxia induced NF-kappaB activity and subsequent inflammatory gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 447, 660–665.
- Thunstrom, E., Manhem, K., Rosengren, A., & Peker, Y. (2016). Blood pressure response to losartan and continuous positive airway pressure in hypertension and obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 193, 310–320.
- Torres, G., Sanchez-de-la-Torre, M., & Barbe, F. (2015). Relationship between OSA and hypertension. *Chest* 148, 824–832.
- Totoson, P., Fhayli, W., Faury, G., Korichneva, I., Cachot, S., Balazza, M., et al. (2013). Atorvastatin protects against deleterious cardiovascular consequences induced by chronic intermittent hypoxia. *Exp Biol Med (Maywood)* 238, 223–232.
- Troncoso Brindeiro, C. M., da Silva, A. Q., Allahdadi, K. J., Youngblood, V., & Kanagy, N. L. (2007). Reactive oxygen species contribute to sleep apnea-induced hypertension in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293, H2971–H2976.
- Trzepizur, W., Martinez, M. C., Priou, P., Andriantsitohaina, R., & Gagnadoux, F. (2014). Microparticles and vascular dysfunction in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 44, 207–216.
- Verges, S., Chacaroun, S., Godin-Ribuot, D., & Baillieux, S. (2015). Hypoxic conditioning as a new therapeutic modality. *Front Pediatr* 3, 58.
- Vriend, J., & Reiter, R. J. (2016). Melatonin and the von Hippel-Lindau/HIF-1 oxygen sensing mechanism: a review. *Biochim Biophys Acta* 1865, 176–183.
- Wang, Z. F., Kang, J., & Dai, B. (2009). Expression and activation of hypoxia inducible factor-1alpha and iNOS in the brain of rats with chronic intermittent hypoxia. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 32, 739–743.
- Wang, Z., Li, A. Y., Guo, Q. H., Zhang, J. P., An, Q., Guo, Y. J., et al. (2013). Effects of cyclic intermittent hypoxia on ET-1 responsiveness and endothelial dysfunction of pulmonary arteries in rats. *PLoS One* 8, e58078.
- Wang, H., Parker, J. D., Newton, G. E., Floras, J. S., Mak, S., Chiu, K. L., et al. (2007). Influence of obstructive sleep apnea on mortality in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 49, 1625–1631.
- Williams, A. L., Chen, L., & Scharf, S. M. (2010). Effects of allopurinol on cardiac function and oxidant stress in chronic intermittent hypoxia. *Sleep Breath* 14, 51–57.
- Wu, H., Zhou, S., Kong, L., Chen, J., Feng, W., Cai, J., et al. (2015). Metallothionein deletion exacerbates intermittent hypoxia-induced renal injury in mice. *Toxicol Lett* 232, 340–348.
- Xia, Y., Choi, H. K., & Lee, K. (2012). Recent advances in hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitors. *Eur J Med Chem* 49, 24–40.
- Xia, Y., Jin, Y., Kaur, N., Choi, Y., & Lee, K. (2011). HIF-1alpha inhibitors: synthesis and biological evaluation of novel moracin O and P analogues. *Eur J Med Chem* 46, 2386–2396.
- Yang, R., Sikka, G., Larson, J., Watts, V. L., Niu, X., Ellis, C. L., et al. (2011). Restoring leptin signaling reduces hyperlipidemia and improves vascular stiffness induced by chronic intermittent hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300, H1467–H1476.
- Yeung, H. M., Hung, M. W., Lau, C. F., & Fung, M. L. (2015). Cardioprotective effects of melatonin against myocardial injuries induced by chronic intermittent hypoxia in rats. *J Pineal Res* 58, 12–25.
- Yorikane, R., Sakai, S., Miyauchi, T., Sakurai, T., Sugishita, Y., & Goto, K. (1993). Increased production of endothelin-1 in the hypertrophied rat heart due to pressure overload. *FEBS Lett* 332, 31–34.
- Young, T., Peppard, P. E., & Gottlieb, D. J. (2002). Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *Am J Respir Crit Care Med* 165, 1217–1239.
- Young, T., Peppard, P., Palta, M., Hla, K. M., Finn, L., Morgan, B., et al. (1997). Population-based study of sleep-disordered breathing as a risk factor for hypertension. *Arch Intern Med* 157, 1746–1752.
- Yuan, G., Nanduri, J., Khan, S., Semenza, G. L., & Prabhakar, N. R. (2008). Induction of HIF-1alpha expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca²⁺ signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR. *J Cell Physiol* 217, 674–685.
- Zamarron, C., Riveiro, A., & Gude, F. (2011). Circulating levels of vascular endothelial markers in obstructive sleep apnoea syndrome. Effects of nasal continuous positive airway pressure. *Arch Med Sci* 7, 1023–1028.
- Zirlik, S., Hildner, K. M., Targosz, A., Neurath, M. F., Fuchs, F. S., Brzozowski, T., et al. (2013). Melatonin and omentin: influence factors in the obstructive sleep apnoea syndrome? *J Physiol Pharmacol* 64, 353–360.
- Zolk, O., Quattek, J., Sitzler, G., Schrader, T., Nickenig, G., Schnabel, P., et al. (1999). Expression of endothelin-1, endothelin-converting enzyme, and endothelin receptors in chronic heart failure. *Circulation* 99, 2118–2123.