



HAL
open science

Hypoxie intermittente et homéostasie glucidique : étude des mécanismes d'action cellulaire

Amandine Thomas

► **To cite this version:**

Amandine Thomas. Hypoxie intermittente et homéostasie glucidique : étude des mécanismes d'action cellulaire. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAV044 . tel-01691086

HAL Id: tel-01691086

<https://theses.hal.science/tel-01691086>

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 L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Physiologie Physiopathologie Pharmacologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Amandine THOMAS

Thèse dirigée par le **Pr. Patrick LEVY** et
codirigée par le **Dr. Bruno GUIGAS**

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

Hypoxie intermittente et homéostasie glucidique: Etude des mécanismes d'action cellulaire

Thèse soutenue publiquement le **4 décembre 2015**,
devant le jury composé de :

Mr Patrick LEVY

PU-PH, Grenoble, Directeur

Mr Bruno GUIGAS

Assistant professor, Leiden, Pays-Bas, Co-directeur

Mr Christophe MOINARD

PU, Grenoble, Président du jury

Mr Benoît VIOLLET

DR Inserm, Grenoble, Rapporteur

Mme Sophie GIORGETTI-PERALDI

CR Inserm, Nice, Rapporteur,

Mme Jennifer RIEUSSET

DR Inserm, Lyon, Examineur



RESUME

L'hypoxie intermittente (HI), induite par les apnées du sommeil, conduit à des altérations de la sensibilité à l'insuline et de l'homéostasie glucidique mais les mécanismes impliqués restent mal connus. **L'objectif de ce travail était d'étudier les effets et les mécanismes sous-jacents d'une exposition chronique à l'HI sur l'homéostasie glucidique.** L'HI induit une résistance à l'insuline à la fois systémique et tissulaire, ainsi qu'une amélioration de la tolérance au glucose associée à une activation de l'AMPK musculaire. L'HI cause également des altérations du foie et du tissu adipeux associées à un changement du pattern d'expression des gènes dans ces tissus et à un risque accru de développement de pathologies vasculaires comme l'athérosclérose. Enfin, la délétion de PHD1, une des protéines régulatrices de HIF-1, entraîne une résistance à l'insuline associée une stéatose hépatique, faisant de HIF-1 une cible potentielle impliquée dans les altérations métaboliques induites par l'HI.

Mots clés : *Syndrome d'apnées obstructives du sommeil, hypoxie intermittente, résistance à l'insuline, tolérance au glucose, AMPK, HIF-1.*

ABSTRACT

Intermittent hypoxia (IH) induced by sleep apnea leads to insulin resistance and impairment in glucose homeostasis but the underlying mechanisms remain poorly understood. **The aim of this work was to study the molecular mechanism(s) by which chronic exposure to IH affect glucose homeostasis in mice.** In our study, we showed that IH impairs both systemic and tissue-specific insulin sensitivity, but improves glucose tolerance by selectively promoting AMPK activation in skeletal muscle. IH also caused changes in the pattern of gene expression in the liver and adipose tissue, notably in gene subsets that are associated with increased risk for vascular diseases such as atherosclerosis. Finally, we reported that whole-body deletion of PHD1, a regulatory protein of HIF-1, leads to insulin resistance associated with hepatic steatosis in mice, suggesting that HIF-1 might be a possible player involved in the metabolic changes induced by IH.

Key words: *Obstructive sleep apnea syndrome, intermittent hypoxia, insulin resistance, glucose tolerance, AMPK, HIF-1.*

TABLE DES MATIERES

Remerciements	4
Listes des tableaux et figures	6
Abréviations	7
INTRODUCTION	9
I-LE SYNDROME D'APNEES OBSTRUCTIVES DU SOMMEIL	10
I-1 Le SAOS	10
I-2 Les pathologies associées au SAOS	11
I-2-1- Le SAOS et pathologies cardiovasculaires	11
I-2-2 Le SAOS et syndrome métabolique	11
I-2-3 Le SAOS et intolérance au glucose	12
I-4 Les traitements	13
I-4-1 L'exercice physique	13
I-4-2 La perte de poids	13
I-4-3 L'orthèse mandibulaire	14
I-4-4 La pression positive continue	14
II-METABOLISME DU GLUCOSE	15
II-1 Régulation périphérique du métabolisme du glucose	15
II-1-1 La signalisation insulinique	17
II-1-2 La voie de l'AMPK	24
III-HYPOXIE ET METABOLISME DU GLUCOSE	38
III-1 Hypoxie, HIF-1, contrôle du métabolisme du glucose	38
III-2 Hypoxie intermittente et homéostasie glucidique	42
III-2-1 Exposition aigue	42
III-2-2 Exposition chronique	43
III-2-3 Mécanismes sous-jacents	48
OBJECTIFS	54
MATERIEL ET METHODES	56
I-ANIMAUX ET DESIGN EXPERIMENTAUX	57
I-1 Chapitre 1	57
I-2 Chapitre 2	57
I-3 Chapitre 3	58

I-4 Chapitre 4	58
II-MODELE D'HYPOXIE INTERMITTENTE (HI)	60
III-TECHNIQUE D'EXPERIMENTATION ANIMALE	61
III-1 Analyses sanguine et plasmatiques	61
III-1-1 Mesure de la glycémie	61
III-1-2 Mesures plasmatiques d'insuline, de cholestérol et de triglycérides	61
III-2 Test de tolérance au glucose, à l'insuline et au pyruvate	62
IV-TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE DOSAGES BIOCHIMIQUES SUR TISSUS	
CONGELES	62
IV-1 Composition lipidique du foie	62
IV-2 Détermination du contenu en glycogène du foie	62
IV-3 Western Blot	63
IV-4 PCR quantitative	63
V-ANALYSES STATISTIQUES	64
RESULTATS	65
CHAPITRE 1 : ETUDE DE L'ALTERATION DE LA SENSIBILITE A L'INSULINE ET DU METABOLISME GLUCIDIQUE INDUITE PAR L'HYPOXIE INTERMITTENTE	66
CHAPITRE 2 : ETUDE DES ATTEINTES TISSULAIRES DU FOIE ET DU TISSU ADIPEUX INDUITE PAR L'HYPOXIE INTERMITTENTE	93
CHAPITRE 3 : ROLE DU TISSU ADIPEUX VISCERAL DANS LES CONSEQUENCES VASCULAIRES DE L'HYPOXIE INTERMITTENTE	121
CHAPITRE 4: IMPLICATION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR 1 (HIF-1) DANS LES ALTERATIONS DU METABOLISME DU GLUCOSE	133
DISCUSSION	160
LISTE DES PUBLICATIONS	175
BIBLIOGRAPHIE	177

Remerciements

Je tiens à remercier les Dr **Benoît VIOLLET** et Dr **Sophie GIOGETTI-PERALDI** d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse et pour les conseils qu'ils m'ont prodigués.

Merci aux Dr **Jennifer RIEUSSET** et Pr **Christophe MOINARD** pour l'intérêt qu'ils ont porté à mes travaux en acceptant d'examiner ma thèse.

Merci à mes co-directeurs de thèse. Tout d'abord au Pr Patrick LEVY qui m'a fait confiance depuis le début et qui a suffisamment cru en moi pour m'accompagner dans cette thèse. Un merci particulier à **Bruno GUIGAS** qui a littéralement « sauvé » ma thèse. Merci de m'avoir aussi bien épaulé et de m'avoir supporté aussi. J'aurais appris beaucoup pendant cette thèse grâce à lui.

Je tiens à remercier les Pr **Diane GODIN-RIBUOT** et Pr **Jean-Louis PEPIN** d'avoir participé à mes travaux et de m'avoir accompagné dans mes dernières aventures au laboratoire et les futures à l'autre bout du monde.

Merci à **Patrice** qui m'a fait confiance pour apprendre à mes côtés et à qui j'ai pu transmettre ce que j'ai appris au cours de ces dernières années.

Un grand merci à **Claire**, qui a été là dès le début de mon master et jusqu'au bout de cette thèse et qui a vécu avec moi les moments sympas et ceux un peu moins sympas...

Elise ton arrivée au labo a été pour moi un renouveau. J'ai trouvé en toi un modèle et un miroir. Merci d'avoir cru en moi, merci pour tous nos emballements scientifiques où nous seules pouvions nous comprendre. Merci aussi pour tout ce qu'on a partagé à l'extérieur du labo, tu as été le témoin des moments les plus importants de ma vie. On se sépare aujourd'hui, mais c'est pour mieux se retrouver.

Mes super copines, **Marielle**, **Jessica** et la petite dernière **Sophie**, sans oublier **Guillaume**, sans vous la vie au labo n'aurait pas été la même... Merci d'avoir été là pour faire la fête, dans les moments difficiles ou les moments de bonheur.

Je remercie aussi tous les membres du laboratoire HP2 avec qui j'ai passé des moments fabuleux et qui ont participé de près ou de loin à mes travaux : **Emeline**, **Sandrine**, **Brigitte**... et **Audrey** bien-sûr, pour mes petits bons de commande de dernière minute !

Merci à mes **parents chéris**, je vous aime et si j'en suis arrivée là, c'est aussi beaucoup grâce à vous et à votre soutien sans faille.

Et bien-sûr, merci à **Ugo**, tu as toujours compris mon investissement dans le travail et tu m'as toujours soutenu, même si tu devais adapter ton emploi du temps ou tes envies.

Vous avez vécu, tous les trois, aussi intensément cette thèse que moi, les visites nocturnes ou matinales au labo avec moi, les charges de travail et les moments de stress énorme... et c'est à travers vos yeux que je n'ai pas douté une seconde de ma capacité à aller au bout de ce travail.

Merci à **Garbo, Indi** et **Ivy** mes compagnons de tous les jours.

Merci aussi à tous ceux qui ont répondu présent et m'ont soutenu le jour J : **Mémé, Morgane, Tati, Jo, Camille...**

J'ai une pensée pour mes grands-pères, Adrien et René. Pépé Toto, c'était écrit... Et une pensée à Lamia qui nous a quittés un peu trop tôt pour partager ce moment avec nous...

Listes des tableaux et figures

Figure 1 Exemple d'un tracé de polysomnographie d'un patient présentant un SAOS	10
Figure 2 : Schéma illustratif des voies aériennes supérieures lors d'une apnée obstructive (A) et après traitement à la PPC (B).	14
Figure 3 : Effets de l'insuline sur les principaux tissus cibles de l'insuline	17
Figure 4 : Cascade de signalisation de l'insuline.	20
Figure 5: Structure de l'AMPK.	26
Figure 6: Régulation de l'activation de l'AMPK.	27
Figure 7: Rôle de l'AMPK dans les processus métaboliques.	28
Figure 8: Effets de l'activation de l'AMPK sur les voies métaboliques.	32
Figure 9 : Régulation centrale de la prise alimentaire.	33
Figure 10 : Signalisation de la leptine.	37
Figure 11 : Régulation de HIF-1 α par les prolylhydroxylases.	40
Figure 12: Effet de l'HI sur la régulation centrale de la prise alimentaire.	48
Figure 13: Mécanismes liant l'hypoxie intermittente induite par le syndrome d'apnées obstructives du sommeil et le développement des altérations métaboliques.	48
Figure 14: Dispositif d'hypoxie intermittente chez le rongeur.	61
Figure 15: Schéma récapitulatif de l'article "Chronic intermittent hypoxia impairs insulin sensitivity but improves whole-body glucose tolerance by activating skeletal muscle AMP-activated protein kinase in mice"	92
Figure 16: Schéma récapitulatif de l'article "Specific transcriptomic signature in response to intermittent hypoxia exposure in liver and fat tissue"	120
Figure 17: Schéma récapitulatif de l'article	132
Figure 18: Schéma récapitulatif de l'article "Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 1 (PHD1) deficiency promotes hepatic steatosis and liver-specific insulin resistance in mice"	159
Figure 19: Stress du RE dans le tissu adipeux et le foie.	166
Figure 20: Expression des sous-unités de l'AMPK.	170
Figure 21: Expression des gènes de la glycolyse.	171

Abréviations

ACC: acétyl-coa carboxylase

AGL: acides gras libres

AgRP: agouti-related peptide

AMPK: adenosine monophosphate activated protein kinase

Angptl4: angiopoïetine like 4

ARNT: Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator,

AS 160: Akt substrate 160 kDa protein

CaMKK: Ca²⁺/Calmoduline dependant protein kinase kinase

CART: transcrit régulé par la cocaïne et les amphétamines

CREBP: cAMP response element-binding protein

CRTC2: CREB-regulated transcription coactivator 2

CPT-1: carnitine palmitoyl transférase-1

eIF-4E: eucaryotic translation initiation factor 4E

FAS: fatty acid synthase

FBP: fructose-1,6-bisphosphatase

FIH: facteur inhibant HIF-1 ou asparagine hydroxylase

Foxo1: forkhead/winged helix transcription factor O class 1

G6P: glucose-6-phosphatase

GK: glucokinase

GS: glycogène synthase

GSK-3: glycogen synthase kinase-3

HFD: high fat diet

HI: hypoxie intermittente

HIF-1: hypoxia-inducible factor 1

HK: Hexokinase

HMGCR: HMG-CoA reductase

HOMA: homeostasis model assessment

HSL: hormone sensitive lipase

IAH: index d'apnées-hypopnées

ICV: intracérébroventriculaire

IL-6: interleukine 6

IMC: indice masse corporelle
IRS: insulin receptor substrate
LFD: low fat diet
LKB1: Liver kinase B1
LPL: lipoprotéine lipase
MAP kinase: mitogen-activated protein kinase
MCD: malonyl CoA decarboxylase
mTORC2: mammalian target of rapamycin complex 2
MSH: hormones mélanotropes alpha et beta
NPY: neuropeptide Y
NTS: noyau du tractus solitaire
PKA: phosphoinositide dependent kinase-1
PEPCK: phosphoénolpyruvate carboxykinase
PHD: prolines hydroxylases
PI3K: phosphoinositide 3-kinase
PIP3: phosphatidylinositol-3-phosphate
PK: pyruvate kinase
PKB: protein kinase B
POMC: pro-opiomélanocortine
PPC: pression positive continue
PTP1B : protein-tyrosine phosphatase 1B
pO₂ : pression en oxygène
ROS: reactive oxygen species
SAOS: syndrome d'apnées du sommeil
SREBP-1c: sterol regulatory element binding protein
TLR-4: toll-like receptor 4
STAT: Signal transducer and activator of transcription
VAS: voies aériennes supérieures
VHL: von Hippel-Lindau

INTRODUCTION

I-LE SYNDROME D'APNEES OBSTRUCTIVES DU SOMMEIL

I-1 Le SAOS

Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) est caractérisé par une obstruction partielle ou totale des voies aériennes supérieures (VAS), entraînant des hypopnées ou des apnées durant le sommeil. Les apnées sont définies par un arrêt total du débit aérien pendant au moins 10 secondes et les hypopnées correspondent à une diminution d'au moins 50% du flux aérien (1). L'indice d'apnées-hypopnées (IAH) définit le nombre d'apnées et d'hypopnées par heure de sommeil et est utilisé pour quantifier la sévérité du SAOS qui est considéré comme léger à modéré lorsque l'IAH est entre 5 et 30, et sévère lorsque l'IAH est supérieur à 30 (1). Ces événements obstructifs récurrents induisent une hypoxie intermittente (HI), une fragmentation du sommeil et des efforts respiratoires (1). Ces différents stimuli contribuent aux nombreuses conséquences du SAOS, incluant des complications cardiovasculaires (hypertension artérielle, athérosclérose, infarctus du myocarde, arythmies cardiaques...) (2-4) et métaboliques (5). Il apparaît cependant que la composante hypoxique est la plus délétère (6).

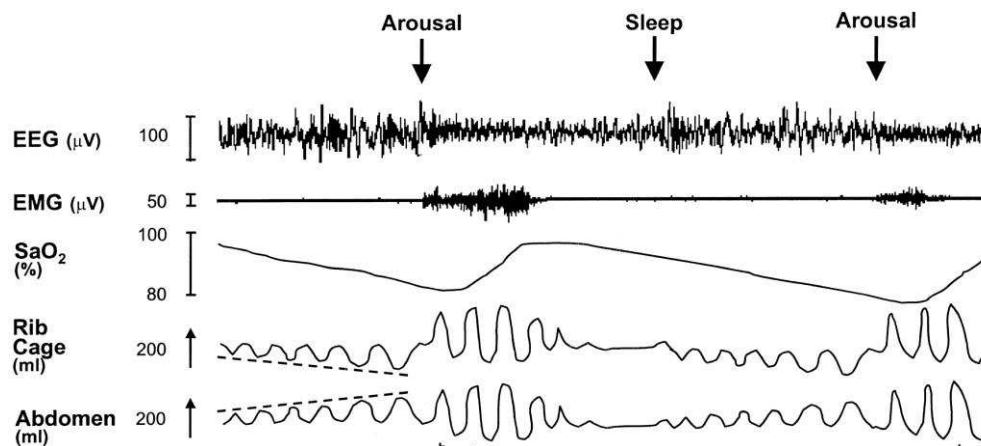


Figure 1 Exemple d'un tracé de polysomnographie d'un patient présentant un SAOS

EEG : électroencéphalogramme ; EMG : électromyogramme ; SaO₂ : saturation en oxygène. D'après Thompson et al, 2001(7).

A l'heure d'aujourd'hui on estime que cette maladie affecte 3 à 9% des femmes et 10 à 17% des hommes (8). La prévalence du SAOS augmente avec l'âge (9), à cause de modifications structurelles des voies aériennes liées au vieillissement (10). L'augmentation de la prévalence du SAOS est aussi très liée à l'épidémie croissante d'obésité. En effet, 50 à 60%

des personnes obèses souffrent aussi d'apnées du sommeil (11; 12). Malgré une telle association, les apnées restent peu diagnostiquées chez les patients avec des dysfonctions métaboliques (13), alors que ces facteurs pourraient avoir des effets synergiques sur les complications cardiovasculaires et la mortalité associée.

I-2 Les pathologies associées au SAOS

I-2-1- Le SAOS et pathologies cardiovasculaires

Le SAOS est considéré comme un facteur de risque indépendant pour les maladies cardiovasculaires (14). Plusieurs études dont celle de Marin en 2005, ont montré que les évènements cardiovasculaires fatals ou non, sont augmentés chez les patients apnéiques et cela d'autant plus que l'IAH est élevé (15). De plus, en l'absence de traitement, les formes sévères du SAOS ont un risque de mortalité cardiovasculaire multiplié par 5,2 (16).

Parmi les pathologies cardiovasculaires associées au SAOS, l'athérosclérose a retenu notre attention de part son lien étroit avec les pathologies métaboliques. Le SAOS induit des modifications précoces associées au développement de l'athérosclérose comme une augmentation de l'épaisseur intima-média ou une dysfonction endothéliale. En effet, une étude a mis en évidence des élévations de l'épaisseur intima-média corrélés au temps passé à une désaturation en oxygène inférieure à 90% (17) ou à l'IAH (18). De plus, il existe une altération de la fonction endothéliale chez le patient apnéique (19; 20; 21). Le SAOS active les mécanismes connus pour induire une dysfonction endothéliale tels que le stress oxydant (22), l'inflammation (23) ou l'augmentation de substances vasoconstrictrices (24). Enfin, des études ont observé une augmentation des plaques athéromateuses chez les patients apnéiques (25; 26).

I-2-2 Le SAOS et syndrome métabolique

Le syndrome métabolique est un regroupement de différentes anomalies métaboliques incluant l'obésité, la résistance à l'insuline, la dyslipidémie et l'hypertension (27). La prévalence du syndrome métabolique est plus importante chez les patients souffrant de

SAOS (28). Concernant l'obésité, celle-ci est reconnue comme l'un des plus importants facteurs de risque pour les apnées avec des prévalences qui augmentent de façon parallèle (11; 12). Une augmentation de 10% du poids corporel est associée à une augmentation de 32% de l'IAH et du risque de développer un SAOS modéré à sévère d'un facteur 6 (29). Le SAOS touche 41% des personnes ayant un indice de masse corporelle (IMC) supérieur à 28, la prévalence atteignant même 78% pour des personnes obèses dirigées vers une chirurgie bariatrique (30; 31). L'obésité peut altérer la mécanique normale des voies aériennes supérieures et contribuer à la physiopathologie du SAOS. En effet, des dépôts graisseux autour du pharynx peuvent réduire le calibre et modifier la forme des VAS promouvant le collapsus (32). L'obésité est associée à une réduction du volume des poumons, contribuant à diminuer la taille des VAS et à augmenter la résistance aérienne (33). De plus, l'obésité est caractérisée par une résistance centrale à la leptine, qui est une hormone produite par les adipocytes, dont le taux est proportionnel à la masse grasse et qui réduit l'appétit (34). En plus de son effet sur l'appétit, elle agit sur les centres respiratoires centraux pour stimuler la ventilation (35). La résistance à la leptine chez l'obèse empêche la leptine de stimuler la ventilation en réponse à une apnée (36) et favorise donc la sévérité de celle-ci. Un certain nombre d'études ont démontré un niveau de leptine élevé chez les patients apnéiques ainsi qu'une diminution de ce taux après le traitement des apnées (37; 38). Ceci suggère une influence du SAOS sur le métabolisme de la leptine et cela indépendamment du poids (39). De plus, il semble qu'il n'existe pas uniquement un lien de cause à effet de l'obésité sur les apnées. Le SAOS pourrait lui aussi être un facteur favorisant le développement de l'obésité (40). En effet, même s'il est connu qu'une prise de poids favorise les événements apnéiques (41), on sait aussi que la diminution de l'activité physique induite par une somnolence diurne excessive entraîne une prise de poids (42).

1-2-3 Le SAOS et intolérance au glucose

De nombreuses études ont mis en évidence le lien entre le diabète de type 2 et le SAOS. Une plus haute prévalence de diabète est retrouvée chez des patients apnéiques en comparaison à des patients non-apnéiques. En effet, on estime que 15 à 30 % des patients apnéiques souffrent de diabète de type 2 (43-45) et ce pourcentage est corrélé à la sévérité des apnées (46; 47). Une étude de suivi sur 2 à 4 ans a mis en évidence une incidence de diabète plus

importante chez les patients souffrant d'un SAOS (48; 49). La désaturation nocturne en oxygène induite par les apnées serait responsable de cet effet, puisque le risque de développer un diabète de type 2 augmente de façon proportionnelle avec la sévérité de cette hypoxie (45; 48; 50; 51). La présence d'apnée est associée à un contrôle de la glycémie moins efficace chez des patients diabétiques (52; 53) et d'autant moins efficace que la sévérité des apnées augmente (46). Enfin, il apparaît que le SAOS induise aussi un moindre contrôle de la régulation de la glycémie indépendamment de la pathologie diabétique (54).

I-4 Les traitements

I-4-1 L'exercice physique

L'exercice physique a été associé à une diminution de l'incidence des troubles respiratoires du sommeil qui est largement induite par un changement des habitudes (55). Au contraire, la diminution du niveau d'exercice a été associée à une augmentation de l'IAH. Ensemble, ces résultats suggèrent que l'exercice physique peut jouer un rôle important dans la prise en charge des apnées en modulant leur sévérité et leur incidence (55). Plus intéressant encore, l'entraînement diminue significativement l'IAH de façon indépendante d'un changement d'IMC (56; 57). Ceci évoque que les effets de l'exercice sur l'IAH ne sont pas uniquement induits par la perte de poids mais peuvent avoir un effet synergique avec celle-ci (58).

I-4-2 La perte de poids

Plusieurs études ont exploré la perte de poids comme option thérapeutique et incluent des méthodes comportementales (régime et exercice physique), pharmacologiques et de chirurgie bariatrique (59). La perte de poids semble être un facteur majeur dans le traitement des apnées, avec une diminution de poids corporel associée à une diminution de l'IAH (60). Les patients avec un SAOS sévère bénéficient plus de la perte de poids que ceux ayant un SAOS modéré (61). Le sibutramine, une molécule anorexigène, a été évalué dans plusieurs études sur des patients apnéiques, mais la prise de cette molécule était associée à de nombreux risques cardiovasculaires et les études ont donc été suspendues (59).

Les effets de la chirurgie bariatrique ont l'air plus prometteur. Ainsi, la diminution moyenne de l'IMC après chirurgie était associée à une amélioration marquée des symptômes du SAOS avec une moindre incidence du diabète de type 2 ou de l'hypertriglycéridémie (62). Le cerclage gastrique chez des patients sévèrement obèses avec un SAOS modéré à sévère a induit une perte de poids significative ainsi qu'une diminution de l'IAH (63). Le changement des règles d'hygiène de vie semble prometteur dans la prise en charge des patients apnéiques. Cependant, les changements définitifs d'hygiène de vie sont assez difficiles à obtenir. De plus, il existe des patients apnéiques qui ne sont pas obèses et pour lesquels une diminution du poids n'est pas suffisante.

1-4-3 L'orthèse mandibulaire

Selon la cause des apnées, en particulier, dans le cas d'apnées induites par une descente du menton vers le cou lors du sommeil. Cette orthèse permet de maintenir la mâchoire inférieure en position avancée pour libérer le passage de l'air dans les voies aériennes et ainsi éviter les apnées (64).

1-4-4 La pression positive continue

Le traitement de référence des apnées consiste à appliquer une ventilation par pression positive continue (PPC). Il s'agit d'une machine qui propulse de l'air ambiant dans les voies respiratoires de façon continue par l'intermédiaire d'un masque facial. La pression de l'air empêche la fermeture des voies aériennes en écartant les parois pharyngées, et empêche ainsi l'obstruction des voies aériennes supérieures et donc les apnées ou hypopnées.

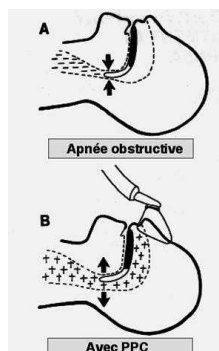


Figure 2 : Schéma illustratif des voies aériennes supérieures lors d'une apnée obstructive (A) et après traitement à la PPC (B).

Cependant, cela reste un traitement lourd et difficile à supporter pour les patients. De plus, des discordances dans la littérature persistent concernant ses effets bénéfiques sur les conséquences métaboliques des apnées. En effet, certaines études mettent en évidence que la PPC réduit le niveau de glucose et d'hémoglobine glyquée (65), améliore le contrôle glycémique (66) ou encore induit une amélioration de la sensibilité à l'insuline évaluée par un clamp euglycémique-hyperinsulinémique (67). D'autres études quant à elles n'ont montré aucun effets de la PPC. En effet, Smurra et al., ne mettent pas en évidence de changement de glycémie, d'insuline plasmatique, de peptide-C ou d'hémoglobine glyquée, ni ne montrent de différence de quantité de glucose infusée lors d'un clamp (68). De même, la PPC ne change pas les niveaux de glucose, de lipides ou de résistance à l'insuline de patients avec un syndrome métabolique (69). La raison de ces discordances peut être expliquée par la sévérité des apnées ainsi que le design des études cliniques.

C'est en raison de ces discordances qu'il apparaît indispensable de renforcer la compréhension de la physiopathologie du SAOS, et en particulier les conséquences métaboliques de cette pathologie, pour déterminer les mécanismes mis en jeu dans ses conséquences délétères et proposer des stratégies thérapeutiques alternatives ou complémentaires à celles déjà proposées.

II-METABOLISME DU GLUCOSE

II-1 Régulation périphérique du métabolisme du glucose

L'homéostasie glucidique est un état d'équilibre entre les apports (absorption intestinale ou production de glucose par le foie) et l'utilisation de glucose (entrée de glucose et utilisation dans les organes). Cette régulation met en jeu le système hormonal ainsi que l'intervention de plusieurs organes qui communiquent entre eux tels que le pancréas, le foie, le tissu adipeux et le muscle squelettique (70).

Plusieurs hormones interviennent dans la régulation de la glycémie dont les deux principales sont l'insuline et le glucagon. Pendant une phase de jeûne physiologique, la glycémie est

maintenue à des niveaux normaux par la production de glucose endogène majoritairement par le foie et de façon moindre par le rein, à partir de la glycogénolyse ainsi que de la gluconéogenèse sous l'action du glucagon (70). Lors d'une prise alimentaire, les nutriments sont absorbés par l'intestin et la glycémie s'élève. Cette augmentation du glucose dans le sang stimule la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques. L'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie vont permettre de stimuler l'entrée de glucose dans les tissus périphériques, en majorité dans le tissu musculaire, et d'inhiber la production de glucose endogène (70).

L'insuline est une protéine globulaire comportant 2 chaînes polypeptidiques reliées entre elles par 3 ponts disulfures. La première chaîne, α , comporte 21 acides aminés et la seconde, β , en comporte 30. Le gène de l'insuline code pour la pré-proinsuline, présentant un peptide signal de 24 acides aminés dans sa partie N-terminale et un peptide C au centre de la séquence. La séquence signal sera clivée lors de la translocation du peptide dans le réticulum endoplasmique, et les ponts disulfures seront mis en place, ce qui donnera alors la proinsuline. L'insuline mature résultera ensuite du clivage enzymatique du peptide C, ce qui formera les chaînes α et β (71).

L'insuline est une hormone hypoglycémisante. Pour cela elle agit sur ses tissus cibles principalement le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux. Elle induit une entrée de glucose dans le muscle et le tissu adipeux, favorise l'utilisation du glucose, permet la transformation du glucose en glycogène et inhibe la production de glucose dans le foie en limitant la dégradation du glycogène et la néoglucogenèse, elle inhibe la sécrétion de glucagon par le pancréas. De plus, elle entraîne la synthèse de lipides dans les cellules adipeuses et dans le foie et la synthèse de protéine dans le foie et le muscle (72).

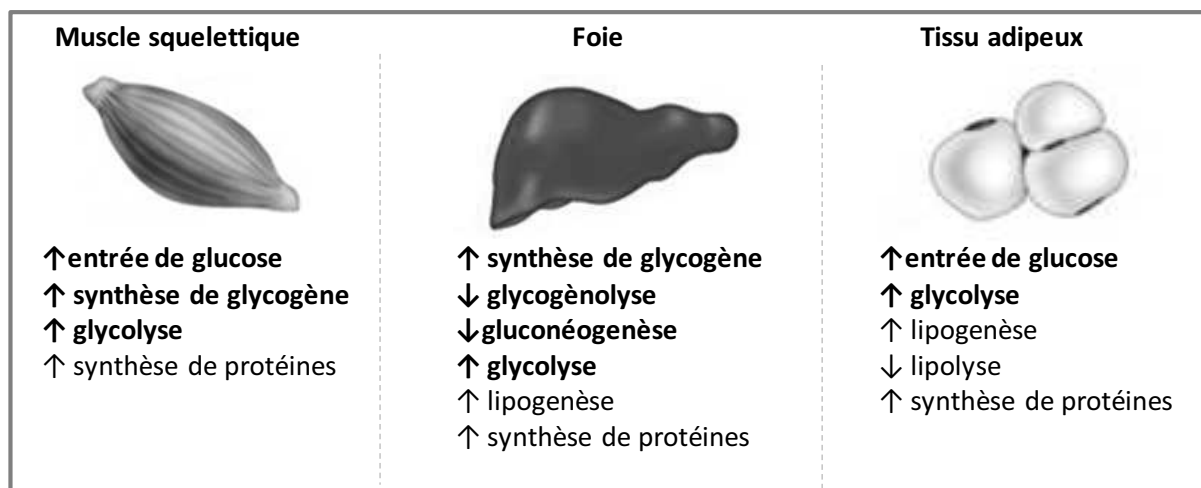


Figure 3 : Effets de l'insuline sur les principaux tissus cibles de l'insuline

Le glucagon est une hormone catabolique constitué de 29 acides aminés. Elle est sécrétée par les cellules α pancréatiques. Lorsque le glucose plasmatique s'abaisse au dessous des valeurs normales, la sécrétion de glucagon augmente, et induit la production de glucose hépatique pour élever la glycémie (72).

En plus de ces deux hormones principales, d'autres hormones interviennent dans la régulation de la glycémie telle que le cortisol, les catécholamines ou l'hormone de croissance. Ces dernières ont toutes un effet hyperglycémiant comme le glucagon (72).

II-1-1 La signalisation insulinique

Les effets métaboliques de l'insuline nécessitent la fixation de cette hormone à son récepteur, présent à la membrane des tissus cibles de l'insuline (principalement le foie, le muscle et le tissu adipeux) (73). La fixation de l'insuline permet l'activation du récepteur qui initie une cascade de réactions de phosphorylations et déphosphorylations avec pour but final l'activation des voies impliquées dans le métabolisme du glucose.

Le récepteur de l'insuline (RI) est une protéine hétérotétramérique constituée de deux sous-unités α extracellulaires et de deux sous-unités β transmembranaires (74). La liaison de l'insuline sur les sous-unités α entraîne la dimérisation du récepteur ainsi que son

autophosphorylation sur des résidus tyrosine de la sous-unité β qui activent le RI (75; 76; 74).

Les tyrosines phosphorylées du RI servent de sites d'ancrage sur lesquels des substrats du récepteur vont pouvoir se fixer. Parmi ces substrats, les mieux caractérisés sont les *insulin receptor substrate* (IRS). Ces IRS sont recrutés à la membrane et au RI grâce à leurs domaines d'homologie à la pleckstrin (PH) et de liaison aux phosphotyrosines (PTP) (77). Ils sont ensuite phosphorylés eux aussi par le RI sur des résidus tyrosine (77; 78).

Les tyrosines phosphorylées de ces IRS agissent comme des sites d'ancrages pour d'autres protéines de la cascade de signalisation contenant des domaines d'homologie à Src (SH2) (77). Il existe plusieurs isoformes d'IRS (1 à 6) qui malgré leur homologie, semblent avoir un rôle complémentaire et non redondant. Les fonctions différentes des IRS seraient contrôlées par leur distribution tissulaire, leur localisation cellulaire ou leur activité. L'IRS-1 et -2 sont largement distribués. Chez le rongeur, l'IRS - 3 est le plus abondant dans les adipocytes, le foie et le poumon. L'IRS - 4 est exprimé dans le muscle squelettique, le foie, le cœur, le cerveau et les reins. Les IRS 5 et 6 ont une expression tissulaire très limitée et ne constituent pas des substrats majeurs pour le RI (77). Des délétions de ces IRS dans des modèles de souris donnent des phénotypes différents confirmant ce rôle complémentaire et non redondant des IRS (79) IRS-1 et IRS-2 semblent avoir un rôle majeur dans le métabolisme du glucose et des lipides, tandis que le rôle des IRS-3 et IRS-4 est moins clair (80; 81).

La *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K) est un hétérodimère constitué d'une sous-unité régulatrice, p85, et d'une sous-unité catalytique, p110. Lorsque les deux sous-unités sont associées, cela maintient la PI3K dans un état inactif. La liaison des domaines SH2 de la sous-unité régulatrice de la PI3K aux tyrosines phosphorylées des IRS permet l'activation de la sous-unité catalytique (77). L'inhibition de la PI3K bloque la plupart des effets métaboliques de l'insuline mettant en évidence son rôle central dans cette signalisation (82). La PI3K peut activer de différentes façons des effecteurs. En effet, elle catalyse la transformation du *phosphatidylinositol 4,5- bisphosphate* (PIP2) en *phosphatidylinositol-3-phosphate* (PIP3)

(83), elle possède une activité sérine kinase et enfin ses deux sous-unités peuvent interagir avec d'autres protéines (82). Le PIP3 produit par l'action de la PI3K, active des molécules de signalisation dont des protéines à activité sérine/thréonine kinase (84) comme la *phosphoinositide dependent kinase-1* (PDK-1) et active le complexe protéique *mamalian target of rapamycin complex 2* (mTORC2) (77).

Une fois activée, la PDK-1 active la protéine AKT aussi connue sous le nom de *protein kinase B* (PKB), en la phosphorylant sur son résidu thréonine 308 (85). L'activation complète d'AKT nécessite une phosphorylation supplémentaire sur la sérine 473 par le complexe mTORC2 (84; 86) lui aussi activé par la PI3K. Il existe trois isoformes de PKB (1 à 3) codées par des gènes différents (87). Toutes ces isoformes possèdent un domaine PH qui permet leur interaction avec le PIP3 et la membrane plasmique. L'isoforme 2 de la PKB est la plus abondante dans les tissus sensibles à l'insuline et semble jouer un rôle prédominant dans l'action métabolique de l'insuline. Ainsi, des souris déficientes en PKB2 sont résistantes à l'insuline (88), contrairement au phénotype obtenu lors d'une délétion des PKB 1 ou 3 (89). PKB a un rôle majeur dans la transmission du signal de l'insuline à travers la phosphorylation de plusieurs enzymes clés du métabolisme du glucose : la *glycogen synthase kinase-3* (GSK-3), de *forkhead/winged helix transcription factor O class member 1* (Foxo1), de *cAMP response element-binding protein* (CREBP) ou encore d'*Akt substrate 160 kDa protein* (AS 160) (73). De plus, PKB active la voie mTORC1 en phosphorylant et inhibant un complexe protéique intermédiaire ou la protéine *prolyl rich Akt-substrate* (PRAS 40) (90). Les effets sur les voies du métabolisme glucidique associés à ces substrats de PKB sont décrits ci-dessous.

Par ailleurs, l'insuline comme d'autres facteurs de croissance, stimule aussi les *mitogen-activated protein kinase* (MAP kinase). Cette voie implique la phosphorylation sur tyrosine des IRS et/ou la protéine Shc pour activer la protéine Ras. Une fois activé, Ras opère comme un interrupteur moléculaire, stimulant une cascade de sérine kinase pour initier la prolifération et la différenciation cellulaire (73).

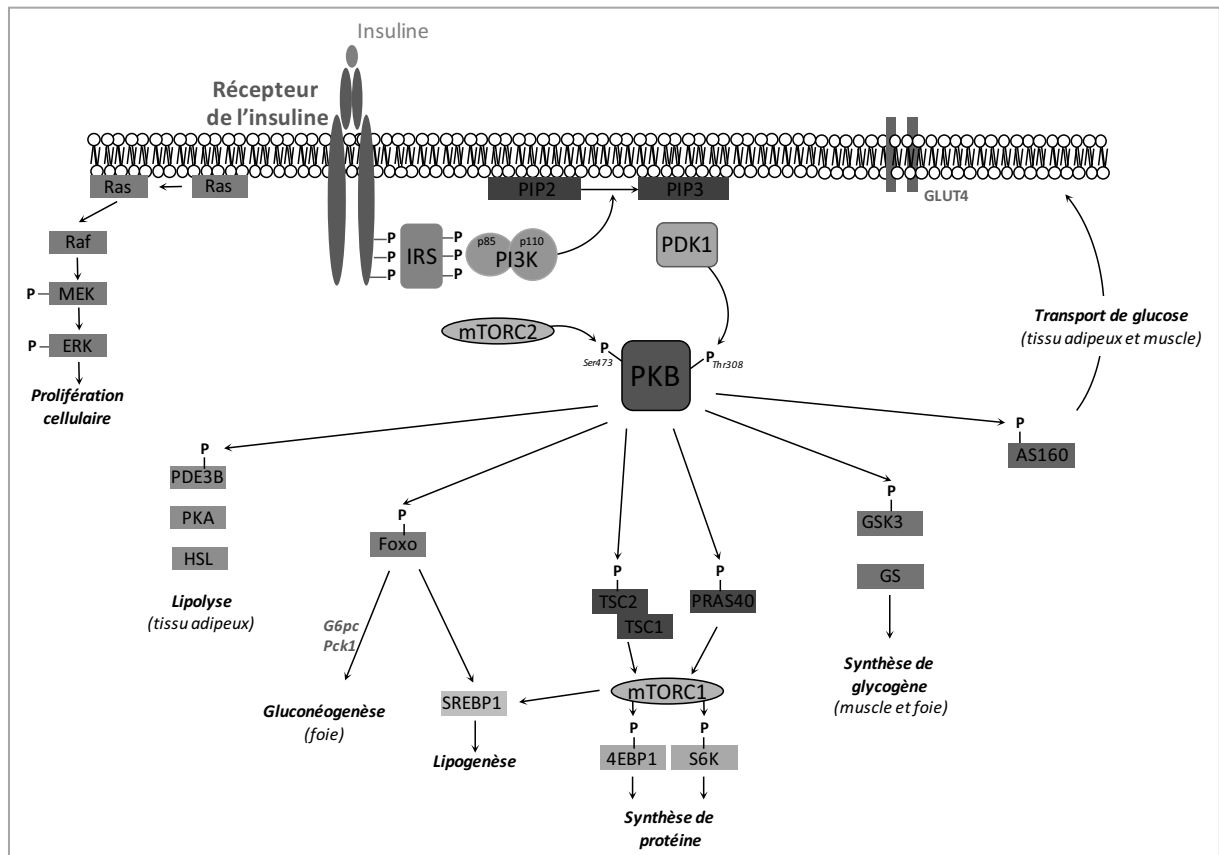


Figure 4 : Cascade de signalisation de l'insuline.

Contrôle de l'entrée de glucose dans les organes périphériques

PKB régule l'entrée de glucose dans les cellules périphériques, adipeuses et musculaires, en particulier par l'intermédiaire de la protéine AS160, qui intervient dans la translocation de transporteurs du glucose spécifiques les GLUT4 vers la membrane plasmique. A l'état basal, les transporteurs GLUT4 sont séquestrés dans des vésicules intracellulaires et l'AS160 est associée à celles-ci. Lors de son activation par l'insuline, la PKB phosphoryle l'AS160 et induit sa dissociation des vésicules qui sont alors transloquées à la membrane plasmique par la voie de l'exocytose (91). De plus, d'autres complexes protéiques ont été impliqués dans la régulation de la translocation des GLUT4. Ainsi, le complexe protéique APS/Cbl/CAP (APS pour *Adapter protein containing pleckstrin homology and Src homology-domains* ; Cbl, produit d'un proto-oncogène et CAP, *Cbl-associating protein*) est activé après la fixation de l'insuline au récepteur et permet par la régulation du trafic des protéines impliquant les rafts

lipidiques et les cavéoles, d'activer la translocation des vésicules contenant les GLUT4 vers la membrane plasmique (92; 93).

Contrôle de la production de glucose par le foie

L'insuline inhibe la production et la libération de glucose par le foie en bloquant la gluconéogenèse et la glycogénolyse. Ces effets se produisent à travers un effet direct de l'insuline sur le foie (94). En effet, l'insuline contrôle directement l'activité de plusieurs enzymes par phosphorylation ou déphosphorylation et régule l'expression de certains gènes impliqués dans la gluconéogenèse (95). En conditions de jeûne, le facteur de transcription CREB est lié à l'ADN et à un co-activateur *CREB-regulated transcription coactivator 2* (CRTC2), ce qui conduit à l'expression des gènes codant pour la *phosphoenolpyruvate carboxykinase* (PEPCK) (96), la *fructose-1,6-bisphosphatase* (FBP) et la *glucose-6-phosphatase* (G6P), ainsi que l'expression d'un facteur de transcription PGC-1 α , un autre régulateur transcriptionnel de la gluconéogenèse hépatique. L'activation de PKB conduit la phosphorylation de CRTC2 ce qui empêche sa liaison avec CREB (97). De plus, PKB phosphoryle également FoxO1, un autre facteur de transcription, qui l'empêche d'aller dans le noyau et bloque son activité transcriptionnelle, ce qui contribue à assurer l'inactivation de la transcription des gènes de la néoglucogenèse ainsi que PGC-1 α . (98) ; (77). L'insuline peut aussi influencer le métabolisme du glucose de façon indirecte par des changements d'acides gras libres (AGL) générés par le tissu adipeux viscéral (99). Ce flux d'AGL vers le foie peut augmenter la production de glucose, correspondant à un signal de sensibilité ou de résistance à l'insuline.

Transformation du glucose en substrat énergétique : glycogène, protéines et triglycérides

L'insuline active l'utilisation du glucose par une activation de la glycolyse, notamment en activant l'activité des enzymes 6-phosphofructokinase et l'hexokinase (100) ou en augmentant la transcription des gènes codant pour la *glucokinase* (GK) et la *pyruvate kinase* (PK) (101) impliquées dans la glycolyse. L'expression de la GK dans le foie est bien dépendante de l'insuline mais les acteurs moléculaires impliqués dans cette activation (102;

103) restent controversés et sont cependant indépendants du facteur de transcription SREBP-1c (104) mais l'insuline active l'expression de l'HKII dans le muscle via SREBP-1c (105). L'insuline stimule aussi l'accumulation de glycogène principalement dans le foie et le muscle, à travers une augmentation du transport du glucose et la synthèse de glycogène. Pour cela, PKB phosphoryle et inactive la GSK-3 ce qui diminue le niveau de phosphorylation de la *glycogène synthase* (GS) augmentant son activité (106).

Majoritairement dans le muscle et le foie, l'insuline augmente la synthèse et bloque la dégradation des protéines à travers l'activation de mTORC1. PKB phosphoryle et inhibe le complexe protéique *tuberous sclerosis complexe* TSC1/TSC2. Ce complexe ayant un effet inhibiteur sur la protéine Rheb activatrice de mTORC1, l'inhibition de TSC1/TSC2 conduit au final à l'activation de mTORC1. De même, PKB inhibe PRAS 40, un inhibiteur de mTORC1, en phosphorylant sur résidu ser 79, ce qui lève l'inhibition sur mTORC1 (77). L'activation de mTORC1 active la machinerie de traduction par une phosphorylation et activation de la kinase ribosomale p70S6K ou encore la phosphorylation de l'inhibiteur de l'*eucaryotic translation initiation factor 4E* (eIF-4E). P70rsk active la synthèse de ribosome en phosphorylant la protéine ribosomal S6 produisant une augmentation de traduction de l'ARNm (107).

L'insuline induit la synthèse de lipides et inhibe leur dégradation. La plupart de ces changements ont lieu sous le contrôle d'un facteur de transcription *sterol regulatory element binding protein* (SREBP-1c) activé par mTORC1 (108). SREBP-1c régule l'expression des gènes de la lipogénèse comme la *fatty acid synthase* (FAS) et l'*acetyl-coa carboxylase* (ACC). SREBP-2 régule l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de cholestérol, tel que l'*HMG-CoA reductase* (HMGCR) (109). Dans les adipocytes, l'insuline stimule la lipogénèse ainsi que l'adipogénèse, c'est-à-dire la différenciation des adipocytes (110). L'insuline inhibe aussi profondément la lipolyse dans le tissu adipeux principalement par l'inhibition de l'*hormone sensitive lipase* (HSL) (111). Cette enzyme est finement régulée par le contrôle de sa phosphorylation qui est activée par phosphorylation par la PKA. L'insuline inhibe l'activité de la lipase par la réduction de l'AMPc en raison de l'activation de la

phosphodiesterase spécifique de l'AMPc dans les cellules graisseuses (112). L'insuline induit la phosphorylation de la *phosphodiesterase 3B* (PDE3B) sur le résidu sérine 273 ce qui l'active et induit une diminution du niveau d'AMP cyclique. Ceci entraîne une diminution de l'activation de la protéine kinase A (PKA) qui AMPc dépendante responsable de l'activation de l'HSL par phosphorylation sur plusieurs résidus (77). L'insuline peut aussi inhiber la lipolyse en activant la protéine phosphatase -1 (PP1) par la phosphorylation de sa sous-unité régulatrice. La PP1 active déphosphoryle et désactive l'HSL (113).

La cascade de signalisation est soumise à un rétrocontrôle négatif qui peut avoir lieu à différents niveaux de la cascade. En premier lieu, en plus de phosphorylations sur des résidus tyrosine, le récepteur à l'insuline et les IRS peuvent subir des phosphorylations sur des résidus sérine qui vont diminuer l'accessibilité des sites de phosphorylations sur tyrosine et bloquer la cascade de signalisation normale (78; 114). L'activation du RI et des IRS est aussi atténuée par des protéines phosphatases, telle que la *protein-tyrosine phosphatase 1B* (PTP1B) ou la *protein-tyrosine phosphatase non-receptor type2* (PTPN2), qui catalysent leur déphosphorylation (75); (77). La signalisation de la PI3K est diminuée par la *phosphatase and tensin homologue* (PTEN) et SH2-containing inositol 50-phosphatase-2 (SHIP2) qui déphosphoryle le PIP3 (73). La PI3K participe au rétrocontrôle négatif sur le récepteur à l'insuline et les IRS, par la phosphorylation des résidus sérine (115) mais aussi par la présence en plus grande quantité de sous-unités régulatrices (116) ou la dimérisation de la sous-unité p85 avec des protéines inhibitrices (117). Akt, GSK3 ainsi que mTORC1 sont aussi connus pour participer au rétrocontrôle négatif de cette voie de signalisation (115; 118).

Ces mécanismes de rétrocontrôle négatif physiologique sont retrouvés dans un contexte pathologique de résistance à l'insuline. La résistance à l'insuline est caractérisée par des défauts à plusieurs niveaux de la cascade de signalisation, telles qu'une diminution de la quantité et de l'activité tyrosine kinase des récepteurs à l'insuline, une diminution de la quantité et de la phosphorylation des IRS-1 et -2. L'hyperinsulinémie induit une diminution de l'expression des IRS-1 et -2, par une dégradation de l'IRS-1 et une inhibition de la synthèse de l'IRS-2 (204) sur tyrosine ou via l'activation de la dégradation de ces protéines

médiée par l'ubiquitine induite par SOCS (205). Il a été montré aussi une diminution de l'activité de la PI3K, ainsi qu'une diminution de la translocation des GLUT4 ou une diminution de l'activité des enzymes intracellulaires (119). La présence d'une résistance à l'insuline induit une moindre suppression de la production de glucose hépatique qui joue un rôle majeur dans l'hyperglycémie, une moindre entrée de glucose dans les tissus captant le glucose comme le muscle et le tissu adipeux, ainsi qu'un défaut de suppression de la lipolyse au niveau du tissu adipeux favorisant la libération d'acides gras circulants qui participent eux-mêmes au maintien de la résistance à l'insuline.

A l'heure actuelle, de nombreuses études ont permis de valider l'implication de l'inflammation, du stress oxydant ou de la lipotoxicité dans ces altérations de la signalisation à l'insuline (119).

II-1-2 La voie de l'AMPK

L'adénosine monophosphate activated protein kinase (AMPK) est un régulateur majeur de l'homéostasie énergétique au niveau cellulaire ainsi qu'au niveau de l'organisme entier (120). Lorsqu'elle est activée, l'AMPK permet d'inhiber les voies anaboliques consommatrices d'ATP et d'activer les voies cataboliques productrices d'ATP pour restaurer l'équilibre énergétique de la cellule (120). L'AMPK est un complexe protéique composé de trois sous-unités, une sous-unité catalytique α et deux sous-unités régulatrices β et γ (121). Chaque sous-unité est présente sous différentes isoformes codées par des gènes distincts. Chez les mammifères, il existe les isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ (codées respectivement par les gènes *prkaa1* et *prkaa2*), $\beta 1$ et $\beta 2$ (*prkab1* et *prkab2*), ainsi que $\gamma 1$, $\gamma 2$ et $\gamma 3$ (*prkag1*, *prkag2* et *prkag3*). La sous-unité catalytique α (63kD) est constituée d'un domaine catalytique serine/thréonine kinase, d'un domaine auto inhibiteur et d'une séquence de liaison à la sous-unité β . Le domaine kinase qui détermine l'activité du complexe de l'AMPK, est localisé sur la partie N terminale de la protéine et est très conservé entre les 2 isoformes de la sous-unité α . Il contient une boucle d'activation sur laquelle est situé un site d'activation, un résidu thréonine 172 dont la phosphorylation active le complexe protéique (120). Plus récemment, il semblerait que ce résidu corresponde en fait au résidu 183 pour la sous-unité

$\alpha 1$ (122). Le domaine auto inhibiteur inhibe l'activité catalytique de la sous-unité α . Le domaine de liaison à la sous-unité β se situe au niveau de la région C-ter de la protéine.

Les sous-unités β et γ ont principalement un rôle structural mais agissent aussi comme des acteurs de l'activité de la protéine.

La sous-unité β contient 2 régions spécifiques : un domaine de liaison au glycogène et un domaine d'attache pour les sous-unités α et γ . Le domaine de fixation au glycogène permet au complexe AMPK de s'associer au glycogène et aux hydrates de carbone (122). La sous-unité β intervient aussi dans la localisation subcellulaire de l'AMPK par la présence de sites de myristoylation sur celle-ci, qui permettent de localiser la protéine à la membrane plasmique (122).

La sous-unité γ a un rôle majeur dans la sensibilité de l'AMPK au niveau d'énergie cellulaire. En effet, les 3 isoformes de cette dernière contiennent 4 répétitions cystathionine- β -synthase (CBS) dont le rôle principal est le contrôle des métabolites intracellulaires et particulièrement la fixation des nucléotides adényliques (122).

L'existence de ces différents complexes est dictée par l'expression tissulaire de chaque isoforme (121). Les isoformes de chaque sous-unité sont exprimées de manière différente selon les tissus et la combinaison de ces différentes isoformes va donner lieu à la formation de 12 hétérotrimères différents avec des fonctions cellulaires variées (122).

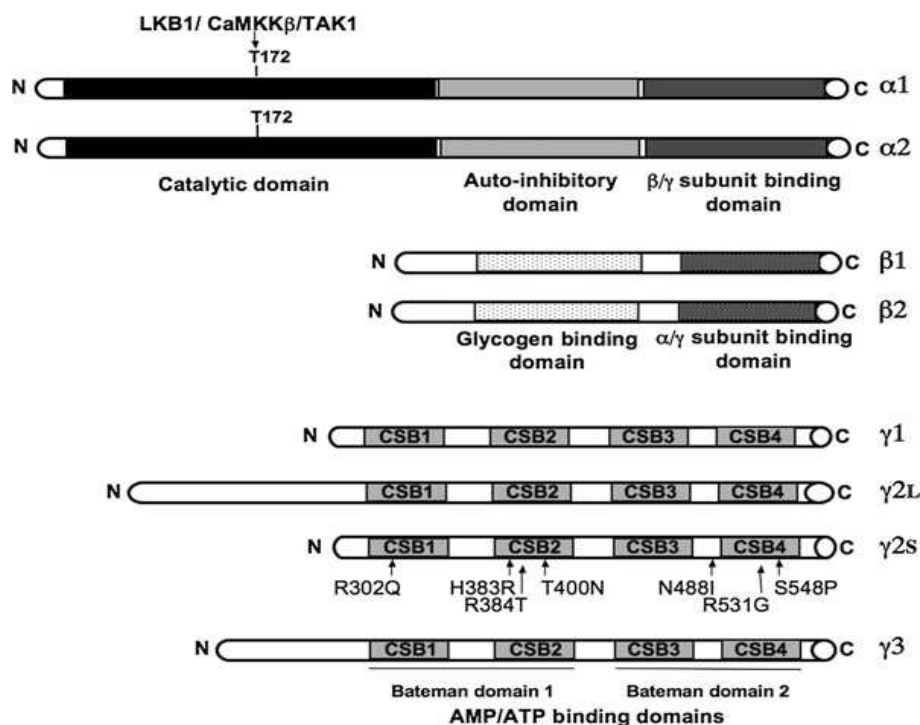


Figure 5: Structure de l'AMPK.

L'AMPK est constituée de trois sous-unités α , β et γ , composées de différents domaines détaillés dans le texte, qui existent sous plusieurs isoformes. D'après Viollet et al, (120)

Il existe plusieurs niveaux de régulation de l'AMPK. Tout d'abord, l'AMP est un activateur allostérique connu de l'AMPK et se fixe sur la sous-unité γ . Lorsqu'une première molécule d'AMP se fixe, elle induit un changement conformationnel permettant d'augmenter l'affinité de la sous-unité pour d'autres molécules d'AMP. La fixation d'AMP et l'activation allostérique permet d'augmenter d'un facteur 2 à 5 l'activité de la protéine. L'ATP peut aussi se fixer sur l'AMPK avec cinq fois moins d'affinité que l'AMP, et est un inhibiteur allostérique de celle-ci. Ainsi, l'AMPK est régulée par le ratio AMP/ATP dans la cellule correspondant au niveau d'énergie cellulaire. La phosphorylation de la Thr 172 de la sous-unité α , quant à elle, active l'AMPK de façon beaucoup plus puissante à savoir d'un facteur 100 à 1000 (121). Plusieurs kinases ont été impliquées dans cette phosphorylation. Les principales sont la Liver kinase B1 (LKB1), la Ca^{2+} /Calmoduline dependant protein kinase kinase (CaMKK) et la mammalian transforming growth factor b-activated kinase (TAK1) (121; 120).

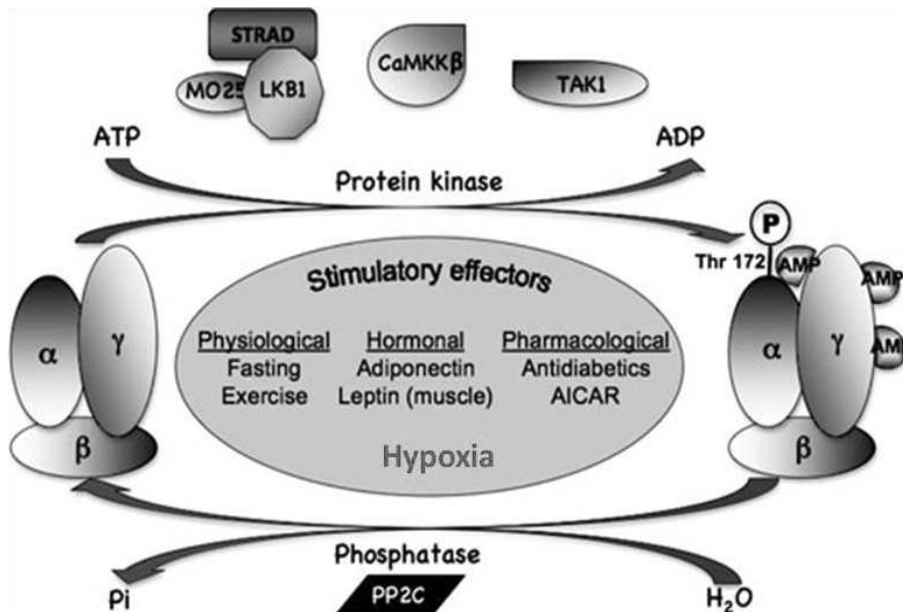


Figure 6: Régulation de l'activation de l'AMPK.

L'AMPK est activée par phosphorylation sur la Thr172 sur la sous-unité α par les protéines kinase LKB1, CaMKK et TAK1. Elle est inhibée par des phosphatases. Des molécules d'AMP peuvent se fixer sur la sous-unité β activant la protéine et protégeant contre la déphosphorylation de la Thr172. *D'après Viollet et al, (120)*

Enfin, en plus de la phosphorylation de la Thr 172, des études ont montré le rôle critique de l'inhibition de cette déphosphorylation (120). Par ailleurs, la fixation d'AMP ou d'ADP sur la sous-unité α permet de protéger la Thr172 de la déphosphorylation par les phosphatases (121).

D'autres sites de phosphorylation de l'AMPK participent également à la régulation de l'activité de cette protéine. Par exemple, la phosphorylation par la PKA de la Ser 485 de la sous-unité α 1 (ou Ser 491 sur la sous-unité α 2) exerce un effet inhibiteur sur l'AMPK (122), tandis que la phosphorylation de la Ser 108 sur la sous-unité β semble nécessaire à l'activation complète de la protéine. Par ailleurs la phosphorylation du résidu Ser 182 de cette même sous-unité impacte quant à elle la localisation sub-cellulaire qui joue un rôle important dans l'activité de la protéine (121).

L'AMPK est connue pour être activée par divers types de stress cellulaires qui implique en particulier une élévation de l'AMP, de l'ADP ou du Ca²⁺ en accord avec les mécanismes

d'activation présentées ci-dessus. Parmi les facteurs activateurs décrits, l'hypoxie est au centre de notre intérêt et active l'AMPK. Le mécanisme d'activation de l'AMPK par l'hypoxie semble principalement faire intervenir la réduction de la production d'ATP par la mitochondrie. Par ailleurs, des radicaux libres oxygénés (RLO) produits lors de conditions hypoxiques, peuvent eux aussi intervenir dans l'activation de l'AMPK de façon indépendante d'une diminution du ratio ATP/AMP, par l'activation des kinases activatrices de l'AMPK. En particulier, les RLO peuvent être responsables d'une altération de l'homéostasie calcique entraînant une augmentation Ca^{2+} intracellulaire activant l'AMPK par l'intermédiaire de la CaMKK (123).

L'AMPK est un senseur de l'état énergétique de la cellule et possède un rôle important dans les processus métaboliques.

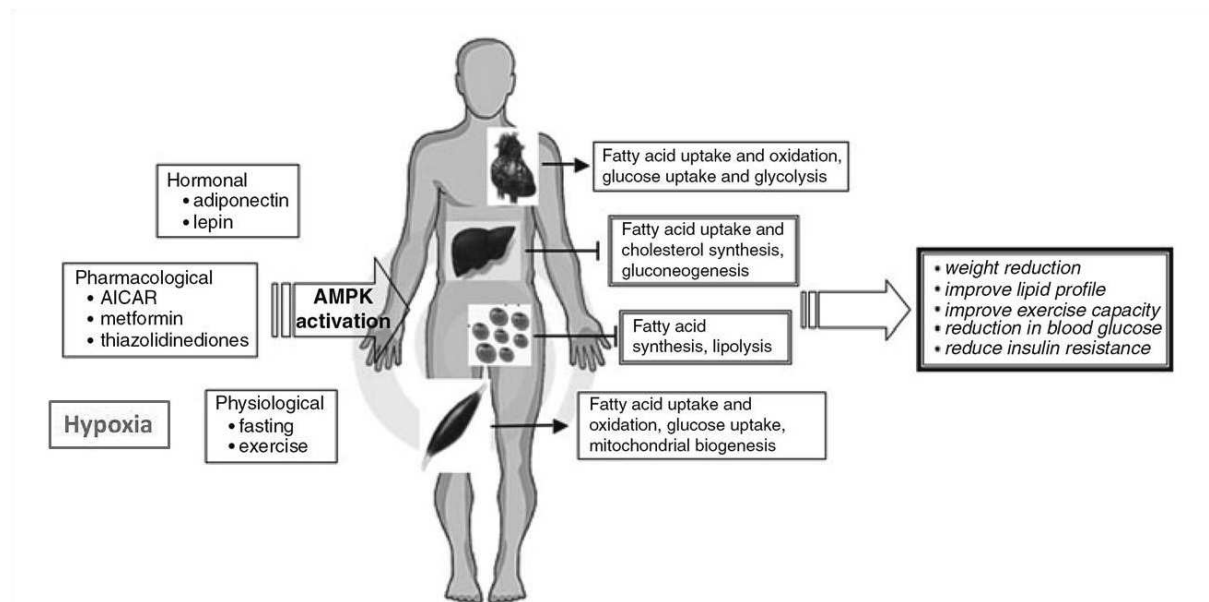


Figure 7: Rôle de l'AMPK dans les processus métaboliques.

L'AMPK a divers effets métaboliques incluant la modulation du métabolisme lipidique, l'augmentation de l'entrée de glucose dans le muscle, l'augmentation de la biogenèse mitochondriale, l'amélioration de la sensibilité à l'insuline et la diminution de la glycémie. *D'après Viollet et al, (120)*

Effet sur l'entrée de glucose dans la cellule

Le rôle de l'AMPK dans l'entrée de glucose a été particulièrement bien décrit dans le muscle squelettique (124; 125). L'activation de l'AMPK par la molécule AICAR induit une

augmentation de l'entrée de glucose, associée à une augmentation de la translocation des transporteurs de glucose, GLUT 4, à la membrane plasmique (126). Cela a été démontré aussi bien dans le muscle squelettique de sujets minces que dans celui de patients diabétiques de type 2 (127). La stimulation de l'AMPK dans le muscle apparaît comme une méthode efficace pour augmenter l'entrée de glucose de façon indépendante de l'insuline, en contournant la voie de l'insuline défectueuse lors d'une résistance à l'insuline. En effet, la translocation des GLUT4 induite par l'AMPK n'est pas modifiée lors de l'inhibition de la voie PI3K-AKT stimulée par l'insuline. L'étude de mutants pour l'AMPK a confirmé ce rôle. L'expression chez la souris d'un dominant négatif α_2 , abolit l'entrée de glucose dans le muscle induite par l'AICAR et par l'hypoxie (128; 129). De même cette abolition des effets de l'AICAR sur l'entrée de glucose est retrouvée chez des animaux avec une délétion d' α_2 , γ_3 ou LKB1 (130; 131-133).

Tout comme l'insuline, la translocation des transporteurs GLUT4 induite par l'AMPK implique l'AS160. En effet, une infusion d'AICAR est associée à une augmentation de la phosphorylation de l'AS160 dans le muscle squelettique de rongeur (134). Par ailleurs, il existe une corrélation positive entre la phosphorylation d'AS160, l'entrée de glucose dans le muscle squelettique et l'activité d'AMPK α_2 (135). La phosphorylation de l'AS160 est altérée ou abolit dans les muscles squelettiques de souris exprimant un dominant négatif α_2 , ou déficient pour les sous-unités α_2 ou γ_3 (136). Le rôle de l'AMPK dans le tissu adipeux reste plus discuté, mais les mécanismes impliqués dans la régulation de l'entrée de glucose entre muscle et tissu adipeux étant très similaires suggèrent que l'AMPK pourrait intervenir dans l'entrée de glucose au niveau du tissu adipeux (137; 138). En plus de son effet sur l'entrée de glucose dans la cellule, l'AMPK est impliquée dans d'autres mécanismes de régulation du métabolisme glucidique.

Effet sur la glycolyse

Dans le muscle cardiaque, l'AMPK stimule la glycolyse en phosphorylant et activant la phosphofructokinase-2 (PFK-2) (139). Une activation de l'expression de l'hexokinase II (HKII) dans le muscle a été mise en évidence suite à un traitement à l'AICAR (139).

Effet sur la synthèse de glycogène

L'effet de l'activation de l'AMPK sur la synthèse de glycogène reste encore discuté, mais il est logique de penser que l'AMPK puisse aussi inhiber cette voie anabolique. D'ailleurs, il apparaît que l'AMPK phosphoryle sur la Ser7 et inhibe la GS musculaire (140). En accord avec cela, l'activité de la GS apparaît diminuée dans le muscle squelettique de rat perfusé avec de l'AICAR (141). Enfin, cela est confirmé par l'abolition de la phosphorylation de la Ser7 et de l'inactivation de la GS chez des souris spécifiquement déficientes pour l'AMPK α 2 dans le muscle squelettique (142). Ceci est donc en faveur d'une diminution de synthèse de glycogène musculaire lors de l'activation de l'AMPK. Cependant, de nombreuses études montrent une accumulation de glycogène dans le muscle lors de l'activation de l'AMPK (143; 144). Ceci peut être expliqué par l'activation de l'entrée de glucose dans la cellule musculaire induite par l'activation de l'AMPK et qui va potentiellement activer allostériquement la GS via une augmentation de la concentration intracellulaire de G-6-P, premier métabolite du glucose. En effet, l'AICAR ne permet plus d'induire l'accumulation de glycogène dans le muscle de souris transgénique chez lesquelles la GS n'est plus activable par la concentration de G-6-P (145). Inversement, le glycogène peut se fixer à l'AMPK par l'intermédiaire de son domaine CBM et avoir un effet inhibiteur sur celle-ci (146). En effet, de haut niveau de glycogène diminue l'activation de l'AMPK induite par l'AICAR dans le muscle de rongeur (141). De façon concordante, l'activation de l'AMPK par l'exercice est plus importante quand les muscles sont déplétés de glycogène (141).

Effet sur la gluconéogenèse

De nombreuses études ont mis en évidence que l'activation de l'AMPK hépatique réprimerait l'expression des principaux gènes de la gluconéogenèse, G6Pc et Pck1, et de ce fait inhiberait la production hépatique de glucose (147; 148). Cet effet passerait en grande partie par la régulation du coactivateur CRTC2. L'activation de l'AMPK induit la phosphorylation de CRTC2 qui séquestre CREB dans le cytoplasme empêchant alors la transcription des gènes de la gluconéogenèse (149). L'inhibition transcriptionnelle de ces gènes peut-être également réalisée par la phosphorylation par l'AMPK des facteurs de transcription HNF4 α et FoxO1 provoquant leur dégradation protéolytique (150; 151).

Cependant, d'autres études ont montré que l'AICAR pouvait inhiber la gluconéogenèse de façon indépendante de l'AMPK laissant à déterminer le rôle de l'AMPK dans la régulation de cette voie métabolique (152).

Effet sur le métabolisme des lipides

L'AMPK régule plusieurs acteurs importants du métabolisme des lipides et son action globale est en faveur de l'oxydation des acides gras et en défaveur de leur biosynthèse. L'AMPK phosphoryle et inactive l'ACC (153; 154) dans le muscle squelettique (155) et dans le foie (156). L'ACC catalyse la transformation de l'acétylCoA en malonyl-coA, étape initiatrice et limitante dans la biosynthèse des acides gras. L'ACC existe sous deux isoformes : ACC1, et ACC2. Lorsque le malonyl-coA est produit, il est ensuite utilisé par la fatty acid synthase (FAS) cytoplasmique dans la synthèse des triglycérides (157). Le malonyl-coA produit par l'ACC joue aussi un rôle de régulation en bloquant le transport des acides gras du cytoplasme vers la mitochondrie via l'inhibition de la carnitine palmitoyl transférase-1 (CPT-1). L'activation de l'AMPK permet donc de diminuer la production de malonyl-coA et de faciliter l'entrée des acides gras dans la mitochondrie où ils seront oxydés. L'AMPK active aussi la malonyl CoA decarboxylase (MCD) ce qui permet de réduire le taux de malonyl coa (158). L'AMPK a un effet à plus long terme en inhibant les facteurs de transcription SREBP-1c et ChREBP (156; 159; 160). L'AMPK supprime l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse induite par l'insuline comme FAS (159), ACC ou pyruvate kinase (161) ou ceux induits par le glucose comme la L-PK. En parallèle, l'AMPK inhibe la HMG-CoA reductase, enzyme impliquée dans la synthèse du cholestérol (162). L'AMPK a aussi été impliquée dans l'inhibition de la lipolyse à travers une phosphorylation directe de l'HSL dans le tissu adipeux (163). Une diminution de l'activité de l'AMPK est associée à une augmentation de lipolyse (164).

Effet sur le métabolisme des protéines

L'AMPK est aussi impliquée dans l'inhibition de la synthèse protéique. Pour cela elle inhibe le complexe protéique mTORC1 (impliqué dans les effets de l'insuline sur la synthèse de protéines). L'AMPK inhiberait soit indirectement mTORC1 par l'intermédiaire de TSC2 qui est

impliqué dans l'inhibition de mTORC1 (165), soit directement par phosphorylation inhibitrice d'une protéine du complexe mTORC1, connue sous le nom de raptor (166; 167).

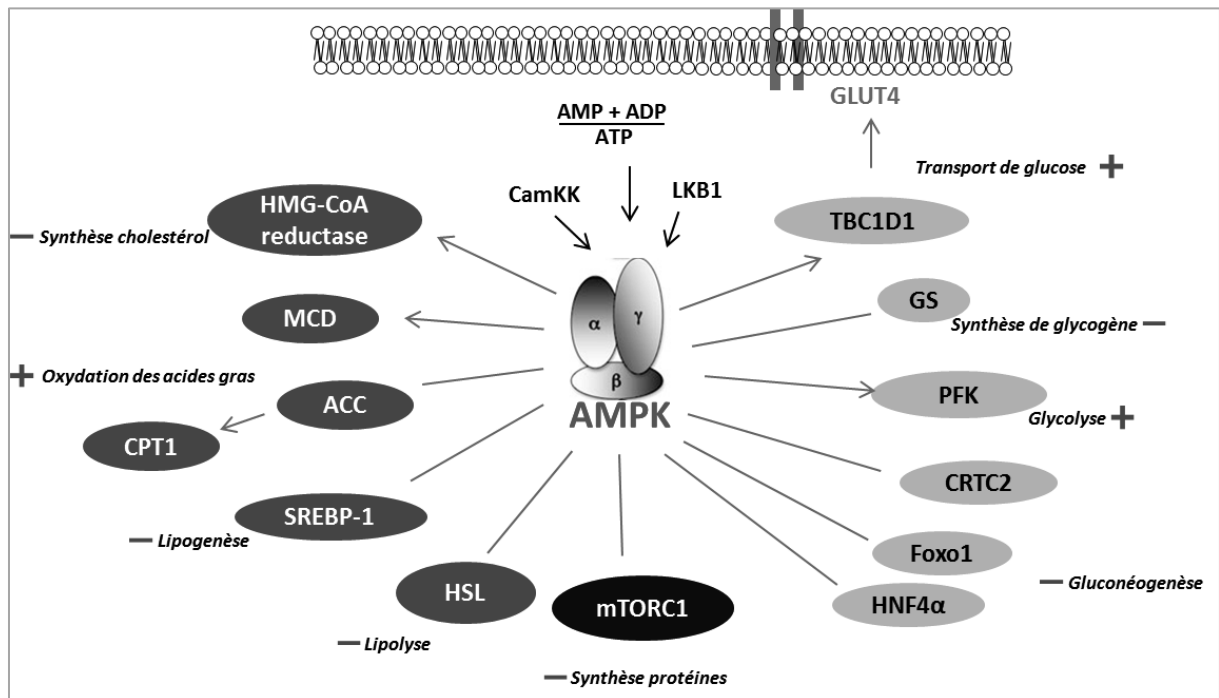


Figure 8: Effets de l'activation de l'AMPK sur les voies métaboliques.

L'AMPK active ou inhibe des protéines cibles impliquées dans différentes voies métaboliques détaillées dans le texte.

II-2 Régulation centrale

En plus d'une régulation de l'homéostasie du glucose impliquant les organes périphériques, le cerveau joue un rôle important dans le contrôle de la prise alimentaire et du métabolisme énergétique en général.

Deux structures spécifiques sont particulièrement impliquées dans cette régulation et sont l'hypothalamus et le tronc cérébral (168).

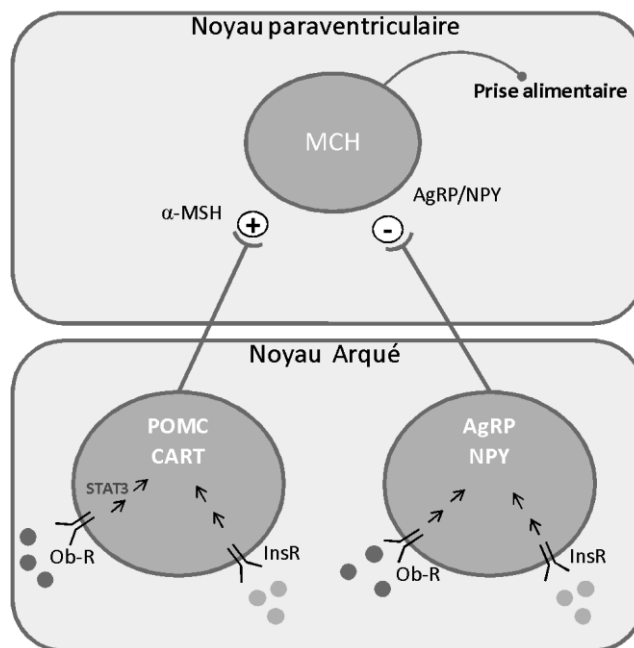


Figure 9 : Régulation centrale de la prise alimentaire.

L'insuline et la leptine se fixent à leurs récepteurs sur les neurones à POMC/CART et augmentent l'expression des peptides anorexigènes (POMC et CART) augmentant l'activité de l'hormone mélanotrope -MSH qui agit sur l'hormone MCH dans le noyau paraventriculaire. L'action de la leptine et de l'insuline sur les neurones à AgRP/NPY, inhibe l'expression des peptides orexigènes AgRP et NPY.

L'hypothalamus a un rôle central. Il est constitué de différents noyaux avec des populations neuronales avec chacune des spécificités. Le noyau arqué occupe un rôle intégrateur majeur avec ses connexions avec d'autres zones hypothalamiques ou le tronc cérébral (169). Deux populations neuronales principales sont contenues dans ce noyau. Tout d'abord, les neurones exprimant le gène codant pour la *pro-opiomélanocortine* (POMC) et le *transcrit régulé par la cocaïne et les amphétamines* (CART), qui ont un effet anorexigène. La POMC est activée par plusieurs clivages donnant des neuropeptides actifs dont les *hormones mélanotropes alpha et beta* (α- et β-MSH) qui vont se fixer aux récepteurs à la mélanocortine MC4R ou MC3R pour exercer leur effet anorexigène (170; 171).

La deuxième population neuronale du noyau arqué correspond à des neurones co-exprimant le *neuropeptide Y* (NPY) et l'*agouti-related peptide* (AgRP) induisant un effet orexigène, notamment par l'effet antagoniste de l'AgRP sur les MC4R. L'activation ou l'inhibition de ces neurones hypothalamiques vont permettre de moduler la prise alimentaire et la dépense énergétique (172).

En particulier, ces neurones du noyau arqué expriment des récepteurs aux hormones comme les récepteurs à la leptine ou l'insuline les rendant sensibles aux niveaux de ces hormones et donc au statut énergétique de l'organisme (173). En effet, l'insuline et la leptine sont connus pour être des signaux d'adiposité, puisque leurs niveaux évoluent de façon parallèle à la masse grasse, et entrent dans les zones cérébrales spécifiques de façon proportionnelle à leurs niveaux plasmatiques (174). Ces deux hormones possèdent un effet anorexigène à travers leurs fixations à leurs récepteurs des cellules neuronales de l'hypothalamus (174).

Le tronc cérébral joue un rôle important lui aussi. Il est le siège des informations nerveuses issues du système nerveux périphériques et représente la deuxième composante essentielle dans la régulation centrale de la prise alimentaire et de la glycémie. Il est composé du noyau du tractus solitaire (NTS) qui possède des neurones à POMC et une concentration importante de récepteurs MC4R, ainsi qu'une forte concentration de récepteur à la leptine (172).

En plus d'un contrôle important sur le poids et la prise alimentaire, des études ont mis en évidence un rôle important de l'hypothalamus dans le contrôle de la glycémie. En effet, des études ont montré un impact du contrôle central sur la production de glucose endogène par le foie ou sur l'utilisation de glucose par les organes périphériques.

Outre sa sensibilité à l'insuline et à la leptine, l'hypothalamus est sensible au glucose et à d'autres nutriments comme les acides gras circulants.

Ainsi, une infusion intracérébroventriculaire (ICV) de glucose induit une diminution des niveaux périphériques de glucose et d'insuline (175). De plus, une hyperglycémie périphérique chez le rat, entraîne une augmentation du niveau de glucose dans l'hypothalamus et supprime la production de glucose hépatique (175). Enfin, si l'oxydation du glucose est bloquée dans l'hypothalamus, la suppression de la production de glucose induite par l'hyperglycémie est abolie (175).

Les signaux centraux activent les canaux K_{ATP} dans l'hypothalamus et une infusion de glucose dans l'hypothalamus ventro-médial inhibe la réponse aux hormones de contre-régulation

lors d'une hypoglycémie. Si les canaux K_{ATP} sont bloqués, les effets de l'infusion de glucose sont inhibés. Les canaux K_{ATP} de l'hypothalamus sont constitués de la sous-unité Kir6.2. Des souris transgéniques qui ont un défaut de sensibilité au glucose induit par l'expression d'un mutant de Kir6.2, développent une intolérance au glucose périphérique (176). L'administration d'un activateur des canaux K_{ATP} diminue la production de glucose endogène aussi chez des sujets humains non-diabétiques. Ce qui appuie le rôle régulateur de l'activation des canaux K_{ATP} dans la régulation centrale de la production de glucose endogène (177).

Le cerveau a longtemps été considéré comme insensible à l'insuline, du fait de l'expression de transporteurs du glucose, GLUT3, qui ne sont pas régulés par l'insuline. Cependant, une étude a montré qu'un défaut de sensibilité à l'insuline centrale induisait une intolérance au glucose (178). Ceci est confirmé par le fait que des souris n'exprimant pas le récepteur à l'insuline dans les neurones développent une obésité, une résistance à l'insuline modérée et une élévation de l'insuline plasmatique (178).

L'infusion d'un antagoniste des récepteurs à l'insuline dans les ventricules cérébraux diminue le contenu en récepteur à l'insuline dans le noyau arqué de l'hypothalamus, induit une hyperphagie, une augmentation de masse grasse et l'échec de la suppression de la production de glucose endogène (179). L'insuline stimule aussi les canaux K_{ATP} chez des rats minces, mais cet effet disparaît lorsque les animaux sont obèses (180).

L'administration d'insuline dans l'hypothalamus active la cascade de signalisation de l'insuline avec l'activation du récepteur, des IRS, de la PI3K ainsi que des cibles d'AKT (181). De plus, l'inhibition de la PI3K induit une intolérance au glucose et altère la suppression de la production endogène de glucose (179; 182). L'infusion d'insuline ICV chez des souris déficientes pour IRS1 ou IRS2 dans le foie n'a pas d'effet sur la production de glucose hépatique (183).

La suppression de la production hépatique de glucose est induite par l'inactivation du nerf vague (184). La diminution de la production de glucose hépatique après une infusion d'insuline ICV est causée par la diminution de l'expression des enzymes de la

gluconéogenèse alors que la glycogénolyse ne semble pas affectée (185). Le mécanisme par lequel l'insuline au niveau central supprime la production de glucose endogène, fait intervenir le facteur de transcription *Signal transducer and activator of transcription 3*, STAT3. Des souris ayant une délétion spécifique de STAT3 dans le foie présentent une résistance à l'insuline et une augmentation des enzymes de la gluconéogenèse (186). Une augmentation d'insuline induit une augmentation de la phosphorylation de STAT3 dans le foie. Les souris déficientes pour STAT3 dans le foie inhibent les effets de l'infusion ICV d'insuline sur la production de glucose hépatique et l'expression des gènes de la gluconéogenèse. Ramadoss et al, ont montré que STAT3 pouvait se lier directement à la région promotrice de la GPase pour en diminuer sa transcription (187). L'*interleukine 6* (IL-6) est une cytokine qui est l'un des ligands principaux de STAT3 (184). Il semblerait que ce sont les cellules de Kupffer dans le foie qui soit à l'origine de la sécrétion de la cytokine, qui va agir sur les hépatocytes et activer STAT3. Cela est confirmé par le fait qu'une infusion d'insuline ICV chez des souris déficientes pour l'IL-6, n'induit pas de phosphorylation de STAT3 (184).

L'hypothalamus ressent aussi le taux d'acides gras circulants. Une infusion d'AG à longue chaîne ICV chez le rat induit une réduction rapide de la prise alimentaire ainsi que des enzymes de la gluconéogenèse et de la production hépatique de glucose (188). Les canaux K_{ATP} seraient aussi activés par les flux de lipides au niveau central et l'activation de la PKC hypothalamique est nécessaire pour moduler la production de glucose endogène après une infusion de lipides (189).

En plus des effets de la régulation centrale sur la production de glucose hépatique, des études ont mis en évidence l'impact de l'hypothalamus sur le métabolisme du muscle et du tissu adipeux. Ainsi, l'action de l'insuline au niveau central via l'activation des canaux K_{ATP} , permet d'augmenter l'entrée de glucose dans le muscle squelettique (190) ainsi que dans le tissu adipeux (191). De plus, l'insuline au niveau central module le métabolisme lipidique périphérique en diminuant la lipolyse dans le tissu adipeux (192) et en augmentant l'entrée d'acides gras dans le tissu adipeux (193).

Comme le glucose, l'insuline ou les acides gras, la leptine active les canaux KATP dans les neurones de rats (194). Les effets centraux de la leptine sont dépendants de la signalisation STAT3 dans l'hypothalamus et sont perdus chez des animaux soumis à un régime riche en graisse suggérant l'existence d'une résistance à leptine centrale (195; 196). La leptine stimule les neurones à POMC induisant une diminution de la prise alimentaire et une perte de poids (194).

Les effets de la leptine semblent faire intervenir plusieurs voies de signalisation comme l'AMPK (197), la voie PI3K (198) ou encore mTOR (199).

En effet, la leptine augmente l'activité de mTOR dans l'hypothalamus et le blocage de la voie mTOR abolit les effets anorexigènes de la leptine (199). L'activation de mTOR dans les neurones hypothalamiques induit aussi la phosphorylation de p70S6K et de 4EBP1 (200). Plus récemment, une étude a pu montrer grâce à l'inactivation de S6K dans les neurones à POMC ou les neurones à AgRP, que S6K1 dans les neurones à POMC régule la production de glucose tandis que S6K1 dans les neurones à AgRP participe plutôt à la régulation de la sensibilité à l'insuline.

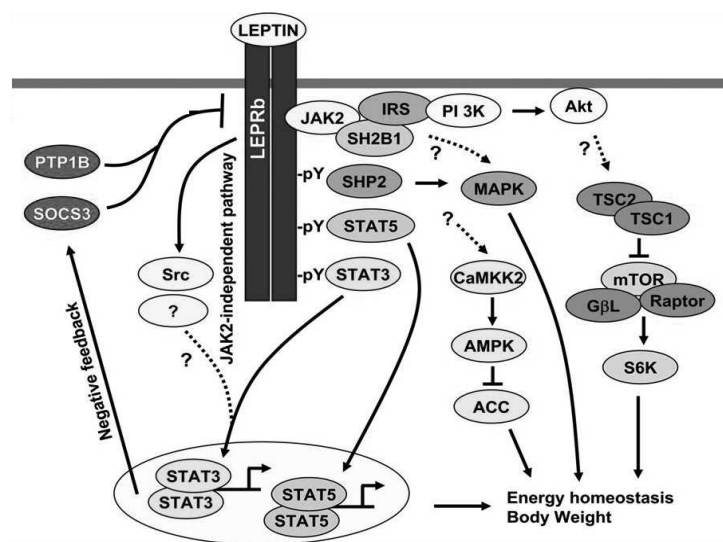


Figure 10 : Signalisation de la leptine.

La leptine se lie à son récepteur, LepRb, et active la protéine Janus kinase 2 (JAK2). JAK2 phosphoryle LepRb sur des résidus tyrosine. Cela permet la liaison et l'activation de la voie des MAPK, de STAT5 et STAT3. JAK2 permet aussi le recrutement et l'activation des protéines IRS de la signalisation de l'insuline. L'activation de la kinase Src promeut l'activation de STAT3. La leptine régule aussi la CaMKK2 et l'AMPK. D'après Morris et al., (201)

Dans cette régulation, l'AMPK possède aussi un rôle important. Contrairement au muscle où la leptine active l'AMPK, celle-ci l'inhibe dans l'hypothalamus et il en est de même pour l'insuline, le glucose ou les acides gras (200).

La réduction de l'activité de l'AMPK hypothalamique induite par la leptine diminue l'expression des gènes codant pour le NPY et l'AgRP dans le noyau arqué ainsi que de la MCH ou la CRH dans d'autres zones de l'hypothalamus (202). De plus, une diminution de l'activité de l'AMPK induit une augmentation de la concentration en malonyl-CoA et donc une diminution de l'activité de la CPT-1 (200). L'augmentation de malonyl-coA qui semble pouvoir agir directement sur des protéines régulant l'expression des gènes des neuropeptides ou l'accumulation d'AG dans le cytoplasme entraîne une diminution de l'expression des gènes codant pour les neuropeptides oréxigéniques (203). En plus des effets sur la prise alimentaire, l'inhibition de l'AMPK rejoint les effets de la leptine ou de l'insuline sur la production hépatique de glucose, puisque l'inhibition de l'activité de l'AMPK hypothalamique chez la souris induit une diminution de la production de glucose hépatique. Au contraire, lorsque l'AMPK hypothalamique est activée pharmacologiquement, cela diminue la production de glucose par le foie (204). En revanche, les effets centraux sur l'entrée de glucose dans le muscle ne semblent pas impliquer l'AMPK (190).

III-HYPOXIE ET METABOLISME DU GLUCOSE

III-1 Hypoxie, HIF-1, contrôle du métabolisme du glucose

L'obésité a été associée à une hypoxie du tissu adipeux (205). En effet, une faible pression partielle en oxygène a été observée dans le tissu adipeux abdominal de patients en surpoids ou obèses (206). De plus, ce résultat a été confirmé par une augmentation de marquage au pimidazole (marqueur de l'hypoxie) ainsi qu'une diminution de la pression en oxygène (pO₂) dans le tissu adipeux de souris soumises à un régime riche en graisse (207). L'hypoxie joue un rôle majeur dans les dysfonctions métaboliques du tissu adipeux en altérant la signalisation de l'insuline dans les adipocytes (208; 209). De plus, l'augmentation de la pO₂

dans le tissu adipeux de souris soumises à un régime riche en graisse a été associée avec une augmentation de l'expression de gènes de l'inflammation (210).

Cette hypoxie du tissu adipeux est associée à une augmentation de l'expression et de la quantité protéique d'un facteur impliqué dans la réponse à l'hypoxie, HIF-1 pour hypoxia inducible factor-1 (207). HIF-1 a été découvert par Semenza tel qu'un facteur nucléaire se liant au gène de l'érythropoïétine en réponse à l'hypoxie (211). On connaît désormais plus de 100 gènes cibles de HIF (212; 213).

HIF est un complexe hétérodimérique constitué d'une sous-unité alpha, régulée par le niveau d'oxygène sanguin, et d'une sous-unité beta également appelée ARNT, Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator, constitutive et stable. Il existe trois isoformes de la sous-unité alpha. HIF-1 α est une isoforme ubiquitaire, à l'inverse de HIF2 α et HIF3 α restreintes à certains types cellulaires (213). Il existe également deux sous-unités β . HIF1b est la sous-unité majeure, indispensable au cours du développement embryonnaire et exprimée dans la plupart des tissus, alors que HIF2 β est plus spécifiquement exprimée dans les reins et le cerveau à l'âge adulte (214). En normoxie, la sous-unité α est continuellement dégradée par l'intermédiaire d'hydroxylation. Ces hydroxylations permettent l'interaction de HIF1 α avec la protéine *von Hippel-Lindau* (VHL) contenue dans un complexe protéique doté d'une activité ubiquitine-ligase qui permet d'induire la dégradation de la sous-unité alpha par le protéasome. Ces hydroxylations sont effectuées par les *prolines hydroxylases* (PHDs) et l'acquisition de sa pleine activité est régulée par l'*asparagine hydroxylase* (FIH) (213).

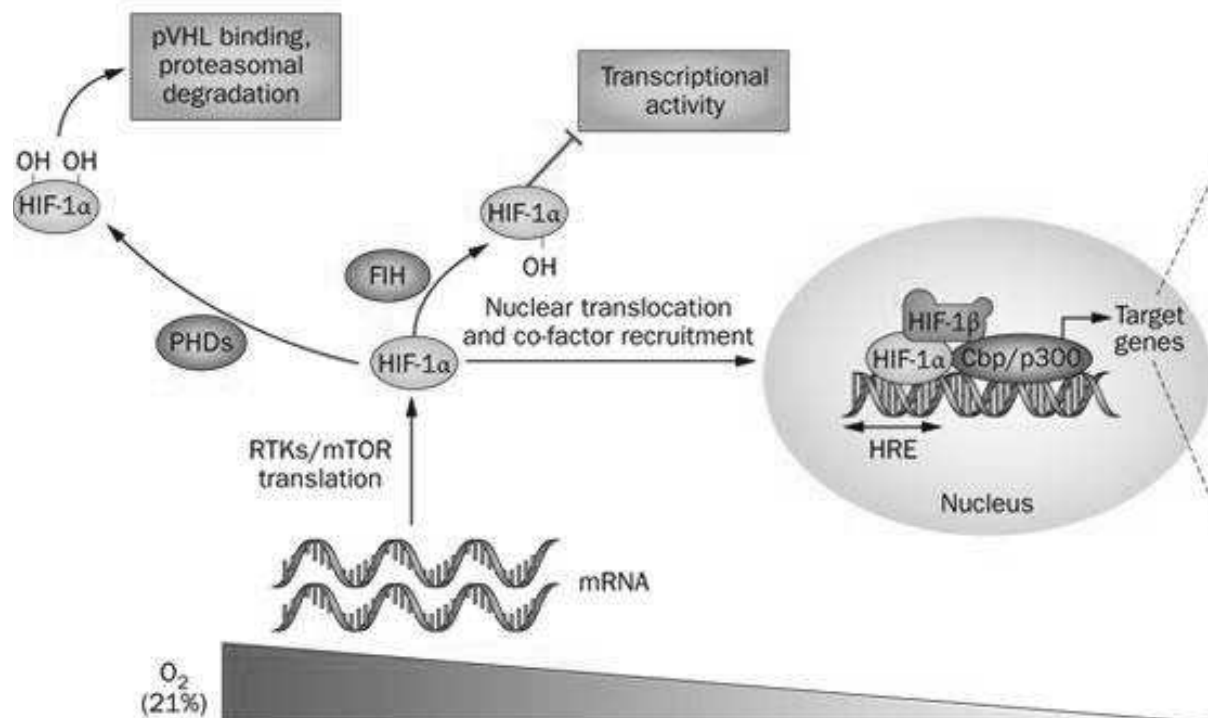


Figure 11 : Régulation de HIF-1 α par les prolylhydroxylases.

En normoxie, HIF-1 α est hydroxylé par des PHD (1 à 3). HIF-1 α est reconnue par la protéine VHL et envoyée vers le protéasome pour être dégradé. En hypoxie, les PHD sont inhibées et la sous-unité α est stabilisée. HIF-1 α est inhibé par le FIH qui réduit son activité transcriptionnelle.

D'après Rapisarda et al., (215)

Les PHDs et le FIH sont des senseurs d'oxygène qui appartiennent à la large famille des dioxygénases. Leurs activités dépendent du 2-oxoglutarate et du fer (II). Il existe trois isoformes des PHDs et une isoforme de FIH. Elles présentent toutes une distribution tissulaire, une régulation, ou une spécificité vis-à-vis des sites d'hydroxylation de HIF α différentes. En hypoxie, la sous-unité HIF-1 α est stabilisée et se dimérise avec HIF1 β dans le noyau, le complexe se lie alors aux séquences HRE présentes sur l'ADN, et recrute ses co-facteurs nécessaires à son activité transcriptionnelle (213).

L'activation de HIF-1 lors de l'hypoxie semble être un facteur majeur dans la dysfonction métabolique. En effet, une étude a montré que dans des adipocytes de souris obèses, l'altération de la signalisation à l'insuline était associée à l'activation de HIF-1 ou HIF-2 et que l'inhibition de ces facteurs par interférence ARN abolissait les effets délétères sur la

signalisation (208). Pour comprendre l'implication de HIF-1 dans les altérations de la sensibilité à l'insuline, des études ont modifié l'expression de ce facteur et évalué l'impact sur la sensibilité à l'insuline.

La surexpression d'un dominant négatif de HIF1- α dans le tissu adipeux rend les animaux plus sensibles à un régime riche en graisse et conduit à une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline (216). De même, la délétion spécifique de HIF-1 α dans le tissu adipeux protège contre l'obésité et la résistance à l'insuline induite par un régime riche en graisse (217; 218). La délétion spécifique de HIF-1 β ^{-/-} dans le tissu adipeux (218) conduit à la même protection contre l'obésité et l'intolérance au glucose induite par un régime riche en graisse. L'inhibition de HIF-1 α dans le tissu adipeux (219) améliore la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline. La délétion partielle systémique de HIF-1 α (220) induit de même une meilleure tolérance au glucose. L'utilisation d'un oligonucléotide anti-sens contre HIF-1 α entraîne une perte de poids et une diminution des niveaux plasmatiques de glucose et d'insuline dans des souris rendues obèses par un régime riche en graisse (220). Cependant, la délétion spécifique de HIF-1 α dans le foie (221) augmente la résistance à l'insuline induite par un régime riche en graisse.

En accord avec les résultats précédents, la surexpression de HIF-1 α dans le tissu adipeux induit une intolérance au glucose (222). Il apparaît cependant que la délétion spécifique de la protéine VHL dans le tissu adipeux n'induit pas de changement de sensibilité à l'insuline (223). De plus, la délétion spécifique de la PHD2 dans le tissu adipeux ou au niveau systémique aurait plutôt un effet bénéfique avec une protection contre la prise de poids induite par un régime riche en graisse ainsi qu'une amélioration de la tolérance au glucose (220; 224). De même, la délétion systémique du FIH protège contre la prise de poids et améliore la sensibilité à l'insuline (216).

Dans le cas de l'HI, Reinke et al., ont montré que les tissus étaient touchés différemment par les cycles d'hypoxie. En effet, alors que le foie et le muscle voient les désaturations répétitives, le tissu adipeux serait plutôt soumis à une hypoxie continue (225).

Une exposition à l'HI chronique in vivo, induit une activation importante et soutenue de HIF-1 (226) et persistante même lors d'un retour à la normoxie (227).

L'HI apparait comme un stimulus plus puissant que l'hypoxie continue pour l'activation de HIF-1 (228). Une augmentation de la quantité de protéine de HIF-1a ainsi qu'une augmentation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 ont été mis en évidence dans des cellules exposées à l'HI (229). HIF-1 peut être activé par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (230), ce qui en fait une bonne cible dans le contexte de l'HI.

III-2 Hypoxie intermittente et homéostasie glucidique

Des études expérimentales avec des modèles de rongeurs ont étudié l'impact de l'hypoxie intermittente sur le métabolisme glucidique

Le stimulus d'hypoxie intermittent est très complexe, car le but est de reproduire les désaturations nocturnes en oxygène associées aux apnées chez le rongeur notamment. Plusieurs types de dispositif ont donc été créés pour mimer au mieux ce stimulus, mais il apparait évident que des différences dans la durée des cycles, la sévérité des désaturations ou le temps d'exposition, peuvent être un facteur majeur de désaccord entre les études. En tenant compte de ceci, nous nous attarderons uniquement sur la revue de la littérature dont les stimuli sont destinés à reproduire des apnées avec des cycles répétitifs réguliers et assez courts, et avec une intermittence d'hypoxie/normoxie lors des cycles mais aussi entre une période nocturne et diurne pour mimer les phases de sommeil et d'éveil chez les patients. Deux types majeurs d'exposition peuvent aussi être dissociées, des expositions dites aiguës, de 30 min à 12h, ou des expositions chroniques de 5 jours à plusieurs semaines

III-2-1 Exposition aiguë

Tout d'abord, une exposition aiguë à l'hypoxie intermittente, c'est-à-dire de 30 min (231) à 12h (225) ne semble pas modifier le taux d'insuline plasmatique chez le rongeur. La glycémie quant à elle, n'évolue pas dans le même sens après l'exposition aiguë à l'HI selon les études. En effet, celle-ci est augmentée dans certaines études (225; 231-233) chez la souris (225; 231; 232) ou le rat (233) alors qu'elle n'est pas modifiée dans deux autres études (231; 234; 235).

Concernant la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose, les études divergent. En effet, une exposition aigue à l'HI peut induire une augmentation de sensibilité à l'insuline mesurée par un test de tolérance à l'insuline chez le rat, ou au contraire entrainer une résistance à l'insuline évaluée par un clamp euglycémique-hyperinsulinémique chez la souris (232). De même, la tolérance au glucose est améliorée (233) ou altérée selon les études (231; 234). La différence des cycles d'HI pourrait être la cause de ces différences, puisque lorsque la sensibilité à l'insuline est améliorée, les cycles sont constitués de 45 secondes d'hypoxie à 6% suivie d'une période de normoxie (21% d'O₂) longue de 5 minutes, soit environ 10 cycles par heure. Au contraire, dans le cas où la sensibilité à l'insuline est altérée, les cycles sont plus courts pour obtenir environ 60 cycles par heure (231; 234).

L'obésité est un facteur de risque très important chez le patient atteint de SAOS. Pour cette raison, des études expérimentales ont eu pour objectif d'évaluer l'impact de l'HI en présence ou non de cette comorbidité. Ainsi, une exposition aigue à l'HI de souris obèse soumises à un régime riche en graisses, induit une augmentation de la glycémie et de l'insuline plasmatique en comparaison aux souris obèses en normoxie. Les niveaux de glycémie et d'insuline étant déjà plus élevés dans le groupe obèse que le groupe mince, il apparait clairement un effet additionnel de l'obésité et de l'HI (225).

Malgré des résultats démontrant l'impact d'une exposition aigue à l'HI, cela ne permet pas de reproduire la chronicité de la pathologie apnéique.

III-2-2 Exposition chronique

Concernant les variables plasmatiques, une seule étude met en évidence une diminution de la glycémie chez des souris exposées 5 jours à l'HI (236). Quelques autres travaux ne mettent pas en évidence de différence de glucose sanguin chez le rat ou la souris (237-242; 243). La plupart cependant sont plutôt en faveur d'une augmentation de la glycémie (240; 244-253).

Exposition aiguë à l'hypoxie intermittente			Durée d'exposition par jour	Cycles	Glycémie	Insulinémie	Sensibilité à l'insuline	Tolérance au glucose
Modèle mince	<i>Iiyori, 2007 (232)</i>	<i>Souris C57BL6</i>	9h	30s à 5% - 30s à 21%	↑	=	↓(clamp EH)	
	<i>Reinke, 2011 (225)</i>	<i>Souris C57BL6</i>	12h	30s à 5% - 30s à 21%	↑	=		
	<i>Rafacho, 2013 (233)</i>	<i>Rats Wistar</i>	57,5 min	45s à 6% - 5min à 21%	↑	=	↑(TTI)	↑
	<i>Lee, 2013 (234)</i>	<i>Souris C57BL6</i>	8h	30s à 5% - 30s à 21%	=	=		↓
	<i>Moreau, 2013 (235)</i>	<i>Rats Sprague-Dawley</i>	8h	80s à 6,5% - 120s à 21%	=	=		
	<i>Jun, 2014 (231)</i>	<i>Souris C57BL6</i>	5h	30s à 5% - 30s à 21%	↑	=		↓
Modèle obèse	<i>Reinke, 2011 (225)</i>	<i>Souris C57BL6</i>	12h	30s à 5% - 30s à 21%	↑	=		

Tableau 1: Effets d'une exposition aiguë à l'hypoxie intermittente

Les effets de l'HI sur le taux d'insuline plasmatiques sont plus diversifiés. Une grande partie des études montrent une augmentation de l'insuline plasmatique chez des rats ou des souris exposées à l'HI (237-239; 242; 244-246; 248; 253). Une diminution de l'insulinémie a néanmoins été observée dans des conditions similaires d'exposition (249-251; 254). Par ailleurs, quelques autres études n'ont pas mis en évidence de changement plasmatique du niveau d'insuline (236; 237; 240; 241; 243; 252; 253).

Alors que les résultats ne paraissent pas toujours concordants concernant les paramètres plasmatiques, il apparaît clairement qu'une exposition chronique à l'HI induit une résistance à l'insuline. En effet, mis à part une étude démontrant que 5 jours d'HI diminue l'index HOMA et donc améliore la sensibilité à l'insuline (236), les autres mettent toutes en évidence une diminution de la sensibilité à l'insuline, évaluée par le HOMA (238; 242; 243; 247; 248; 253); (244) ou lors de tests métaboliques tels que des tests de tolérance à l'insuline (237; 248; 252; 255) ou des clamps euglycémiques-hyperinsulinémiques (239).

Concernant la tolérance au glucose les données sont plus difficilement interprétables. En effet, une amélioration de la tolérance au glucose a été montrée chez des souris exposées 5 jours à l'HI (236), alors que d'autres études ont vu une altération de cette tolérance au

glucose (240; 244; 248; 251; 254) ou alors qu'elle n'était pas modifiée par l'HI (237; 240; 243; 247; 248; 252; 253). Globalement il apparait que le temps d'exposition soit un facteur majeur dans ces différences, puisque lors d'une même étude, Fenik et al., ont montré que sur des souris C57BL6 une exposition de 7 jours ou 35 jours à l'HI induit une intolérance au glucose, alors qu'elle n'est pas modifiée à 21 jours (240). De même, Polak et al., ne voient une altération de tolérance au glucose qu'après 14 jours d'HI et non pas après 7 jours (248). De plus, dans plusieurs des études citées, la résistance à l'insuline ne s'accompagne pas toujours d'une détérioration de la tolérance au glucose (247; 252; 253).

Exposition chronique à l'hypoxie intermittente			Durée d'exposition par jour	Cycles	Glycémie	Insulinémie	Sensibilité à l'insuline	Tolérance au glucose
Modèle mince	Polotsky, 2003 (236)	<i>Souris C57BL6</i>	16h	30s à 5% - 30s à 21%	↓	=	↑(HOMA)	↑
	Li, 2005 (241)	<i>Souris C57BL6</i>	12h	30s à 5% - 30s à 21%	=	=		
	Li, 2006 (246)	<i>Souris WT</i>	12h	30s à 5% - 30s à 21%	↑	↑		
	Savransky, 2007 (249)	<i>Souris C57BL6</i>	12h	30s à 5% - 30s à 21%	↑	↓		
	Savransky, 2007 (250)	<i>Souris C57BL6</i>	12h	30s à 5% - 30s à 21%	↑	↓		
	Chen, 2010 (239)	<i>Rat Sprague Dawley</i>	10h	60s à 8% - 120s à 21%	=	↑	↓ (clamp EH)	
	Drager, 2011 (243)	<i>Souris C57BL6</i>	12h	30s à 6% - 30s à 21%	=	=	↓(HOMA)	↓
	Fenik, 2012 (240)	<i>Rats Sprague Dawley</i>	10h	90s à 10% - 90s à 21%	↑	=	=	↓
	Lee, 2013 (234)	<i>Souris C57BL6</i>	12h	30s à 5% - 30s à 21%	=	=		=
	Wang, 2013 (242)	<i>Souris C57BL6</i>	8h	15s à 5% - 5min à 21%	=	↑	↓(HOMA)	↓
	Polak, 2013 (248)	<i>Souris C57BL6</i>	12h	30s à 6% - 30s à 21%	↑	↑	↓(TTI)	↓
	Sherwani, 2013 (251)	<i>Souris Thallyho/Jngl</i>	8h	80s à 5% - 160s à 21%	↑	↓		↓
	He, 2014 (245)	<i>Rats Wistar</i>	8h	30s à 7,5% - 90s à 21%	↑	↑		
	Pae, 2014 (254)	<i>Rats Sprague-Dawley</i>	1h	4min à 10% - 4min à 21%		↓		↓
	Poulain, 2014 (255)	<i>Souris ApoE-/-</i>	8h	30s à 5% - 30s à 21%			↓(TTI)	
Carreras, 2014 (238)	<i>Souris C57BL6</i>	12h	90s à 6,4% - 90s à 21%	=	↑	↓ (HOMA)		

Tableau 2: Effets d'une exposition chronique à l'hypoxie intermittente

Ici, encore l'impact de l'obésité associée à l'HI a été observé. Des études basées sur des expositions chroniques ont montré la même chose avec des niveaux de glycémie et d'insuline d'autant plus élevés dans les groupes hypoxiques et obèses (247). Il apparaît même que l'obésité permet de déceler les effets de l'HI que l'on ne met pas forcément en évidence chez des animaux minces. En effet, l'impact de l'HI est d'autant plus important chez les animaux obèses avec une différence de tolérance au glucose, de glycémie ou d'insuline plasmatique beaucoup plus marquée entre la normoxie et l'hypoxie chez les animaux obèses (243). Une autre étude a même mis en évidence des altérations métaboliques uniquement chez des animaux obèses et exposés longtemps à l'HI (236).

Alors qu'il apparaît que l'HI induit des modifications de l'homéostasie glucidique, l'étude plus approfondie des voies moléculaires impliquées dans ces altérations, apparaissent importante pour établir clairement l'impact de cette HI.

La voie de signalisation à l'insuline a été peu étudiée dans le contexte de l'HI, les études se sont attardées surtout sur l'état de phosphorylation de la protéine AKT.

Ainsi, une diminution de la phosphorylation d'AKT a été montrée dans le foie de rats exposés 28 jours à l'HI (242) ainsi que dans le tissu adipeux et le muscle squelettique de souris exposées 6 ou 8 semaines à l'HI (238; 252; 253). Cependant, aucune différence de phosphorylation d'AKT n'a été observée dans le muscle soléaire de souris exposées 1 jour ou 4 semaines à l'HI (234). Au contraire, Rafacho et al., ont mis en évidence que l'amélioration de sensibilité à l'insuline de rats exposés de façon aiguë à l'HI était associée à une augmentation de la phosphorylation d'AKT dans le muscle squelettique (233). De plus, l'HI induit une diminution d'expression de la PI3K dans le tissu adipeux de souris minces exposées 12 semaines à l'HI (236). Pour finir, une augmentation des ARNm de PECK et G6P ont été mis en évidence dans les foies de souris exposées 14 jours ou 6 semaines (248; 252), ainsi qu'une augmentation des ARNm du récepteur à l'insuline et de GLUT2 dans les foies de rats exposés 28 jours à l'HI (242). Une diminution de la quantité de GLUT4 a été associée à une diminution de sensibilité de l'insuline uniquement chez des rats exposés 40 jours à l'HI (239). Ainsi, il apparaît que l'état de résistance à l'insuline puisse impliquer une altération de

la cascade de signalisation à l'insuline ; cependant selon les études, les tissus ne semblent pas tous affectés.

Alors que l'hypoxie est connue pour être un des activateurs de l'AMPK (256), seulement 2 études ont recherché l'activation de l'AMPK en hypoxie intermittente. La première a montré une diminution de l'activation de l'AMPK dans le muscle génioglosse de rats exposés à l'HI (257), tandis que la seconde a mis en évidence une augmentation de la phosphorylation de l'AMPK dans le muscle cardiaque de rats soumis à l'HIC (258).

La plupart des études sur des modèles d'HI, ont mis en évidence une diminution de poids et de prise alimentaire chez les animaux exposés à l'HI (225; 235; 240; 243); (259), suggérant une altération de la régulation de cette prise alimentaire. Volgin et al., ont mis en évidence une augmentation de l'expression des facteurs de transcription de la famille des STAT : STAT1, STAT3 et STAT5b, impliqués dans la signalisation induite par la leptine, dans l'hypothalamus de rats exposés 35 jours à l'HI (260). Les auteurs ont aussi montré une augmentation de l'expression des gènes codant pour les récepteurs α -adrénergiques au niveau hypothalamique dans ces conditions.

Une autre étude a observé qu'une exposition aigue à l'HI suffisait à induire une augmentation de la phosphorylation de STAT3 et une augmentation de l'activité des neurones POMC dans le noyau arqué de l'hypothalamus (235) chez le rat. Ces résultats étaient accompagnés d'une augmentation du taux de leptine plasmatique ainsi qu'une diminution de la prise alimentaire.

Ensemble ces résultats suggèrent que l'HI peut altérer la régulation du métabolisme à travers des mécanismes centraux et en réponse à des variations des taux d'hormones ou de catécholamines circulantes.

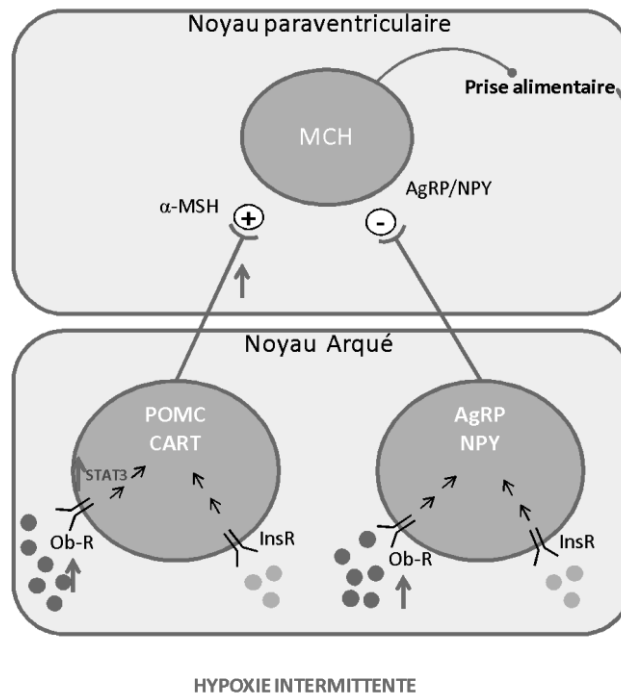


Figure 12: Effet de l'HI sur la régulation centrale de la prise alimentaire.

L'HI induit une augmentation de la leptine plasmatique, une augmentation de l'expression et de la phosphorylation de STAT3 et de l'activité des neurones à POMC. Ceci est associé à une diminution de la prise alimentaire (235; 260).

III-2-3 Mécanismes sous-jacents

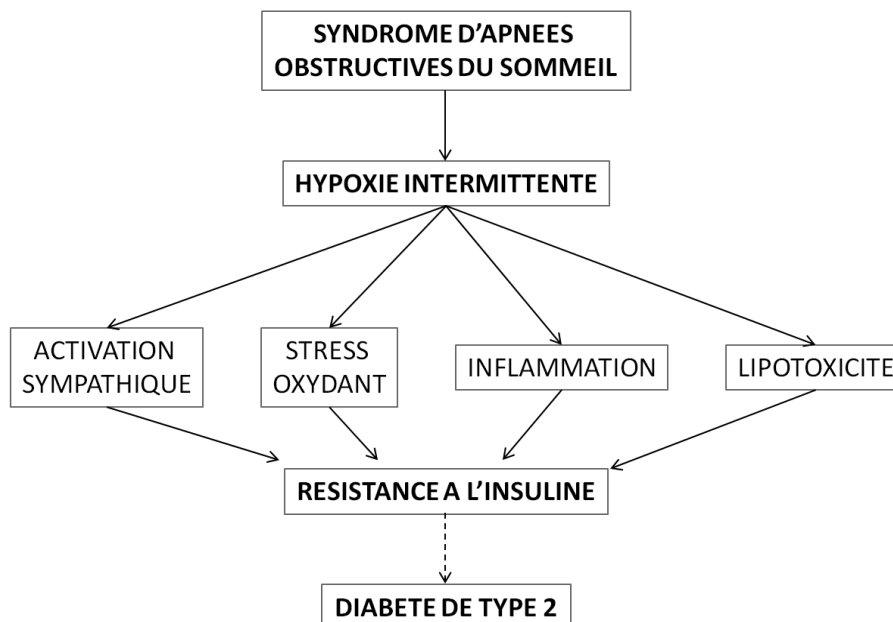


Figure 13: Mécanismes liant l'hypoxie intermittente induite par le syndrome d'apnées obstructives du sommeil et le développement des altérations métaboliques.

L'HI est connue pour être à l'origine d'une activation sympathique, d'un stress oxydant et d'une inflammation (261). Ces trois mécanismes peuvent tous agir de manière synergique dans l'altération de l'homéostasie du glucose associée à l'HI aussi bien au niveau de la signalisation de l'insuline, que de la régulation centrale du métabolisme et potentiellement de l'activation de l'AMPK.

III-2-3-1 Activation du système nerveux sympathique

Normalement, l'activité du système nerveux central diminue pendant le sommeil par rapport à la journée. Au contraire, les patients apnéiques présentent un haut niveau d'activité sympathique pendant la journée mais aussi pendant la nuit, associé à des niveaux élevés de catécholamines circulantes (262; 263). Les modèles humains et animaux du SAOS confirment ces résultats. En effet, une expérience de notre laboratoire, chez le sujet sain exposé à l'HI pendant 14 jours, montre une augmentation du système nerveux sympathique chez celui-ci (3). Plusieurs études chez le rongeur arrivent à la même conclusion (264). Une augmentation du tonus sympathique a un impact sur le métabolisme, à travers l'innervation du foie, du pancréas, du muscle squelettiques et du tissu adipeux (265). L'adrénaline sécrétée par la médullo-surrénale sous le contrôle du système nerveux autonome, augmente la production de glucose et altère la sécrétion d'insuline, favorisant le développement d'une résistance à l'insuline (266). L'inhibition du système nerveux sympathique par la dénervation des corps carotidiens abolit la résistance à l'insuline induite par un régime riche en graisse (267). De plus, l'adrénaline et la noradrénaline sont connues depuis longtemps pour être des médiateurs cruciaux dans la lipolyse du tissu adipeux (268). En effet, le système catécholaminergique induit une lipolyse dans le tissu adipeux à travers différents type de récepteurs β -adrénergiques (269). La lipolyse et la résistance à l'insuline induites par l'HI pourraient être provoquées par l'activation du système nerveux sympathique. Chez le volontaire humain, une exposition de 5 heures à l'HI induit une diminution de la sensibilité à l'insuline associée à une augmentation de l'activité du système nerveux sympathique (270). Cependant, chez la souris, le blocage du SNS pharmacologiquement suggère que le développement de la résistance à l'insuline est indépendant de l'activité sympathique (232). De récentes études ont montré que l'hyperglycémie ou l'intolérance au glucose induites par l'HI chez la souris étaient abolies lors de la dénervation des corps carotidiens, du blocage des

récepteurs α -adrénergiques ou d'une surrénalectomie médullaire, mais sans impacter la sensibilité à l'insuline (231; 252; 253).

III-2-3-2 Stress oxydant

La présence de stress oxydant dans le SAOS et sa place importante dans les pathologies associées à ce syndrome ont été bien démontrées (271). En effet, les désaturations et resaturations en oxygène engendrent la production de radicaux libres (272). Dans les modèles animaux d'HI, de nombreuses études ont fait le lien entre le stress oxydant et les atteintes cardiaques (273) et vasculaires (274). L'augmentation du stress oxydant est différente entre les organes. Le foie semble impacté, avec une augmentation d'expression d'une des sous-unités (p47phox) de la NADPH oxidase, enzyme générant des ions superoxydes, associée à une augmentation de la peroxydation des lipides (275). Une activation chronique de stress oxydant a été associée à une résistance à l'insuline *in vitro* (276). D'autres études ont mis en évidence l'association du stress oxydant avec la résistance à l'insuline *in vivo* dans le contexte du diabète (277; 278), de l'obésité (279) ou du syndrome métabolique. Ces résultats ont été retrouvés dans des modèles animaux où une augmentation de stress oxydant a été retrouvée dans le foie, le tissu adipeux ou le muscle squelettique de souris nourries avec des régimes riches en graisses (280; 281; 282). Une étude a montré *in vitro* qu'une augmentation de ROS pouvait induire l'activation de protéines serine kinases (283) qui sont impliquées dans les phosphorylations inhibitrices du récepteur de l'insuline et de ses substrats dans des modèles de résistance à l'insuline (284). Les effets bénéfiques de traitements antioxydants supportent le lien entre résistance à l'insuline et stress oxydant. En effet, des études chez des modèles animaux de diabète indiquent que les antioxydants améliorent la sensibilité à l'insuline (285).

Le stress oxydant a donc été étudié et envisagé comme cause des troubles métaboliques associés à l'HI. En effet, une augmentation de la peroxydation des lipides du foie chez des souris minces (225; 243; 248; 250) ou obèses (225; 243) a été observée que ce soit lors d'expositions aiguës (225; 247) ou chroniques (243; 247; 248; 250).

Des essais cliniques ont démontré une amélioration de sensibilité à l'insuline chez des patients apnéiques insulino-résistants traités avec des anti-oxydants tels que la vitamine C,

la vitamine E ou la N-acétylcystéine (286 ; 287; 288). De la même façon, des traitements antioxydants ont été envisagés chez l'animal exposé à l'HI. Ainsi, un traitement au resvératrol, molécule antioxydante, abolit l'augmentation d'insuline plasmatique et de l'index de résistance à l'insuline, HOMA, induite par l'HI (238; 242). Il améliore la sensibilité à l'insuline évaluée par la phosphorylation des protéines PI3K et Akt dans le foie ou le tissu adipeux (238; 242).

III-2-3-3 Inflammation

Le SAOS est reconnu comme une pathologie inflammatoire (289). L'hypoxie intermittente est bien connue comme induisant une inflammation, et le rôle de l'inflammation dans les conséquences délétères de l'HI a été mis en évidence dans plusieurs études et au niveau de plusieurs organes (290). En particulier, une exposition aiguë à l'HI induit une augmentation de l'expression de TNF α dans le tissu adipeux epididymal (225). Plus récemment, l'étude par cytométrie en flux de la fraction stromale du tissu adipeux de souris minces exposées à l'HI pendant 8 semaines a mis en évidence une augmentation du nombre de macrophages ainsi qu'une augmentation de macrophages avec un phénotype pro-inflammatoire vs une diminution de ceux ayant un phénotype anti-inflammatoire (237). Des travaux ont mis en évidence que l'environnement pro-inflammatoire pouvait entraîner un changement de phénotype des macrophages. En effet, alors que les macrophages résidents du tissu adipeux de souris minces expriment des gènes caractéristiques des macrophages M2 « anti-inflammatoire » qui peuvent protéger les adipocytes contre l'inflammation, lors d'un régime riche en graisse, les macrophages subissent une transformation vers un état « pro-inflammatoire M1 » qui contribue à la résistance à l'insuline (291; 292). Les macrophages expriment alors des marqueurs spécifiques de cet état M1 comme CD11c (293). En outre, dans notre équipe nous avons mis en évidence que la délétion du récepteur *toll-like receptor 4* (TLR-4) protégeait les souris de la résistance à l'insuline induite par l'HI (294). Comme pour le tissu adipeux, il existe un lien fort entre inflammation et atteinte métabolique au niveau du foie. Le foie contient de nombreuses cellules immunitaires dont des lymphocytes et des macrophages résidents spécifiques du foie, les cellules de Kupffer. De la même façon, les cellules de Kupffer ont la possibilité de se polariser vers un état pro-inflammatoire M1 (295).

Des patients ayant une stéatose et une fibrose hépatique présentent une augmentation de l'expression de TNF α (296). De même, l'inhibition de TNF α améliore la stéatose hépatique induite par un régime riche en graisse chez la souris (297). La déplétion des cellules de Kupffer prévient du développement de la résistance à l'insuline hépatique induite par un régime riche en graisse (298). Une exposition chronique à l'HI induit une augmentation de l'activité de NF κ B (247; 249) et une augmentation de l'expression de de TNF α ou MIP-2 (243) dans le foie de souris minces ou obèses. Plusieurs études ont mis en évidence des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires circulantes chez les patients apnéiques avec plus ou moins d'effets bénéfiques sur ces paramètres du traitement par pression positive continue (299; 300).

III-2-3-4 Lipotoxicité

La résistance à l'insuline dans le tissu adipeux induit une moindre inhibition de la lipolyse par l'insuline et entraîne alors une augmentation de la sécrétion d'acides gras libres par les adipocytes. Un niveau élevé d'acides gras circulants sécrétés par le tissu adipeux est associé à l'accumulation de graisse ectopique et responsable de la résistance à l'insuline dans le muscle squelettique et le foie (301). L'HI est connue pour induire une dyslipidémie. En effet, une exposition à l'HI de 5 jours à 12 semaines chez des souris sauvages ou ApoE $^{-/-}$ induit une augmentation des niveaux plasmatiques de cholestérol total, de LDL-cholestérol ainsi que de triglycérides (241; 302; 303). De plus, le niveau d'acides gras libres est lui aussi augmenté après une exposition à l'HI de 2 semaines (303), suggérant une activation de la lipolyse au niveau du tissu adipeux.

Drager et al., ont montré qu'une exposition de 4 semaines à l'HI induisait une surexpression de l'*angiopoïétine like 4* (Angptl4) associée à une diminution de l'activité de la lipoprotéine lipase dans le tissu adipeux épидidymal de souris (304). La *lipoprotéine lipase* (LPL) est une enzyme qui hydrolyse les TG circulants pour permettre l'entrée des AG dans la cellule via la *FA transport protein* (FATP) et le CD36. Cette protéine semble jouer un rôle majeur dans l'accumulation intra-organite de lipides et le développement d'une résistance à l'insuline. La surexpression spécifique de la lipoprotéine lipase dans le muscle ou le foie, induit une augmentation de l'entrée de lipide dans le muscle et une stéatose hépatique

respectivement, conduisant à une résistance à l'insuline dans le tissu (305). Au contraire, la délétion musculaire de la LPL (306), de CD36 (307) ou de FATP1 (308), protège contre l'accumulation de lipide dans le muscle et la résistance à l'insuline concomitante. Plusieurs études récentes ont fait le lien entre stéatose hépatique non alcoolique et SAOS (309). Minville et al., ont de plus suggéré que la sévérité de l'hypoxie nocturne est indépendamment associée à la stéatose, et que l'obésité préexistante exacerbe l'effet de l'hypoxie (310). D'un point de vue expérimental, des dommages structurels dans le foie ont été mis en évidence lors d'une exposition à l'HI (311). Alors qu'une exposition de 4 ou 12 semaines à l'HI ne semble pas modifier le contenu du foie en 13 triglycérides de souris minces, celui-ci augmente en présence d'une obésité (243; 250). En effet, l'exposition à l'HI conduit à une augmentation de la biosynthèse des lipides dans le foie pouvant être responsable d'une accumulation de lipides hépatiques (312).

OBJECTIFS

L'hypoxie intermittente (HI) est une conséquence délétère du syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) et a été suggéré comme pouvant être une des causes principales des pathologies métaboliques et cardiovasculaires associées au SAOS. Des modèles d'HI chez l'animal ont démontré une diminution de la sensibilité à l'insuline mais les mécanismes moléculaires sous-tendant ces altérations sont mal connus. D'autre part, des effets bénéfiques ou délétères de l'HI sur l'homéostasie glucidique ont été rapportés dans la littérature et restent donc conflictuels à l'heure actuelle.

L'objectif général de cette thèse était d'étudier les conséquences et les mécanismes sous jacents d'une exposition chronique à l'HI sur l'homéostasie métabolique et le développement de l'athérosclérose dans différents modèles murins.

Dans le chapitre 1, nous avons dans un premier temps caractérisé les effets d'une exposition chronique à l'HI sur la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose au niveau systémique chez la souris, puis étudié en détails les mécanismes moléculaires sous jacents dans les principaux tissus métaboliques.

Dans le chapitre 2, nous avons réalisé une analyse combinée par immunohistologie et transcriptomique du tissu adipeux et du foie de souris soumises à une HI chronique afin d'essayer d'identifier de nouvelles voies mécanistiques potentiellement impliquées dans les altérations métaboliques associées à l'HI.

Dans le chapitre 3, le rôle du tissu adipeux dans le développement de l'athérosclérose lors d'une exposition chronique à l'HI a été étudié chez la souris transgénique déficiente pour l'ApoE.

Enfin, le facteur de transcription HIF-1 a été impliqué dans les effets de l'hypoxie et la régulation du métabolisme énergétique. Dans le chapitre 4, nous avons donc évalué les effets d'une délétion de PHD1, une des principales protéines régulatrices de HIF1, sur la sensibilité à l'insuline et l'homéostasie du glucose dans un modèle de souris transgénique.

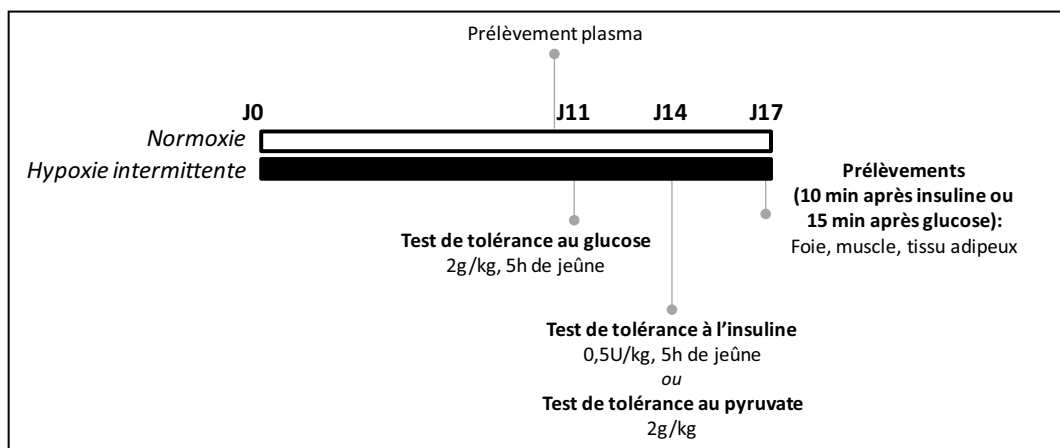
MATERIEL ET METHODES

I-ANIMAUX ET DESIGN EXPERIMENTAUX

Les animaux des différentes études ont été hébergés dans des conditions réglementaires de température (20-24°C) et d'hygrométrie avec des cycles d'alternance jour/ nuit de 12h. L'accès à l'eau et à la nourriture se faisait ad libitum sauf dans des conditions expérimentales particulières qui seront détaillées ci-dessous. Le projet a reçu l'autorisation du ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche pour l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques (n°20150414171623568V26-APAFIS#641).

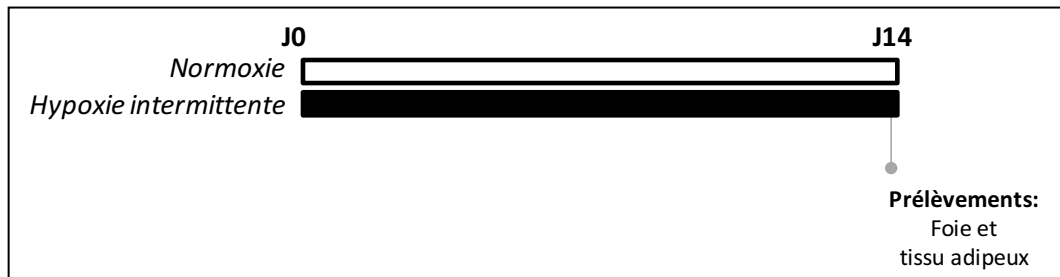
I-1 Chapitre 1

Dans cette étude, des souris **C57BL/6j** âgées de 8 semaines ont été exposées à la normoxie (N) et à l'hypoxie intermittente (HI) pendant 17 jours (voir II-Modèle d' HI). Le poids et la prise alimentaire ont été suivis pendant l'exposition. Des prélèvements plasmatiques ont été réalisés à la fin de l'exposition, ainsi les tests métaboliques (voir chronologie ci-dessous). Les tissus ont été prélevés à la fin de l'expérimentation selon plusieurs conditions : injection de NaCl, pour la condition contrôle, injection de glucose (2g/kg) et injection d'insuline (0,5U/kg) respectivement 15 et 10 minutes avant la mise à mort des animaux.



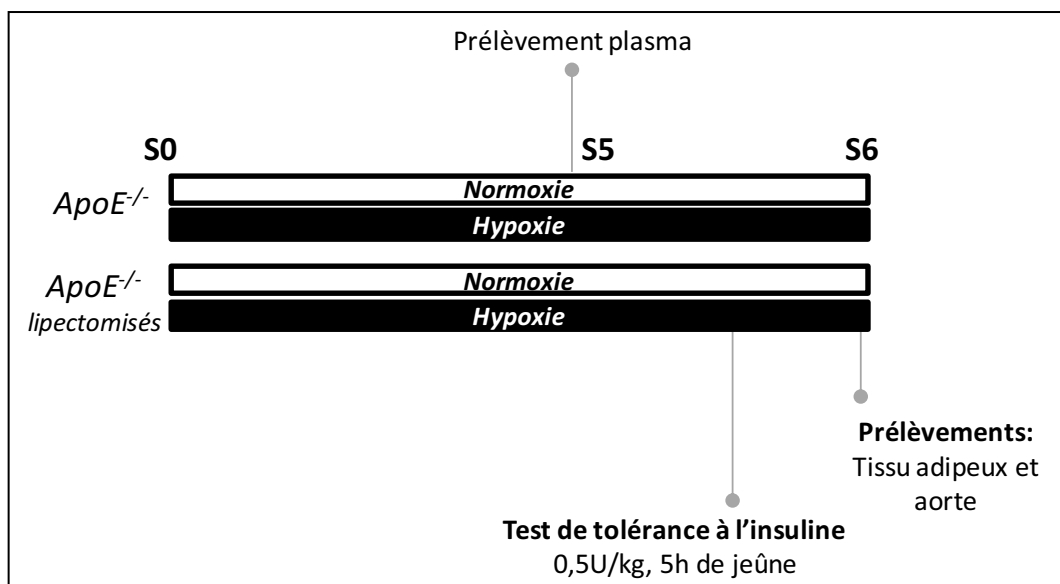
I-2 Chapitre 2

Dans cette seconde étude, des souris de fond génétique **Swiss x 129**, âgées de 8 semaines ont été exposées 14 jours à la N et à l'HI. Ces animaux n'ont pas eu d'évaluation métabolique. Le foie et le tissu adipeux ont été prélevés après 14 jours d'HI sans autre intervention.



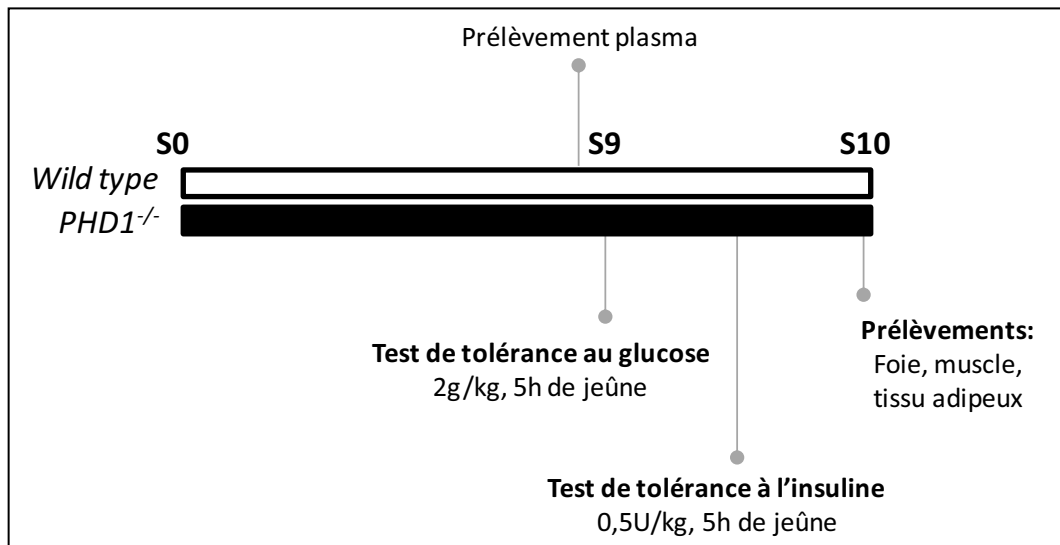
I-3 Chapitre 3

Dans ce chapitre, nous avons utilisés des souris déficientes pour l'apolipoprotéine E ($ApoE^{-/-}$) de fond génétique **C57BL/6j**, qui développent des plaques athéromateuses. Elles ont été exposées pendant 6 semaines à l'HI ou la N. Une partie des animaux a subi une lipectomie du tissu adipeux épididymal avant l'exposition.

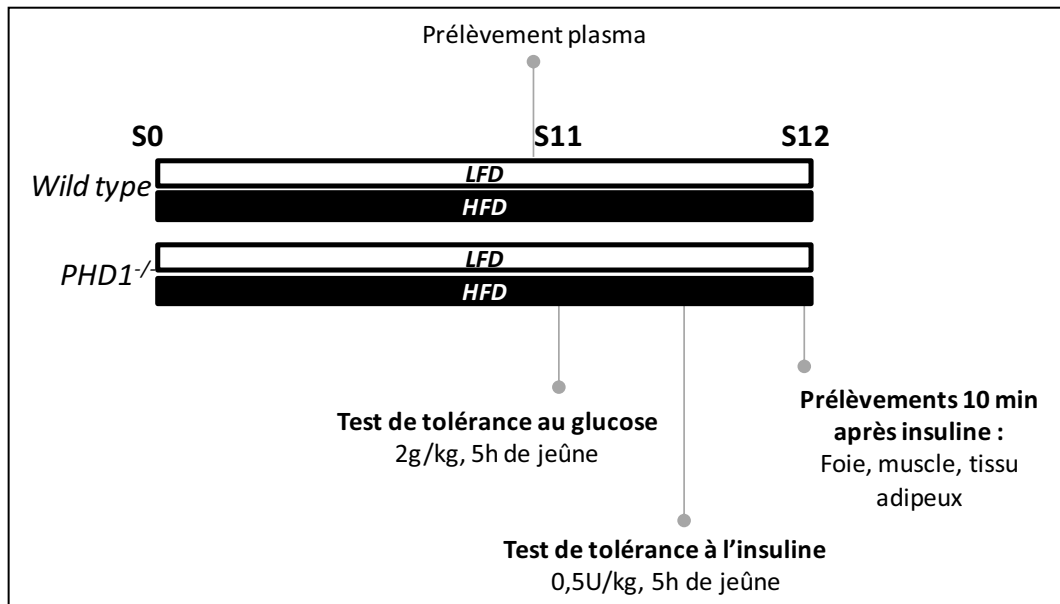


I-4 Chapitre 4

Dans cette étude, des souris de fond génétique **Swiss x 129**, wild type (WT) et déficiente pour la protéine PHD1 ($PHD1^{-/-}$), âgées de 8 à 13 semaines ont été utilisées. Une partie des animaux a été soumise à un régime standard et étudiée à l'âge de 10 semaines.



Une seconde partie a été soumise à un régime riche en graisse ou High-fat diet, HFD (60% énergie venant du gras; D13091502 ; Research Diets) ou pauvre en graisse ou low fat diet, LFD (10% énergie venant du gras; D13091501; Research Diets) à partir de l'âge de 8 semaines et pendant 12 semaines. Le poids et la prise alimentaire ont été suivis pendant plusieurs semaines pour le premier groupe expérimental et tout au long du régime pour le second groupe. Des prélèvements plasmatiques ont été réalisés, ainsi que des tests métaboliques (voir chronologie ci-dessous). Les tissus ont été prélevés à la fin de l'expérimentation après une injection d'insuline (0,5U/kg) 10 minutes avant la mise à mort des animaux.



II-MODELE D'HYPOXIE INTERMITTENTE (HI)

L'hypoxie est obtenue par un enrichissement du milieu en azote, directement dans les cages d'hébergements des animaux. Ce mélange d'air est injecté dans les cages en alternance avec de l'air afin d'obtenir une hypoxie intermittente (HI). Un système d'électrovannes dont l'ouverture et la fermeture sont commandées de façon électronique par un système de pilotage informatisé, permet d'obtenir des cycles d'hypoxie/normoxie de très courte durée grâce à une injection très précise des mélanges gazeux. Le développement de ce système a été réalisé au sein du laboratoire HP2 en partenariat avec l'entreprise André Cros S.A., Echirolles, France.

Les animaux hypoxique sont exposés à l'HI 8h par jour (de 6h à 14h) avec des cycles de 1 minute, composés de 30 secondes d'hypoxie avec une fraction inspirée d'oxygène(FiO₂) à 5% et de 30 secondes de normoxie à 21%. Les animaux normoxiques sont soumis aux même flux d'air mais la FiO₂ dans les cages est maintenue à 21%. De cette façon les animaux en normoxie sont eux aussi soumis au stress engendré par le bruit et le souffle d'air.

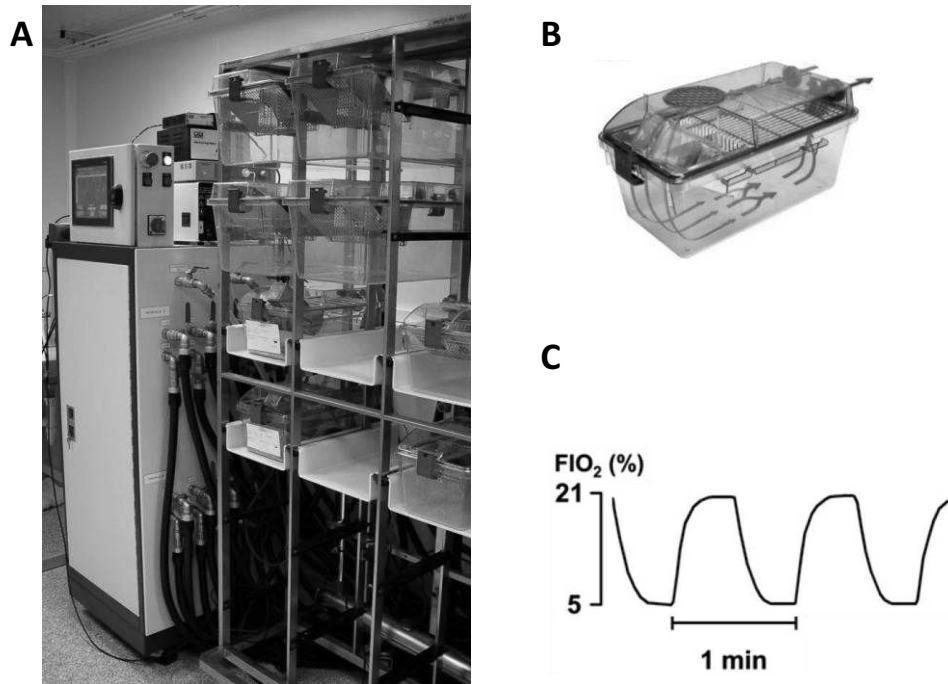


Figure 14: Dispositif d'hypoxie intermittente chez le rongeur.

Les cages sont placées sur un portoir (A) permettant une distribution homogène de l'air dans toutes les cages (B). La fraction en oxygène de l'air est modulée par un enrichissement en azote permettant d'obtenir le cycle d'HI suivant : $FiO_2=21\%$ durant 30 secondes puis $FiO_2=5\%$ durant 30 secondes.

III-TECHNIQUE D'EXPERIMENTATION ANIMALE

III-1 Analyses sanguine et plasmatiques

III-1-1 Mesure de la glycémie

La glycémie est mesurée après une petite incision à l'extrémité de la queue. Une goutte de sang est utilisée pour mesurer la glycémie avec un glucomètre One-touch ultra, Lifescan. Elle est exprimée en mg/dl.

III-1-2 Mesures plasmatiques d'insuline, de cholestérol et de triglycérides

Après incision de l'extrémité de la queue, du sang est collecté sur animal éveillé et à jeun (de 6 à 16h selon l'expérimentation) dans un capillaire hépariné. Le capillaire est ensuite centrifugé à 3000 rpm pendant 7 minutes à température ambiante.

III-1-2-1-Mesure de l'hématocrite

L'hématocrite est le rapport de la quantité de globules rouges par rapport au volume de sang total. Elle est exprimée en %.

III-1-2-2--Dosage de l'insuline

L'insuline plasmatique a été dosée avec un kit ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Elle est exprimée en ng/ml.

III-1-2-3-Dosage des triglycérides et du cholestérol plasmatiques

Les triglycérides et le cholestérol total sont dosés avec un test enzymatique en utilisant les kits enzymatiques 236691, 11488872 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). Elles sont exprimées en mg/ml.

III-2 Test de tolérance au glucose, à l'insuline et au pyruvate

Les tests de tolérance à l'insuline et au glucose ont tous été réalisés après 6h de jeune. Le test de tolérance au pyruvate a été réalisé après une nuit à jeun (16h). Après une prise de sang initial (t=0), une injection intrapéritonéale de glucose (2 g/kg de poids total), d'insuline (0,5 U/kg de poids total) ou de pyruvate (2 g/kg de poids total) a été réalisée sur des souris éveillées. Le taux de glucose sanguin a ensuite été mesuré en faisant saigner la queue à 15, 30, 60, 90 et 120 minutes en utilisant un glucomètre.

IV-TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE DOSAGES BIOCHIMIQUES SUR TISSUS CONGELES

IV-1 Composition lipidique du foie

Des petits morceaux de foies ont été homogénéisés dans du méthanol froid. Après centrifugation, les lipides ont été extraits par addition de 1800 µl de CH₃OH:CHCl₃ (1:3 v/v) à 45 µl d'homogénat, suivi d'un mélange par vortex et d'une séparation de phase par centrifugation (1400 rpm; 15 min à température ambiante). La phase organique a été séchée et dissoute dans de l'eau avec du triton X-100 à 2%. Les triglycérides et le cholestérol ont été dosés comme décrit dans la partie 1-2-c. La quantité de lipides a été exprimée en mg par mg de protéine déterminée par un dosage de Bradford (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France).

IV-2 Détermination du contenu en glycogène du foie

Des morceaux congelés de foie d'environ 20 mg ont été homogénéisés dans 500 µl de 0,5 M de NaOH, puis chauffés à 100°C pendant 15 minutes. Après refroidissement, 200 µl d'acide acétique à 2 M ont été ajoutés suivi d'une centrifugation de 2 minutes à 2500 g. Ensuite, 100 µl ont été ajoutés, suivi d'une incubation de 30 minutes à 40 °C avec de amylo (alpha-1,4-alpha-1,6)-glucosidase (102857, Roche diagnostics, Meylan, France) dans un tampon contenant 66 mM Pi, 2 mM Mg²⁺, 1,5 mM ATP 1,5 mM NADP, et 2,25 U/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase (127 655, Roche diagnostics, Meylan, France). L'absorbance a été lue à 340 nm en utilisant un spectrophotomètre (Microplate reader 680, Biorad) avant et 15 minutes après l'addition d'hexokinase à 1,54 U/ml (1426362, Roche diagnostics, Meylan, France).

IV-3 Western Blot

Des échantillons d'environ 50 mg de foie, de muscle squelettique et de tissu adipeux épидидymal ont été lysés dans du tampon refroidi contenant: 50 mM d'Hepes (pH 7.6), 50 mM de NaF, 50 mM de KCl, 5 mM de NaPPi, 1 mM d'EDTA, 1 mM d'EGTA, 1 mM de DTT, 5 mM de β-glycerophosphate, 1 mM de sodium vanadate, 1% de NP40 et de cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete, Roche, Mijdrecht, The Netherlands). Les échantillons ont été séparés par électrophorèse SDS-Page, puis transférés sur membrane PVDF. Les membranes ont alors été incubées avec des anticorps primaires, puis des anticorps secondaires. Les bandes ont été visualisées par chimiluminescence et les images quantifiées à l'aide du logiciel Image J (NIH, US).

IV-4 PCR quantitative

Des morceaux d'environ 20 à 50 mg de foie, de muscle squelettique ou de tissu adipeux épидидymal ont été lysés dans 1 ml de trizol (Trireagent, Sigma). Les protéines sont précipitées en ajoutant 200µl de choloforme et centrifugation à 12000 g, 15 minutes, 4°C. L'ARN est ensuite précipité par l'ajout de 500 µl de 2-propanol à la phase aqueuse et centrifugation à 12000 g, 10 minutes, 4°C. 0,5 µg d'ARN est soumis à une transcription inversée pour obtenir de l'ADN complémentaire par utilisation d'une enzyme de rétrotranscription iScript (Biorad). L'ADNc est alors utilisé pour la qPCR (quantitative

polymerase chain reaction) en temps réel. Les gènes sont amplifiés dans un thermocycleur Biorad (40 cycles de: 30 secondes à 95°C, 5 secondes à 95°C et 10 secondes à 60°C).

V-ANALYSES STATISTIQUES

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (erreur standard à la moyenne). L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel Graphpad Prism 6 pour windows (San diego, California USA). Les données ont été comparées soit par des tests de Student soit par des analyses de variances (ANOVA) associées à des tests *post-hoc* (Sidak ou Tukey). Les différences entre les groupes ont été considérées statistiquement significative pour un $p < 0,05$.

La partie "Matériel et Méthodes" se limite aux expérimentations que j'ai réalisées moi-même dans les différentes études. Les expérimentations réalisées par les autres co-auteurs sont complétées dans les parties « matériel et méthodes » de chaque article.

RESULTATS

CHAPITRE 1 : ETUDE DE L'ALTERATION DE LA SENSIBILITE A L'INSULINE ET DU METABOLISME GLUCIDIQUE INDUITE PAR L'HYPOXIE INTERMITTENTE

Des modèles d'HI chez l'animal ont mis en évidence une diminution de la sensibilité à l'insuline mais les mécanismes moléculaires sous-tendant ces altérations sont mal connus. D'autre part, des effets bénéfiques ou délétères de l'HI sur l'homéostasie glucidique ont été rapportés dans la littérature et restent donc conflictuels à l'heure actuelle.

Dans ce chapitre, nous avons dans un premier temps **caractérisé les effets d'une exposition chronique à l'HI** sur la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose au niveau systémique chez la souris, puis **étudié en détails les mécanismes moléculaires** sous jacents dans les principaux tissus métaboliques.

Dans cette étude, nous avons confirmé que l'HIC réduisait la sensibilité à l'insuline systémique chez la souris. De plus, nous avons montré pour la première fois que cela était secondaire à des altérations de la signalisation de l'insuline dans les trois principaux tissus métaboliques impliqués dans la régulation de l'homéostasie du glucose, à savoir le foie , le tissu adipeux et le muscle squelettique.

L'autre découverte importante a été la démonstration que, malgré l'induction d'une résistance à l'insuline, l'HIC améliorait la tolérance au glucose, très certainement en favorisant l'absorption de glucose induite par l'activation de la voie de l'AMPK dans le muscle squelettique.

Globalement, nous avons montré que l'HIC altère la sensibilité à l'insuline systémique mais améliore la tolérance au glucose en activant la voie de l'AMPK dans le muscle squelettique.

Chronic intermittent hypoxia impairs insulin sensitivity but improves whole-body glucose tolerance by activating skeletal muscle AMP-activated protein kinase in mice

Running title: Chronic intermittent hypoxia and metabolic homeostasis

Amandine Thomas^{1,2}, Elise Belaïdi^{1,2}, Gerard C. van der Zon³, Maurice Dematteis¹, Luc Bertrand⁴, Jean-Louis Pepin^{1,2}, Patrick Levy^{1,2} and Bruno Guigas^{3,5}

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

²*INSERM U1042, Grenoble, F-38042 France*

³*Department of Molecular Cell Biology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands*

⁴*Pole of Cardiovascular Research, Institut de Recherche Expérimentale et Clinique, Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium*

⁵*Department of Parasitology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands*

Address for correspondence: Dr. Bruno Guigas, Department of Parasitology, Leiden University Medical Center, P.O. Box 9600, Postzone L40-Q, 2300 RC Leiden, the Netherlands;

Tel. +31-71-52-61328; Fax: +31-71-52-68270; E-Mail: b.g.a.guigas@lumc.nl

ABSTRACT (250 Words)

Introduction: Obstructive sleep apnea syndrome is a highly prevalent disease resulting in chronic intermittent hypoxia (CIH). CIH is associated with insulin resistance and dysregulation of glucose homeostasis although conflicting results persist in the literature. In the present study, we investigated the effects and underlying mechanism(s) of CIH on whole-body insulin sensitivity and glucose tolerance in mice.

Methods: C57Bl6/J male mice were exposed to CIH (1 min cycle, FiO₂ 21-5%, 8h/day) or normoxia during two weeks. Fasting plasma parameters, hepatic lipid composition, and whole-body insulin sensitivity and glucose tolerance were determined. Changes in various signaling pathways and expression of key metabolic/inflammatory genes were assessed in liver, skeletal muscle and white adipose tissue (WAT) by western blot and qPCR.

Results: CIH reduced food intake and body weight in mice. Blood glucose was not affected whereas plasma insulin level was increased by CIH, indicating systemic insulin resistance. In line with this, whole-body insulin sensitivity assessed by intraperitoneal insulin tolerance test was reduced in CIH mice. The insulin-induced phosphorylation of Protein Kinase B (PKB) and of some PKB downstream targets were also significantly reduced in liver, epididymal WAT and skeletal muscle, from CIH mice. Remarkably, CIH improved whole-body glucose tolerance, independently of changes in body weight, food intake and circulating insulin levels. This effect was associated with elevated Thr172-AMP-activated Protein Kinase (AMPK) phosphorylation in skeletal muscle, suggesting a tissue-specific AMPK-dependent increase in glucose uptake.

Conclusion: CIH impairs whole-body and tissue-specific insulin sensitivity while improving glucose tolerance by promoting skeletal muscle AMPK activation.

Key words: sleep apnea, intermittent hypoxia, insulin resistance, glucose tolerance, AMPK

Abbreviations

AMPK, AMP-activated protein kinase

AUC, area under curve

CIH, chronic intermittent hypoxia

eWAT, epididymal adipose tissue

FiO₂, fraction of inspired oxygen

GTT, glucose tolerance test

HOMA, homeostasis model assessment

ITT, insulin tolerance test

OSAS, Obstructive sleep apnea syndrome

TC, total cholesterol

TG, triglycerides

Introduction

Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) is characterized by recurrent pharyngeal collapse during sleep leading to transient respiratory arrest and intermittent hypoxia (IH). The prevalence of OSAS is increasing worldwide (1), mostly reflecting the parallel rise in obesity, a major risk factor for the disease (2). Indeed, half of the obese people are suffering from OSAS (3) and a strong link has been established between apneic pathology and metabolic disorders such as insulin resistance and type 2 diabetes (4).

Among the components of OSA, IH has been independently associated with metabolic dysfunctions (5) and acute exposure to IH was shown to decrease insulin sensitivity in healthy volunteers (6). As an experimental model for OSAS, various groups have investigated the impact of acute or chronic IH on whole-body insulin sensitivity and glucose homeostasis in rodents (7-10), (10-14), (15), (16), (17), (18). Although IH was generally found to impair insulin sensitivity in both rodents and humans (5; 8; 9; 14; 16; 18), the exact underlying molecular mechanism(s) remain mostly unknown to date, notably the respective contribution of the various metabolic organs to systemic insulin resistance. Among the possible mechanisms, adipose tissue inflammation has been recently suggested to be involved in metabolic alteration associated to IH (18), (19). On the other hand, some conflicting results were reported on the effects of IH on whole-body glucose homeostasis. For instance, whole-body glucose tolerance was shown to be impaired in lean and obese mice following acute or chronic exposure to IH (10). By contrast, glucose tolerance was reported to be improved in mice subjected to 5 days of IH (7) and rats acutely exposed to IH (13). Overall, these discrepancies might reflect differences in experimental protocols, including frequency, intensity and duration of IH, and/or the rodent models used.

In the present study, we investigate the effect of two weeks IH exposure on whole-body insulin sensitivity and glucose tolerance in mice and dissect the underlying molecular mechanisms in the main organs involved in the regulation of whole-body metabolic homeostasis, *i.e.* white adipose tissue, skeletal muscle and the liver.

Methods

Ethics. All mouse experiments were performed in accordance with the Institute for Laboratory Animal Research Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and have received approval from the ethical committee of the Université Grenoble Alpes (agreement number: B3851610006).

Animals and experimental design. In this study, 8 weeks-old male C57BL/6J mice (Janvier, France), were housed under standard conditions in conventional cages with *ad libitum* access to standard chow diet (RM1, Special Diets Services, Essex, England) and water. Upon randomization according to body weight, mice were next exposed to intermittent hypoxia (IH) for 2 weeks. IH was achieved in experimental cages as previously described (1). Briefly, the animals were exposed to IH (60-s cycle, 21% to 5% of Fraction of inspired oxygen, FiO₂) for 8 hours during daytime (6am-2pm). FiO₂ was measured with a gas analyzer (ML206, ADInstruments) throughout the experiment. In similar experimental cages located in the same animal facility, control animals were exposed to air (21% FiO₂) at similar flows than the IH stimulus to reproduce equivalent levels of noise and turbulences related to gas circulation. Ambient temperature was maintained at 20-22°C.

Plasma analysis. Blood samples were obtained in 6h unfed mice (food withdrawn at 6:00 am) via tail vein bleeding. Blood glucose levels were determined by use of a glucometer (OneTouch ultra, Lifescan, Issy-Les-Moulineaux, France). Plasma TC, TG and insulin levels were measured using the commercially available enzymatic kits 236691, 11488872 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) and ELISA insulin kit (#EZRMI, Milipore), respectively. The homeostatic model (HOMA), which is a good surrogate measure of whole-body insulin sensitivity in mice (20), was calculated as $([\text{glucose (mg/dl)} \times 0.055] \times [\text{insulin (ng/ml)} \times 172.1]) / 3857$.

Glucose, insulin and pyruvate tolerance tests

Whole-body glucose tolerance and insulin sensitivity were assessed by an intraperitoneal (i.p.) glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT), respectively. After an initial blood collection ($t = 0$), an i.p. injection of glucose (2g/kg total body weight) or insulin (0.5U/kg total body weight, NovoRapid, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) was performed in 6h-unfed conscious mice (food withdrawn at 6am). Blood glucose levels were next measured by tail bleeding at different time points using a glucometer (One Touch, Lifescan). A pyruvate tolerance test was also performed after an i.p. injection of sodium pyruvate (2 g/kg of total body weight) in 16h-fasted conscious mice. The area under the curve (AUC) for the glucose excursion was calculated using trapezoidal integration.

Hepatic lipid composition. Liver lipids were extracted as previously described (21). Briefly, small liver pieces were homogenized in ice-cold methanol. After centrifugation, lipids were extracted by addition of 1800 μ l CH₃OH: CHCl₃ (1:3 v/v) to 45 μ l homogenate, followed by vigorous vortexing and phase separation by centrifugation (14000 rpm; 15 min at RT). The organic phase was dried and dissolved in 2% Triton X-100 in water. TG and TC concentrations were measured using commercial kits as described above. Liver lipids were expressed as mg per mg protein, which was determined using the Bradford protein assay kit (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

Hepatic glycogen content. Liver glycogen content was extracted from 20 mg of frozen liver of 6h-fasted mice homogenized in 500 μ l of 0.5 M NaOH and boiled for 15 minutes. After cooling, 200 μ l of 2 M acetate was added followed by centrifugation (2 min, 2500g). 100 μ l of supernatant was next incubated for 30 min at 40°C with amylo(α -1,4- α -1,6)-glucosidase (102857, Roche diagnostics, Meylan, France) in a buffer containing 66 mM Pi, 2 mM Mg²⁺, 1,5 mM ATP, 1,5 mM NADP, and 2,25 U/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase (127 655, Roche diagnostics, Meylan, France). The absorbance was read at 340nm using a

spectrofluorometer (Microplate reader 680, Biorad) before and 15 min after addition of 1,54 U/ml hexokinase (1426362, Roche diagnostics, Meylan, France).

Western blot analysis. Snap-frozen liver, skeletal muscle and epididymal white adipose tissue samples (~50 mg) were lysed in ice-cold buffer containing: 50 mM Hepes (pH 7.6), 50 mM NaF, 50 mM KCl, 5 mM NaPPi, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 5 mM β -glycerophosphate, 1 mM sodium vanadate, 1% NP40 and protease inhibitors cocktail (Complete, Roche, Mijdrecht, The Netherlands). Western blots were performed as previously described (21). All the primary antibodies used are listed in **Supplementary Table 1**. Bands were visualized by enhanced chemiluminescence and quantified using Image J (NIH, US).

RNA purification and qRT-PCR. RNA was extracted from snap-frozen liver, skeletal muscle or epididymal white adipose tissue samples (~25 mg) using Trizol reagent RNA Isolation reagent (Sigma, Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Total RNA (0.5 μ g) was reverse transcribed and quantitative real-time PCR was then performed with SYBR Green Core Kit on a MyIQ thermal cycler (Bio-Rad). mRNA expression was normalized to mGUSb mRNA content and expressed as fold change compared to control mice using the $\Delta\Delta$ CT method. All the primers sequences are listed in **Supplementary Table 2**.

Statistical analysis. All data are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using Graphpad Prism 6 software package for Windows (San diego, California USA) with two-tailed unpaired Student's test when only 2 groups are compared, and two-way anova analysis of variance and post-hoc test. Differences between groups were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Results

Chronic intermittent hypoxia decreases body weight and food intake

Eight week-old male C57Bl6/J mice were subjected to chronic intermittent hypoxia (CIH, 30s at 5% of FiO₂- 30s at 21% of FiO₂) or normoxia during 8 hours every day (from 6am to 2pm) for two weeks (Fig. 1A). At the end of the experimental period, blood hematocrit was significantly higher in CIH mice than in normoxic mice (+16%; Fig 1B), validating our protocol for CIH exposure. The body weight was significantly decreased by CIH (-11% after 2 weeks; Fig. 1C), mostly due to reduction in liver weight, whereas epididymal white adipose tissue (eWAT) and skeletal muscle mass were not affected (Fig. 1D). The total food intake was significantly reduced in mice subjected to CIH mice (-21%), an effect mostly due to complete inhibition of food intake during the hypoxic exposure (-95% from 6am to 2pm; Fig. 1E). During the normoxic period, *i.e.* from 2pm to 6am, the food intake was similar between groups without any compensatory overfeeding in CIH-exposed mice.

Chronic intermittent hypoxia impairs systemic and tissue-specific insulin sensitivity

Exposure to CIH did not affect fasting plasma cholesterol, triglycerides and glucose levels (Fig 1F-H) but increased plasma insulin level (+51%, Fig 1I) and the HOmeostasis Model Assessment of Insulin Resistance index (HOMA-IR, +70%; Fig 1J), suggesting systemic insulin resistance. To further investigate the effect of CIH on insulin sensitivity, mice were subjected to an intraperitoneal insulin tolerance (ipITT) after 14 days of CIH exposure (Fig 2A). In line with HOMA-IR, CIH mice have impaired whole-body insulin sensitivity when compared to normoxic mice (Fig 2B,C). To study the effect of CIH on tissue-specific insulin sensitivity, liver, eWAT and skeletal muscle from CIH and normoxic mice were harvested in separate experiments 10 min after intraperitoneal injection of PBS or insulin. Although the IR β protein contents were not affected, the insulin-induced phosphorylations of Protein Kinase B (PKB) and its downstream targets Proline-Rich Akt Substrate of 40 kDa (PRAS40, Fig 2D-G) and Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3, data not shown) were reduced in liver, epididymal white adipose tissue and skeletal muscle from CIH mice, indicating that insulin sensitivity was

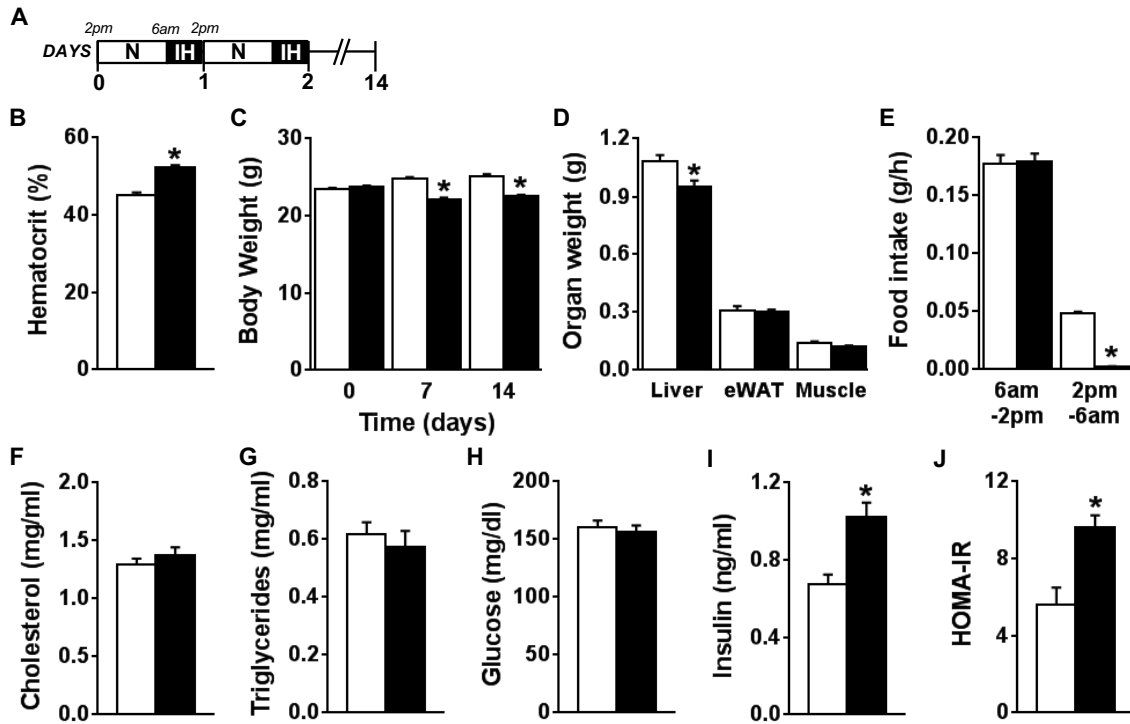


Figure 1. Chronic intermittent hypoxia decreases body weight and food intake, and increases plasma insulin level. Mice were subjected to intermittent hypoxia (closed bars) or normoxia (open bars) from 6am to 2pm for 14 days (A). Blood hematocrit (B) was measured at the end of the experimental period. Body weight (C) was monitored throughout the experimental period. The weights of liver, epididymal white adipose tissue (eWAT) and skeletal muscle were measured after sacrifice (D). Food intake (E) was determined during (6am to 2pm) and after IH-exposure (2pm to 6am). At day 14, plasma total cholesterol (F), triglycerides (G), glucose (H) and insulin (I) levels were determined after 6h of fast and HOMA-IR (J) was calculated. Data are means \pm SEM (B n=23, C n=31, D n=11, F-J n=23). * p<0.05 vs normoxic mice.

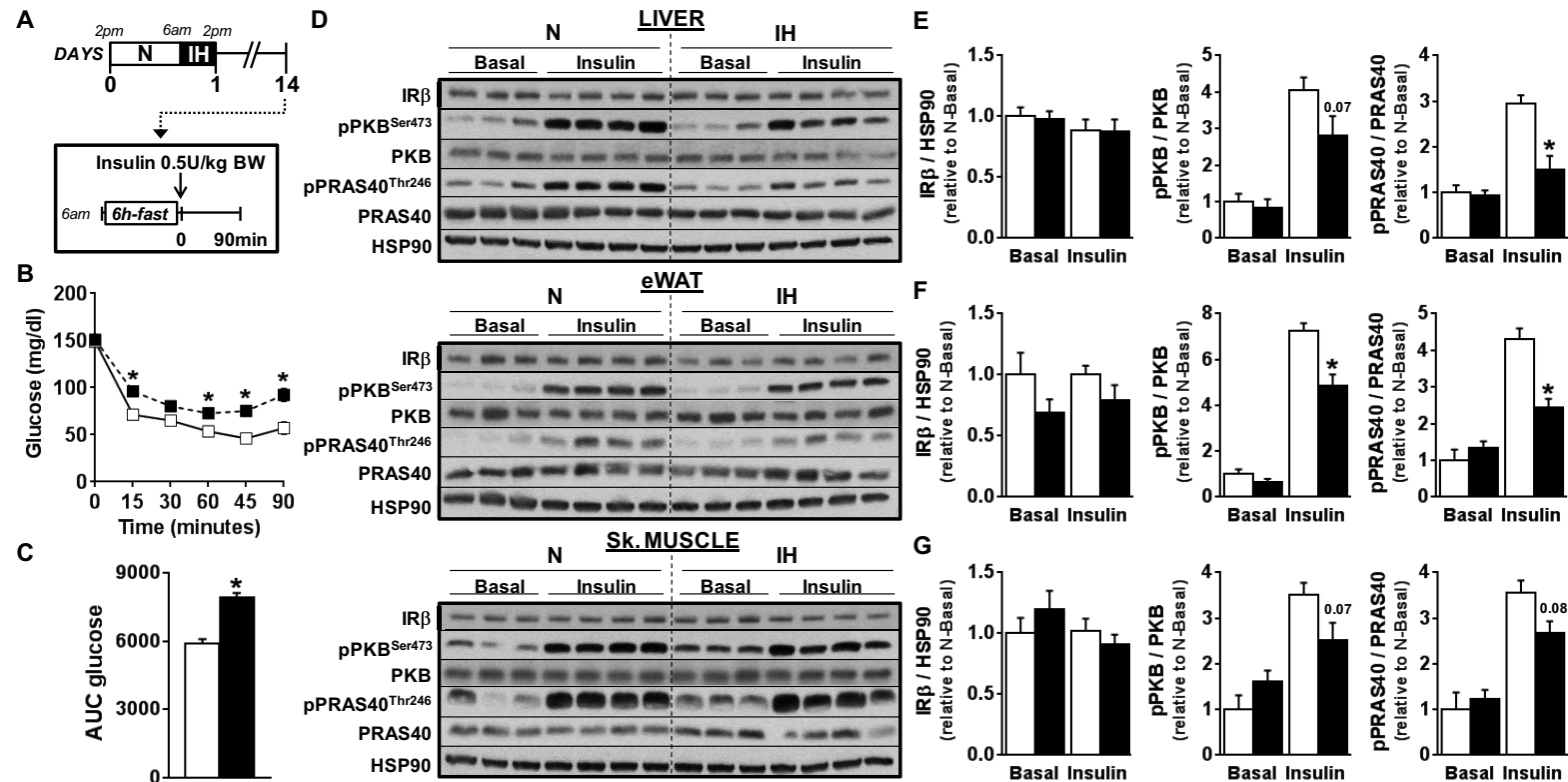


Figure 2. Chronic intermittent hypoxia impairs systemic and tissue-specific insulin sensitivity. At day 14, an intraperitoneal insulin tolerance test (0.5 U/kg total body weight) was performed in 6h-fasted normoxic (open squares) and cIH mice (closed squares), and tissue-specific insulin signaling was studied in liver, epididymal white adipose tissue (eWAT) and skeletal muscle 10 minutes after insulin injection (A). Blood glucose levels were measured at the indicated time-points (B), and the AUC of the glucose excursion curve was calculated as a surrogate for whole-body insulin sensitivity (C). The protein expression of IR β , PKB, PRAS40 and HSP90, and phosphorylation states of Ser473-PKB and Thr246-PRAS40 were determined by Western blot (D) and quantified by densitometric analysis in liver (E), eWAT (F) and skeletal muscle (G). The phospho-to-total ratios were calculated and expressed a fold change relative to normoxic mice in basal condition. Data are means \pm SEM (B-C $n=8$, D-G $n=3$ basal, $n=5$ insulin). * $p < 0.05$ vs normoxic mice.

impaired in each of these metabolic organs. In the liver, the insulin resistance was associated with increased HIF-1 α protein content (Fig. 3A-B) and upregulation of some HIF-1 α target genes involved in glucose oxidation (Fig. 3C). No difference in hepatic glycogen level was observed between the two groups (Fig. 3D). The expression of lipogenic genes, but not of those involved in fatty acid oxidation, were also found to be significantly upregulated in the liver of CIH mice (Fig. 3C), although hepatic triglycerides and cholesterol contents were not affected (Fig. 3E-F). In WAT, the insulin resistance induced by CIH is also associated with elevated HIF- α protein levels (Fig S1A-B) but neither the gene expression of pro-inflammatory M1 macrophage markers (Fig. S1C) nor the activity of the NF κ B pathway (data not shown) were found to be changed.

Chronic intermittent hypoxia improves whole-body glucose tolerance

To investigate whether the detrimental effect of CIH observed on insulin sensitivity have an impact on glucose homeostasis, mice were subjected to an intraperitoneal glucose tolerance test (GTT, Fig. 4A). Surprisingly, we found that CIH significantly improves whole-body glucose tolerance (Fig. 4B, C) whereas plasma insulin levels were similar in between groups (Fig. 4D). Importantly, the same result was obtained when the GTT was performed after injecting the same absolute amount of glucose in both groups, allowing to exclude any eventual experimental bias due to the lower body weight in CIH mice (Supplementary Fig. 2A-C). Similarly, the difference of feeding behavior observed during CIH exposure, *i.e.* almost complete inhibition of food intake, could also potentially underlie part of the effect on whole-body glucose homeostasis. However, the whole-body glucose tolerance was still increased in CIH mice when compared to normoxic mice that were subjected to the same pattern of food intake than CIH mice by removing food from 6am to 2pm (Fig. S2D-F), indicating that this beneficial effect on glucose homeostasis was independent of the CIH-induced decrease in food intake. Of note, no differences on the glucose excursion curve during an intraperitoneal pyruvate tolerance (Fig. S3A-B) and the expression of key gluconeogenic genes in the liver (Fig. S3C) were observed between CIH and normoxic mice,

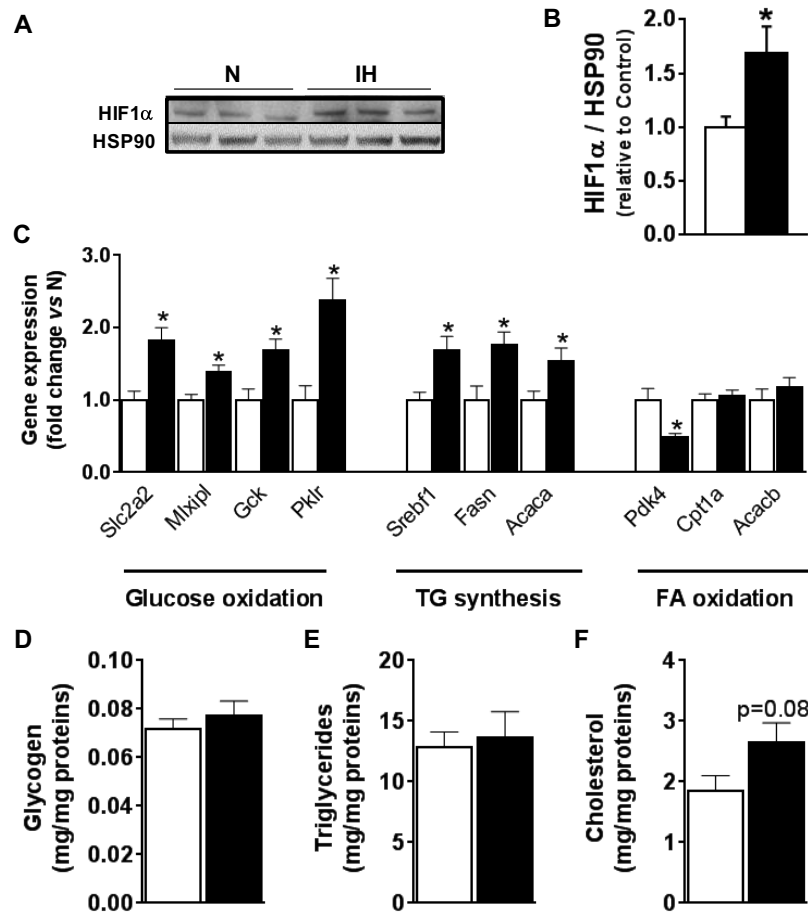


Figure 3. Chronic intermittent hypoxia increases HIF-1 α protein content and expression of glycolytic and lipogenic genes in the liver but does not affect hepatic lipid composition. The livers from 6h-fasted normoxic (open squares) and cIH mice (closed squares) were collected and immediately freeze-clamped for subsequent analysis. HIF-1 α protein expression was measured by Western blot (A), quantified by densitometric analysis (B) and expressed as fold change relative to normoxic mice. The mRNA expression of key genes involved in the regulation of hepatic glycolysis (Slc2a2: GLUT2; Mlxipl: ChREBP; Gck: GK; Pklr: L-PK), TG synthesis (Srebf1: SREBP-1c; Fasn: FAS; Acaca: ACC1) and fatty acid (FA) oxidation (Pdk4: PDK4; Cpt1a: CPT-1 α ; Acacb: ACC2) was measured by RT-qPCR. The results are expressed relative to the housekeeping gene RPLPO as fold change versus normoxic mice. Hepatic glycogen (D), triglycerides (TG, E) and cholesterol (F) contents were determined. Data are means \pm SEM (n=6 mice/group). * p<0.05 vs normoxic mice.

indicating that the effect on glucose tolerance is specific and unlikely related to changes in hepatic gluconeogenesis.

Chronic intermittent hypoxia promotes skeletal muscle AMPK activation

To elucidate the molecular mechanism(s) underlying the enhanced whole-body glucose tolerance in CIH mice, the two main signaling pathways involved in the regulation of glucose uptake were studied (Fig. 4D-J). For this purpose, the liver, eWAT and skeletal muscle were sampled during the GTT at the climax of the effect, *i.e* 15 min after glucose load, and the insulin and AMPK pathways were analyzed. Neither the expression of PKB nor its phosphorylation on Ser473 were affected by CIH during the GTT in any of the tissues. By contrast, although not affected in eWAT, the phosphorylation of Thr172-AMPK was significantly reduced in the liver and increased in skeletal muscle of CIH mice. The phosphorylation of the AMPK downstream target AcetylCoA Carboxylase (ACC) on Ser79 was also found to be increased in skeletal muscle. Altogether, our results suggest that the improvement of whole-body glucose tolerance by CIH could be secondary to specific activation of AMPK in skeletal muscle resulting in tissue-specific increase in glucose uptake.

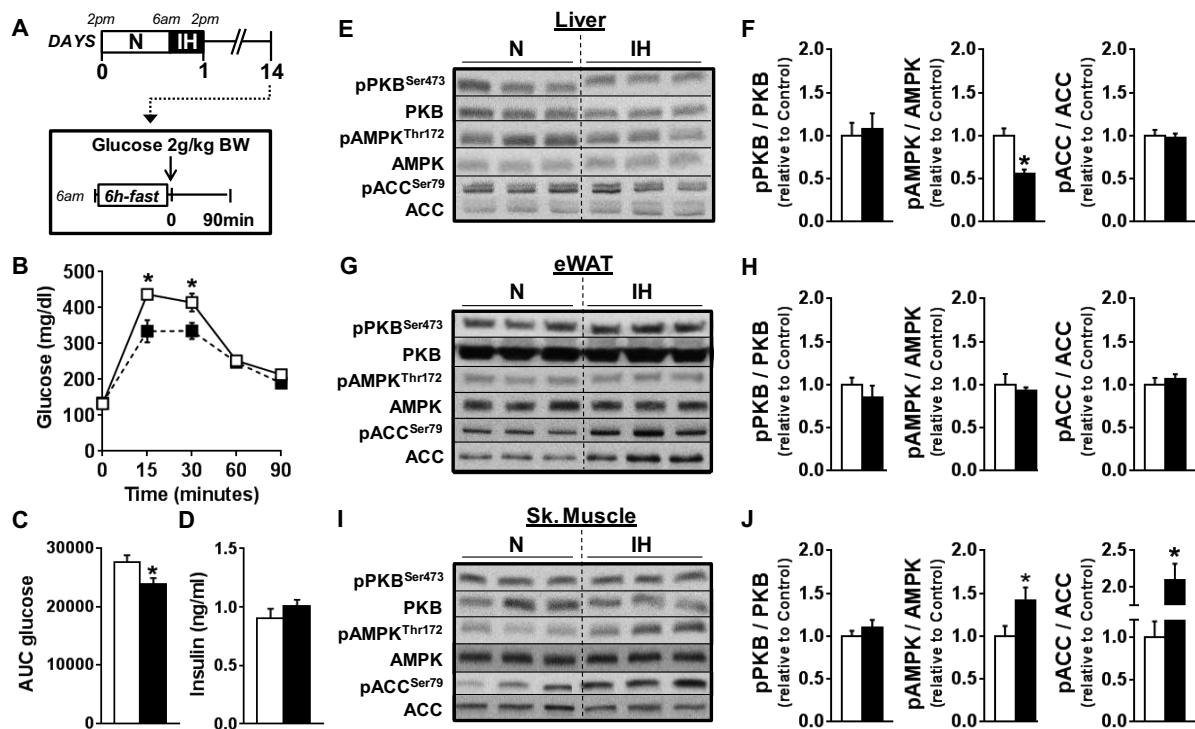


Figure 4. Chronic intermittent hypoxia improves whole-body glucose tolerance and promotes specific AMPK activation in skeletal muscle. At day 11, an intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT, 2 g/kg total body weight) was performed in 6h-fasted normoxic (open squares) and cIH mice (closed squares) (A). Blood glucose levels were measured at the indicated time-points (B), and the AUC of the glucose excursion curve was calculated as a surrogate for whole-body glucose tolerance (C). The plasma insulin level during ipGTT was measured at 15 minutes (D). Data are means \pm SEM (n=8 mice/group). * $p < 0.05$ vs normoxic mice. Tissue-specific insulin/AMPK signaling pathways were studied during ipGTT 15 minutes after glucose injection in liver (E-F), epididymal white adipose tissue (eWAT, G-H) and skeletal muscle (I-J). The phosphorylation state of Ser473-PKB, Thr172-AMPK and Ser79-ACC, were assessed by Western blot and quantified by densitometric analysis. The phospho-to-total ratios were calculated and expressed a fold change relative to normoxic mice in every tissue. Data are means \pm SEM (n=7 animals/group). * $p < 0.05$ vs control.

Discussion

Obstructive sleep apnea (OSA), and its associated episodes of systemic intermittent hypoxia, is a risk factor for the development of insulin resistance (5). A significant number of studies in both rodents and humans have indeed reported that CIH impaired insulin sensitivity but the exact underlying mechanism(s) still remained unknown to date. In the present study, we confirmed that CIH lowered systemic insulin sensitivity in lean mice but showed for the first time that this was secondary to alterations of insulin signaling in the three main metabolic tissues involved in the regulation of whole-body glucose homeostasis, *i.e.* liver, adipose tissue and skeletal muscle. The other important finding was the striking demonstration that, despite inducing insulin resistance, CIH can improve whole-body glucose tolerance, presumably by promoting AMPK-mediated glucose uptake in skeletal muscle.

In line with several previous studies (22; 23), we found a significant decrease in the mean daily food intake in lean mice subjected to 14 days of CIH. By assessing the feeding pattern throughout the day, we provided clear evidence that this decrease in food intake is exclusively due to a complete inhibition of food intake but only during the CIH exposure. Feeding behavior is tightly controlled by the central nervous system through complex regulatory networks involving afferent neural inputs from the periphery and circulating metabolites and hormones acting directly on specific neurons from key hypothalamic regions (24). Among the hormones potentially involved in the anorexigenic effect of CIH, plasma leptin levels was reported to be enhanced during both acute (8h) (23) and chronic exposure to HI (25). This is also in accordance with clinical studies showing that patients with OSA have significantly higher leptin levels than weight-matched subjects without OSA (26). Although not measured in our study, changes in circulating leptin can eventually underlie the inhibition of food intake observed during CIH, but we cannot exclude that this might also be secondary to alterations in various other oxygen-sensing pathways in the CNS. For example, Zhang et al. have reported that activation of HIF-2 α in the hypothalamus directly controls the transcription of the anorexigenic gene *Pomc*, leading to inhibition of food intake (27). Further studies are clearly required to clarify this point.

Remarkably, even if our mice exhibited lower daily food intake and reduced body weight following CIH exposure, they were also clearly insulin resistant, in accordance with previous studies showing increased plasma insulin levels (7; 9; 10; 15; 16; 28), lower glucose response during ITT (15; 16; 18) or decrease in glucose infusion rate during hyperinsulinemic-euglycemic clamp (8; 9; 14). Interestingly, the analysis of tissue-specific insulin signaling during ITT revealed that CIH alters insulin sensitivity in all the main metabolic tissues, *i.e.* WAT, skeletal muscle, and the liver.

HFD-induced WAT hypoxia has been reported to trigger tissue-specific inflammation and insulin resistance by promoting infiltration of monocytes and/or polarization of resident macrophages towards a pro-inflammatory M1 phenotype (29). In addition, 4 weeks of IH was found to induce insulin resistance and WAT inflammation, as assessed by *ex vivo* release of pro-inflammatory cytokines and increased NF κ B activity, an effect abolished in TLR4 knockout mice (30). In our experimental conditions, we found increased HIF-1 α protein content in epididymal WAT from CIH mice, suggesting tissue hypoxia, but no significant changes in the gene expression of macrophages markers and pro-inflammatory cytokines. These results are in contrast with our previous work showing that ApoE $^{-/-}$ mice exposed to CIH for 6 weeks exhibited a reduced systemic insulin sensitivity associated with increased WAT pro-inflammatory macrophages (18). However, on top of having been performed in a different mouse strain, the shorter duration of IH exposure in our present study (14 days *versus* 6 weeks) might also be one of the explanations for this discrepancy. Among other possible mechanisms, increased ER stress in WAT, as previously reported in other metabolic mouse models (31), has also been shown to promote insulin resistance. Interestingly, some of our preliminary results might support enhanced ER stress in WAT from CIH mice, indicating that activation of this pathway could underlie part of the detrimental effect of CIH on WAT insulin sensitivity (data not shown). However, a detailed study dissecting ER stress pathways in WAT is definitely required to investigate this attractive hypothesis more in depth.

Skeletal muscle insulin resistance is also a classical feature of HFD-induced metabolic dysfunctions (32) and was found to be induced by CIH in our study. Among the possible

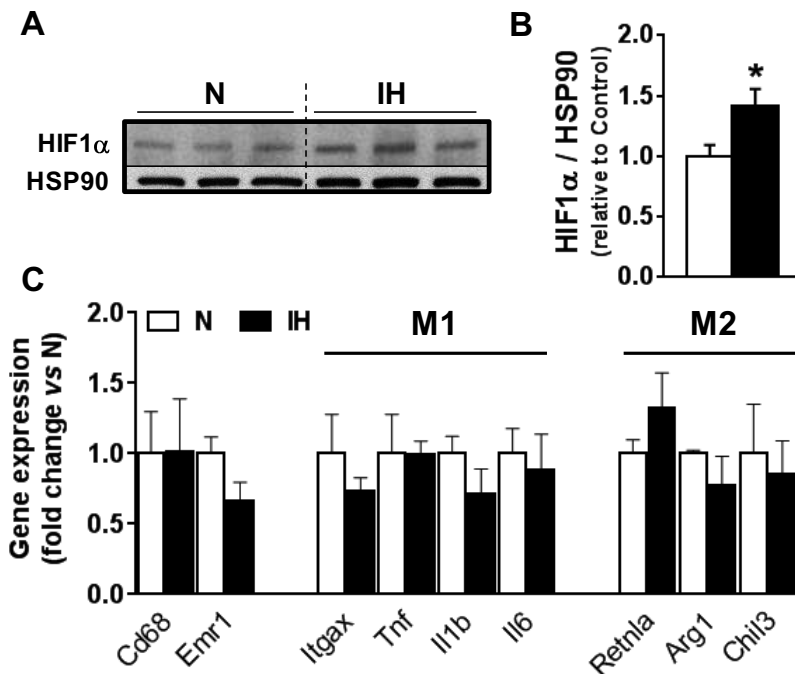
underlying mechanisms involved in tissue-specific alteration of insulin signaling, neither enhanced local inflammation nor activation of ER stress were found to be present in skeletal muscle from CIH mice (data not shown). Some other pathways involved in skeletal muscle insulin resistance, such as defect in mitochondrial oxidative phosphorylation or increased intramyocellular fat content, were not covered in our study and would certainly deserve a careful attention in the framework of future investigation.

In the liver, HFD-induced local insulin resistance can be secondary to tissue-specific inflammation and/or increased in hepatic steatosis (33). Despite no apparent changes in inflammatory markers (data not shown), we found a significant upregulation of lipogenic genes in the livers from CIH mice. However, glycogen and lipid contents were not significantly affected, indicating that changes in hepatic glycogen and TG synthesis were unlikely contributing to the CIH-induced insulin resistance in the liver. Among the possible other underlying mechanisms, oxidative stress is known to impair insulin signaling and induce hepatic insulin resistance (34; 35). Although oxidative stress *per se* was not investigated in our study, Jun et al. have reported an increase in p47phox in the liver after 4 weeks of IH (36), suggesting that activation of this pathway might play a role in hepatic insulin resistance induced by CIH. This aspect would definitively require further dedicated investigation.

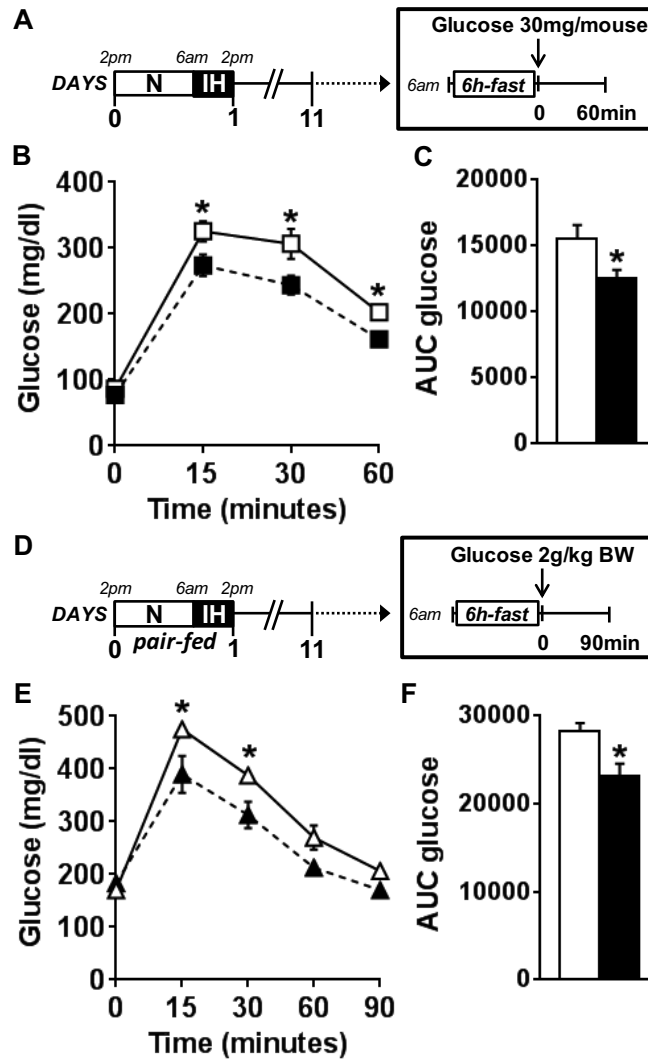
The other important outcome of this study was the counterintuitive demonstration that, despite systemic and tissue-specific insulin resistance, CIH can improve whole-body glucose tolerance by a mechanism that appeared to be independent of changes in feeding behavior and body weight. At the molecular level, the regulation of glucose uptake by peripheral tissues involved both insulin-dependent and -independent mechanisms (37). Interestingly, the activity of AMP-activated protein kinase (AMPK), which plays a central role in the control of glucose uptake by promoting insulin-independent translocation of GLUT4 to the plasma membrane (38), was found to be specifically increased in skeletal muscle from CIH mice. AMPK is a heterotrimeric protein kinase which acts as an intracellular energy sensor and is constituted of an alpha catalytic subunit and two beta and gamma regulatory subunits. Among the possible mechanism(s) underlying AMPK activation, a decrease in energy status induced by CIH exposure in skeletal muscle cells might be possible.

Determination of adenine nucleotides content in skeletal muscle would therefore be very important to assess this possibility. An increase in some circulating hormones, such as leptin, adiponectin or catecholamine, in skeletal muscle AMPK activation by CIH might also be involved (39). Although we did not measure plasma levels of these specific hormones in our experimental conditions, we did not find any change in the phosphorylation state of STAT3, suggesting that activation of skeletal muscle AMPK during CIH is unlikely due to increased leptin signaling. Finally, an effect of CIH on the heterotrimeric composition of AMPK might also affect the sensitivity of the complex towards adenine nucleotides and/or its interaction with some AMPK downstream targets. In mouse skeletal muscle, the two major heterotrimers of AMPK are composed of $\alpha 2\beta 2\gamma 1$ (70%) and $\alpha 2\beta 2\gamma 3$ (20%) subunits (40). Although, a trend for a decrease in gamma1 and a concomitant increase in beta2 subunit expression was evidenced in skeletal muscle from CIH mice (data not shown), the putative contribution of this slight effect on AMPK activation should be investigated more extensively in further studies.

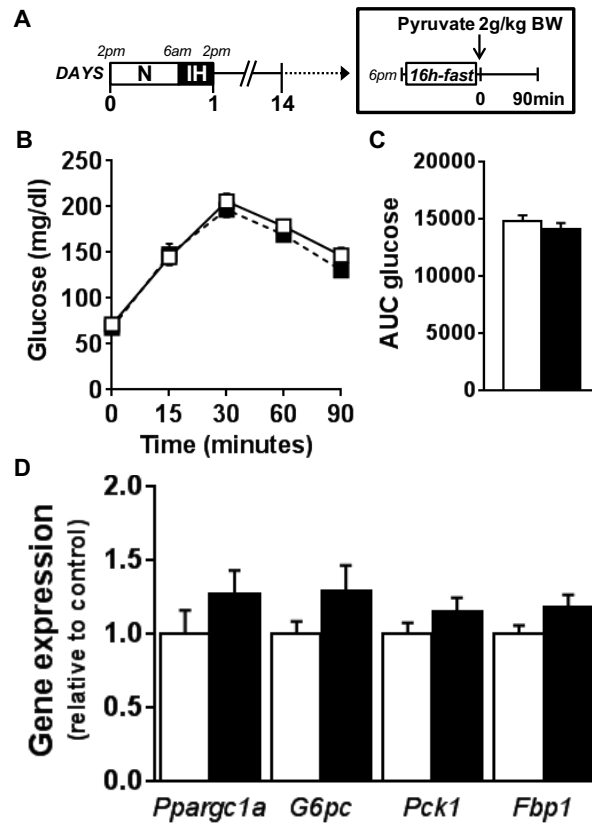
In summary, our findings indicate that CIH impairs systemic insulin sensitivity by altering insulin signaling in various metabolic organs, but clear underlying molecular mechanism(s) are still lacking. Further studies are therefore required to elucidate this important feature, including the possible contribution of the CNS in the regulation of peripheral tissue-specific insulin sensitivity during CIH. On the other hand, CIH promotes whole-body glucose tolerance by a mechanism presumably involving tissue-specific activation of AMPK and glucose uptake in skeletal muscle. The elucidation of the molecular mechanism(s) by which CIH induce AMPK activation in skeletal muscle and the exact contribution of this specific activation to the regulation of whole-body glucose homeostasis during CIH, notably by the use of AMPK knockout mice, would be crucial. Of note, together with an increase in hepatic HIF-1 α content by CIH we found an upregulation of some HIF-1 α target genes involved in glycolysis (41), suggesting that enhanced glucose flux through the oxidative pathway in the liver from CIH mice might also contribute to the improvement in whole-body glucose tolerance.



Supplementary Figure 1. Chronic intermittent hypoxia increases HIF-1 α protein but does not affect the gene expression of pro-inflammatory macrophages markers in white adipose tissue. The WAT from 6h-fasted normoxic (open squares) and cIH mice (closed squares) were collected and immediately freeze-clamped for subsequent analysis. HIF-1 α protein expression was measured by Western blot (A), quantified by densitometric analysis (B) and expressed as fold change relative to normoxic mice. The mRNA expression of general macrophages markers (Cd68: CD68; Emr1: F4/80) and M1- (Itgax: CD11C; Tnfa: TNF- α ; Il1b: IL-1 β ; Il6: IL-6) or M2-specific (Retnla: FIZZ1; Arg1: ARG1; Chil3: YM1) was measured by RT-qPCR. The results are expressed relative to the housekeeping gene RPLP0 as fold change *versus* normoxic mice. Data are means \pm SEM (n=6 mice/group). * p<0.05 vs normoxic mice.



Supplementary Figure 2. Chronic intermittent hypoxia improves whole-body glucose tolerance independently of changes in body weight and food intake. At day 11 (A), an intraperitoneal GTT (30mg/mouse) was performed in 6h-fasted normoxic (open squares) and cIH mice (closed squares) (A). Blood glucose levels were measured at the indicated time-points (B), and the AUC of the glucose excursion curve was calculated (C). An intraperitoneal GTT (2g/kg of total body weight) was performed in 6h-fasted cIH mice (closed triangles) and normoxic mice pair-fed during IH exposure (open triangles). Food was removed daily from 6am to 2pm to reproduce the food intake pattern observed in cIH mice (see Fig.1E). Data are means \pm SEM (n=6 mice/group). * p<0.05 vs normoxic mice.



Supplementary Figure 3. Chronic intermittent hypoxia does not affect hepatic gluconeogenesis. At day 14, an intraperitoneal pyruvate tolerance test (2 g/kg total body weight) was performed in 16-fasted normoxic (open squares) and cIH mice (closed squares) (A). Blood glucose levels were measured at the indicated time-points (B), and the AUC of the glucose excursion curve was calculated as a surrogate for hepatic gluconeogenesis (C). The mRNA expression of key genes involved in the regulation of hepatic gluconeogenesis (*Ppargc1a*: PGC1alpha; *G6pc*: G6Pase; *Pck1*: PEPCCK; *Fbp1*: FBP1) was measured by RT-qPCR. The results are expressed relative to the housekeeping gene mGUSb as fold change *versus* normoxic mice. Data are means \pm SEM (n=7-8 mice/group in A-B and D-F and n=10 in C and G). * p<0.05 vs normoxic mice.

Supplementary Table 1: Primary antibodies for Western blots

Primary antibody	Residue	Supplier	Reference	Dilution
ACC	-	Cell Signaling	#3662	1:2000
ACC	Ser79	Cell Signaling	#3661	1:2000
AMPK α	-	Cell Signaling	#2532	1:1000
AMPK α	Thr172	Cell Signaling	#2535	1:1000
IR β	-	Santa Cruz	Sc-711	1:1000
PKB 1	-	Upstate	07-416	1:1000
PKB 2	-	Upstate	07-372	1:1000
PKB	Ser473	Cell Signaling	#9271	1:1000
PRAS40	-	Cell Signaling	#2640	1:1000
PRAS40	Thr246	Cell Signaling	#2610S	1:1000

Supplementary Table 2: Primer sequences for qRT-PCR

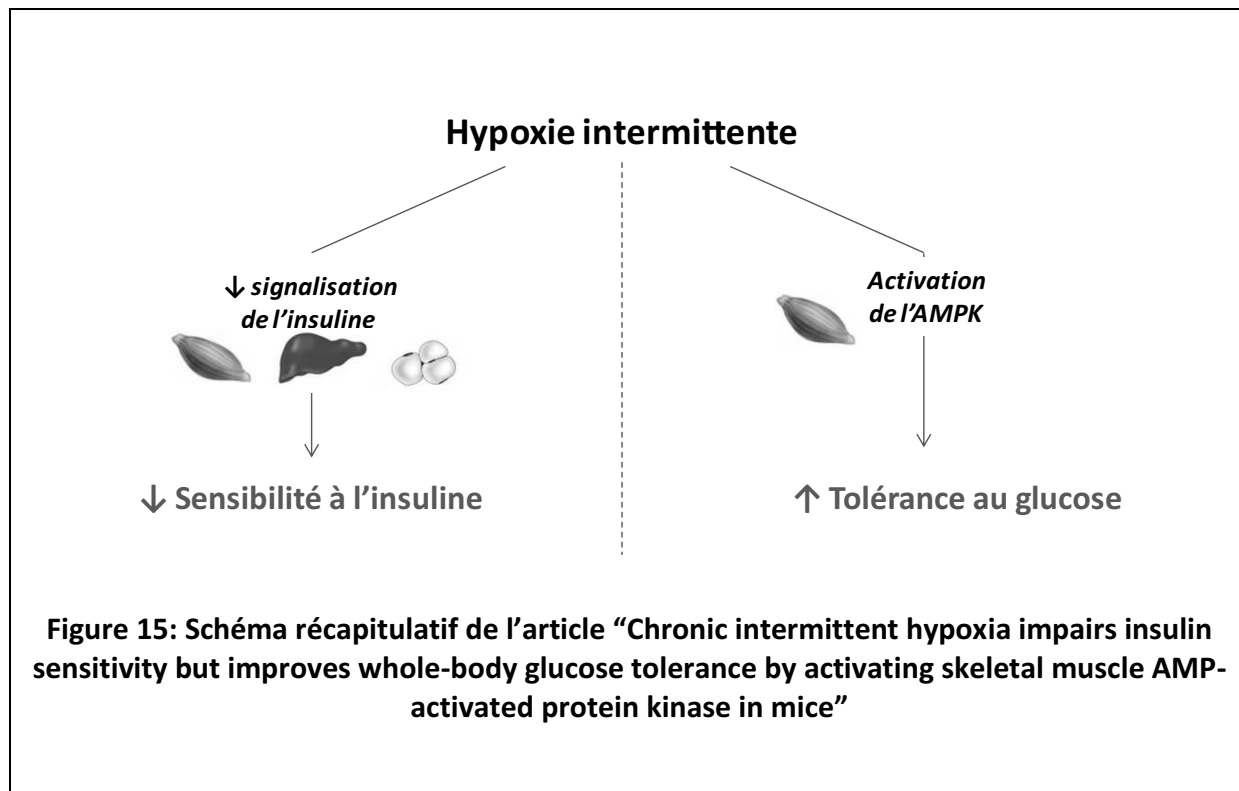
Gene	Accession number	Forward primer	Reverse primer
<i>Acaca</i>	NM_133360.2	CAGCTGGTGCAGAGGTACCG	TCTACTCGCAGGTACTGCCG
<i>Acacb</i>	NM_133904.2	GCGCCTACTATGAGGCCAGCA	ACAAACTCGGCTGGGGACGC
<i>Cpt1a</i>	NM_013495	AGGAGACAAGAACCCCAACA	AAGGAATGCAGGTCCACATC
<i>Fasn</i>	NM_007988	CACAGGCATCAATGTCAACC	TTTGGGAAGTCCTCAGCAAC
<i>Fbp1</i>	NM_019395.2	GCATCGCACAGCTCTATGGT	ACAGGTAGCGTAGGACGACT
<i>Gck</i>	NM_010292.5	TGCGGAGATGCTCTTTGACT	TCTCGGAGAAGTCCCACGAT
<i>G6pc</i>	NM_008061	CCATGGGCGCAGCAGGTGTA	AGCCACGACCTGGTGGGGAA
<i>Mlxipl</i>	NM_021455	CCAGCCTCAAGGTGAGCAAA	CATGTCCC GCATCTGGTCA
<i>Pdk4</i>	NM_013743	GATTGACATCCTGCCTGACC	CAGGGCTTTCTGGTCTTCTG
<i>Pck1</i>	NM_011044.2	GGGCCGCTGGATGTCGGAAG	GGTGCGGCCTTTCATGCACC
<i>Pklr</i>	NM_013631	CCTCTGCCTTCTGGATATCGAC	CGATGGTGGCAATGATGCT
<i>Ppargc1a</i>	NM_008904.2	CCCAGAGTCACCAAATGACCCCA	CCTCTTGGTTGGCGGTGGCA
<i>Srebfl</i>	NM_011480	GGCCGAGATGTGCGAACT	TTGTTGATGAGCTGGAGCATGT
<i>Sle2a2</i>	NM_031197.2	TCATGTCGGTGGGACTTGTG	CCCAAGGAAGTCCGCAATGT

Références

1. Peppard PE, Young T, Barnet JH, Palta M, Hagen EW, Hla KM: Increased prevalence of sleep-disordered breathing in adults. *Am J Epidemiol* 177:1006-1014
2. Resta O, Foschino-Barbaro MP, Legari G, Talamo S, Bonfitto P, Palumbo A, Minenna A, Giorgino R, De Pergola G: Sleep-related breathing disorders, loud snoring and excessive daytime sleepiness in obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25:669-675, 2001
3. Drager LF, Lopes HF, Maki-Nunes C, Trombetta IC, Toschi-Dias E, Alves MJ, Fraga RF, Jun JC, Negrao CE, Krieger EM, Polotsky VY, Lorenzi-Filho G: The impact of obstructive sleep apnea on metabolic and inflammatory markers in consecutive patients with metabolic syndrome. *PLoS One* 5:e12065
4. Botros N, Concato J, Mohsenin V, Selim B, Doctor K, Yaggi HK: Obstructive sleep apnea as a risk factor for type 2 diabetes. *Am J Med* 122:1122-1127, 2009
5. Punjabi NM, Shahar E, Redline S, Gottlieb DJ, Givelber R, Resnick HE: Sleep-disordered breathing, glucose intolerance, and insulin resistance: the Sleep Heart Health Study. *Am J Epidemiol* 160:521-530, 2004
6. Louis M, Punjabi NM: Effects of acute intermittent hypoxia on glucose metabolism in awake healthy volunteers. *J Appl Physiol* (1985) 106:1538-1544, 2009
7. Polotsky VY, Li J, Punjabi NM, Rubin AE, Smith PL, Schwartz AR, O'Donnell CP: Intermittent hypoxia increases insulin resistance in genetically obese mice. *J Physiol* 552:253-264, 2003
8. Iiyori N, Alonso LC, Li J, Sanders MH, Garcia-Ocana A, O'Doherty RM, Polotsky VY, O'Donnell CP: Intermittent hypoxia causes insulin resistance in lean mice independent of autonomic activity. *Am J Respir Crit Care Med* 175:851-857, 2007
9. Chen L, Cao ZL, Han F, Gao ZC, He QY: Chronic intermittent hypoxia from pedo-stage decreases glucose transporter 4 expression in adipose tissue and causes insulin resistance. *Chin Med J (Engl)* 123:463-470
10. Drager LF, Li J, Reinke C, Bevans-Fonti S, Jun JC, Polotsky VY: Intermittent hypoxia exacerbates metabolic effects of diet-induced obesity. *Obesity (Silver Spring)* 19:2167-2174
11. Fenik VB, Singletary T, Branconi JL, Davies RO, Kubin L: Glucoregulatory consequences and cardiorespiratory parameters in rats exposed to chronic-intermittent hypoxia: effects of the duration of exposure and losartan. *Front Neurol* 3:51
12. Carreras A, Kayali F, Zhang J, Hirotsu C, Wang Y, Gozal D: Metabolic effects of intermittent hypoxia in mice: steady versus high-frequency applied hypoxia daily during the rest period. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 303:R700-709
13. Rafacho A, Goncalves-Neto LM, Ferreira FB, Protzek AO, Boschero AC, Nunes EA, Zoccal DB: Glucose homeostasis in rats exposed to acute intermittent hypoxia. *Acta Physiol (Oxf)* 209:77-89
14. Lee EJ, Alonso LC, Stefanovski D, Strollo HC, Romano LC, Zou B, Singamsetty S, Yester KA, McGaffin KR, Garcia-Ocana A, O'Donnell CP: Time-dependent changes in glucose and insulin regulation during intermittent hypoxia and continuous hypoxia. *Eur J Appl Physiol* 113:467-478

15. Wang Q, Sun X, Li X, Dong X, Li P, Zhao L: Resveratrol attenuates intermittent hypoxia-induced insulin resistance in rats: involvement of Sirtuin 1 and the phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase/AKT pathway. *Mol Med Rep* 11:151-158
16. Polak J, Shimoda LA, Drager LF, Udem C, McHugh H, Polotsky VY, Punjabi NM: Intermittent hypoxia impairs glucose homeostasis in C57BL6/J mice: partial improvement with cessation of the exposure. *Sleep* 36:1483-1490; 1490A-1490B
17. Sherwani SI, Aldana C, Usmani S, Adin C, Kotha S, Khan M, Eubank T, Scherer PE, Parinandi N, Magalang UJ: Intermittent hypoxia exacerbates pancreatic beta-cell dysfunction in a mouse model of diabetes mellitus. *Sleep* 36:1849-1858
18. Poulain L, Thomas A, Rieusset J, Casteilla L, Levy P, Arnaud C, Dematteis M: Visceral white fat remodelling contributes to intermittent hypoxia-induced atherogenesis. *Eur Respir J* 43:513-522, 2013
19. Carreras A, Zhang SX, Almendros I, Wang Y, Peris E, Qiao Z, Gozal D: Resveratrol attenuates intermittent hypoxia-induced macrophage migration to visceral white adipose tissue and insulin resistance in male mice. *Endocrinology* 156:437-443
20. Lee S, Muniyappa R, Yan X, Chen H, Yue LQ, Hong EG, Kim JK, Quon MJ: Comparison between surrogate indexes of insulin sensitivity and resistance and hyperinsulinemic euglycemic clamp estimates in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:E261-270, 2008
21. Geerling JJ, Boon MR, van der Zon GC, van den Berg SA, van den Hoek AM, Lombes M, Princen HM, Havekes LM, Rensen PC, Guigas B: Metformin lowers plasma triglycerides by promoting VLDL-triglyceride clearance by brown adipose tissue in mice. *Diabetes* 63:880-891
22. Messenger SA, Moreau JM, Ciriello J: Intermittent hypoxia and systemic leptin administration induces pSTAT3 and Fos/Fra-1 in the carotid body. *Brain Res* 1446:56-70, 2012
23. Moreau JM, Ciriello J: Effects of acute intermittent hypoxia on energy balance and hypothalamic feeding pathways. *Neuroscience* 253:350-360
24. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG: Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661-671, 2000
25. Volgin DV, Kubin L: Chronic intermittent hypoxia alters hypothalamic transcription of genes involved in metabolic regulation. *Auton Neurosci* 126-127:93-99, 2006
26. Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, Hopper K, Lotsikas A, Lin HM, Kales A, Chrousos GP: Sleep apnea and daytime sleepiness and fatigue: relation to visceral obesity, insulin resistance, and hypercytokinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1151-1158, 2000
27. Zhang H, Zhang G, Gonzalez FJ, Park SM, Cai D: Hypoxia-inducible factor directs POMC gene to mediate hypothalamic glucose sensing and energy balance regulation. *PLoS Biol* 9:e1001112
28. Li J, Bosch-Marce M, Nanayakkara A, Savransky V, Fried SK, Semenza GL, Polotsky VY: Altered metabolic responses to intermittent hypoxia in mice with partial deficiency of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Physiol Genomics* 25:450-457, 2006

29. Fujisaka S, Usui I, Bukhari A, Ikutani M, Oya T, Kanatani Y, Tsuneyama K, Nagai Y, Takatsu K, Urakaze M, Kobayashi M, Tobe K: Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes* 58:2574-2582, 2009
30. Poulain L, Richard V, Levy P, Dematteis M, Arnaud C: Toll-like receptor-4 mediated inflammation is involved in the cardiometabolic alterations induced by intermittent hypoxia. *Mediators Inflamm* 2015:620258, 2015
31. Boden G, Duan X, Homko C, Molina EJ, Song W, Perez O, Cheung P, Merali S: Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals. *Diabetes* 57:2438-2444, 2008
32. Abdul-Ghani MA, DeFronzo RA: Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. *J Biomed Biotechnol* 2010:476279, 2010
33. Fabbrini E, deHaseth D, Deivanayagam S, Mohammed BS, Vitola BE, Klein S: Alterations in fatty acid kinetics in obese adolescents with increased intrahepatic triglyceride content. *Obesity (Silver Spring)* 17:25-29, 2009
34. Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR: CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* 105:1067-1075, 2000
35. Schattenberg JM, Wang Y, Rigoli RM, Koop DR, Czaja MJ: CYP2E1 overexpression alters hepatocyte death from menadione and fatty acids by activation of ERK1/2 signaling. *Hepatology* 39:444-455, 2004
36. Jun J, Savransky V, Nanayakkara A, Bevans S, Li J, Smith PL, Polotsky VY: Intermittent hypoxia has organ-specific effects on oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295:R1274-1281, 2008
37. Pacini G, Thomaseth K, Ahren B: Contribution to glucose tolerance of insulin-independent vs. insulin-dependent mechanisms in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281:E693-703, 2001
38. Sakamoto K, Holman GD: Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295:E29-37, 2008
39. Lim CT, Kola B, Korbonits M: AMPK as a mediator of hormonal signalling. *J Mol Endocrinol* 44:87-97, 2010
40. Mounier R, Theret M, Lantier L, Foretz M, Viollet B: Expanding roles for AMPK in skeletal muscle plasticity. *Trends Endocrinol Metab* 26:275-286, 2015
41. Ito K, Suda T: Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:243-256, 2014



CHAPITRE 2 : ETUDE DES ATTEINTES TISSULAIRES DU FOIE ET DU TISSU ADIPEUX INDUITE PAR L'HYPOXIE INTERMITTENTE

Dans la recherche des mécanismes moléculaires pouvant être impliqués dans les altérations de l'homéostasie du glucose, nous avons voulu déterminer les voies cellulaires impactées par l'HI dans deux tissus métaboliques majeurs, le foie et le tissu adipeux.

Ainsi, dans cette étude, une analyse transcriptomique par *micro-array* nous a permis de mettre en évidence que dans le foie, l'expression de 184 gènes était augmentée et celle de 192 était diminuée par l'HI. Concernant le tissu adipeux, 4158 gènes étaient activés contre 1654 dont l'expression était abaissée.

Globalement, l'HI induit une augmentation de la lipogenèse, de la β -oxydation, de l'oxydation phosphorylante mitochondriale ainsi que la fibrose et l'inflammation dans le foie, De plus, l'HI entraîne une altération du métabolisme du tissu adipeux avec par exemple une diminution de la β -oxydation, une inflammation et une fibrose du tissu adipeux.

L'augmentation de l'inflammation et de la fibrose au niveau hépatique ont été confirmées par une analyse histologique ainsi que par qPCR. Une augmentation des gènes impliqués dans la lipogenèse, la fibrose et l'inflammation, a bien été observée. Cependant, aucunes de ces modifications n'a induit d'altérations macroscopiques du foie.

Concernant le tissu adipeux. Nous avons montré une augmentation de la masse grasse des animaux soumis à l'HI avec une augmentation de la taille de ses adipocytes, ainsi que de sa vascularisation.

Specific transcriptomic signature in response to intermittent hypoxia exposure in liver and fat tissue

Judith Aron-wisnewsky^{1,2,3} Emmanuelle. Gras^{4,5}, **Amandine.Thomas**^{4,5}, Veronique Pelloux^{1,2,3}
,Diane. Godin-Ribuot^{4,5}, Karine Clement^{1,2,3} *, Jean-Louis Pepin^{4,5*}

1- *Institute of Cardiometabolism and Nutrition, ICAN, Assistance Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France*

2- *-Paris 6, UMR_S U1166, Nutriomics, 75013 Paris, France*

3- *Institut national de la santé et de la recherche médicale, INSERM, UMR_S U1166, Nutriomics, 75013 Paris, France*

4- *Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), U 1042, HP2 Laboratory (Hypoxia: Pathophysiology), Joseph Fourier University, Grenoble, France;*

5- *Grenoble University Hospital, Pole Thorax et Vaisseaux, France*

5936 words

Abstract (254)

Background and aim: During obesity, Obstructive sleep apnea (OSA) and chronic intermittent hypoxia (CIH) associate with the occurrence and progression of non alcoholic fatty liver diseases (NAFLD). NAFLD also associates with obesity-induced adipose tissue (AT) alterations. CIH impact on liver and AT in non-obese OSA and lean mice has been poorly studied. Therefore our aim was to evaluate whether two weeks of CIH in lean mice may impact these two organs in the absence of obesity.

Methods: Lean mice were submitted to either normoxia (controls) or CIH (CIH+) for 14 days. We analyzed liver and epididymal adipose tissue signatures using transcriptomic analysis, further confirming our results with RT-PCR and immuno-histology of both adipose and liver tissues.

Results: Liver transcriptomic analysis revealed that 184 and 192 genes were respectively up and down-regulated in CIH+ vs. controls. CIH exposure induced NAFLD pathways with increased lipogenesis, β -oxydation, mitochondrial oxidative phosphorylation, extra-cellular matrix deposition and inflammation and decreased detoxification of ROS production. Nevertheless, two weeks CIH exposure did not translate into liver tissue alteration. Noteworthy, we observe adaptative responses at the AT level with increased visceral adiposity despite weight loss and AT characteristics modifications (hypertrophy and increased vascularization). Transcriptomic signatures revealed 4158 up- and 1654 down-regulated genes in CIH+ vs controls, with blunted AT metabolism and oxidation-phosphorylation and increased extracellular matrix and inflammation pathways.

Conclusion: Two weeks CIH in lean mice induces all the main pathways involved in NAFLD. AT responds differently to CIH with reduced local metabolism and AT remodeling with increase in adipocytes size and vascularization.

Introduction

Obstructive sleep apnea (OSA) is a significant health concern which is highly prevalent in obesity and independently associated with the different components of the metabolic syndrome such as visceral obesity, hypertension, insulin resistance and abnormal lipid metabolism (1). OSA induces repetitive occurrence of partial or complete pharyngeal collapses during sleep which subsequently induce chronic intermittent hypoxia (CIH), thus leading to intermediary mechanisms including low grade inflammation, sympathetic over-activity and oxidative stress (2).

Non-alcoholic liver fatty liver disease (NAFLD) is also very prevalent in obesity and/or type-2 diabetes. Diagnosed by liver biopsy, NAFLD includes a continuous spectrum of severity ranging from simple steatosis (in more than 5% of the hepatocytes) to overt steatohepatitis (i.e NASH) defined as the association of steatosis, ballooning and inflammatory infiltration (3). The staging of the disease includes the amount of fibrosis deposition which predicts the disease prognosis and can further progress towards cirrhosis and hepatocarcinoma (4). The physiopathology involves a “first hit” including insulin resistance and lipid accumulation in the liver and subsequently a “second hit”, namely inflammatory mediators, that would exacerbate liver alterations (5). Recently, this concept has been revised highlighting more complex mechanisms (4). It is believed that free-fatty acids and their metabolites display liver lipotoxicity, and concomitantly with impaired mitochondria function, the occurrence of oxidative stress further aggravates liver alterations (6) as summarized in figure 5.

Thus, OSA and NAFLD share common intermediary mechanisms and OSA might play a role in NAFLD occurrence and progression. As such, human studies using both non-invasive surrogates of liver injury or liver biopsy based diagnosis have demonstrated that OSA is involved in NAFLD development (7–9) as confirmed in a large meta-analysis (10). CIH display a dose-dependant effect in the severity of NAFLD lesions (7) and the absence of OSA seems protective from NAFLD development in morbid obesity (11).

Rodent studies have attempted to dissect the pathophysiology linking CIH and NAFLD. CIH exposure rapidly induces metabolic features associated with NAFLD. Rodent models submitted to CIH develop insulin resistance in 4 weeks in lean mice or as soon as 5 days in obese ones (12, 13). Triglyceride systemic levels also increase significantly after 5 days both in lean and obese animals that further exacerbate when submitted to longer duration of CIH exposure. This systemic increase in triglyceride associates with increased liver fat accumulation (14, 15). Since HIF1 α - genetically-invalidated mice submitted to CIH are protected from those alterations, it is suggested that molecular mechanisms involving this key transcription factor are involved in CIH-mediated NASH (16). Oxidative stress is also induced by CIH both at the systemic level and in the liver after short and longer term exposure (17–19). Lipid peroxydation produced from Reactive oxygen species in the liver are prevented by the use of antioxidants (17, 18). If long term CIH (from 4 weeks to 6 months) induces liver alterations in lean and obese mice (18–21), short term CIH does not alter liver histology in lean ones (12, 15). Interestingly, some limited evidence exist showing that 5 days of CIH up-regulated genes involved in hepatic lipogenesis (15). Nevertheless, change in fat mass may intervene in the propensity to NAFLD development in response to CIH. Indeed, the amount and phenotypic characteristics of visceral AT promotes NALFD (22). Free-fatty acid overflow in the liver comes from increased AT lipolysis during obesity (4), and AT inflammation contribute to NAFLD progression (23)

However, there is currently limited number of studies investigating the effects of CIH on both tissues (7) during obesity and none in lean animals. Our purpose was then to examine the effects of a short term CIH exposure on mouse liver and AT phenotypes independently of obesity.

Material and methods

Animals:

Normal weight Swiss mice were maintained in a temperature-, humidity- and light controlled room (12 h light/dark cycles), allowed free access to water and standard chow (dry food composed of 2.5% lipid, 14.4% protein and 4.4% fiber). During light phase, eight-weeks old mice were submitted either to normoxia (n=8) or chronic intermittent hypoxia for 14 days (n=8). While the control group was maintained for 8 hours in normoxia, the treated group was maintained for 8 hours/d during sleep to cycles of CIH of 1 min including 30 sec at FiO₂ 5% and 30 sec in normoxia for 14 days as described in (24). At the end of the experiment, epididymal, subcutaneous AT were taken as well as liver for further analysis. Part of the tissues was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction. The other part of the tissues was conserved in AFA 4% then frozen at -80°C for future immunohistological studies. Weight was measured at the beginning and at the end of the study protocol. All animal experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee.

Microarray experiments

Total RNA was extracted from stored tissues by using the RNeasy total RNA Mini kit (QIAGEN) with one-column DNase digestion. RNA quality and concentration were assessed by using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Only RNA having a RIN (RNA Integrity Number) over 4 were amplified. An Illumina RNA amplification kit (Ambion) was used according to the manufacturer's instructions to obtain biotin-labeled complementary RNA from 250 ng total RNA. Hybridization processes were performed with Illumina MouseRef-8 v2.0 Expression BeadChip (Illumina Inc). Hybridized probes were detected with cyanin-3-streptavidin (1mg/mL; Amersham Biosciences, GE Health Care) and scanned by using an Illumina BeadArray Reader. Raw data were extracted with GenomeStudio 2011.1 software by using the default settings and without any additional normalization. The difference in gene expression between the two conditions (normoxia or CIH) was performed by SAM software (Significant analysis of microarray, Stanford University, CA, USA. <http://wwwstat.stanford.edu/~tibs/SAM/index.html>), which provides a list of significant

genes and an estimate of the false discovery rate (FDR) representing the percentage of genes that could be identified by chance. The FDR was tested at 5%.

RT-PCR Analysis

Total RNA from AT depots performed at the time of sacrifice was extracted using an RNeasy total RNA Mini kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France). RNA was quantified by Nanodrop spectrophotometer (ND-1000, Nanodrop Technologies). RNA (200 ng to 1 mg) was reverse transcribed using the Multi-Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen). Realtime quantitative RT-PCR for selected genes was performed on a StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, France). Data were normalized to the mean of four reference genes, 18S, CYCLO, RLP0 and RLP19 levels, and analyzed using the comparative CT method.

Histological Analysis

Epididymal, subcutaneous AT as well as liver were fixed with neutral-buffered formalin 10% for 24 hr, embedded in paraffin, sectioned, and stained with hematoxylin eosin. Fibrosis was evaluated using Masson Trichrome staining. Adipocyte size was measured on 10 different fields using perfect image software.

Statistical analysis

As specified in the legends of the figures, data are presented as the mean \pm sd, or mean \pm sem and $P < 0.05$ was considered statistically significant. Non-parametric Mann and Whitney test was used to compare two groups, with a Welch correction when distribution was not Gaussian.

Results

Change in pangenomic signatures after intermittent hypoxia exposure in liver

Confirming previous results in lean mice, short term CIH did not translate in changes in liver immuno-histochemistry, both using hematoxin eosin (to detect vacuoles of steatosis) or Trichrom Masson (to detect fibrosis) as seen in **Figure 1a**. Despite, no noticeable histological liver changes, we observed major transcriptomic changes. As expected HIF1 α gene expression, the most important pathway modified by hypoxia, was significantly different between groups in liver (3.6 fold higher in the CIH+ group as displayed on **supplemental Figure 1**) confirming the significant impact of two weeks of CIH exposure on this major transcription factor. We further characterized the specific effects of CIH on liver using transcriptomic signatures. The Significance Analysis of Microarrays (SAM) procedure detected 184 up- and 192 down-regulated genes when comparing CIH+ to controls. The functional analysis of genes, annotated with categories of the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) are shown in **Figure 1c**. Significant up-regulated pathways included oxidative phosphorylation, tricarboxylic acid (TCA) cycle, synthesis and degradation of citrate and ketone bodies pathways. Significant down-regulated pathways included glycan structures biosynthesis, circadian rhythm, and Notch signaling pathways. We further used GO process functional annotations displayed in **supplemental Figure 2** which confirmed that significant up-regulated pathways included transport, metabolic process oxido-reduction, electron transport chain and lipid metabolism and transport, generation of precursor metabolites and energy pathways. Genes involved in the respiratory chain complexes (such as cytochrome c oxidase, NADH dehydrogenase and ATP synthase), acetyl-CoA production, β -oxydation enzymes (such as acetyl-Coenzyme-A acyltransferase 2) but also ketogenesis (such as 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase, 3-hydroxybutyrate dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase) were up-regulated. By contrast, other gene were down-regulated such as genes involved in the regulation of activities of respiratory complexes (nitric oxide associated 1 (NOA1)) and glutathione S-transferase involved in detoxification of electrophilic compounds including products of oxidative stress. Overall these results suggest an increased lipogenesis and β -oxydation, increased mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) and decreased detoxification of ROS production after 14 days of CIH.

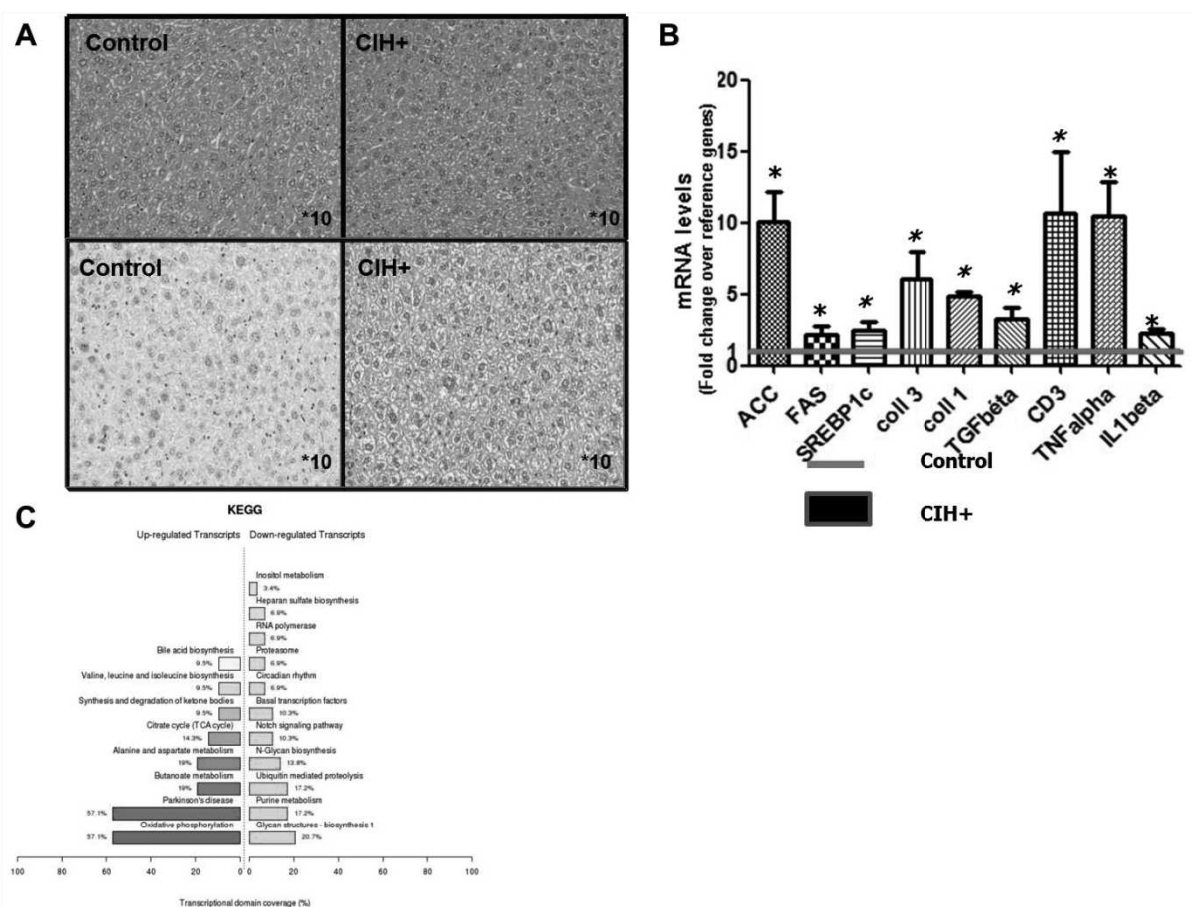


Figure 1: NAFLD pathway increased during CIH. a) KEGG Pathways up and down regulated between CIH+ and controls in the liver. Up-regulated pathways are highlighted in red or yellow whereas down-regulated pathways are represented in green or blue. The tool Funnet <http://www.inside-r.org/node/45909> was used to build this figure b) immuno-histochemistry of liver tissue. The upper panel uses hematoxylin eosin staining and the lower panel uses Trichrom masson. c) Increased expression of genes involved in lipogenesis, extracellular matrix and inflammation; the red line represents the gene expression of the control groups whereas the bars represent gene expression expressed as the ratio to the reference genes in the CIH group (N=8; non parametric Mann and whitney test were used); Data are expressed as mean \pm sd, * indicate significant results.

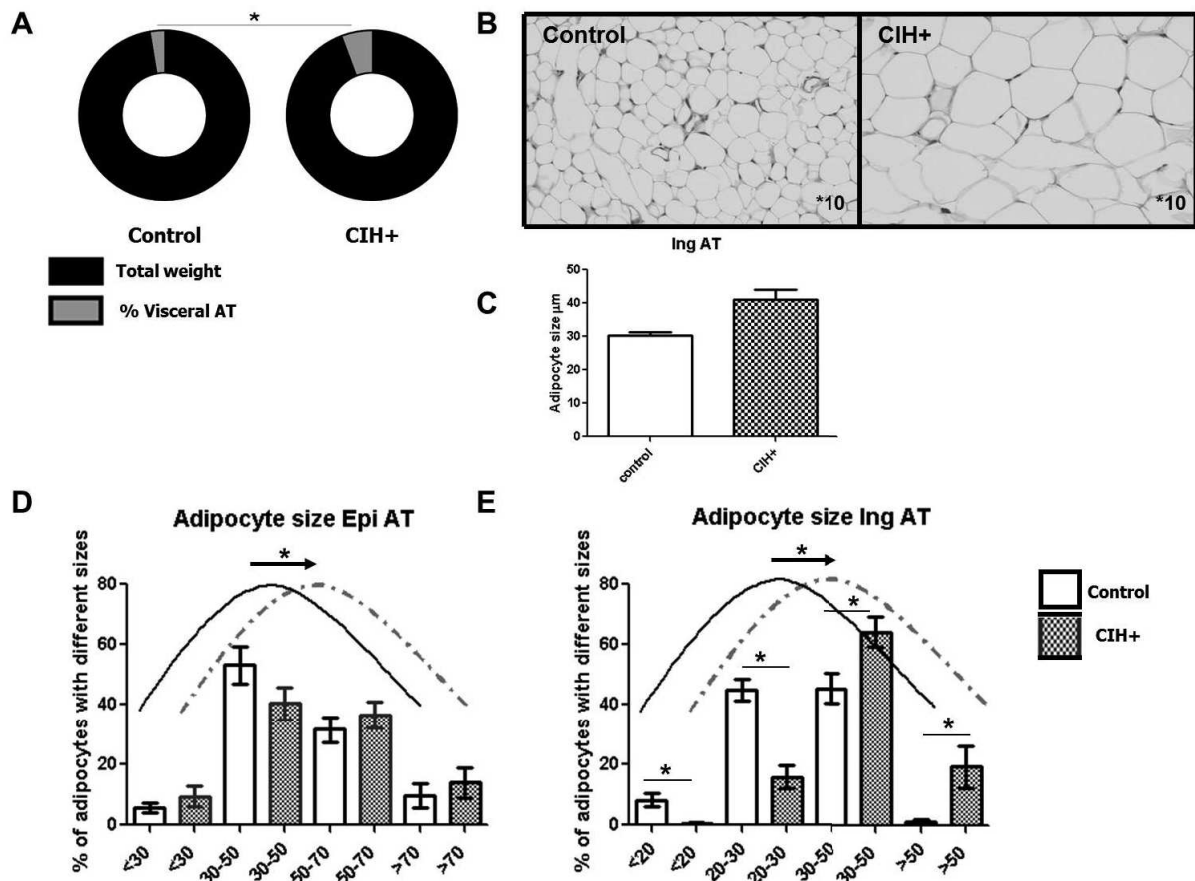


Figure 2: Adiposity and adipose tissue characteristics: a) visceral adiposity in controls and CIH+ mice. Light grey represent the proportion of epididymal adipose tissue and black represent the overall weight. b) Histochemistry of inguinal adipose tissue stained with hematoxylin eosin in controls and CIH+ mice. c) adipocyte size on inguinal adipose tissue expressed as mean \pm sem. Proportion of adipocytes by diameter size in epididymal (d) and inguinal (e) adipose tissue expressed as mean \pm sd. * indicate significant results. White represents the controls and black the CIH+ mice

Changes of liver Lipogenic, inflammatory and ECM genes after CIH

We further verified whether key genes involved in NAFLD physiopathology were modified by 14 days of CIH using qPCR. We found significant differences in gene expression between controls and CIH+ mice as seen in **Figure 1b**. Genes involved in lipogenesis such as ACC, SREBP1c, FAS were significantly up-regulated by a 10 to 2 fold ratio in CIH+ as compared to controls. Genes involved in extracellular matrix synthesis such as coll 1, coll 3 and TGF β were significantly up-regulated by a 6 to 3 fold ratio in CIH+ as compared to lean controls. Genes involved in inflammation pathway such as lymphocytes marker CD3, and inflammatory cytokines TNF α and IL1 β were significantly up-regulated by a 10 to 2 fold ratio in CIH+ as compared to controls. By contrast we did not observe any difference in PPAR γ transcription factor nor in extracellular matrix degradation proteins (MMP2, MMP9) nor in total or pro or anti-inflammatory macrophages markers (CD68, CD11b, arginase) (data not shown). Overall, microarrays as well as our RT-PCR results demonstrated up-regulation in pathways involved in NAFLD namely lipogenesis, β -oxydation, extracellular matrix and inflammation after 14 days of CIH in non-obese mice.

Increase of adipocyte size after CIH

After 14 days of CIH, although lean controls slightly gain weight (+1.16 \pm 1.2g), CIH+ mice lost weight (-0.1 \pm 2.3g ns). We measured visceral adiposity at sacrifice, expressed as the ratio of epididymal AT on total body weight. We observed that CIH+ mice exhibited at least two fold more visceral fat compared to the normoxia group despite slight decreased of total weight (**Figure 2A**). In epididymal AT, there was an increased proportion of larger adipocytes in CIH+ ($p=0.001$), which did not reach significance when compared by adipocyte size intervals. By contrast, in inguinal AT (subcutaneous depot), mean adipocyte size was significantly increased in CIH+ as depicted in **Figure 2D**. Furthermore, the distribution of adipocytes sizes varied across all size intervals in CIH+ with a shift towards bigger adipocytes (**Figure 2B, C and E**).

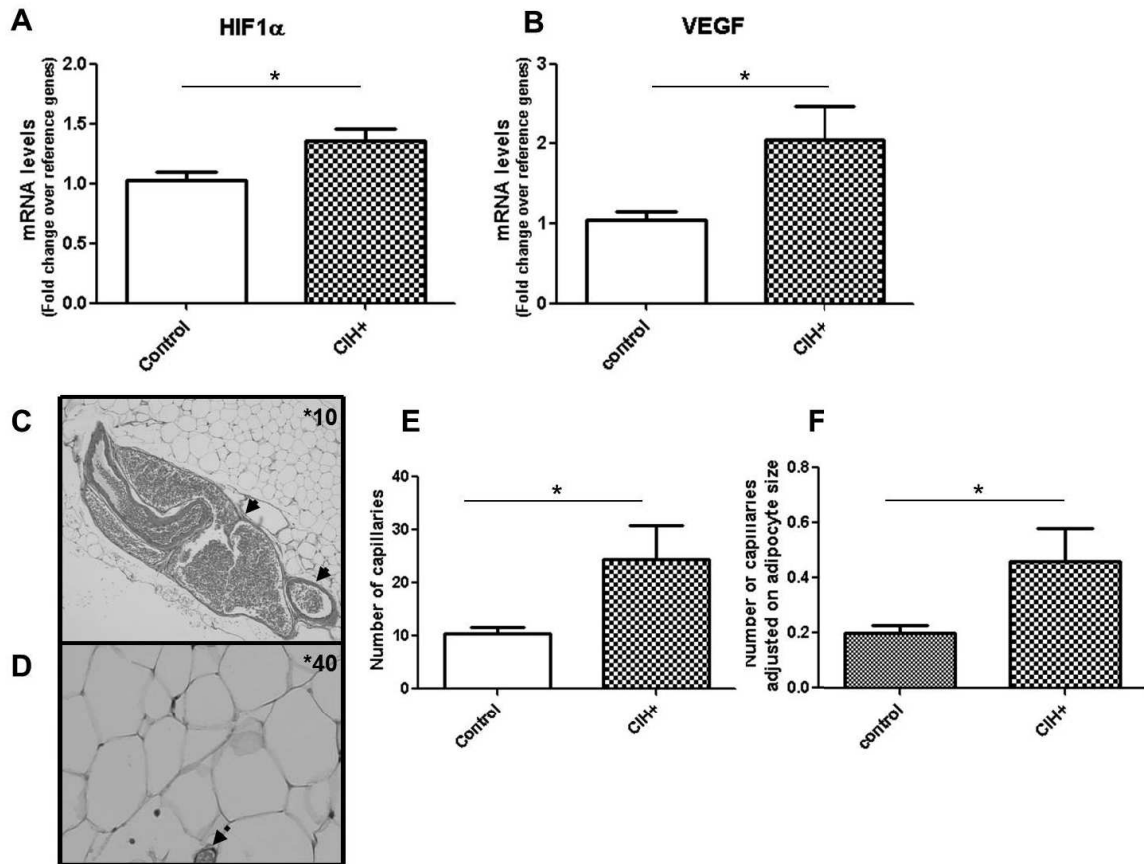


Figure 3: CIH effects on vascularisation in epididymal adipose tissue. a) HIF1 α gene expression in controls and CIH+ animals, b) VEGF expression in controls and CIH+ animals expressed as mean \pm sem. * indicate significant results. White represents the controls and black the CIH+ mice. c) histochemistry using hematoxylin eosin staining in epididymal adipose tissue of a representative mice. Upper panel represent big vessels whereas lower panel represent capillaries. d) Total number of capillaries in the overall paraffin mounted biopsy in controls and CIH+ mice. e) Total number of capillaries adjusted on adipocyte size in controls and CIH+ animals.

Increased adipose tissue vascularization after CIH

As in the liver, HIF1 α gene expression was significantly increased in epididymal AT in CIH+ as compared to controls (by 1.5 fold; p=0.04) **Figure 3A**. HIF-1 regulates vascular endothelial growth factor (VEGF) transcription and accordingly we found a two fold significant increase in VEGF in epididymal AT from CIH+ as compared to controls (p=0.04) **Figure 3B**. This was associated with a significant increase in the number of capillaries (**Figure 3C, D**) even after normalization by adipocyte size, upon immunohistochemistry (**Figure 3E, F**).

Change in pan-genomic signatures characterize intermittent hypoxia exposure in fat tissue

We characterized the effects of CIH on epididymal AT using transcriptomic signatures. We detected 4158 up- and 1654 down-regulated genes when comparing CIH+ to controls. Functional annotations using KEGG are shown in **Figure 4a** and using GO annotation on **Supplemental Figure 3**. Significant up-regulated pathways included MAPK signaling, insulin signaling, regulation of actin cytoskeleton, Wnt signalling, cancer and apoptosis pathways. By contrast, down-regulated pathways included oxidative phosphorylation, citrate cycle, fatty acid metabolism pathways. Furthermore, up-regulated genes involved genes related to inflammation as well as TLR4 and genes from the extra-cellular matrix such as collagens and integrins and extra cellular matrix remodelling such as LOX1. Down-regulated genes were those of the respiratory complex chain (NADH dehydrogenase, ATP synthase), those leading glycolysis products into the Krebs cycle and those involved in β -oxydation and lipoprotein lipase. Overall those results suggest a concomitant down-regulation of AT metabolism and an up-regulation of pathological alterations of its structure (inflammation and remodeling) under CIH as compared to controls.

Finally, we 192 genes were common to both tissues and were differentially expressed in liver and epididymal AT upon CIH as represented on figure 4b. Interestingly 54 and 34 were respectively both up and down-regulated in the two tissues. Clock genes were amongst the latter. By contrast 174 were down regulated in the liver and up-regulated in the AT and 27 were up-regulated in the liver and down regulated in the AT mostly part of the respiratory chain and production of acetyl co-A.

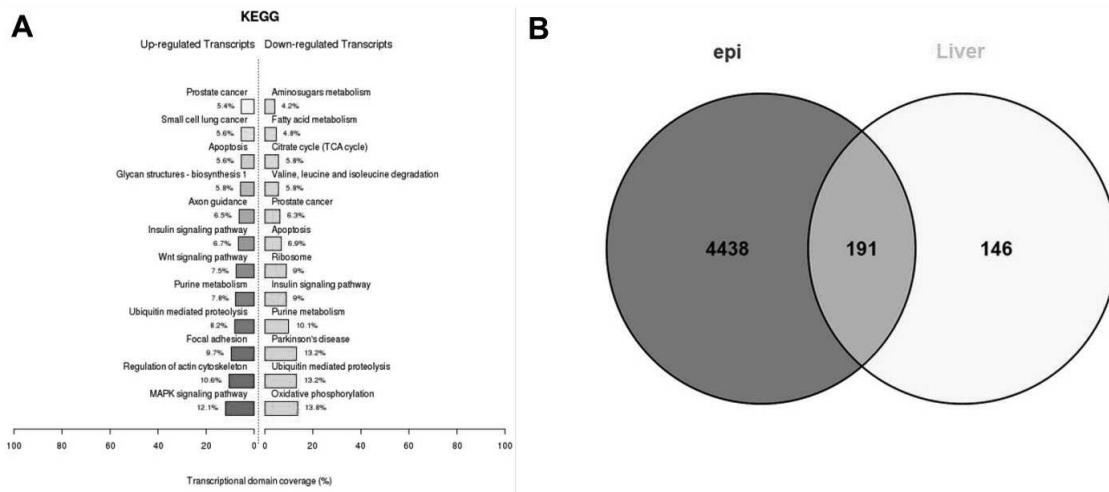


Figure 4 Pathways up and down regulated between CIH+ and controls in the epididymal adipose tissue using KEGG annotations: a) Up-regulated pathways are highlighted in red or yellow whereas down-regulated pathways are represented in green or blue; b) common gene differentially expressed in liver and AT.

Discussion

This is the first description of concomitant transcriptomic signature reflecting the effects of two weeks of intermittent hypoxia exposure in liver and AT, independently of obesity. 14 days of CIH, in lean mice, induce differential effects on liver and AT. It activates at the transcriptomic level, pathways related to NAFLD physiopathology (lipogenesis, free-fatty acid metabolism, extra-cellular remodeling and inflammation) as summarized in figure 5. However such a short-term exposure does not yet translate into liver tissue alterations. By contrast, CIH rapidly impact AT depots by promoting visceral adiposity with a shift to larger adipocytes. Furthermore, there is an extra cellular matrix remodeling of AT with adaptations to CIH by increasing vascularization, and altered metabolism.

This is the first study that allows a broader view of the pathways involved in the effects of CIH on AT and liver. Concomitantly to the expected HIF1 α up-regulation, we observed an increase in genes mediating liver lipogenesis, which is in accordance with previous data. Indeed, only 5 days of IH already increased key genes involved in fatty acid synthesis namely SREBP-1, SCAP, and SCD-1 (15,16). Conversely, in mice with partial deficiency of HIF1 α lipogenesis increase was partially blunted (16). However, we herein display a more complete picture regarding the different pathways of NASH pathogenesis. Indeed, we showed that not only lipogenesis is increased but also lipid metabolism pathways such as β -oxydation and TCA cycle which are two key mechanisms known in NASH development (25). Interestingly, we observe that 14 days of CIH seem to induce an overall increase in pathways leading to Acetyl co-A production. During NAFLD, in order to deal with increase Acetyl co-A influx, TCA cycle is up-regulated, as demonstrated in a study using labeled tracers comparing patients with high or low intra-hepatic triglyceride without OSA. By contrast, ketogenesis, evaluated by the production of β -hydroxybutyrate turn-over, was unchanged (26) in this setting. In fact, a recent kinetic study displayed that ketogenesis is induced in the first 16 weeks of HFD and NAFLD development and further decreases below normal value when the HFD is pursued for 32 weeks with the exacerbation of NAFLD severity, suggesting a progressive defect in that ketogenesis adaptative response (27). Furthermore, it was recently demonstrated in mice that defect in ketogenesis induced major

increase in hepatic triglyceride content and liver inflammation under high-fat diet. By contrast enhancing ketogenesis rescued the normal TCA cycle (28). Thus ketogenesis is believed to play a major role in the regulation of hepatic acyl-CoA metabolism and TCA cycle function in the absorptive state and might therefore modulate NAFLD (29). We herein observed a new finding namely the up-regulation of ketogenesis during CIH. This could account for several hypotheses. On the one hand, it might represent an adaptation to deal with the increase of Acetyl co-A in order to produce energy for the liver (30), in this specific context of lack of oxygen. It has indeed been demonstrated that although mitochondrial content and TCA cycle increase during NAFLD, mitochondrial consumption of O₂ and ATP synthesis are inefficiently coupled (27). Furthermore, it might also support the need to increase the energy supply to further support the function of other tissues such as AT where we observed a blunted metabolism. On the other hand, since hepatic cells do not possess the final enzyme to oxidize ketone bodies, increasing ketogenesis at this early stage of CIH could represent an early adaptation to protect against the development of liver alterations. Indeed, despite major changes at the gene expression level, we did not observe any modifications at the tissue level after such a short CIH duration in lean mice, in conformity with previous studies (12,15).

Genes from the respiratory complex chain were up-regulated, suggesting an increased oxidative phosphorylation (OXPHOS). However concomitantly, CIH mice display a down-regulation of NOA1, a protein involved in the machinery that adjusts OXPHOS activity to oxygen concentrations. It has been demonstrated that when mNOA1 levels drops, the stability of the respiratory chain complex is decreased thus inducing increased oxidative stress (31). Likewise, mechanisms involved to detoxify oxidative stress are down-regulated namely glutathione S-transferase. Overall these data are concordant with previous data which displayed that CIH induced liver oxidative stress (17–19), a process that is also enhanced during NAFLD development (27). All of the above suggest that CIH induces mitochondrial dysfunction, a process that is at stake also in NAFLD without OSA (32). This suggest that the addition of CIH in a context NALFD risk, such as insulin resistance or obesity, might exacerbate this mitochondrial dysfunction and participate to the increased severity of NALFD observed in patients with morbid obesity and OSA (7,33). Finally we display another

important observation which is the down-regulation of circadian pathways during CIH. There is currently a large literature linking clock genes to the regulation of lipid metabolism and subsequent hepatic steatosis and NAFLD development (30). Sleep duration and quality has been demonstrated as linked to NAFLD in epidemiological studies (34). A new hypothesis brought up by our data is that CIH and associated alteration in sleep quality might play a deleterious role in exacerbating liver alterations by modulating circadian rhythm.

Remarkably, our study did not solely focus on liver but also evaluated the effects of CIH on the cross talk between AT depots and liver. We demonstrated that although lipogenesis, oxidative phosphorylation pathways, β -oxidation and TCA cycle are increased in the liver, the reverse occurs in the AT with a reduced β -oxidation, TCA cycle activity and fatty acid metabolism. These results suggest that mice are able to adapt their overall biology to a short term CIH by blunting AT metabolism which might enable the liver to remain functional despite reduced oxygen availability. A previous study had established that when rats were submitted to CIH, local PO₂ differed between organs with a nice intermittent hypoxia profile occurring in the liver which contrast to the rather sustained hypoxia in fat tissue (35). The 50% dramatic reduction in partial pressure in AT might account for the reduced oxidative-phosphorylation pathway we herein observe. We also showed that CIH induced AT adaptation to reduced oxygen availability by increasing the expression of VEGF, a target pathway of HIF1 α (36). Subsequently, and as soon as 14 days, CIH induced an increase in the number of capillaries in the epididymal AT. We have recently demonstrated in young healthy humans exposed to 14 nights of intermittent hypoxia that such an exposure up-regulates serum VEGF (37). This is a phenomenon often observed in cancer where local hypoxia triggers an increase vascularization (38,39).

We also observed that CIH induces moderate weight loss in accordance to previous reports (12,35,40). However we herein went further and demonstrated that CIH increases visceral adiposity which is known to play a role in metabolic related diseases such as NAFLD (22,33). Furthermore, we displayed remodeling of AT towards larger adipocytes. Interestingly, in a previous study performed in obese human individuals, we did not see any differences in adipocyte size or in macrophage infiltration in patients with or without CIH (7).

However, the importance and the duration of obesity might have blunted additional effects of CIH on AT. The novelty of our study relies in the fact that we studied the effect of CIH per se on AT of lean mice. Hypertrophy is known to be associated with increased production of inflammatory cytokines (41) in accordance to the observed up-regulation of some inflammatory genes. In fact a recent human study evaluated in obese individuals with or without OSA the transcriptomic signatures of visceral AT, using affimetrix microarray (42). They also display that inflammatory genes were up-regulated as well as other pathway such as ubiquitine proteasome proteolysis, involved in many processes including cell cycle, apoptosis, and responses to inflammatory and oxidative stress (43). In lean animals, we also observed a reduced AT metabolism, but our results differ from a previous mice study displaying increased expression of genes involved in the respiratory chain in visceral AT of lean mice submitted to CIH (44). Accordingly to our data, in humans fat samples, OSA was not associated with respiratory chain complex genes up-regulation (42). In the discordant rodent experiment, mice were older and most importantly, the CIH protocol was unusual with cycles of 3 minutes of normoxia/hypoxia instead of 1min as most generally performed (13,35,40), which does not reflect human OSA exposure to intermittent hypoxia. The cyclic pattern of IH exposure is known impact on HIF1 α induction and subsequently on host metabolism (45).

Finally, we shown that in the context of CIH, visceral AT up-regulates genes involved in extra-cellular matrix (collagens, integrins) and it's remodelling (LOX). Extracellular matrix dynamics plays a key role in inducing adipogenesis and functional adipocytes (46). Interestingly, a recent study performed in humans display that LOX serum concentrations were increased in OSA patients with NASH. Moreover CPAP, which is a treatment of OSA that reduces CIH, was associated with reduction of LOX systemic concentrations (33). The authors show that it was induced in liver. By contrast, we only saw an increase in the visceral AT. However, our mice did not display histological NASH and were of normal weight whereas they investigated LOX in the context of massively obese individuals with NASH. From our point of view, LOX is indeed an important marker involved in collagen cross-linking. It is known to be increased in AT from obese individuals with fibrosis (47). Furthermore AT fibrosis is associated with metabolic alterations (48) as well as the severity of liver fibrosis

and NAFLD (49). Therefore, it might well be that the increase in LOX systemic concentration seen in patients with OSA and NAFLD (33) comes from both liver fibrosis but also that of AT during obesity.

Although our findings are novel and shed a new light into the relationship between OSA, NAFLD and AT biology, we are aware of some limits of our study. In this specific experiment, we did not assess serum concentrations to evaluate the degree of metabolic alterations such as fasting glucose and triglycerides. However, it has been extensively demonstrated already that CIH induces those alterations even in lean mice (12,15) before they display any liver alterations. Another limit is that we did not confirm our gene expression results with protein concentration assessment.

Conclusion

Overall, we report for the first time the effects of two weeks of CIH on both AT and liver in lean animals. Although we do not observe any tissue alterations at the liver level, our results demonstrate that relatively short term CIH induces all the pathways involved in future NAFLD development. More interestingly we uncover novel mechanistic pathways that are early induced in short term CIH such as ketogenesis. We also display that CIH display specific responses to CIH in liver and AT. Oxidation-phosphorylation is increased in the liver but in contrast is down-regulated in the AT suggesting early adaptation to protect the normal liver function. Furthermore, AT is able to rapidly increase its vascularization to adapt to the decrease oxygen availability.

Acknowledgements

This work was supported by ANR (IHU N°) and Fondation pour la Recherche Médicale (N° DEQ)

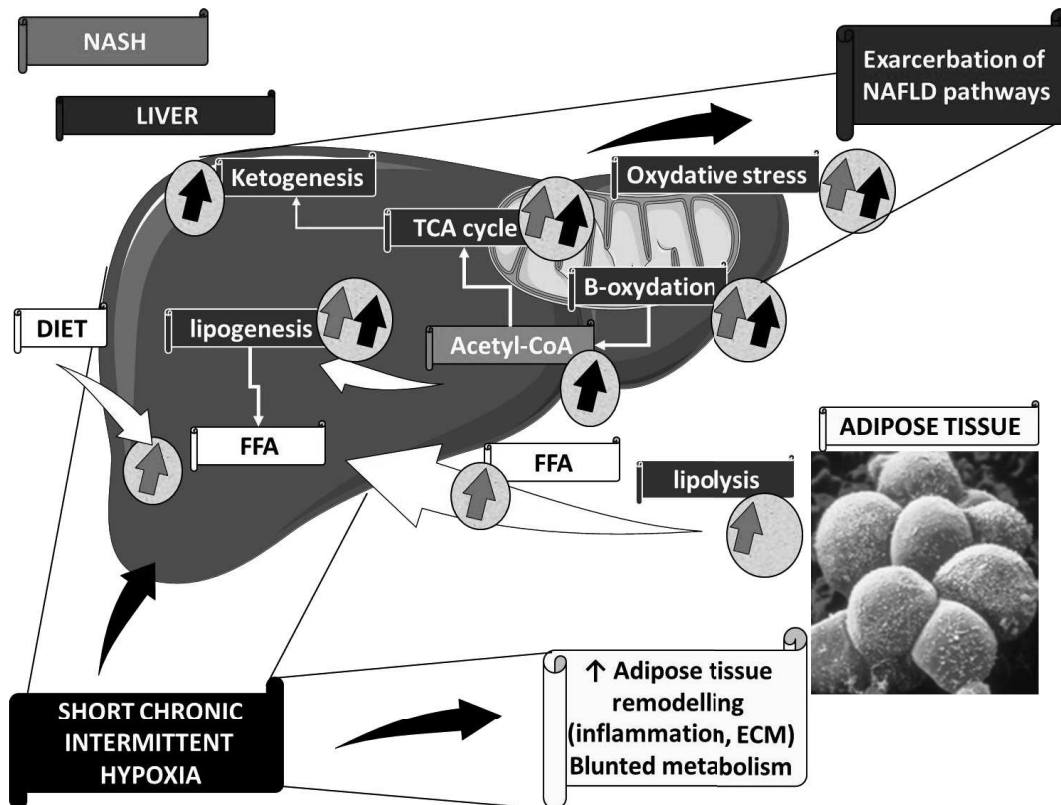


Figure 5: Summary of physiopathological pathways involved during NASH and CIH. Principal pathways involved in liver metabolism are outlined in blue. Pathways increased in NAFLD are displayed in red. Pathways increased during CIH are displayed in black.

References

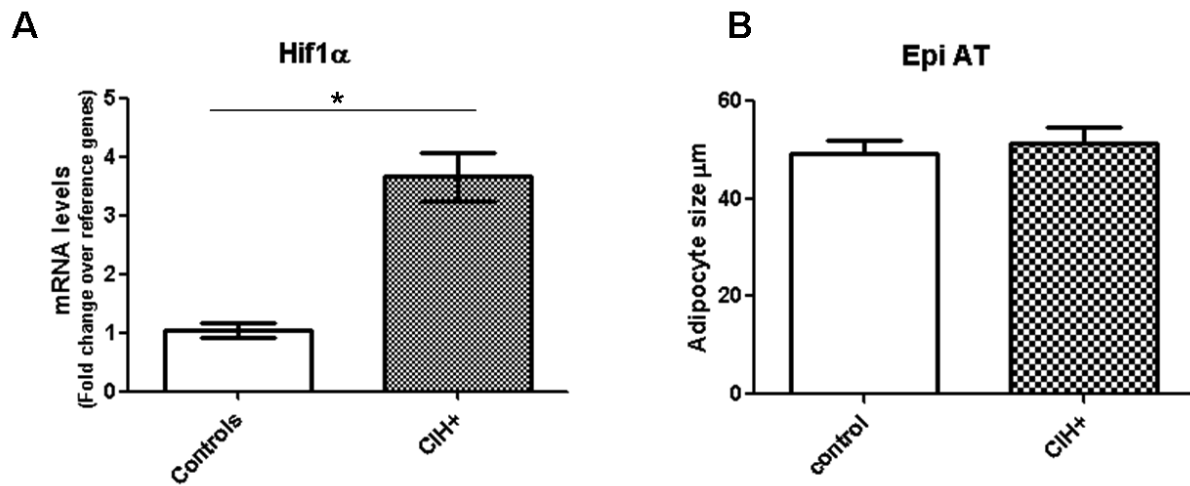
1. Baguet J-P, Barone-Rochette G, Tamisier R, Levy P, Pépin J-L. Mechanisms of cardiac dysfunction in obstructive sleep apnea. *Nat Rev Cardiol*. 2012 Dec;9(12):679–88.
2. Mesarwi O, Polak J, Jun J, Polotsky VY. Sleep disorders and the development of insulin resistance and obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2013 Sep;42(3):617–34.
3. Sanyal AJ, Brunt EM, Kleiner DE, Kowdley KV, Chalasani N, Lavine JE, et al. Endpoints and clinical trial design for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2011 Jul;54(1):344–53.
4. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science*. 2011 Jun 24;332(6037):1519–23.
5. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology*. 1998 Apr;114(4):842–5.
6. Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology*. 2010 Aug;52(2):774–88.
7. Aron-Wisnewsky J, Minville C, Tordjman J, Lévy P, Bouillot J-L, Basdevant A, et al. Chronic intermittent hypoxia is a major trigger for non-alcoholic fatty liver disease in morbid obese. *J Hepatol*. 2012 Jan;56(1):225–33.
8. Minville C, Hilleret M-N, Tamisier R, Aron-Wisnewsky J, Clement K, Trocme C, et al. Nonalcoholic fatty liver disease, nocturnal hypoxia, and endothelial function in patients with sleep apnea. *Chest*. 2014 Mar 1;145(3):525–33.
9. Polotsky VY, Patil SP, Savransky V, Laffan A, Fonti S, Frame LA, et al. Obstructive sleep apnea, insulin resistance, and steatohepatitis in severe obesity. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Feb 1;179(3):228–34.
10. Musso G, Cassader M, Olivetti C, Rosina F, Carbone G, Gambino R. Association of obstructive sleep apnoea with the presence and severity of non-alcoholic fatty liver disease. A systematic review and meta-analysis. *Obes Rev Off J Int Assoc Study Obes*. 2013 May;14(5):417–31.
11. Corey KE, Misdraji J, Zheng H, Malecki KM, Kneeman J, Gelrud L, et al. The absence of obstructive sleep apnea may protect against non-alcoholic fatty liver in patients undergoing bariatric surgery. *PloS One*. 2013;8(5):e62504.
12. Drager LF, Li J, Reinke C, Bevans-Fonti S, Jun JC, Polotsky VY. Intermittent hypoxia exacerbates metabolic effects of diet-induced obesity. *Obes Silver Spring Md*. 2011 Nov;19(11):2167–74.
13. Polotsky VY, Li J, Punjabi NM, Rubin AE, Smith PL, Schwartz AR, et al. Intermittent hypoxia increases insulin resistance in genetically obese mice. *J Physiol*. 2003 Oct 1;552(Pt 1):253–64.
14. Drager LF, Li J, Shin M-K, Reinke C, Aggarwal NR, Jun JC, et al. Intermittent hypoxia inhibits clearance of triglyceride-rich lipoproteins and inactivates adipose lipoprotein lipase in a mouse model of sleep apnoea. *Eur Heart J*. 2012 Mar;33(6):783–90.
15. Li J, Thorne LN, Punjabi NM, Sun C-K, Schwartz AR, Smith PL, et al. Intermittent hypoxia induces hyperlipidemia in lean mice. *Circ Res*. 2005 Sep 30;97(7):698–706.

16. Li J, Bosch-Marce M, Nanayakkara A, Savransky V, Fried SK, Semenza GL, et al. Altered metabolic responses to intermittent hypoxia in mice with partial deficiency of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Physiol Genomics*. 2006 May 16;25(3):450–7.
17. Jun J, Savransky V, Nanayakkara A, Bevans S, Li J, Smith PL, et al. Intermittent hypoxia has organ-specific effects on oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008 Oct;295(4):R1274–81.
18. Savransky V, Bevans S, Nanayakkara A, Li J, Smith PL, Torbenson MS, et al. Chronic intermittent hypoxia causes hepatitis in a mouse model of diet-induced fatty liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Oct;293(4):G871–7.
19. Savransky V, Nanayakkara A, Vivero A, Li J, Bevans S, Smith PL, et al. Chronic intermittent hypoxia predisposes to liver injury. *Hepatology*. 2007 Apr;45(4):1007–13.
20. Savransky V, Reinke C, Jun J, Bevans-Fonti S, Nanayakkara A, Li J, et al. Chronic intermittent hypoxia and acetaminophen induce synergistic liver injury in mice. *Exp Physiol*. 2009 Feb;94(2):228–39.
21. Li J, Grigoryev DN, Ye SQ, Thorne L, Schwartz AR, Smith PL, et al. Chronic intermittent hypoxia upregulates genes of lipid biosynthesis in obese mice. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2005 Nov;99(5):1643–8.
22. Kim D, Chung GE, Kwak M-S, Seo HB, Kang JH, Kim W, et al. Body Fat Distribution and Risk of Incident and Regressed Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. 2015 Jul 27;
23. Tordjman J, Poitou C, Hugol D, Bouillot J-L, Basdevant A, Bedossa P, et al. Association between omental adipose tissue macrophages and liver histopathology in morbid obesity: influence of glycemic status. *J Hepatol*. 2009 Aug;51(2):354–62.
24. Dematteis M, Godin-Ribuot D, Arnaud C, Ribuot C, Stanke-Labesque F, Pépin J-L, et al. Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding the human disease. *ILAR J Natl Res Council Inst Lab Anim Resour*. 2009;50(3):262–81.
25. Begrich K, Massart J, Robin M-A, Bonnet F, Fromenty B. Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2013 Oct;58(4):1497–507.
26. Sunny NE, Parks EJ, Browning JD, Burgess SC. Excessive hepatic mitochondrial TCA cycle and gluconeogenesis in humans with nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab*. 2011 Dec 7;14(6):804–10.
27. Satapati S, Sunny NE, Kucejova B, Fu X, He TT, Méndez-Lucas A, et al. Elevated TCA cycle function in the pathology of diet-induced hepatic insulin resistance and fatty liver. *J Lipid Res*. 2012 Jun;53(6):1080–92.
28. Cotter DG, Ercal B, Huang X, Leid JM, d'Avignon DA, Graham MJ, et al. Ketogenesis prevents diet-induced fatty liver injury and hyperglycemia. *J Clin Invest*. 2014 Dec;124(12):5175–90.
29. Patman G. NAFLD: Ketogenesis could be a determinant of steatohepatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014 Dec;11(12):702.
30. Rui L. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol*. 2014 Jan;4(1):177–97.

31. Heidler J, Al-Furoukh N, Kukat C, Salwig I, Ingelmann M-E, Seibel P, et al. Nitric oxide-associated protein 1 (NOA1) is necessary for oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiratory complexes. *J Biol Chem*. 2011 Sep 16;286(37):32086–93.
32. García-Ruiz C, Baulies A, Mari M, García-Rovés PM, Fernandez-Checa JC. Mitochondrial dysfunction in non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance: cause or consequence? *Free Radic Res*. 2013 Nov;47(11):854–68.
33. Mesarwi OA, Shin M-K, Drager LF, Bevans-Fonti S, Jun JC, Putcha N, et al. Lysyl Oxidase as a Serum Biomarker of Liver Fibrosis in Patients With Severe Obesity and Obstructive Sleep Apnea. *Sleep*. 2015 Jun 11;
34. Kim C-W, Yun KE, Jung H-S, Chang Y, Choi E-S, Kwon M-J, et al. Sleep duration and quality in relation to non-alcoholic fatty liver disease in middle-aged workers and their spouses. *J Hepatol*. 2013 Aug;59(2):351–7.
35. Reinke C, Bevans-Fonti S, Drager LF, Shin M-K, Polotsky VY. Effects of different acute hypoxic regimens on tissue oxygen profiles and metabolic outcomes. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985*. 2011 Sep;111(3):881–90.
36. Greijer AE, van der Groep P, Kemming D, Shvarts A, Semenza GL, Meijer GA, et al. Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). *J Pathol*. 2005 Jul;206(3):291–304.
37. Briancçon-Marjollet A, Pépin J-L, Weiss JW, Lévy P, Tamisier R. Intermittent hypoxia upregulates serum VEGF. *Sleep Med*. 2014 Nov;15(11):1425–6.
38. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):677–84.
39. Lévy P, Godin-Ribuot D, Pepin J-L. Sleep apnoea and cancer: the new challenge. *Eur Respir J*. 2014 Jun;43(6):1567–70.
40. Yao Q, Shin M-K, Jun JC, Hernandez KL, Aggarwal NR, Mock JR, et al. Effect of chronic intermittent hypoxia on triglyceride uptake in different tissues. *J Lipid Res*. 2013 Apr;54(4):1058–65.
41. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Mar;92(3):1023–33.
42. Gharib SA, Hayes AL, Rosen MJ, Patel SR. A pathway-based analysis on the effects of obstructive sleep apnea in modulating visceral fat transcriptome. *Sleep*. 2013 Jan;36(1):23–30.
43. Finley D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:477–513.
44. Gharib SA, Khalyfa A, Abdelkarim A, Ramesh V, Buazza M, Kaushal N, et al. Intermittent hypoxia activates temporally coordinated transcriptional programs in visceral adipose tissue. *J Mol Med Berl Ger*. 2012 Apr;90(4):435–45.
45. Yuan G, Nanduri J, Khan S, Semenza GL, Prabhakar NR. Induction of HIF-1alpha expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca²⁺ signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR. *J Cell Physiol*. 2008 Dec;217(3):674–85.
46. Mariman ECM, Wang P. Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2010 Apr;67(8):1277–92.
47. Divoux A, Tordjman J, Lacasa D, Veyrie N, Hugol D, Aissat A, et al. Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes*. 2010 Nov;59(11):2817–25.

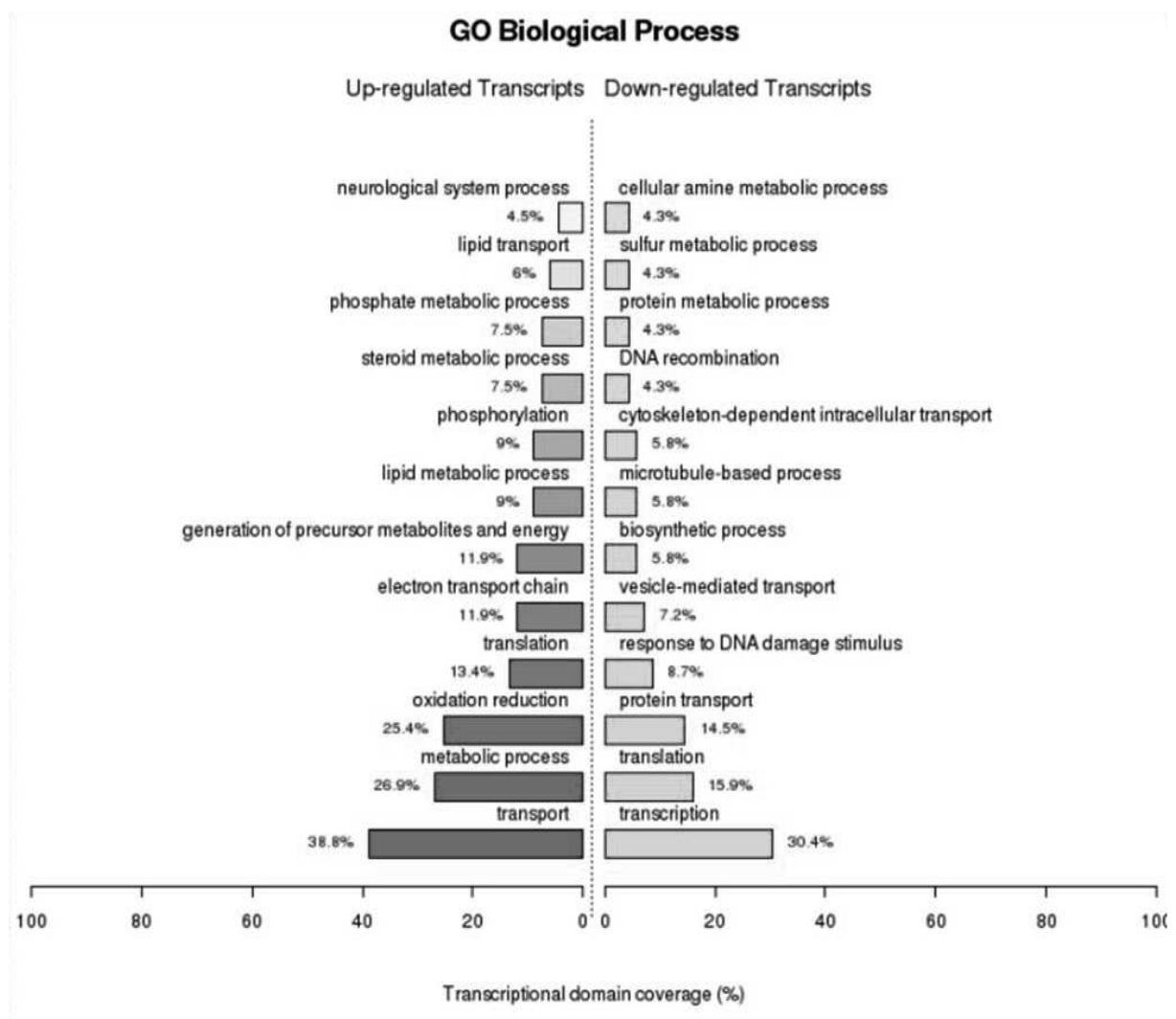
48. Pasarica M, Gowronska-Kozak B, Burk D, Remedios I, Hymel D, Gimble J, et al. Adipose tissue collagen VI in obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Dec;94(12):5155–62.
49. Abdennour M, Reggio S, Le Naour G, Liu Y, Poitou C, Aron-Wisnewsky J, et al. Association of adipose tissue and liver fibrosis with tissue stiffness in morbid obesity: links with diabetes and BMI loss after gastric bypass. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Mar;99(3):898–

Supplemental Figure titles and legends



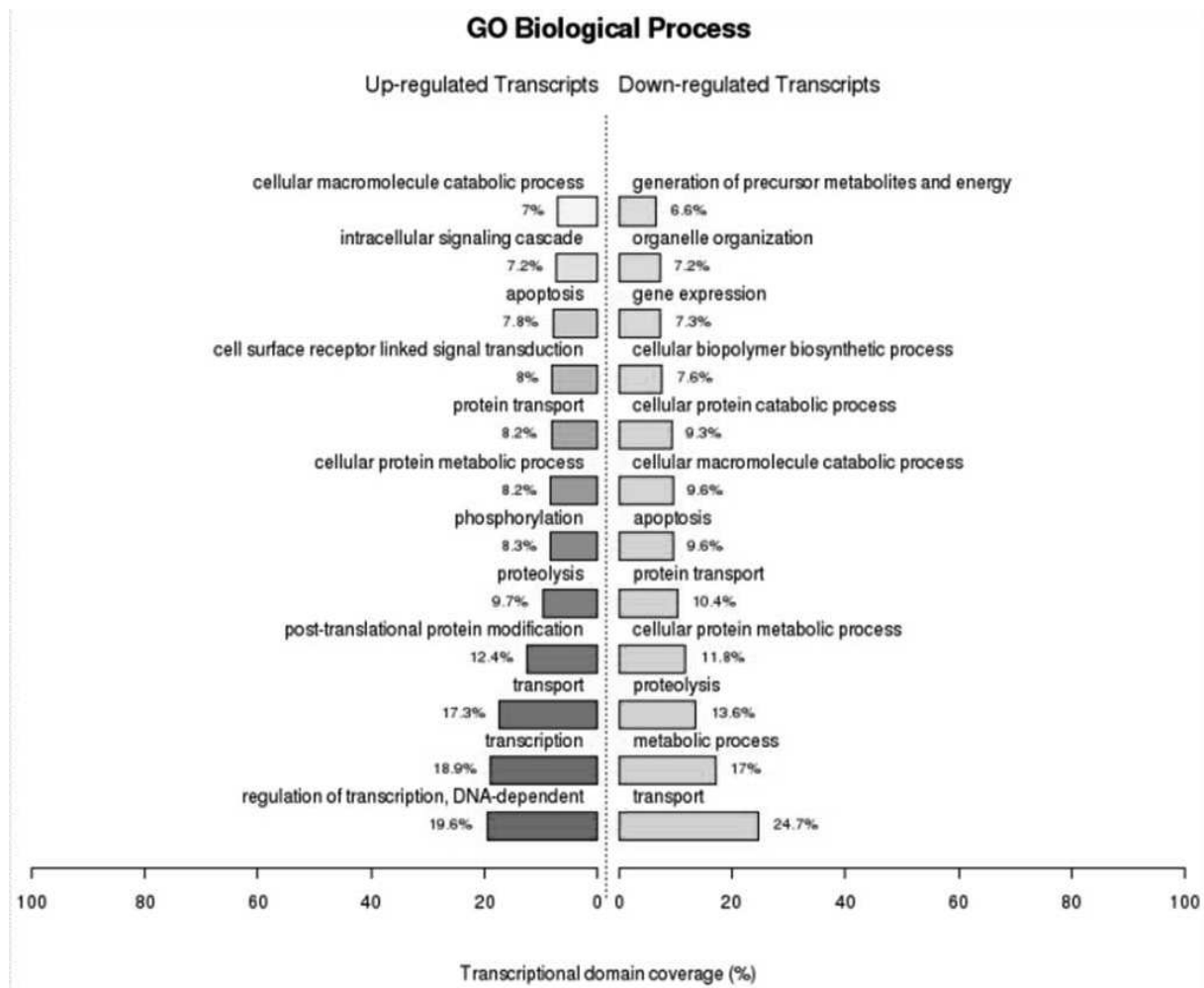
Supplemental figure 1

a) Increased HIF1 α gene expression in CIH+ (black) as compared to controls (white) and expressed as the ratio to reference genes. Data are expressed as mean \pm sd, * indicate significant results b) mean adipocyte size in epididymal adipose tissue in controls white and in CIH+ (black)



Supplemental figure 2: Pathways up and down regulated between CIH+ and controls in the liver using GO level 7 annotations.

Up-regulated pathways are highlighted in red or yellow whereas down-regulated pathways are represented in green or blue



Supplemental figure 3 : Pathways up and down regulated between CIH+ and controls in the epididymal adipose tissue using GO level 7 annotations.

Up-regulated pathways are highlighted in red or yellow whereas down-regulated pathways are represented in green or blue

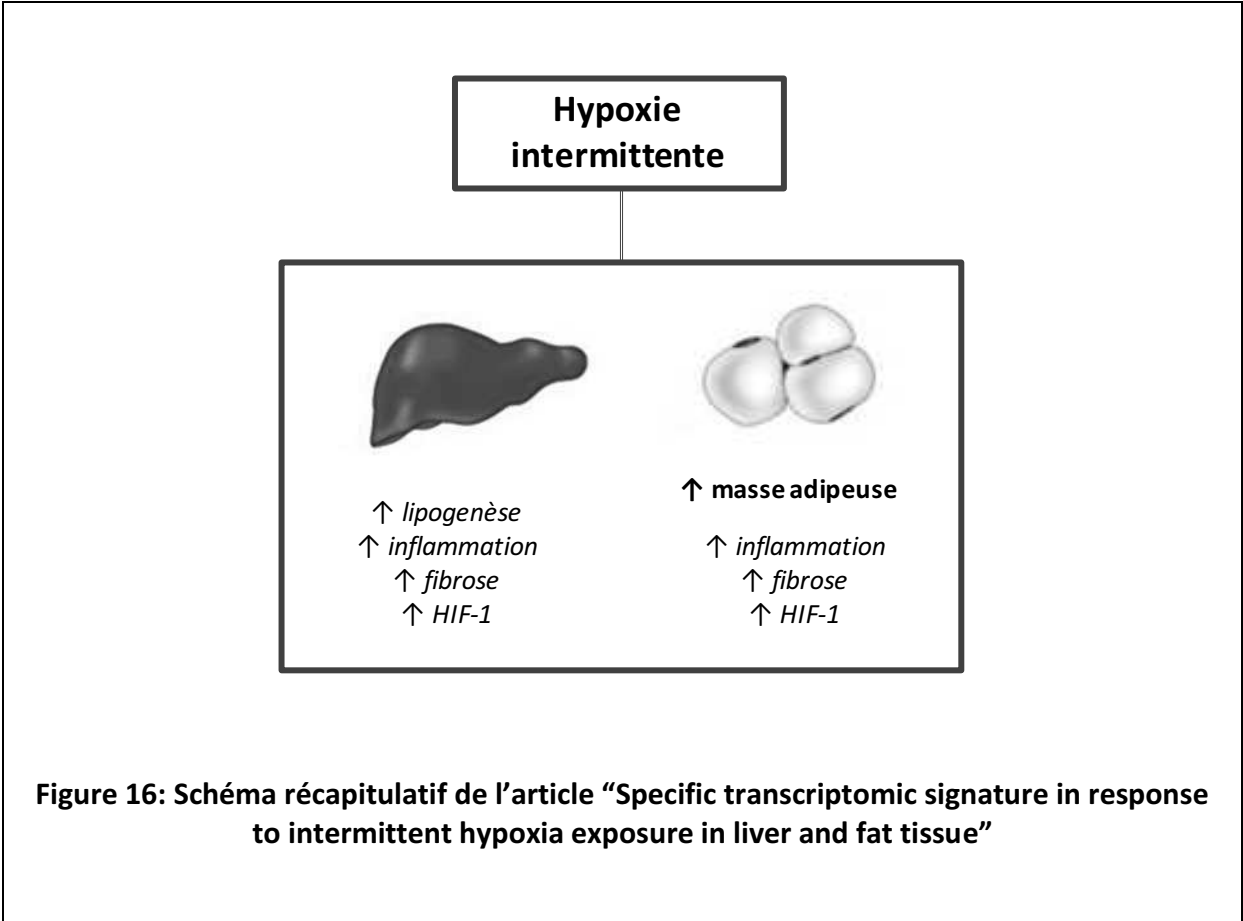


Figure 16: Schéma récapitulatif de l'article "Specific transcriptomic signature in response to intermittent hypoxia exposure in liver and fat tissue"

CHAPITRE 3 : ROLE DU TISSU ADIPEUX VISCERAL DANS LES CONSEQUENCES VASCULAIRES DE L'HYPOXIE INTERMITTENTE

Le SAOS à travers sa composante hypoxique, est fortement associé aux pathologies cardiovasculaires. Il a été bien établi depuis ces dernières années, que les pathologies métaboliques étaient des facteurs de risque majeurs dans le développement d'altérations cardiovasculaires. Parmi les mécanismes reliant les atteintes métaboliques et les altérations vasculaires, l'implication du tissu adipeux dans le développement de plaques athérosclérotiques a bien été démontré.

Les chapitres précédents ont mis en avant une dysfonction du tissu adipeux avec une augmentation de son inflammation ainsi qu'une moindre sensibilité à l'insuline.

Ainsi, dans cette étude nous nous sommes intéressé au rôle potentiel de ce tissu adipeux altéré, sur les processus d'athérogenèse dans les vaisseaux dans le contexte de l'HI.

Pour cela nous avons utilisé des souris prédisposées au développement de plaques d'athéorsclérose (ApoE^{-/-}) que nous avons exposées à l'HI. Une partie des animaux a subit une lipectomie afin d'évaluer l'impact du retrait de ce tissu sur le remodelage vasculaire.

Cette étude montre que l'HI induit un remodelage vasculaire athérosclérotique associé à un remodelage structurel et inflammatoire du tissu adipeux viscéral. Ces effets vasculaires sont abolit lors d'une lipectomie, suggérant l'implication du tissu adipeux remodelé sur les vaisseaux.



Visceral white fat remodelling contributes to intermittent hypoxia-induced atherogenesis

Laureline Poulain^{1,2}, Amandine Thomas^{1,2}, Jennifer Rieusset³, Louis Casteilla⁴, Patrick Levy^{1,2,5}, Claire Arnaud^{1,2,7} and Maurice Dematteis^{1,2,6,7}

Affiliations: ¹INSERM U1042, HP2 Laboratory, Grenoble, ²Faculté de Médecine, Université Joseph Fourier, Grenoble, ³INSERM UMR-1060, CarMeN Laboratory, Lyon, ⁴UMR UPS/CNRS/EFS 5273 INSERM U1031, STROMALab, Toulouse, ⁵Laboratoires du Sommeil et EFCR, CHU, Hôpital A. Michallon, Grenoble, and ⁶Pôle Pluridisciplinaire de Médecine, CHU, Hôpital A. Michallon, Grenoble, France. ⁷Both authors contributed equally.

Correspondence: C. Arnaud, Laboratoire HP2, Institut Jean Roget, Faculté de Médecine de Grenoble, BP 170, 38042 Grenoble Cedex 9, France. E-mail: claire.arnaud@ujf-grenoble.fr

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

Epididymal adipose tissue alterations were investigated in 20-week-old nonobese male apolipoprotein E-deficient mice exposed to intermittent hypoxia (inspiratory oxygen fraction 5–21%, 60-s cycle, 8 h·day⁻¹) or air for 6 weeks. These adipose tissue alterations, as well as metabolic alterations and aortic atherosclerosis, were then assessed in lipectomised or sham-operated mice exposed to intermittent hypoxia or air for 6 weeks.

Intermittent hypoxia induced morphological (shrunken adipocytes), functional (increased uncoupling protein-1 expression) and inflammatory (increased macrophage recruitment and secretion of interleukin-6 and tumour necrosis factor- α) remodelling of epididymal adipose tissue. Hypoxic mice presented more severe dyslipidaemia and atherosclerosis lesions and developed insulin resistance. Epididymal lipectomy attenuated both intermittent hypoxia-induced dyslipidaemia and atherogenesis, but did not improve insulin sensitivity.

Our results confirmed that the dyslipidaemic and proatherogenic effects of intermittent hypoxia are partly mediated through morphological, functional and inflammatory remodelling of visceral white fat, regardless of obesity.

 @ERSpublications

Dyslipidaemic and proatherogenic effects of intermittent hypoxia are partly mediated by visceral white fat remodelling <http://ow.ly/r3rLz>

Received: Feb 01 2013 | Accepted after revision: June 19 2013 | First published online: Sept 26 2013

Support statement: This research was funded by a grant from AGIR@dom to M. Dematteis and a grant from the Heart and Arteries Foundation to C. Arnaud and M. Dematteis.

Conflict of interest: Disclosures can be found alongside the online version of this article at www.erj.ersjournals.com

Copyright ©ERS 2014

Introduction

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

We have shown that intermittent hypoxia induced vascular and systemic inflammation in nonobese C57BL6 [6] and ApoE^{-/-} [9] mice, and noted that intermittent hypoxia also induced inflammatory alterations and morphological changes of EWAT, with histological features of brown adipose tissue [17]. Therefore, we hypothesised that intermittent hypoxia itself could induce EWAT remodelling, which could contribute to metabolic and vascular disorders, independently of any obesity. The aims of the present study were firstly to characterise intermittent hypoxia-induced functional and structural alterations of EWAT using a nonobese mouse model of intermittent hypoxia, then to determine the contribution of this fat remodelling to intermittent hypoxia-induced metabolic and vascular alterations using EWAT-lipectomised animals.

Methods

Animals

35 20-week-old male ApoE^{-/-} mice (C57BL6 background) fed on a standard-chow diet were used. They were weighed throughout the experiments, and food intake was measured daily. The study was conducted in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes [18], and to the Guide for Care and Use of Laboratory Animals [19].

Intermittent hypoxia

Intermittent hypoxia was performed as previously described [6]. The animals were exposed during daytime ($n=10$ per cage, $8\text{ h}\cdot\text{day}^{-1}$, cyclic inspiratory oxygen fraction (FI_{O_2}) 5–21%, 60-s cycle ($60\text{ events}\cdot\text{h}^{-1}$) and lowest blood oxygen saturation up to 60%) for 6 weeks. FI_{O_2} was measured with a gas analyser (ML206, ADInstruments GmbH, Spechbach, Germany) throughout the experiment. Control animals (normoxic mice) were exposed to air in similar cages to reproduce similar noise and turbulences to those of the intermittent hypoxia stimulus. Ambient temperature was maintained at 20–22°C.

Adipose tissue alterations

On the day following the last exposure period, animals were anaesthetised by intraperitoneal ketamine–xylazine mixture ($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}/10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) for bilateral EWAT collection. The tissue was either snap frozen in liquid nitrogen then stored at -80°C for mRNA study, or fixed in 90% ethanol for immunohistochemistry or incubated for cytokine determinations.

Immunohistochemical study

Ethanol-fixed, paraffin-embedded EWAT were sectioned ($3.5\text{ }\mu\text{m}$), deparaffinised in toluene and rehydrated in descending ethanol series, then stained with haematoxylin and eosin to assess tissue

morphology. Adipocyte size was measured from photographs (10×40 magnification) using NIS-Elements microscope imaging software (Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, the Netherlands).

For macrophage staining, sections were incubated overnight at 4°C with a rat anti-F4/80 (1:10; eBiosciences SAS, Paris, France). Endogenous peroxidase activity was blocked with hydrogen peroxide. Nonspecific binding was blocked with normal goat serum (Vector Clinisciences SAS, Nanterre, France). Specific staining was detected using the N-Histofine Simple Stain Mouse Max-PO (Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan) followed by hematoxylin counterstaining. Macrophage infiltration was calculated as the ratio of nuclei of F4/80 positive cells to total nuclei counted in eight fields for each animal ($n=5$ mice per group).

Uncoupling protein-1 and monocyte chemoattractant protein-1 mRNA expression

Uncoupling protein (UCP)-1, the hallmark of brown adipocytes, and monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 mRNA levels were determined by reverse transcription followed by real-time quantitative reverse transcriptase (qRT)-PCR. Total mRNA was extracted from epididymal fat of intermittent hypoxic and normoxic mice ($n=7-11$ per group), isolated with Tri-reagent (Invitrogen Life Technologies SAS, Saint Aubin, France) and analysed by qRT-PCR (ABI-7500; Applied Biosystems Life Technologies SAS, or LightCycler; Roche Diagnostics, Meylan, France). Each sample was analysed in duplicate, and 36B4 or TATA box-binding protein mRNA levels were simultaneously analysed as housekeeping genes (table 1).

Cytokine secretion

EWAT was isolated from mice and weighed. Each pad was divided into two equal pieces and incubated at 37°C with mild shaking in RPMI medium only (Invitrogen) or with the β -adrenergic agonist isoprenaline (4×10^{-5} M; Hospira Enterprises BV, Almere, the Netherlands). The basal condition was defined as cytokine secretion in the absence of the lipolytic agent isoprenaline. After 120 min of incubation, interleukin (IL)-6 and TNF- α were measured in the supernatants using ELISA, according to the manufacturer's instructions (R&D Systems Europe, Lille, France). Cytokine concentrations were expressed as $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ for 1 g of adipose tissue. Plasma levels of IL-6, TNF- α and adiponectin were measured using ELISA (R&D Systems). Circulating leptin level was evaluated using MILLIPLEX MAP Mouse Adipokine Panel based on multiplex technology (Millipore SAS, Molsheim, France).

The role of epididymal adipose tissue

Epididymal lipectomy

In another series of mice, the animals were either lipectomised or sham-operated under intraperitoneal ketamine-xylazine ($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}/10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) anaesthesia. Bilateral EWAT was carefully removed to keep the gonads intact. Sham animals underwent the same surgical protocol without removing the fat. Surgery sites were closed with 4-0 nylon absorbable monofilament (Ethicon SAS, Issy-Les-Moulineaux, France) and mice received buprenorphine ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ *i.p.*). After 3 days during which body weight was measured daily, the animals were exposed to intermittent hypoxia or normoxia for 6 weeks, therefore constituting four experimental groups (lipectomised intermittent hypoxic and normoxic mice and sham intermittent hypoxic and normoxic mice, $n=7-10$ per group). On the day following the last exposure period, the animals were anaesthetised as described above. Blood was collected by cardiac puncture. The thoracoabdominal aorta, including the aortic roots, was removed and snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

Metabolic alterations

Lipid measurements

Total and high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides were measured in plasma by a colorimetric enzymatic reaction using the Modular P analyser (Roche Diagnostics). Low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol was calculated using the Friedewald formula.

TABLE 1 Primers used for quantitative reverse transcriptase PCR analysis

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

UCP: uncoupling protein; MCP: monocyte chemoattractant protein; TBP: TATA box-binding protein; 36B4: acidic ribosomal phosphoprotein [ribosomal protein, large, P0: RPLP0].

Plasma levels of glycerol and nonesterified fatty acids (NEFA) were measured by colorimetric enzymatic reaction using the free glycerol reagent (Sigma-Aldrich, Lyon, France) and the NEFA-HR(2) (Wako Diagnostics, Neuss, Germany) assays, respectively.

Intraperitoneal insulin tolerance test

During intermittent hypoxia exposure, we used the intraperitoneal insulin tolerance test to assess global insulin sensitivity. Mice were fasted for 10 h then weighed before blood was collected from the tail tip for baseline glucose determination ($t=0$). Blood glucose was measured using the OneTouch Ultra glucometer (LifeScan France, Issy-Les-Moulineaux, France). Insulin ($0.75 \text{ IU}\cdot\text{kg}^{-1}$ body weight; Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark) was injected intraperitoneally, followed by further blood glucose measurements at 15, 30, 60 and 90 min after the injection. The lowest blood glucose level (nadir) and its timing following insulin administration were calculated.

Assessment of aortic lesions

Atherosclerotic lesion size

Lesions of the thoracoabdominal aorta and aortic roots were analysed by Oil-red-O staining ($n=7-10$ per group). For each aortic root, we quantified lipid deposition from five sections ($8 \mu\text{m}$ thickness), separated from each other by $80 \mu\text{m}$. Quantitative analysis of lipid deposition was performed using computer image analysis (MetaMorph 7 software, Zeiss Microscope; Molecular Devices France, St. Grégoire, France) after manual thresholding (thoraco-abdominal lesion) or contouring (aortic roots).

Atherosclerotic lesion inflammation

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

Statistical analysis

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

Results

Intermittent hypoxia induces morphological and functional remodelling of epididymal fat

EWAT from intermittent hypoxic mice exhibited shrunken adipocytes (fig. 1a) with increased expression of UCP-1 (fig. 1b) and thicker extracellular matrix (fig. 1c).

Intermittent hypoxia induces inflammatory remodelling of epididymal fat

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

Intermittent hypoxia induces insulin resistance and aggravates both dyslipidaemia and atherosclerosis

The pre-existing dyslipidaemic pattern of the ApoE^{-/-} mouse strain was aggravated by intermittent hypoxia, including higher plasma levels of total and LDL cholesterol, triglycerides, glycerol and NEFA in sham hypoxic compared to normoxic animals (table 2). Sham-operated hypoxic mice developed insulin resistance as shown by the lower glycaemia decline following insulin administration (fig. 3). Intermittent hypoxia also accelerated the development of atherosclerosis, as shown by the larger lesions in thoracoabdominal aorta and aortic roots (fig. 4). The atherosclerotic plaque composition was not affected

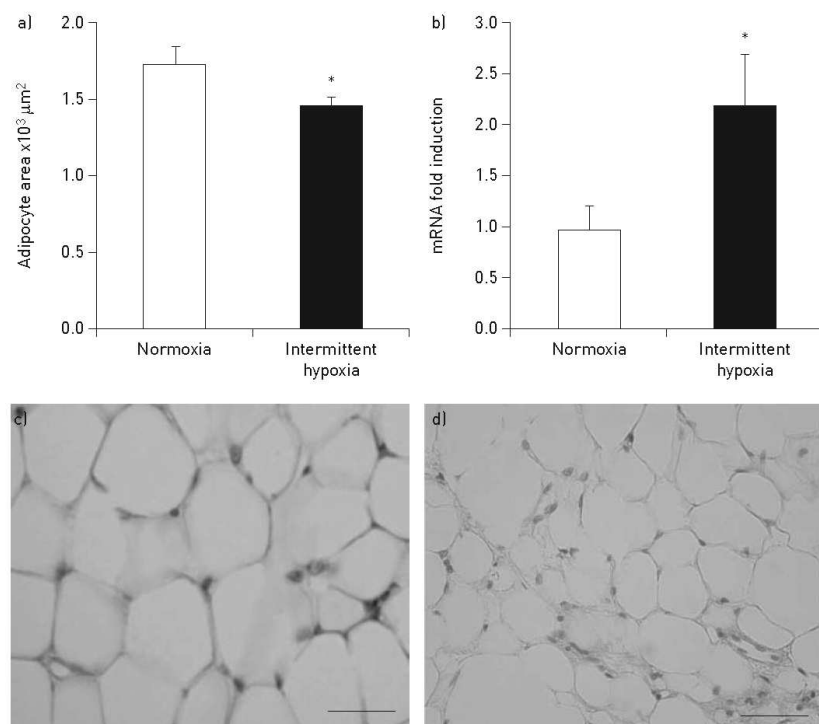


FIGURE 1 Intermittent hypoxia induces epididymal white adipose tissue morphological and functional remodelling. a) Quantification of adipocyte size after 6 weeks of intermittent hypoxia or normoxia. $n=7-8$ per group. *: $p<0.05$ versus normoxia. b) Adipose tissue mRNA expression of uncoupling protein-1. Measurement is normalised to 36B4 mRNA. $n=7-8$ per group. *: $p<0.05$ versus normal. c) and d) Haematoxylin and eosin staining of adipose tissue from c) normoxic and d) intermittent hypoxic mice. Scale bar=50 μm .

by intermittent hypoxia, as shown by the similar plaque content of macrophages (normoxia $5.40 \pm 1.40\%$ versus intermittent hypoxia $3.81 \pm 0.56\%$), T-cells (normoxia $0.25 \pm 0.05\%$ versus intermittent hypoxia $0.29 \pm 0.04\%$) and smooth muscle cells (normoxia $4.5 \pm 1.53\%$ versus intermittent hypoxia $4.16 \pm 1.20\%$).

Epididymal lipectomy prevents intermittent hypoxia-induced dyslipidaemia and atherosclerosis

Lipectomy prevented the intermittent hypoxia-related disturbances in plasma cholesterol, whereas glycerol and NEFA levels remained similar to those of sham hypoxic animals (table 2). The proatherogenic effect of intermittent hypoxia was also prevented by lipectomy, as atherosclerotic plaque size in the thoracoabdominal aorta was very similar to those of normoxic animals (fig. 4a and b). This effect was more modest in the aortic roots (fig. 4c and d). In contrast, plaque quality was not modified by lipectomy, as shown by the plaque contents of macrophages (normoxia $3.02 \pm 0.62\%$ versus intermittent hypoxia $3.99 \pm 0.66\%$), T-cells (normoxia $0.29 \pm 0.07\%$ versus intermittent hypoxia $0.26 \pm 0.05\%$) and smooth muscle cells (normoxia 2.83 ± 1.10 versus intermittent hypoxia $5.0 \pm 1.96\%$).

Regarding glucidic metabolism, lipectomy did not prevent the intermittent hypoxia-induced insulin resistance. In contrast, and in agreement with the buffering role of WAT in maintenance of glucose homeostasis, lipectomy induced insulin resistance in normoxic animals (fig. 3).

Discussion

The pathophysiology of OSA-induced atherogenesis and metabolic alterations remains poorly understood. Here, we showed in nonobese ApoE-deficient mice that 6 weeks of intermittent hypoxia led to morphological, functional and inflammatory remodelling of the visceral WAT, and this remodelling contributed to intermittent hypoxia-induced dyslipidaemia and atherosclerosis. This study is the first to

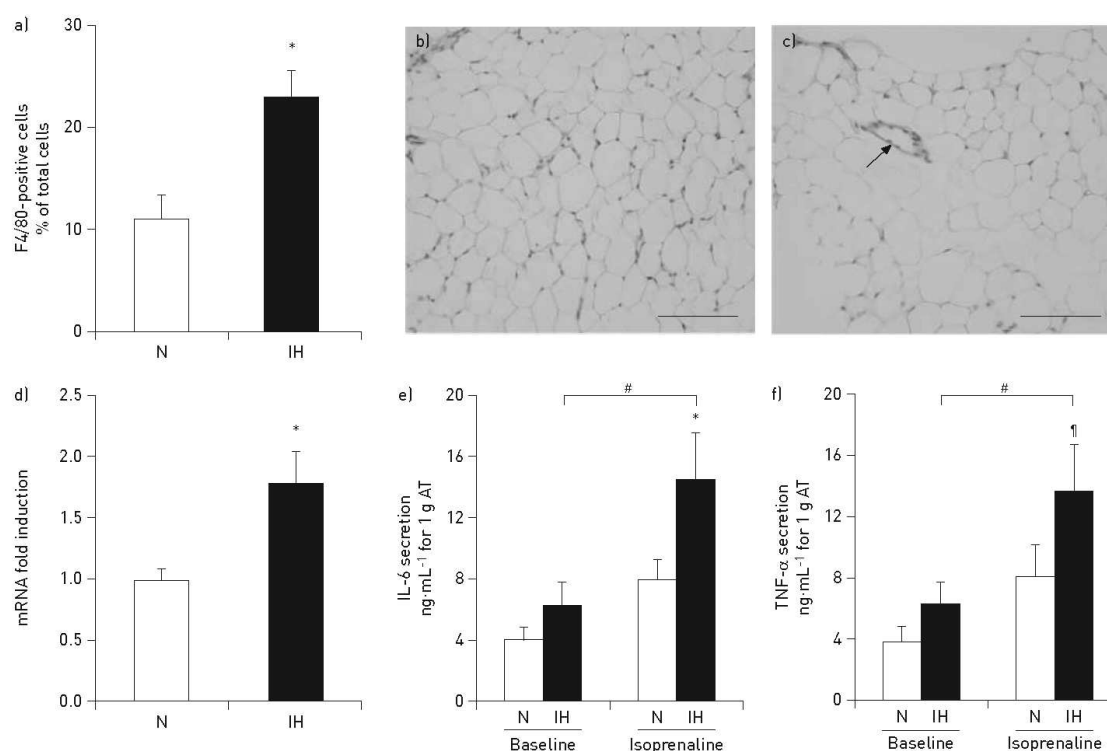


FIGURE 2 Intermittent hypoxia (IH) induces epididymal white adipose tissue inflammatory remodelling. a) Quantification of macrophage infiltration after 6 weeks of IH or normoxia (N). $n=5$ per group. *: $p<0.05$ versus normoxia. b) and c) Representative F4/80 immunostaining showing macrophages organised in a crown-like structure around adipocytes (arrow). Scale bars=100 μm . d) Adipose tissue mRNA expression of monocyte chemoattractant protein-1. Measurement is normalised to TATA box-binding protein mRNA. $n=8-11$ per group. *: $p<0.05$ versus normoxia. e) Interleukin (IL)-6 and f) tumour necrosis factor (TNF)- α secretion from epididymal adipose tissue (AT) at basal condition or after isoprenaline stimulation. $n=13$ per group. *: $p<0.05$ versus normoxia; #: $p<0.05$ versus basal condition; †: $p=0.083$.

provide evidence that a physiological amount of visceral WAT exposed to intermittent hypoxia becomes pathological, behaving like excess fat in obesity.

Methodological considerations

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

Intermittent hypoxia induces EWAT remodelling

In lean mice, intermittent hypoxia induced moderate EWAT inflammation, including macrophage infiltration, increased MCP-1 expression and proinflammatory cytokine release (IL-6 and TNF- α). Fat inflammation is well known in obesity and results at least in part from hypoxia, as, with fat expansion, adipocytes become too distant from blood vessels [20]. Through the repetitive hypoxia-reoxygenation sequence, intermittent hypoxia generates free radical stress and inflammation. Intermittent hypoxia also increases sympathoadrenergic activity, which in turn exacerbates oxidative stress [21], and the adipose expression of MCP-1 [22], which is a key chemokine regulating macrophage tissue infiltration [23]. We used isoprenaline to mimic the sympathetic overactivity occurring in OSA patients during sleep, which resulted in enhanced proinflammatory cytokine release. Collectively, our data suggest chronic low-grade EWAT inflammation with intermittent exacerbation during sympathetic activation.

TABLE 2 Weight and biological characteristics in lipectomised and sham-operated apolipoprotein-E deficient mice exposed to intermittent hypoxia or normoxia

	Sham		Lipectomy	
	Normoxia	Intermittent hypoxia	Normoxia	Intermittent hypoxia
Age weeks	20	20	20	20
Subjects n	7	10	9	9
Mouse weight g				
Day 0	29.4±1.0	28.7±0.7	28.7±0.6	28.8±0.9
Day 7	29.1±1.1	26.6±0.7*.#	29.8±0.9	28.2±0.8
Day 42	28.5±1.3	28.5±0.6	30.7±0.5#	28.3±0.7*
Epididymal adipose tissue weight mg				
Day 42	346.1±37.3	273.1±41.0		
Parameters at 42 days				
Haematocrit %	41.1±1.7	48.4±0.9*	41.4±0.8	45.3±1.1*
Total cholesterol g·L ⁻¹	4.7±0.5	6.3±0.5*	4.7±0.9	4.8±0.3
LDL cholesterol g·L ⁻¹	3.7±0.4	5.1±0.5*	3.7±0.8	3.9±0.3
HDL cholesterol g·L ⁻¹	0.9±0.02	0.9±0.03	0.8±0.1	0.8±0.1
Triglycerides g·L ⁻¹	0.6±0.1	0.9±0.2*	0.9±0.1	0.6±0.1
Glycerol g·L ⁻¹	28.0±2.1	51.1±9.5*	34.4±4.2	59.9±7.1*
NEFA g·L ⁻¹	0.9±0.09	1.6±0.08*	1.1±0.2	1.8±0.2*

Data are presented as mean ± SEM, unless otherwise stated. LDL: low-density lipoprotein; HDL: high-density lipoprotein; NEFA: nonesterified fatty acids. *: p<0.05 versus normoxia; #: p<0.05 versus day 0.

EWAT from mice subjected to intermittent hypoxia had shrunken adipocytes and UCP-1 overexpression. UCP-1 is a hallmark of brown adipocytes (thermogenic fat) and is also expressed in adipogenic cells gaining characteristics of brown adipocytes (phenotyping switch into “brite” adipocytes, *i.e.* brown-like adipocytes). Again, β -adrenergic stimulation may account for both alterations as it leads to lipolysis (NEFA release from adipocytes) and induces the appearance of brite adipocytes in WAT [24]. However, a full characterisation is required to confirm the browning of the white fat, as well as the involvement of the sympathoadrenergic system, which could be a common denominator of the various WAT remodelling due to intermittent hypoxia. Moreover, the meaning of this adipose plasticity, in particular regarding energy imbalance under intermittent hypoxia, remains to be elucidated.

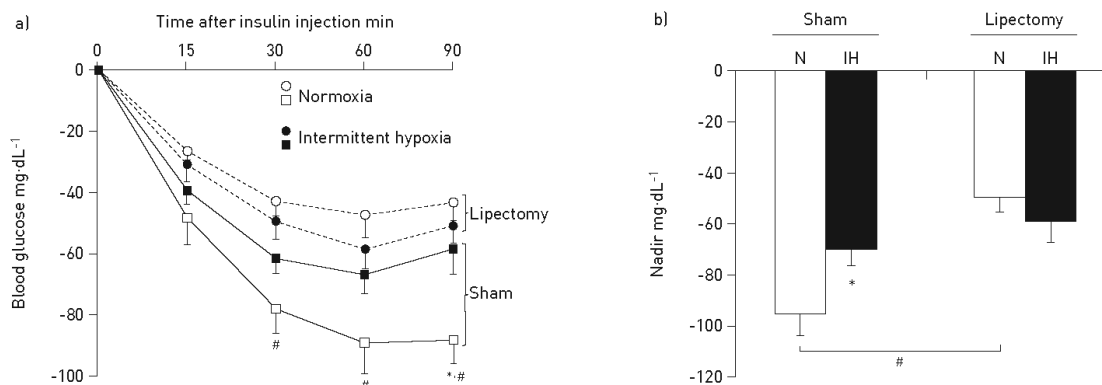


FIGURE 3 Intermittent hypoxia (IH) induces insulin resistance. a) Intraperitoneal insulin tolerance test in epididymal lipectomised or sham-operated mice exposed to IH or normoxia (N) for 6 weeks; b) Lowest blood glucose level during the first 90 min (nadir). n=6–15 per group. *: p<0.05 versus N; #: p<0.05 versus sham N.

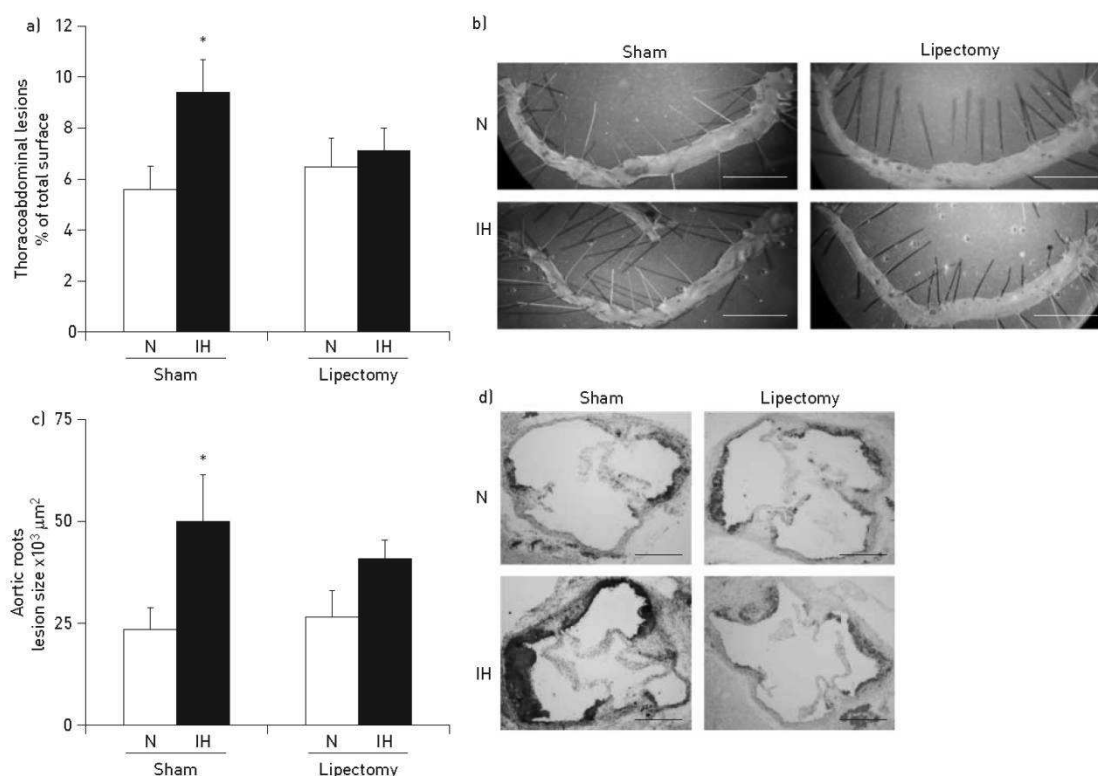


FIGURE 4 Epididymal lipectomy attenuates intermittent hypoxia (IH)-induced atherosclerosis. a) Thoracoabdominal aortic lesions expressed as percentage of total aorta surface in lipectomised or sham-operated mice exposed to IH or normoxia (N) for 6 weeks. b) Representative photographs of thoracoabdominal lesions. Scale bars=0.5 cm. c) Size of atherosclerotic lesions in aortic roots expressed in μm^2 . d) Representative photographs of aortic root lesions. Scale bars=1000 μm . n=10 per group. *: $p < 0.05$ versus N.

Intermittent hypoxia induces insulin resistance, dyslipidaemia and atherosclerosis

As previously, we used ApoE-deficient mice to assess the atherogenic and metabolic effects of intermittent hypoxia, as they are atherosclerosis-prone animals and develop dyslipidaemia and insulin resistance. We confirmed the atherogenic and dyslipidaemic effects of intermittent hypoxia; hypoxic mice exhibited larger aortic atherosclerotic lesions and higher plasmatic levels of cholesterol (total and LDL) and triglycerides. Lipid alterations, constituting an early step of atherogenesis [25], have been previously described both in OSA patients and in mice exposed to intermittent hypoxia [26]. Intermittent hypoxia also increased plasmatic glycerol and NEFA, and aggravated the insulin resistance. WAT constitutes the main source of NEFA, also called free fatty acids (FFAs), and excessive circulating FFAs contribute to insulin resistance [27, 28]. The relationship between fat inflammation, in particular macrophage-related inflammation in WAT, and insulin resistance is now largely described in the literature [14]. Our results are in agreement with clinical studies showing a progressive worsening of insulin resistance and metabolic syndrome with OSA severity [26]. Exposure to intermittent hypoxia also leads to decreased insulin sensitivity in healthy volunteers [29] and in lean mice [30]. Collectively, our data and those from the literature demonstrate that intermittent hypoxia induces metabolic disorders independently of any obesity, and suggest that intermittent hypoxia-induced adipose tissue alterations could represent one of the links between inflammation, insulin resistance and vascular consequences.

EWAT lipectomy attenuates the dyslipidaemic and atherogenic effects of intermittent hypoxia

We performed bilateral EWAT lipectomy before exposure to assess the specific role of EWAT in intermittent hypoxia-induced cardiovascular and metabolic alterations. Lipectomised animals had smaller atherosclerotic lesions in the thoracoabdominal aorta, whereas the preventive effect was less in the aortic root.

This suggests that, beyond WAT alterations, the atherogenic effect of intermittent hypoxia involves additional mechanisms such as regional aortic susceptibility to develop atherosclerosis, *e.g.* aortic roots are prone to develop the largest lesions in particular due to haemodynamic factors.

From our results, the lesser atherosclerosis progression after lipectomy appears to be related to the prevention of intermittent hypoxia-induced dyslipidaemia, as lipectomised hypoxic mice had similar levels of total and LDL cholesterol to normoxic animals. However, the beneficial effect of lipectomy may also be related to the prevention of EWAT inflammation. We did not investigate the mechanisms underlying the beneficial effect on lipid levels as it was beyond the scope of this study. Because we found inflammatory alterations in EWAT, we chose to focus on proinflammatory cytokines, but other signalling proteins, such as the adipose angiopoietin-like 4, a potent lipoprotein lipase inhibitor, are probably involved in intermittent hypoxia-associated atherosclerosis and may have contributed to the preventive effect of lipectomy [31]. In contrast, the intermittent hypoxia-induced elevation in plasma glycerol and FFAs remained unchanged. Lipectomy in this study was limited to the epididymal compartment, which is the largest and most easily harvested visceral WAT depot in mice. However, there are other WAT territories such as mesenteric, perirenal and subcutaneous WAT. Glycerol and FFAs are two products of lipolysis occurring in the various adipose tissues, including epididymal and subcutaneous tissues. Although visceral WAT is predominantly associated with metabolic disease, the majority of circulating FFAs originate from subcutaneous WAT [32].

Regarding insulin sensitivity, whereas it has been shown that removing visceral fat could prevent insulin resistance in obese or ageing rats [33], we found that EWAT lipectomy induced insulin resistance in lean normoxic animals. These data confirm the major role of WAT in the homeostatic regulation of glucose; it is indeed one of the primary targets of insulin-stimulated glucose uptake, and it regulates insulin sensitivity through the release of numerous cytokines and adipokines. Therefore clinical situations with quantitative (excessive or overly reduced adipose mass) and/or qualitative alterations of the WAT may lead to insulin resistance [34]. We found that sham-operated hypoxic mice and lipectomised normoxic mice exhibited similar insulin resistance, suggesting that EWAT in animals exposed to intermittent hypoxia was functionally impaired for glucose buffering. As a consequence, lipectomy in hypoxic animals did not further aggravate the insulin resistance.

Conclusion

Although the causative mechanisms remain to be elucidated, we showed that intermittent hypoxia had detrimental effects on EWAT of nonobese mice, and these contributed to the cardiovascular and metabolic complications induced by intermittent hypoxia. EWAT exhibited inflammatory alterations that were exacerbated under β -adrenergic activation, the latter mimicking the sympathetic activation induced by sleep apnoea events. Therefore, our original findings suggest novel therapeutic options for OSA patients, as compliance with the gold standard continuous positive airway pressure therapy is limited, and losing fat through weight reduction is applicable only in obese OSA patients. Targeting inflammation, either using drugs or by improving lifestyle (diet and exercise), and buffering nocturnal sympathetic activation could provide further therapeutic options for OSA patients.

References

- 1 Somers VK, White DP, Amin R, *et al.* Sleep apnea and cardiovascular disease: an American Heart Association/American College of Cardiology Foundation Scientific Statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on Clinical Cardiology, Stroke Council, and Council On Cardiovascular Nursing. *Circulation* 2008; 118: 1080–1111.
- 2 Dematteis M, Godin-Ribuot D, Arnaud C, *et al.* Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding the human disease. *ILAR J* 2009; 50: 262–281.
- 3 Baguet JP, Hammer L, Lévy P, *et al.* The severity of oxygen desaturation is predictive of carotid wall thickening and plaque occurrence. *Chest* 2005; 128: 3407–3412.
- 4 Drager LF, Bortolotto LA, Lorenzi MC, *et al.* Early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 613–618.
- 5 Dematteis M, Julien C, Guillermet C, *et al.* Intermittent hypoxia induces early functional cardiovascular remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 227–235.
- 6 Arnaud C, Beguin PC, Lantuejoul S, *et al.* The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184: 724–731.
- 7 Savransky V, Nanayakkara A, Li J, *et al.* Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 1290–1297.
- 8 Jun J, Reinke C, Bedja D, *et al.* Effect of intermittent hypoxia on atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 2010; 209: 381–386.
- 9 Arnaud C, Poulain L, Lévy P, *et al.* Inflammation contributes to the atherogenic role of intermittent hypoxia in apolipoprotein-E knock out mice. *Atherosclerosis* 2011; 219: 425–431.
- 10 Li J, Thorne LN, Punjabi NM, *et al.* Intermittent hypoxia induces hyperlipidemia in lean mice. *Circ Res* 2005; 97: 698–706.

- 11 Li J, Nanayakkara A, Jun J, *et al.* Effect of deficiency in SREBP cleavage-activating protein on lipid metabolism during intermittent hypoxia. *Physiol Genomics* 2007; 31: 273–280.
- 12 Bonsignore MR, McNicholas WT, Montserrat JM, *et al.* The adipose tissue in obesity and obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 2012; 39: 746–767.
- 13 Bigaard J, Frederiksen K, Tjønneland A, *et al.* Waist circumference and body composition in relation to all-cause mortality in middle-aged men and women. *Int J Obes (Lond)* 2005; 29: 778–784.
- 14 Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol* 2010; 72: 219–246.
- 15 Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006; 116: 1793–1801.
- 16 Ohman MK, Shen Y, Obimba CI, *et al.* Visceral adipose tissue inflammation accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2008; 117: 798–805.
- 17 Poulain L, Rieusset J, Levy PA, *et al.* Intermittent hypoxia induces dyslipidemia and atherogenesis through visceral white adipose tissue inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185: A3867.
- 18 Council of Europe. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes. European Treaties ETS 123. Strasbourg, March 18, 1986.
- 19 National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, National Academies Press, 1996.
- 20 Trayhurn P, Wang B, Wood IS. Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *Br J Nutr* 2008; 100: 227–235.
- 21 Prabhakar NR, Kumar GK, Peng YJ. Sympatho-adrenal activation by chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* 2012; 113: 1304–1310.
- 22 Wang YY, Lin SY, Chuang YH, *et al.* Adipose proinflammatory cytokine expression through sympathetic system is associated with hyperglycemia and insulin resistance in a rat ischemic stroke model. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 300: E155–E163.
- 23 Kanda H, Tateya S, Tamori Y, *et al.* MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 2006; 116: 1494–1505.
- 24 Smorlesi A, Frontini A, Giordano A, *et al.* The adipose organ: white-brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation. *Obes Rev* 2012; 13: Suppl. 2, 83–96.
- 25 Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1685–1695.
- 26 Jun J, Polotsky VY. Metabolic consequences of sleep-disordered breathing. *ILAR J* 2009; 50: 289–306.
- 27 Bays H, Mandarino L, DeFronzo RA. Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 463–478.
- 28 Jensen MD. Is visceral fat involved in the pathogenesis of the metabolic syndrome? Human model. *Obesity (Silver Spring)* 2006; 14: Suppl. 1, 20S–24S.
- 29 Louis M, Punjabi NM. Effects of acute intermittent hypoxia on glucose metabolism in awake healthy volunteers. *J Appl Physiol* 2009; 106: 1538–1544.
- 30 Iiyori N, Alonso LC, Li J, *et al.* Intermittent hypoxia causes insulin resistance in lean mice independent of autonomic activity. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 851–857.
- 31 Drager LF, Yao Q, Hernandez KL, *et al.* Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis via activation of adipose angiotensin-like 4. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 188: 240–248.
- 32 Klein S. The case of visceral fat: argument for the defense. *J Clin Invest* 2004; 113: 1530–1532.
- 33 Gabriely I, Ma XH, Yang XM, *et al.* Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging: an adipokine-mediated process? *Diabetes* 2002; 51: 2951–2958.
- 34 McKnight SL. WAT-free mice: diabetes without obesity. *Genes Dev* 1998; 12: 3145–3148.

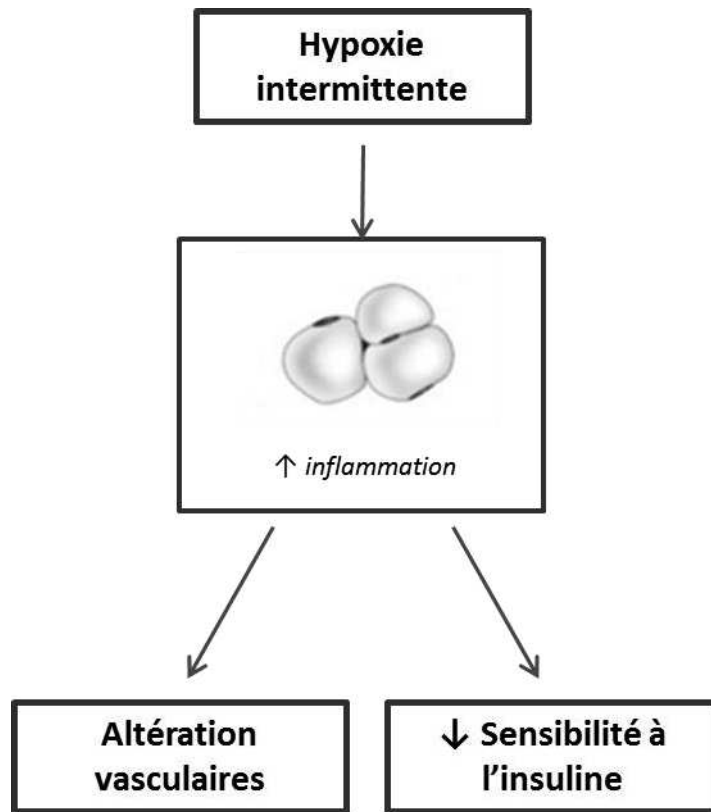


Figure 17: Schéma récapitulatif de l'article

"Visceral white fat remodelling contributes to intermittent hypoxia-induced atherogenesis"

CHAPITRE 4: IMPLICATION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR 1 (HIF-1) DANS LES ALTERATIONS DU METABOLISME DU GLUCOSE

L'implication du facteur HIF-1 dans les conséquences cardiovasculaires de l'HI a été démontré dans notre laboratoire mais son rôle dans les dysfonctions métaboliques associées à l'HI reste à déterminer. Des études ont mis en évidence que, lors d'une obésité, le tissu adipeux devenait hypoxique. HIF-1 est connu pour être activé dans ces conditions et pour participer aux altérations métaboliques induites par l'obésité.

Dans cette étude, nous avons supposé que l'inactivation de PHD1, l'une des protéines régulatrices de HIF-1, induirait une altération de l'homéostasie métabolique chez la souris.

Nous avons observé que la délétion de la PHD1 induisait une diminution de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline chez des souris sous régime normal ou pauvre en graisse (*Low fat diet*, LFD).

Le tissu métabolique principalement impliqué dans ces altérations semble être le foie, où une diminution très significative de la signalisation de l'insuline a été mise en évidence. Ces effets néfastes au niveau hépatique sont associés à une stéatose et une inflammation.

Il est apparu néanmoins, que la délétion de PHD1 n'aggravait pas les effets métaboliques induits par un régime riche en graisses (*High fat diet*, HFD).

Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 1 (PHD1) deficiency promotes hepatic steatosis and liver-specific insulin resistance in mice

Running title: PHD1 deficiency and metabolic homeostasis

Amandine Thomas^{1,2}, Elise Belaïdi^{1,2}, Judith Aron-Wisnewsky^{3,4,5}, Gerard C. van der Zon⁶,
Diane Godin-Ribuot^{1,2}, Karine Clement^{3,4,5}, Jean-Louis Pepin^{1,2}, Patrick Levy^{1,2} and Bruno
Guigas^{6,7}

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

²*INSERM U1042, Grenoble, F-38042 France*

³*Institute of Cardiometabolism and Nutrition, ICAN, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière hospital, Paris, France.*

⁴*INSERM, UMR S U1166, Nutriomics Team, Paris, France Sorbonne Universités.*

⁵*UPMC University Paris 06, UMR_S 1166 I, Nutriomics Team, Paris, France.*

⁶*Department of Molecular Cell Biology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands.*

⁷*Department of Parasitology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands.*

Address for correspondence: Dr. Bruno Guigas, Department of Parasitology, Leiden University Medical Center, P.O. Box 9600, Postzone L40-Q, 2300 RC Leiden, the Netherlands; Tel. +31-71-52-61328; Fax: +31-71-52-68270; E-Mail: b.g.a.guigas@lumc.nl

ABSTRACT (252 Words)

Introduction: Obesity is associated with hypoxia and elevated hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 α) in metabolic tissues. Prolyl hydroxylase-1 (PHD1) plays an important role in regulating HIF-1 α stability. Here we investigated the consequence of PHD1 inactivation on metabolic homeostasis in mice.

Methods: Wild-type (WT) and PHD1-deficient (PHD1 $^{-/-}$) mice were studied at baseline and after 12 weeks on low- (LFD) or high-fat diet (HFD). Plasma parameters, whole-body insulin sensitivity and glucose tolerance, and hepatic lipid composition were determined. Changes in insulin signaling and expression of key metabolic/inflammatory genes were studied in various metabolic tissues.

Results: At baseline, PHD1 $^{-/-}$ mice exhibited higher white adipose tissue (WAT) mass despite lower body weight and impaired insulin sensitivity and glucose tolerance when compared to age-matched WT mice. PHD1 $^{-/-}$ mice on LFD showed a higher body weight gain and WAT mass than WT mice, this being associated with glucose intolerance and systemic insulin resistance. Analysis of metabolic tissues revealed that PHD1 deficiency led to increased expression of the lipogenic proteins ACC and FAS in the liver, leading to hepatic steatosis and insulin resistance. Furthermore, markers of inflammation were also found to be increased in the liver, but not in WAT or skeletal muscle, from PHD1 $^{-/-}$ mice. As expected, HFD promoted obesity, hepatic steatosis and systemic insulin resistance in WT mice but the extents of these diet-induced metabolic dysfunctions were similar in PHD1 $^{-/-}$ mice.

Conclusion: Whole-body PHD1 deficiency in mice promotes hepatic steatosis and liver-specific insulin resistance but did not worsen the deleterious effects of HFD on metabolic homeostasis.

Key words: Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 1, insulin resistance, PKB, AMPK, inflammation, hepatic steatosis, lipogenesis

Abbreviations

AMPK, AMP-activated protein kinase

ACC, acetyl-CoA carboxylase

AUC, area under curve

eWAT, epididymal white adipose tissue

FAS, fatty acid synthase

GTT, glucose tolerance test

HFD, high-fat diet

HOMA, homeostasis model assessment

HIF-1 α , hypoxia-inducible factor 1 alpha

ITT, insulin tolerance test

LFD, low-fat diet

PHD1, prolyl hydroxylase 1

PKB, protein kinase B

TC, total cholesterol

TG, triglycerides

WT, wild-type

Introduction

Obesity is believed to be associated with some degree of hypoxia in metabolic organs, notably in white adipose tissue (WAT) (1; 2). A significant decrease in oxygen tension (pO_2) was indeed reported in various fat pads from different mouse models of obesity but also in subcutaneous WAT from overweight and obese subjects (3). Hypoxia was suggested to be involved in WAT inflammation (4) and to play a major role in obesity-induced metabolic dysfunctions, at least partly by impairing adipocyte insulin sensitivity (5; 6). At mechanistic level, WAT hypoxia promotes increase in both gene and protein expression of the transcription factor HIF-1 (7).

HIF-1 is a heterodimer composed of the constitutive nuclear HIF- β subunit and one of the three isoforms of the O_2 -regulated cytosolic HIF- α subunit: HIF-1 α , HIF-2 α and HIF-3 α (8). HIF-1 expression and transcriptional activity are tightly regulated by the oxygen-sensitive prolyl hydroxylases (PHD1-3), although the tissue-specific respective contribution of each PHD isoforms remains unclear (9). In normoxia, once hydroxylated by PHDs, HIF- α subunits are ubiquitinated and subjected to proteasomal degradation. By contrast, the PHD activities are reduced during hypoxia, leading to stabilization of HIF- α subunits and their subsequent translocation to the nucleus where they can dimerize with HIF- β to trigger activation of specific target genes (10). Through increased HIF-1 α transcriptional activation, adipose tissue hypoxia play a major role in obesity-induced insulin resistance and metabolic dysfunctions, notably by promoting local expression and secretion of chemokines/adipokines and recruitment of pro-inflammatory macrophages and T cells accumulation into WAT (2). By contrast, pharmacological or genetic inhibition of HIF-1 α was reported to lower high-fat diet (HFD)-induced metabolic dysfunctions (11; 12; 13; 14; 15) at least partly by attenuating adipose tissue fibrosis and inflammation (11) and lowering hepatic steatosis (12). Overall, this indicates that modulation of HIF-1 α transcriptional activity in metabolic tissues might be involved in the hypoxia- and obesity-associated alteration of whole-body energy homeostasis.

In the present study, we hypothesized that inactivation of PHD1, one of the critical component of the HIF-PHD oxygen-sensing pathway, would impair metabolic homeostasis in mice. We therefore examined the impact of PHD1 deficiency on whole-body glucose homeostasis and tissue specific insulin sensitivity in mice subjected to low- and high-fat diet.

Methods

Ethics. All mouse experiments were performed in accordance with the Institute for Laboratory Animal Research Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and have received approval from the ethical committee of the Université Grenoble Alpes (agreement number: B3851610006).

Animals and experimental design.

In this study, male PHD1^{-/-} mice (Swiss x sv129 background) and their wild-type (WT) littermates, were housed under standard conditions in conventional cages with *ad libitum* food and water. Ambient temperature was maintained at 20-22°C. In the first experiment, mice were fed a standard chow diet (RM1, Special Diets Services, Essex, England) and study at age of 10-12 weeks. In the second set of experiments, 10 weeks-old PHD1^{-/-} and WT mice were fed a low fat diet (10% energy derived from fat; D13091501; Research Diets) or high fat diet (60% energy derived from fat; D13091502 ; Research Diets) during 12 weeks.

Plasma analysis. Blood samples were obtained in 6h unfed mice (food withdrawn at 8:00 am) via tail vein bleeding. Blood glucose levels were determined by use of a glucometer (OneTouch ultra, Lifescan, Issy-Les-Moulineaux, France). Plasma TC, TG and insulin levels were measured using the commercially available enzymatic kits 236691, 11488872 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) and ELISA insulin kit (#EZRMI, Milipore), respectively. The homeostatic model assessment (HOMA) adapted to mice was calculated as $([\text{glucose (mg/dl)} \times 0.055] \times [\text{insulin (ng/ml)} \times 172.1]) / 3857$ and used as a surrogate measure of whole-body insulin sensitivity (11).

Glucose and insulin tolerance tests

All the experiments were performed in 6h unfed mice (food withdrawn at 8:00 am). Whole-body glucose tolerance and insulin sensitivity were assessed by an intraperitoneal (i.p.) glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT). After an initial blood collection (t = 0), an i.p. injection of glucose (2g/kg total body weight) or insulin (0.5U/kg total body weight, NovoRapid, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) were performed in conscious mice. Blood glucose levels were next measured by tail bleeding at 15, 30, 60, 90, and 120 minutes using a glucometer. Whole-body insulin sensitivity was assessed by an i.p. insulin tolerance test (ITT). The glucose or insulin areas under the curve (AUC) were measured using trapezoidal integration.

Hepatic lipid composition. Liver lipids were extracted as previously described (12). Briefly, small liver pieces were homogenized in ice-cold methanol. After centrifugation, lipids were extracted by addition of 1800 μ l CH₃OH:CHCl₃ (1:3 v/v) to 45 μ l homogenate, followed by vigorous vortexing and phase separation by centrifugation (14000 rpm; 15 min at RT). The organic phase was dried and dissolved in 2% Triton X-100 in water. TG and TC concentrations were measured using commercial kits as described above. Liver lipids were expressed as mg per mg protein, which was determined using the Bradford protein assay kit (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

Western blot analysis. Snap-frozen liver, skeletal muscle and epididymal WAT samples (~50 mg) were lysed in ice-cold buffer containing: 50 mM Hepes (pH 7.6), 50 mM NaF, 50 mM KCl, 5 mM NaPPi, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 5 mM β -glycerophosphate, 1 mM sodium vanadate, 1% NP40 and protease inhibitors cocktail (Complete, Roche, Mijdrecht, The Netherlands). Western blots were performed as previously described (12). All the primary antibodies used are listed in **Supplementary Table 1**. Bands were visualized by enhanced chemiluminescence and quantified using Image J (NIH, US).

RNA purification and qRT-PCR. RNA was extracted from snap-frozen liver, skeletal muscle or epididymal adipose tissue samples (~25 mg) using Trireagent RNA Isolation reagent (Sigma, Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Total RNA (0.5 µg) was reverse transcribed and quantitative real-time PCR was then performed with SYBR Green Core Kit on a MyIQ thermal cycler (Bio-Rad). mRNA expression was normalized to RPLP0 mRNA content and expressed as fold change compared to control mice using the $\Delta\Delta CT$ method. All the primers sequences are listed in **Supplementary Table 2**.

Statistical analysis. All data are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using Graphpad Prism 6 software package for Windows (San Diego, California USA) with two-tailed unpaired Student's test. Differences between groups were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results

PHD1 deficiency impairs whole-body metabolic homeostasis. We first determined the effect of constitutive deletion of PHD1 gene on expression of the other PHD isoforms and the HIF-1 α target gene *Ldha* in liver, epididymal white adipose tissue (eWAT) and skeletal muscle (Fig. S1). As expected, a drastic decrease of *Egln2* gene expression, corresponding to PHD1 protein, was found in each tissues. In the liver, an increase in the expression of *Egln3* (PHD3) was observed, while an upregulation of *Egln1* (PHD2) and a downregulation of *Egln3* were evidenced in eWAT. No compensatory expression was detected in skeletal muscle (Fig. S1A-C). LDHa expression was elevated in all tissues from PHD1^{-/-} mice, although this did not reach statistical significance in skeletal muscle, suggesting increase in HIF-1 α transcriptional activity.

To investigate the role of PHD1 on whole-body metabolic homeostasis, PHD1-deficient and WT control mice on regular chow diet were phenotyped at the age of 12 weeks-old. The body and liver weights were found to be lower in PHD1^{-/-} mice compared to WT mice whereas epididymal and subcutaneous adipose tissue weights were significantly higher (Fig. 1A-B). The mean daily food intake was also lower in PHD1^{-/-} than in WT mice (Fig. 1C). PHD1 deficiency was associated with elevated fasting plasma triglycerides (Fig. 1D), glucose (Fig. 1F) and insulin (Fig. 1G) levels, although circulating total cholesterol was not affected (Fig. 1E). The calculated HOmeostasis Model Assessment of Insulin Resistance index (HOMA-IR) was increased in PHD1^{-/-} mice compared to WT mice (Fig. 1H), suggesting systemic insulin resistance. To assess the effect of PHD1 deletion on whole-body glucose homeostasis and insulin sensitivity, mice were subjected to intraperitoneal glucose and insulin tolerance tests, respectively. In line with HOMA-IR, PHD1^{-/-} mice have impaired whole-body glucose tolerance (Fig. I-K) and systemic insulin sensitivity (Fig. L-M) when compared to WT mice.

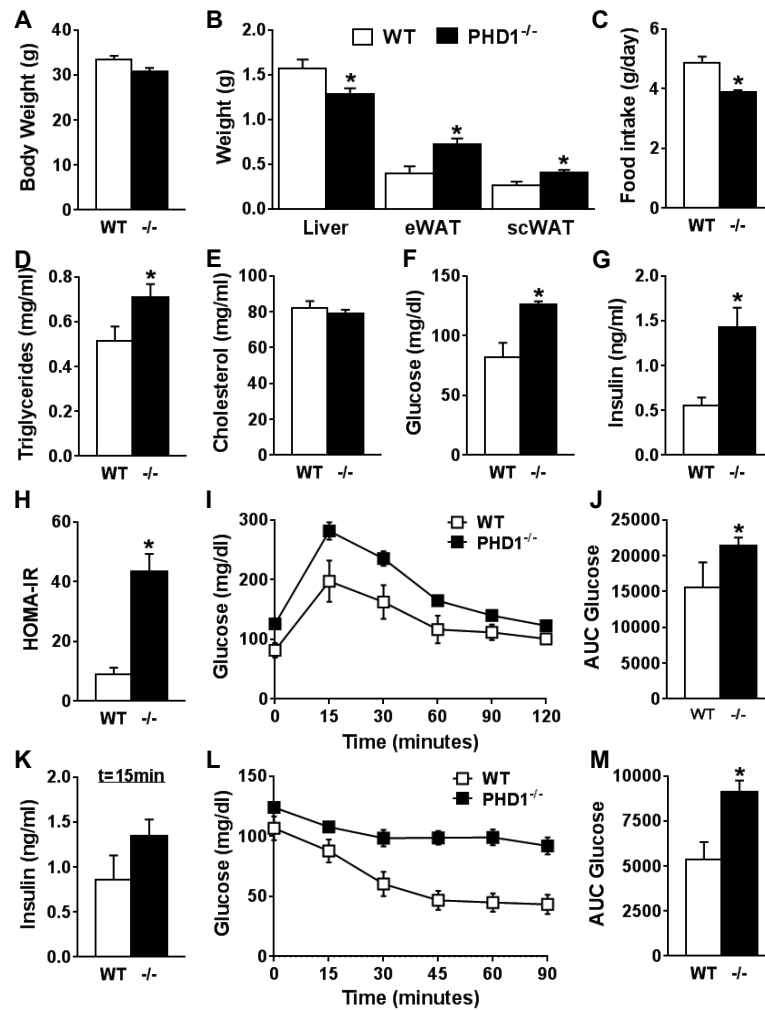


Figure 1. PHD1 deficiency induces glucose intolerance and insulin resistance in chow-fed mice. Body weight (A) and weights of liver, epididymal white adipose tissue (eWAT) and subcutaneous white adipose tissue (scWAT) were measured at sacrifice in 12 weeks-old mice on regular chow diet (B). Daily food intake (C) was monitored during 5 weeks. Plasma triglycerides (D), total cholesterol (E), glucose (F) and insulin (G) levels were determined after 6h of fast and HOMA-IR (H) was calculated. An intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT, 2 g/kg total body weight) was performed in 6h-fasted WT (open squares) and PHD1^{-/-} mice (closed squares). Blood glucose levels were measured at the indicated time-points (I), and the AUC of the glucose excursion curve was calculated as a surrogate for whole-body glucose tolerance (J). The plasma insulin level during ipGTT was measured at 15 minutes (K). An intraperitoneal insulin tolerance test (0.5 U/kg total body weight) was performed in 4h-fasted WT (open squares) and PHD1^{-/-} mice (closed squares). Blood glucose levels were measured at the indicated time-points (L), and the AUC of the glucose excursion curve was calculated as a surrogate for whole-body insulin sensitivity (M). Data are means \pm SEM (n=7-13). * p<0.05 vs WT mice.

PHD1 deficiency promotes body weight and fat mass gain, dyslipidemia and glucose intolerance but does not worsen HFD-induced metabolic alterations.

To further investigate the effect of PHD1 deletion on metabolic homeostasis, WT and PHD1^{-/-} mice were next challenged with a synthetic low-(LFD, 10% kcal from fat) or high-fat diet (HFD, 60% kcal from fat) for 12 weeks. PHD1^{-/-} mice on LFD showed a higher body weight gain and liver and fat mass than WT mice (Fig. 2A-C), although no significant difference was observed in mean daily food intake (Fig. 2D). In line with what was observed on chow diet, fasting plasma TG and insulin levels, and HOMA-IR were significantly higher in LFD-fed PHD1^{-/-} mice when compared to WT mice (Fig. 2E-I), suggesting impairment in whole-body metabolic homeostasis. Indeed, glucose intolerance coupled to elevated plasma insulin level was observed in LFD-fed PHD1^{-/-} mice subjected to an intraperitoneal glucose tolerance test (Fig. 2J-L). Of note, similar effects on body weight gain, plasma parameters and whole-body metabolic homeostasis were observed in between genotype after 6 weeks (Fig. S2).

As expected, WT mice on HFD exhibited increased body weight, liver and fat mass, fasting plasma TG, TC, glucose and insulin levels (Fig. 2A-H). HOMA-IR and whole-body glucose tolerance were also significantly impaired when compared with mice fed a LFD (Fig. 2I-L). Surprisingly, although most of the metabolic parameters were similarly affected, HFD-fed PHD1^{-/-} were found to have a slightly but significantly lower fasting plasma glucose level (Fig. 2G) and better glucose tolerance (Fig. 2J-K) than WT mice on the same diet.

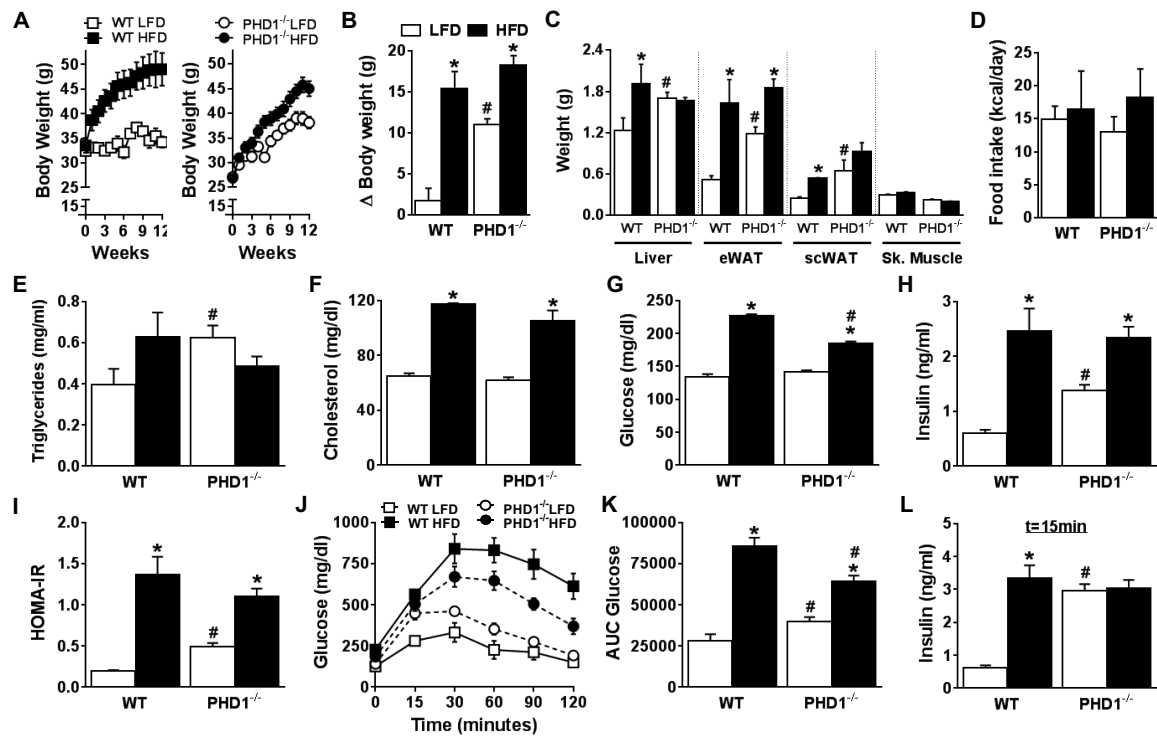


Figure 2: PHD1 deficiency promotes weight gain and insulin resistance but does not worsen high fat diet-induced metabolic alterations. WT and PHD1^{-/-} mice were fed a low-fat diet (LFD, 10 % fat, open squares) or high-fat diet (HFD, 45% fat, closed squares) for 12 weeks. Body weight was monitored throughout the experimental period (A). The delta (Δ) change in body weight from the start of diet (B), weight of liver, epididymal and subcutaneous white adipose tissue, and skeletal muscle (C) were measured after sacrifice at week 12. The mean daily food intake (D) was assessed during 12 weeks. Plasma triglycerides (E), total cholesterol (F), glucose (G) and insulin levels (H) were determined and HOMA-IR (I) was calculated in 6-hour unfed mice at week 12. An intraperitoneal GTT (2 g/ kg of total body weight) was performed in 6-hour unfed mice at week 11. Blood glucose levels were measured at the indicated time-points (J), and the area under the curve (AUC) of the glucose excursion curve was calculated as a measure for glucose tolerance (K). The plasma insulin level during ipGTT was measured at 15 minutes (L). Data are means \pm SEM (n=4-7). * $p < 0.05$ vs LFD-fed mice, # $p < 0.05$ vs WT mice.

PHD1 deficiency impairs hepatic insulin sensitivity.

In order to study the impact of PHD1 deletion on systemic insulin sensitivity, LFD- and HFD-fed WT and knockout mice were subjected to an intraperitoneal insulin tolerance test. In parallel experiments, metabolic tissues (liver, eWAT and skeletal muscle) were harvested 10 min after insulin administration for assessing tissue-specific insulin sensitivity by Western blot. The hypoglycemic response to insulin was impaired in LFD-fed PHD1^{-/-} mice compared to WT mice (Fig. 3A-B), reflecting systemic insulin resistance. Remarkably, the insulin-induced phosphorylation of Protein Kinase B (PKB) was significantly reduced in the liver (Fig. 3C-D) whereas no significant impairments were observed in eWAT and skeletal muscle (Fig. 3E-H), indicating that the alteration of systemic insulin sensitivity in LFD-fed PHD1^{-/-} mice was mostly due to hepatic insulin resistance. When subjected to HFD, both WT and PHD1^{-/-} mice developed systemic and hepatic insulin resistance but no significant differences were observed in between the two genotypes (Fig. 3A-H).

PHD1 deficiency promotes hepatic steatosis and liver inflammation.

Hepatic insulin resistance is often associated with nonalcoholic steatohepatitis (NASH), which is characterized by inflammation and ectopic accumulation of TG in the liver. Strikingly, when compared to WT mice, PHD1^{-/-} mice on LFD exhibited significantly higher TC and TG hepatic contents (Fig. 4A-C) that are associated with increased gene and protein expressions of the lipogenic enzymes ACC and FAS (Fig. 4D-G). Of note, a general trend for higher expression of inflammatory gene markers, such as *Ccr2*, *Ccl2* and *Tnfa*, was also observed in LFD-fed PHD1^{-/-} mice, although this not always reach statistical significance (Fig. 4H). As expected, HFD increased liver TC and TG levels in WT mice which is associated with the classical compensatory downregulation of proteins involved in hepatic de novo lipogenesis (Fig. 4A-G). However, neither the hepatic lipid composition nor the expression of lipogenic proteins were significantly different between WT and PHD1^{-/-} mice on HFD, indicating that HFD-induced hepatic steatosis was not aggravated by PHD1 deficiency.

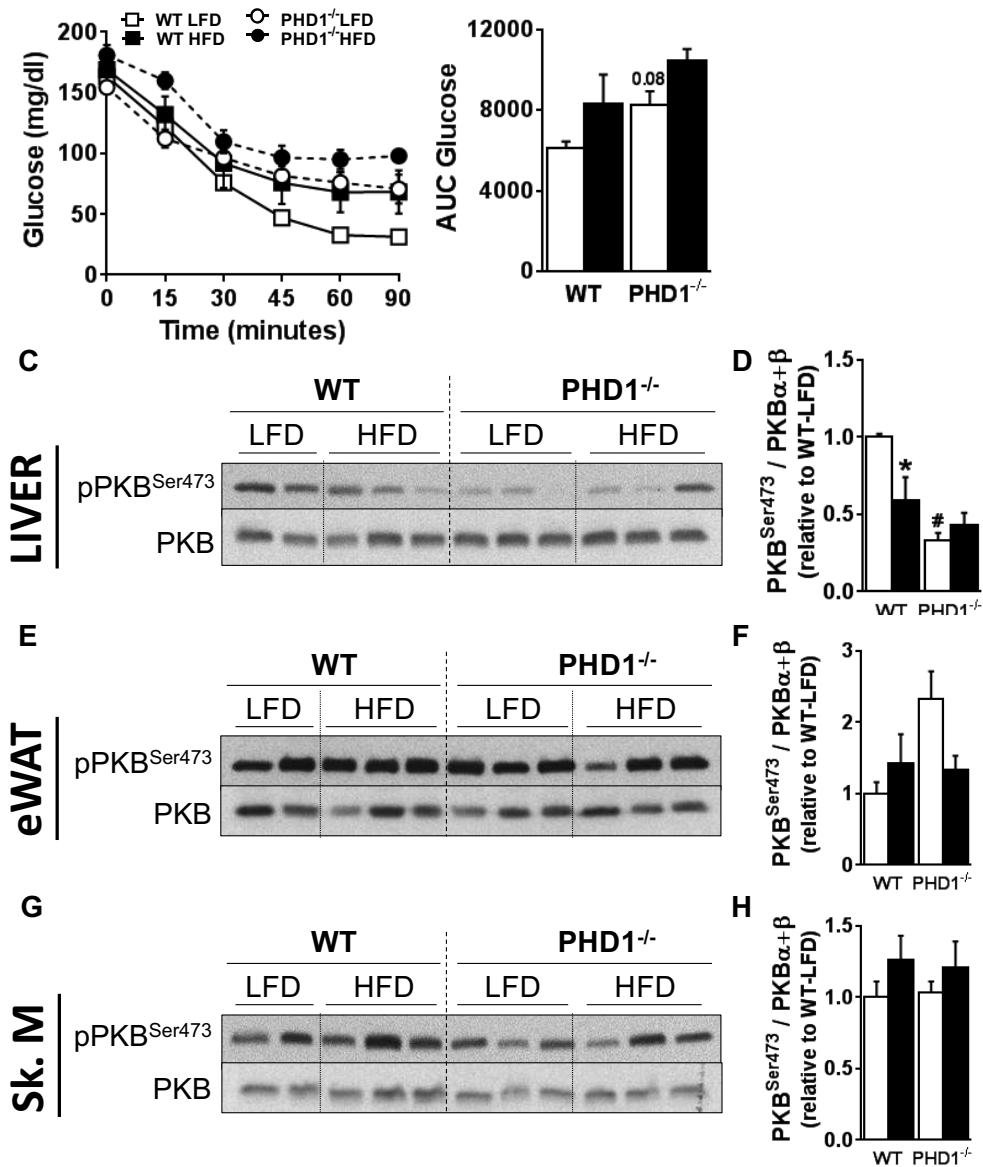


Figure 3. PHD1 deficiency induces systemic and liver-specific insulin resistance. An intraperitoneal ITT (0.5 U/kg total body weight) was performed in 4-hour unfed WT and PHD1^{-/-} mice on either low-fat diet (LFD, open squares) or high-fat diet (HFD, closed squares) mice at week 11. Blood glucose levels were measured at the indicated time-points (A) and the AUC of the glucose excursion curve was calculated as a measure for insulin resistance (B). In separate experiments, the mice were sacrificed 15min after insulin injection and the tissue-specific insulin signaling pathway was studied in liver, eWAT and skeletal muscle by Western blot. Representative blots are shown in (C, E and G). Densitometric quantification was performed and results were expressed a fold change relative to WT-LFD mice (D, F and H). Data are means \pm SEM (n=4-7). * p<0.05 vs LFD mice, # p<0.05 vs WT mice.

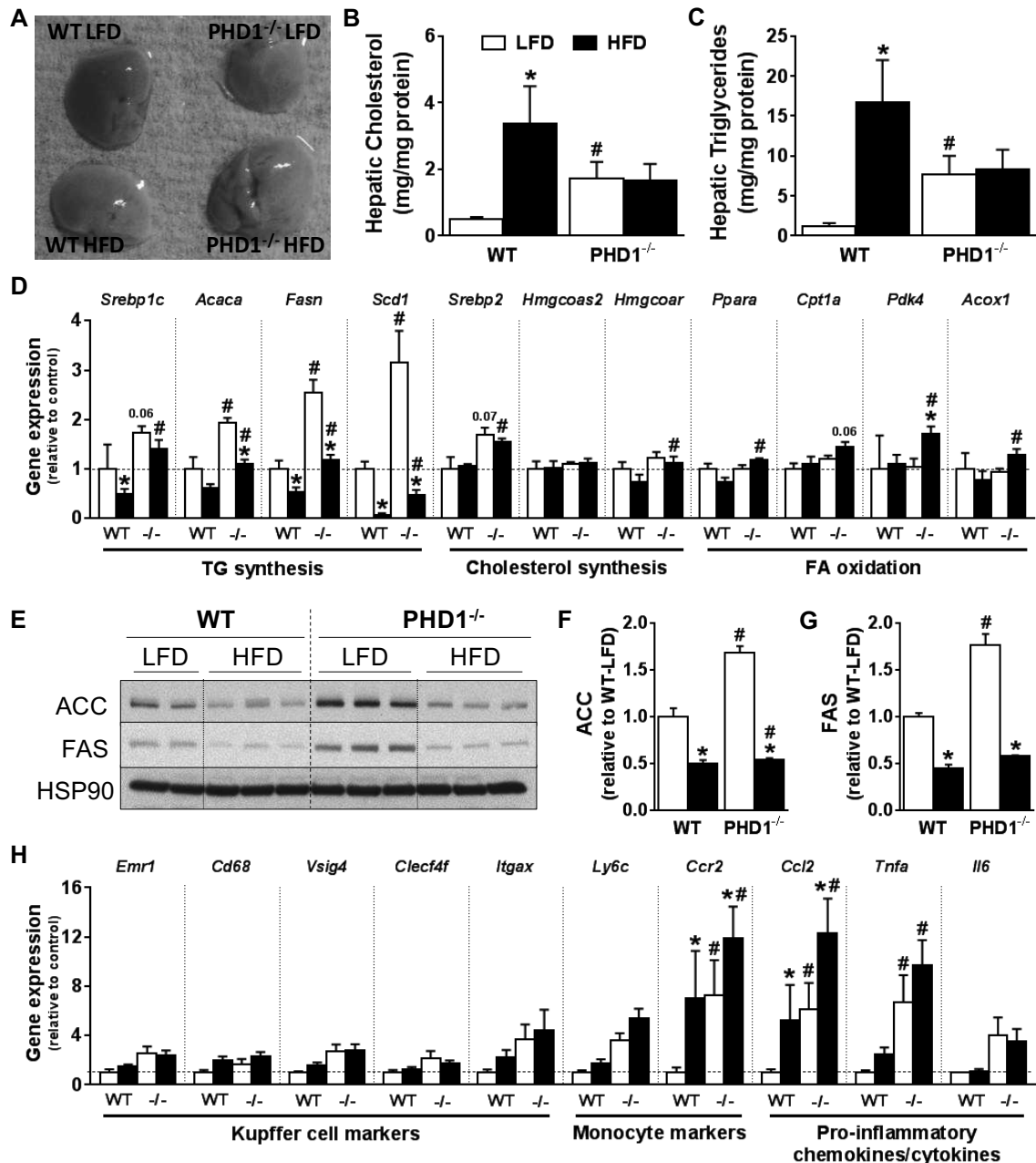


Figure 4. PHD1 deficiency promotes hepatic steatosis. Livers from WT and PHD^{-/-} mice on either low-fat diet (LFD, open squares) or high-fat diet (HFD, closed squares) were sampled (A) after 12 weeks. Hepatic cholesterol (B) and triglycerides (TG, C) contents were determined. The mRNA expression of key genes involved in the regulation of hepatic TG synthesis (*Srebp1c*: SREBP1c; *Acaca*: ACC1; *Fasn*: FAS; *Scd1*: SCD1), cholesterol synthesis (*Srebp2*: SREBP2; *Hmgcoar*: HMGCoA Reductase; *Hmgcoas*: HMGCoA Synthase) and fatty acid oxidation (*Ppara*: PPARα; *Pdk4*: PDK4; *Cpt1a*: CPT1a; *Acox1*: Acyl-Coenzyme A Oxidase) was measured by RT-qPCR. The results are expressed relative to the housekeeping gene RPLP0 as fold change versus WT-LFD mice. Liver ACC and FAS protein expression were studied by Western blot. Representative blots are shown in (E). Total protein expression was quantified by densitometric analysis and expressed as a fold change relative to WT-LFD mice (F, G). HSP90 expression was used as internal housekeeping protein. The mRNA expression of key genes

involved in inflammation (*Emr1*: F4/80, *Cd68*: CD68, *Vsig4*: VSIG4, *Clec4f*: CLEC4F; *Itgax*: CD11c; *Ly6c*: ; *Ccr2*: CCR2; *Ccl2*: MCP-1; *Tnfa*: TNF α ; *Il6*: IL6) was measured by RT-qPCR. The results are expressed relative to the housekeeping gene RPLP0 as fold change versus WT-LFD mice. Data are means \pm SEM (n=4-7). * p<0.05 vs LFD mice, # p<0.05 vs WT mice.

Overall, our results indicates that whole-body PHD1 deficiency in mice promotes hepatic steatosis and liver-specific insulin resistance but did not worsen the deleterious effects of HFD on metabolic homeostasis

Discussion

In the present study, we report that whole-body PHD1 deletion in mice impaired systemic glucose homeostasis and insulin sensitivity in mice on normal chow or low-fat diet, this detrimental metabolic effects being associated with increased hepatic steatosis and inflammation, and liver-specific insulin resistance.

PHD is a dioxygenase that requires oxygen and 2-oxoglutarate as co-substrates and iron and ascorbic acid as cofactors for hydroxylation of proline residues. Three isoforms of PHD (PHD1, PHD2, and PHD3) are evolutionary conserved and ubiquitously expressed in most tissues (1). In normoxic conditions, PHDs act as oxygen-sensing enzymes and promote hydroxylation of the alpha subunit of HIF, leading to its subsequent proteasomal degradation (1). Deletion of PHDs is therefore expected to increase cellular HIF-1 α content by promoting protein stabilization, although the respective role of each PHDs in the control of tissue-specific levels of HIF- α isoforms remain to be clarified (13).

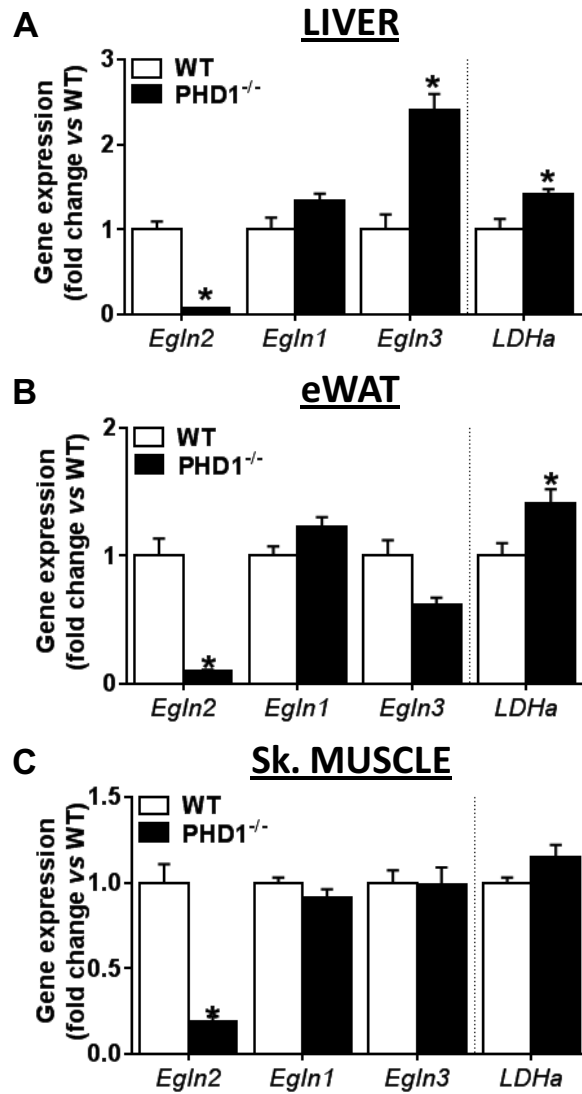
The main metabolic tissue apparently involved in the alteration of systemic insulin resistance and glucose intolerance in PHD^{-/-} knockout mice on LFD appears to be the liver, where a very significant decrease in tissue-specific insulin signaling was evidenced. At the mechanistic level, an increase in both lipogenic enzymes and hepatic lipid content, and in inflammatory markers were found in LFD-fed PHD1^{-/-} mice. Interestingly, both hypoxia and deletion of PHD-1 were shown to activate the pro-inflammatory IKK β /NF κ β canonical

pathway in an *in vitro* model of cancer cells (13), suggesting that a similar alteration might occur in metabolic tissues and underlie increased local inflammation and insulin resistance. Of note, the increase in hepatic steatosis in PHD1^{-/-} mice probably result from increased hepatic *de novo* lipogenesis due to upregulation of gene and protein involved in TG synthesis, like ACC and FAS. However, additional defects in key pathways controlling nutrients metabolism in peripheral tissues might also occur in other metabolic organs, such as WAT, and promote ectopic fat accumulation in the liver. In line with this, PHD1 deletion led to both a decrease in ACC and FAS protein expression and a reduction in AMPK activity in WAT (Fig. S4) that might result in impaired tissue-specific fat storage and oxidation, respectively.

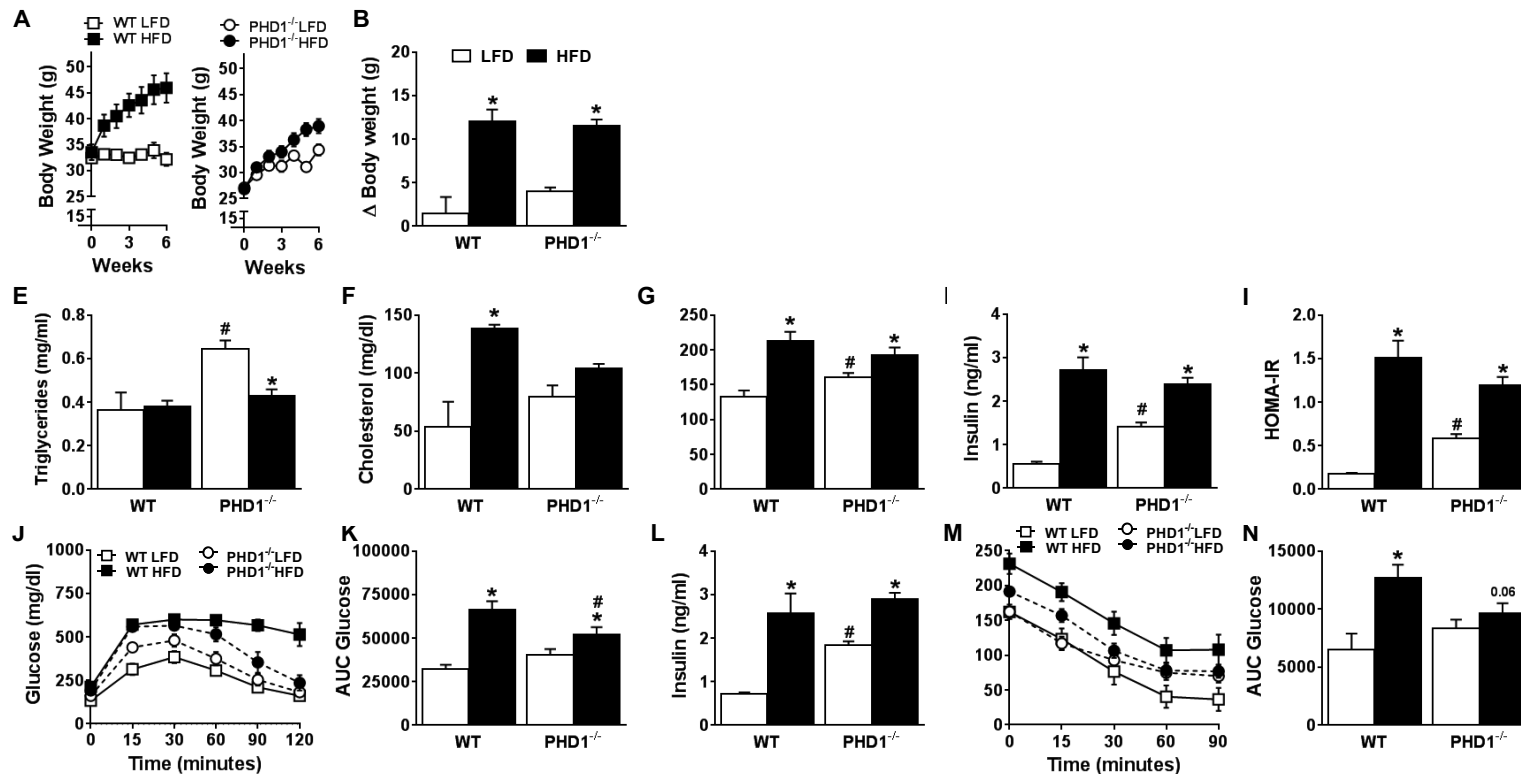
At systemic level, the altered metabolic phenotype of our PHD1^{-/-} mice resembles the one observed in a mouse model of adipose-tissue specific HIF-1 activation. Indeed, overexpression of a constitutively active form of HIF-1 α in WAT led to an increase in body weight gain, fat mass and impairment of whole-body glucose tolerance in mice on normal chow diet (14). Furthermore, in contrast with our study, the metabolic phenotype of these mice was also clearly worsened when challenged with HFD, an effect associated with higher inflammation, fibrosis and insulin resistance in WAT (14). However, contrasting findings were recently reported showing that both systemic and adipose-tissue specific deletion of PHD2 can protect mice against HFD-induced metabolic disorders (13). On the other hand, liver-specific deletion of PHD3 alone or concomitantly with PHD1 or 2, was also shown to improve glucose tolerance and insulin sensitivity (14). Adipocyte-specific PHD2^{-/-} mice on HFD are indeed characterized by a decrease in fat mass and adipocyte size when compared to WT mice, as well as a reduction in monocytes/macrophages infiltration, expression of pro-inflammatory cytokines and lipogenesis in WAT (13; 15). Moreover, an increase in glucose oxidation in WAT due to upregulation of glycolytic genes in adipocytes might also contribute to the improvement in whole-body glucose homeostasis (13; 15). A reduction in both HFD-induced hepatic gluconeogenesis and liver steatosis was also suggested to be involved in the favorable metabolic profile of these various models of PHD deficiency (13-15). Finally, it can also be speculated that part of the detrimental effect on metabolic homeostasis of whole-body PHD1 deletion might be secondary to a central effect, *i.e.* alteration of the

hypothalamic regulation of peripheral insulin sensitivity and nutrient metabolism. Some isoforms of HIF- α are indeed expressed in various hypothalamic regions (16) and deletion of PHD1 might therefore affect HIF- α protein contents and transcriptional activities in key brain area involved in metabolic homeostasis.

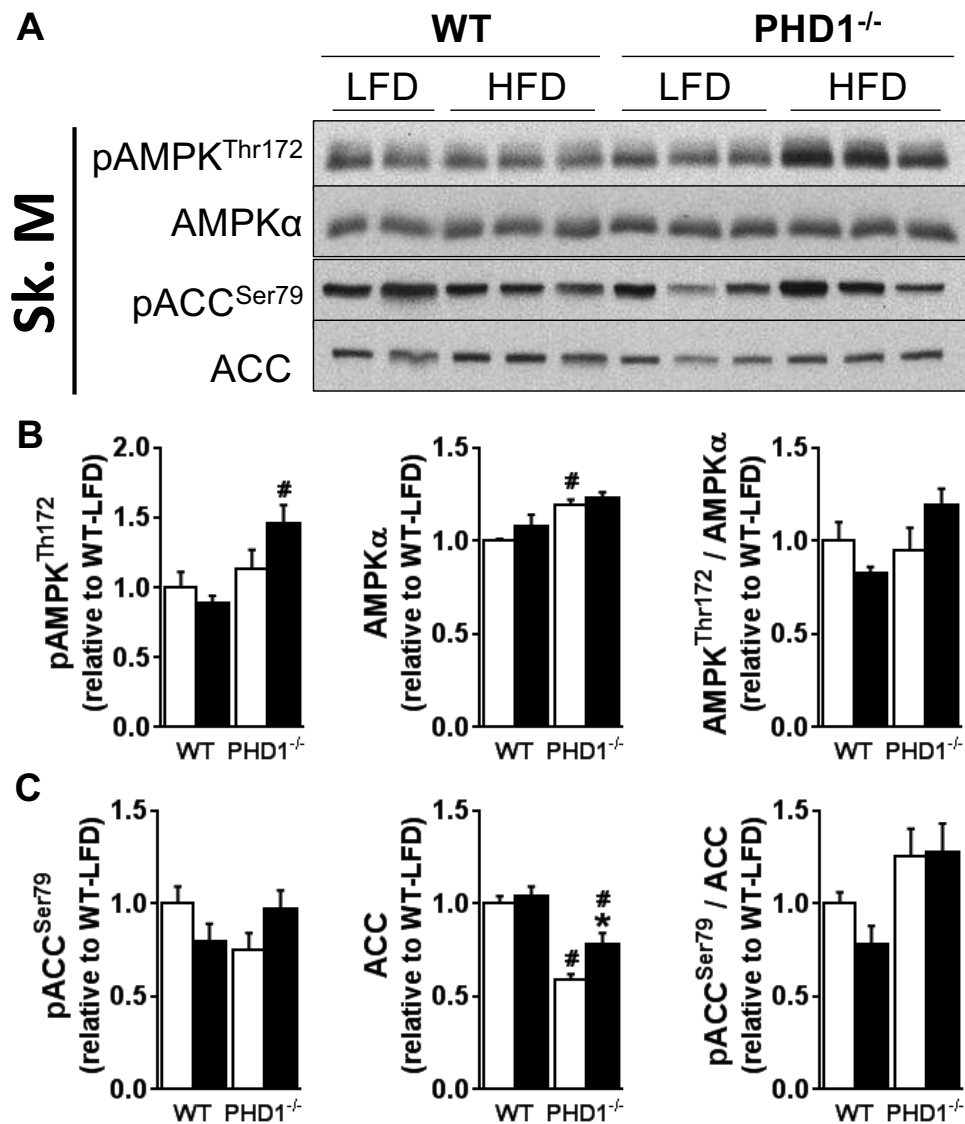
Altogether, the reason(s) for the discrepancies in the metabolic phenotype between the various PHD mouse models are not clear but may be due to differences and/or redundancies in the tissue-specific control of the various HIF- α isoforms by each PHD. Of note, most of the studies showing an improvement in metabolic homeostasis have been performed in HFD-fed PHD knockout mice, a condition where we also observed a trend for a better glucose tolerance in our whole-body PHD1^{-/-} mice. However, by contrast to our study, relatively few information are available on the metabolic phenotype of these animals on LFD and/or normal chow diet and would have been useful to eventually unravel subtle metabolic consequences of PHD deficiencies. Finally, it is important to underline that in our model of constitutive whole-body knockout mice, we observed significant and tissue-specific compensatory expression of the other PHD isoforms when PHD1 was deleted. Therefore, we cannot exclude that some of the detrimental effects on the metabolic homeostasis found in our model are actually secondary to a shift in the composition (and functions) of PHD isoforms in the various metabolic tissues. Further studies using tissue-specific and inducible deletion of PHD1 are therefore clearly required for investigating the respective contribution of the organs involved in the regulation of metabolic homeostasis, notably the brain, in the impairment of whole-body insulin sensitivity and glucose homeostasis.



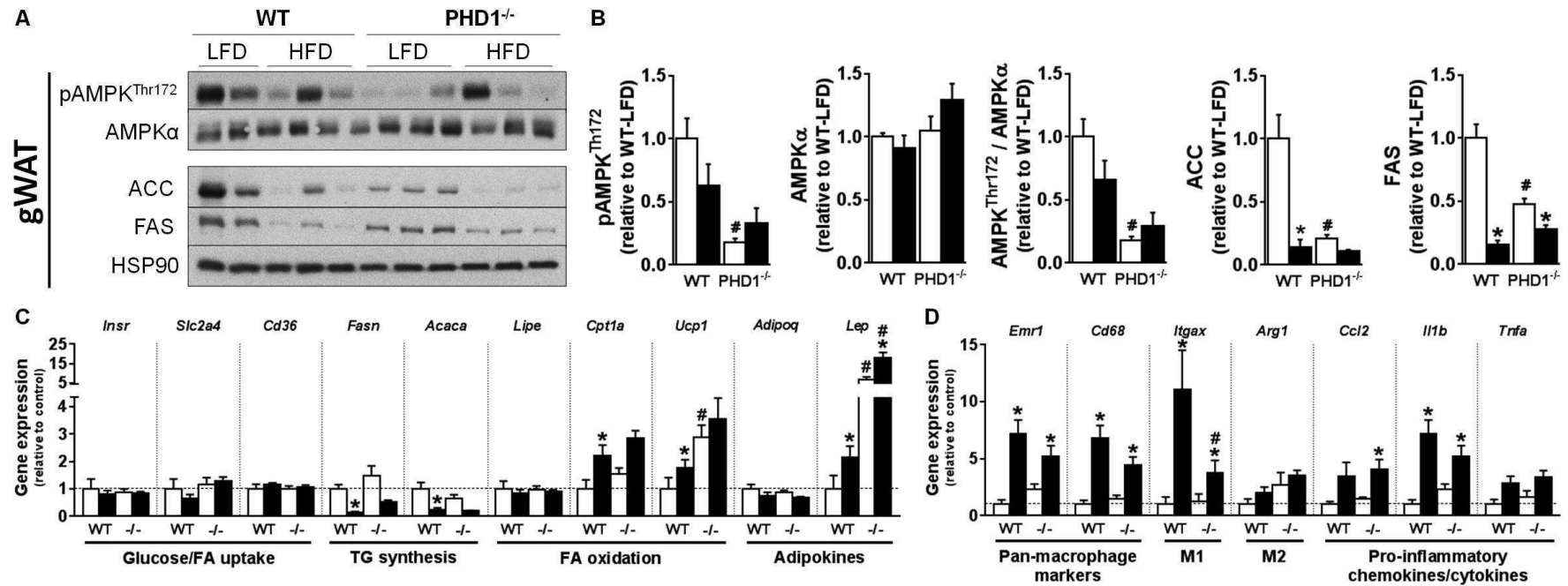
Supplementary Figure 1. Effects of whole-body PHD1 deficiency on tissue-specific expression of PHDs isoforms. The mRNA expression of the various HIF-PHDs isoforms (*EglN2*: PHD1; *EglN1*: PHD2; *EglN3*: PHD3; *Ldha*: LDHa) was measured by RT-qPCR in liver (A), epididymal white adipose tissue (B) and skeletal muscle (C) of WT and PHD1^{-/-} mice on chow diet. The results are expressed relative to the housekeeping gene RPLP0 as fold change vs WT mice. Data are means ± SEM (n=7-13). * p<0.05 vs WT mice.



Supplementary Figure 2. PHD1 deficiency promotes weight gain and insulin resistance but does not worsen high fat diet-induced metabolic alterations. WT and PHD1^{-/-} mice were fed a low-fat diet (LFD, 10 % fat, open squares) or high-fat diet (HFD, 45% fat, closed squares) for 6 weeks. Body weight was monitored throughout the experimental period (A). The delta (Δ) change in body weight from the start of diet (B). Plasma triglycerides (C), total cholesterol (D), glucose (E) and insulin levels (F) were determined and HOMA-IR (G) was calculated in 6-hour unfed mice at week 6. An intraperitoneal GTT (2 g/ kg of total body weight) was performed in 6-hour unfed mice at week 5. Blood glucose levels were measured at the indicated time-points (H), and the area under the curve (AUC) of the glucose excursion curve was calculated as a measure for glucose tolerance (I). The plasma insulin level during ipGTT was measured at 15 minutes (J). An intraperitoneal ITT (0.5 U/kg total body weight) was performed in 4-hour unfed mice at week 6. Blood glucose levels were measured at the indicated time-points (K) and the AUC of the glucose excursion curve was calculated as a measure for insulin resistance (L). Data are means \pm SEM (n=4-7). * p<0.05 vs LFD-fed mice, # p<0.05 vs WT mice.



Supplementary Figure 3. Effects of PHD1 deficiency on AMPK signaling pathway in skeletal muscle from low- and high-fat diet-fed mice. The protein expression of AMPK α and ACC, and the phosphorylation states of Thr172-AMPK α and Ser79-ACC were assessed by Western Blot 15min after insulin injection in skeletal muscle from WT and PHD1^{-/-} mice on low- (LFD, open squares) or high-fat diet (HFD, black square), as described in Figure 3. Representative blots are shown in (A) and densitometric quantifications in (B-C). The phospho-to-total ratios were calculated and expressed a fold change relative to WT-LFD mice. Data are means \pm SEM (n=4-7). * p<0.05 vs LFD mice, # p<0.05 vs WT mice.



Supplementary Figure 4. Effects of PHD1 deficiency on AMPK signaling and expression of lipogenic proteins and metabolic/inflammatory genes in white adipose tissue from low- and high-fat diet-fed mice. The protein expression of AMPK α , ACC and FAS, and the phosphorylation state of Thr172-AMPK α were assessed by Western Blot 15min after insulin injection in epididymal white adipose tissue (eWAT) from WT and PHD1^{-/-} mice on low- (LFD, open squares) or high-fat diet (HFD, black square), as described in Figure 3. Representative blots are shown in (A) and densitometric quantifications expressed a fold change relative to WT-LFD mice in (B). HSP90 expression was used as internal housekeeping protein. The mRNA expression of key genes involved in glucose/FA uptake (*Insr*: Insulin receptor α , *Slc2a4*: GLUT4; *Cd36*: CD36), triglycerides synthesis (*Fasn*: FAS; *Acaca*: ACC1), fatty acid oxidation (*Lipe*: HSL; *Cpt1a*: CPT1 α ; *Ucp1*: UCP1) and adipokines (*Adipoq*: Adiponectin; *Lep*: Leptin) were measured by RT-qPCR (C). The mRNA expression of key genes involved in eWAT inflammation (D) was measured by RT-qPCR (*Emr1*: F4/80, *Cd68*: CD68, *Arg1*: ARG1; *Itgax*: CD11c; *Ccl2*: MCP-1; *Il1b*: IL1 β ; *Tnfa*: TNF α). The results are expressed relative to the housekeeping gene RPLP0 as fold change versus WT-LFD mice. Data are means \pm SEM (n=4-7). * p<0.05 vs LFD mice, # p<0.05 vs WT mice.

Supplementary Table 1: Primary antibodies for Western blots

Primary antibody	Residue	Supplier	Reference	Dilution
ACC	-	Cell Signaling	#3662	1:2000
ACC	Ser79	Cell Signaling	#3661	1:2000
AMPK α	-	Cell Signaling	#2532	1:1000
AMPK α	Thr172	Cell Signaling	#2535	1:1000
FAS		Cell signaling	#3180	1:1000
PKB 1+2		Upstate	07-416 + 07-372	1:2000
PKB	Ser473	Cell signaling	#9271	1:1000
HSP90		Santa Cruz	sc-7947	1:1000

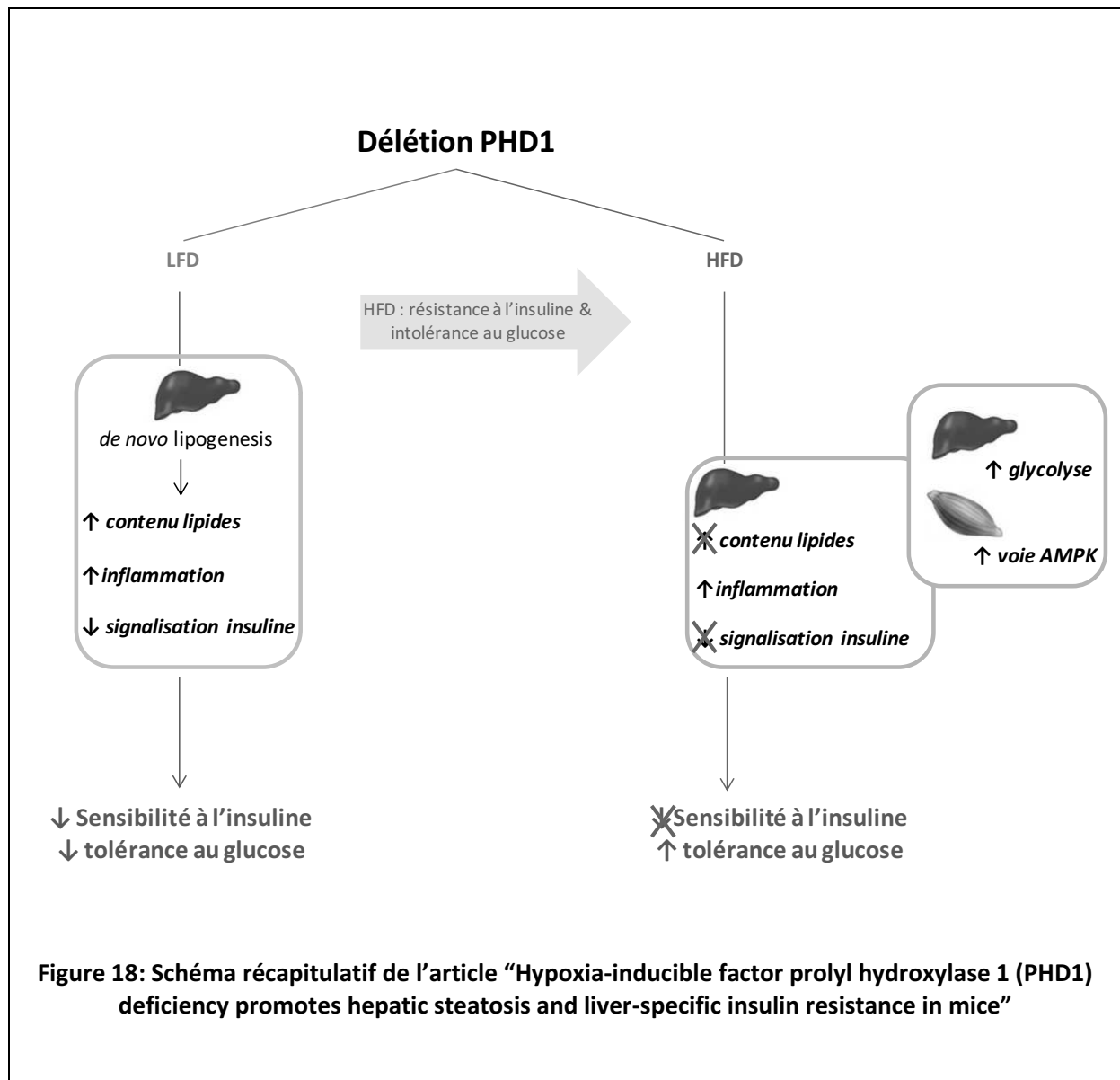
Supplementary Table 2: Primer sequences for qRT-PCR

Gene	Accession number	Forward primer	Reverse primer
<i>Acaca</i>	NM_133360.2	CAGCTGGTGCAGAGGTACCG	TCTACTCGCAGGTACTGCCG
<i>Acox1</i>	NM_015729	GGGACCCACAAGCCTCTGCCA	GTGCCGTCCAGGCTTCACCTGG
<i>Adipoq</i>	NM_009605	GGAATGACAGGAGCTGAAGG	CGAATGGGTACATTGGGAAC
<i>Arg1</i>	NM_007482.3	GACCACGGGGACCTGGCCTT	ACTGCCAGACTGTGGTCTCCACC
<i>Ccl2</i>	NM_011333.3	TCAGCCAGATGCAGTTAACGCC	GCTTCTTTGGGACACCTGCTGCT
<i>Cd36</i>	NM_001159558	GCAAAGAACAGCAGCAAAATC	CAGTGAAGGCTCAAAGATGG
<i>Cd68</i>	NM_009853.1	CCTCCACCCTCGCCTAGTC	TTGGGTATAGGATTCGGATTTGA
<i>Cpt1a</i>	NM_013495	AGGAGACAAGAACCCCAACA	AAGGAATGCAGGTCCACATC
<i>Emr1</i>	NM_010130.4	CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC	GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG
<i>Fasn</i>	NM_007988	CACAGGCATCAATGTCAACC	TTTGGGAAGTCTCAGCAAC
<i>Hmgcr</i>	NM_008255	CTTGTGGAATGCCTTGTGATTG	AGCCGAAGCAGCACATGAT
<i>Hmgcs2</i>	NM_008256.4	CATCGCAGGAAGTATGCCCG	GCTGTTTGGGTAGCAGCTCG
<i>Insr</i>	NM_010568.2	GCCAAAATTATCATTGGACCCC	CATCCGGCTGCCTCTTTCT
<i>Itgax</i>	NM_021334.2	GCCACCAACCCTTCTGGCTG	TTGGACACTCCTGCTGTGCAGTTG
<i>Lipe</i>	NM_010719	AGCCTCATGGACCCTCTTCT	GCCTAGTGCCTTCTGGTCTG
<i>Lep</i>	NM_008493	CCCTGTGTCGGTTCCTGTGGC	GCGGATACCGACTGCGTGTGT
<i>Pdk4</i>	NM_013743	GATTGACATCCTGCCTGACC	CAGGGCTTCTGGTCTTCTG
<i>Ppara</i>	NM_011144	CAACCCGCCTTTTGTCCATAC	CCTCTGCCTCTTTGTCTTCG
<i>Slc2a4</i>	NM_009204	CTCAATGGTTGGGAAGGAAA	GAGGAACCGTCCAAGAATGA
<i>Srebf1</i>	NM_011480	GGCCGAGATGTGCGAACT	TTGTTGATGAGCTGGAGCATGT
<i>Srebf1</i>	NM_011480	CTGGCTGAGGCGGGATGA	TACGGGCCACAAGAAGTAGA

Références

1. Ichiki T, Sunagawa K: Novel roles of hypoxia response system in glucose metabolism and obesity. *Trends Cardiovasc Med* 24:197-201, 2014
2. Trayhurn P: Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiol Rev* 93:1-21, 2013
3. Pasarica M, Sereda OR, Redman LM, Albarado DC, Hymel DT, Roan LE, Rood JC, Burk DH, Smith SR: Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes* 58:718-725, 2009
4. Ye J, Gao Z, Yin J, He Q: Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E1118-1128, 2007
5. Regazzetti C, Peraldi P, Gremeaux T, Najem-Lendom R, Ben-Sahra I, Cormont M, Bost F, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF, Giorgetti-Peraldi S: Hypoxia decreases insulin signaling pathways in adipocytes. *Diabetes* 58:95-103, 2009
6. Yin J, Gao Z, Liu D, Liu Z, Ye J: Berberine improves glucose metabolism through induction of glycolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:E148-156, 2008
7. Rausch ME, Weisberg S, Vardhana P, Tortoriello DV: Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *Int J Obes (Lond)* 32:451-463, 2008
8. Schofield CJ, Ratcliffe PJ: Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:343-354, 2004
9. Berra E, Ginouves A, Pouyssegur J: The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling. *EMBO Rep* 7:41-45, 2006
10. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ: Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292:468-472, 2001
11. Lee S, Muniyappa R, Yan X, Chen H, Yue LQ, Hong EG, Kim JK, Quon MJ: Comparison between surrogate indexes of insulin sensitivity and resistance and hyperinsulinemic euglycemic clamp estimates in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:E261-270, 2008

12. Geerling JJ, Boon MR, van der Zon GC, van den Berg SA, van den Hoek AM, Lombes M, Princen HM, Havekes LM, Rensen PC, Guigas B: Metformin lowers plasma triglycerides by promoting VLDL-triglyceride clearance by brown adipose tissue in mice. *Diabetes* 63:880-891
13. Matsuura H, Ichiki T, Inoue E, Nomura M, Miyazaki R, Hashimoto T, Ikeda J, Takayanagi R, Fong GH, Sunagawa K: Prolyl hydroxylase domain protein 2 plays a critical role in diet-induced obesity and glucose intolerance. *Circulation* 127:2078-2087, 2013
14. Rahtu-Korpela L, Karsikas S, Horkko S, Blanco Sequeiros R, Lammentausta E, Makela KA, Herzig KH, Walkinshaw G, Kivirikko KI, Myllyharju J, Serpi R, Koivunen P: HIF prolyl 4-hydroxylase-2 inhibition improves glucose and lipid metabolism and protects against obesity and metabolic dysfunction. *Diabetes* 63:3324-3333, 2014
15. Taniguchi CM, Finger EC, Krieg AJ, Wu C, Diep AN, LaGory EL, Wei K, McGinnis LM, Yuan J, Kuo CJ, Giaccia AJ: Cross-talk between hypoxia and insulin signaling through Phd3 regulates hepatic glucose and lipid metabolism and ameliorates diabetes. *Nat Med* 19:1325-1330, 2013
16. Zhang H, Zhang G, Gonzalez FJ, Park SM, Cai D: Hypoxia-inducible factor directs POMC gene to mediate hypothalamic glucose sensing and energy balance regulation. *PLoS Biol* 9: e1001112, 2011



DISCUSSION

L'objectif général de ce projet était d'explorer les mécanismes moléculaires de la réponse à l'hypoxie intermittente (HI) sur l'homéostasie du glucose. Ce sujet est d'un intérêt majeur compte tenu des implications cliniques et épidémiologiques. Par ailleurs, l'impact de l'HI sur l'homéostasie du glucose et la prise en charge appropriée, ne sont pas définitivement établis en recherche clinique ce qui renforce l'attente de données expérimentales originales. Dans le **chapitre 1**, nous confirmons que l'HI induit une résistance à l'insuline chez la souris et montrons pour la première fois dans le domaine des apnées du sommeil que cette diminution de sensibilité à l'insuline était secondaire à un défaut de signalisation à l'insuline dans les trois principaux tissus métaboliques impliqués dans l'homéostasie du glucose (foie, tissu adipeux et muscle squelettique). Dans ce modèle original d'exposition à l'HI, les animaux hypoxiques présentaient une meilleure tolérance au glucose induite par l'activation de l'AMPK dans le muscle squelettique. Dans le **chapitre 2**, l'étude transcriptomique du foie et du tissu adipeux de souris non obèses exposées à l'HI pendant 14 jours a montré une réponse organe-spécifique. Nous avons observé une activation des gènes impliqués dans la lipogenèse, la fibrose et l'inflammation au niveau hépatique, ainsi qu'une activation des gènes de l'inflammation et de la fibrose au niveau du tissu adipeux, conduisant à une augmentation de la masse grasse et de la taille des adipocytes. Le **chapitre 3** évaluant l'impact de l'HI sur le remodelage vasculaire a montré que des souris ApoE^{-/-} exposées à 6 semaines d'HI avaient un remodelage morphologique, fonctionnel et inflammatoire du tissu adipeux viscéral et que ce remodelage contribuait à la dyslipidémie et l'athérosclérose induite par l'HI. Dans le **chapitre 4**, nous avons montré que la délétion au niveau de l'organisme entier de la PHD1, une des enzymes inhibitrices de HIF-1 α , induisait une altération de l'homéostasie du glucose et de la sensibilité à l'insuline chez la souris non exposée à l'HI, principalement due à une stéatose et une inflammation hépatique associées à une altération de la signalisation insulinique spécifiquement au niveau du foie.

HYPOXIE INTERMIETTENTE, POIDS ET PRISE ALIMENTAIRE

Nous confirmons (1-10), une diminution de poids chez les animaux exposés à l'hypoxie. Comme déjà mis en évidence par d'autres équipes, la prise alimentaire était réduite chez les

animaux exposés à l'HI contribuant à la perte de poids observée (6; 11; 12). Notre travail apporte une contribution supplémentaire en montrant que la diminution de prise alimentaire est spécifique à la période d'exposition (8h par jour, de 6h à 14h), alors que la prise alimentaire est la même entre les deux groupes en dehors de la période d'exposition (14h-6h). Parmi les mécanismes impliqués dans la régulation de la prise alimentaire, la leptine a été considérée avec intérêt dans les modèles d'HI. En effet, des études ont mis en évidence une augmentation de leptine chez les animaux hypoxiques lors d'une exposition chronique (313) ou aigue (235). Cette augmentation chez les animaux hypoxiques concorde avec l'augmentation des taux de leptine plasmatique observée chez le patient apnéique (30) essentiellement présente quand l'obésité est associée au SAS. La leptine a par ailleurs un effet sur le contrôle ventilatoire, l'activité sympathique et participe aux conséquences cardiovasculaires de l'HI (14). En HI, le niveau de leptine est augmentée et est associée à une augmentation de l'activation des neurones anorexigènes même en l'absence d'augmentation de la masse grasse (235; 260), suggérant un effet plus direct du stimulus hypoxique sur sa régulation. Le facteur de transcription HIF-1, activé pendant l'HI régule la transcription de gènes cibles dont celui de la leptine (16). Néanmoins, l'arrêt brutal de la prise alimentaire pendant l'exposition, laisse envisager une régulation à cinétique rapide de la prise alimentaire reposant sur d'autres mécanismes. Par exemple, il a été montré qu'une activation de HIF-2 α directement au niveau de l'hypothalamus pouvait contrôler la transcription du gène anorexigène *Pomc* et ainsi diminuer la prise alimentaire (17). Les résultats obtenus en HI et l'hypothèse d'un rôle de HIF-1 sur ces paramètres, concordent avec les résultats obtenus chez des animaux déficients pour la PHD1, qui présentent lors d'un régime standard, une diminution de prise alimentaire, ainsi qu'un poids plus faible. Par ailleurs, nous avons soumis des animaux normoxiques à une alimentation contrôlée de façon à reproduire exactement le format de prise alimentaire des animaux en HI. Fait intéressant, ces animaux « pair-fed » présentent quand même une diminution de leur poids (*résultats non montrés*), suggérant d'autres effets que la seule diminution de prise alimentaire sur le poids. L'exposition à l'hypoxie ou à l'altitude entraîne une augmentation de la dépense énergétique de repos ou d'activité (314), suggérant que la dépense énergétique pourrait être augmentée chez les animaux exposés à l'HI et participer aux effets sur le poids. On sait

qu'une diminution de poids induite par l'hypoxie est associée à une diminution de la masse de certains tissus, en particulier la masse adipeuse et la masse musculaire (314), même s'il existe encore des controverses quant aux tissus préférentiellement atteints (315). Dans nos conditions, les effets de l'HI sur la masse musculaire n'ont été étudiés que dans le chapitre 1, et nous n'avons pas observé de modifications de celle-ci. Concernant le tissu adipeux, les données sont plus controversées puisque dans le chapitre 1, aucune modification de masse grasse n'a été observée ; dans le chapitre 2, l'HI a induit une augmentation de la masse du tissu adipeux et de la taille des adipocytes ; et enfin, dans le chapitre 3, les animaux hypoxiques présentaient une diminution de masse adipeuse associée à une diminution de la taille des adipocytes. Ces différences peuvent s'expliquer par des durées d'expositions différentes, le caractère obèse ou non obèse des souris exposées et les lignées utilisées. Ainsi, nous avons utilisé des souris de fond génétique C57BL6 dans le chapitre 1, des Swiss 129 dans le chapitre 2 et enfin des souris déficientes pour l'ApoE (fond C57BL6) pour le chapitre 3. La durée d'exposition à l'HI était également différente, allant de deux (chap. 1 & 2) à six semaines (chap. 3). Il est probable que l'impact de l'HI soit différent selon le contexte (tissu adipeux déjà modifié par l'obésité ou remodelage *de novo* lié à l'HI) et que les mécanismes adaptatifs varient en fonction d'une exposition aiguë ou chronique à l'HI.

La perte de poids et la diminution de prise alimentaire sont reconnues pour avoir des effets bénéfiques sur l'homéostasie du glucose (316) ; (317). Cependant dans nos conditions, les effets du poids et de la prise alimentaire ont été évalués et ne participent pas aux altérations mises en évidence sur la régulation de l'homéostasie du glucose.

HYPOXIE INTERMITTENTE ET RESISTANCE A L'INSULINE

En utilisant les critères validés dans la littérature (2; 22; 23; 24-28) nous avons montré une résistance à l'insuline après une exposition de deux (chapitre 1) ou six (chapitre 3) semaines à l'HI. L'analyse de la sensibilité à l'insuline au niveau tissulaire par évaluation de la signalisation de l'insuline, nous a permis de démontrer que l'HI induisait une atteinte de

cette sensibilité dans les trois organes métaboliques étudiés à savoir le foie, le tissu adipeux et le muscle squelettique. Des études précédentes avaient déjà observé des diminutions de la phosphorylation de PKB dans un des trois organes lors d'une exposition à l'HI (233; 238; 30; 10), mais nous mettons en évidence pour la première fois cette altération de façon concomitante dans les trois tissus cibles de l'insuline. Les mécanismes classiquement décrits pour induire une résistance tissulaires à l'insuline, tels que l'inflammation ou la stéatose hépatique, n'ont pas été retrouvés dans le contexte du chapitre 1 (318; 301). Cependant dans les chapitres 2 et 3, nous avons observé une inflammation du tissu adipeux caractérisée par une augmentation de l'expression de gènes pro-inflammatoires, de l'accumulation de macrophages ou de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par le tissu adipeux après une exposition à l'HI. L'inflammation tissulaire, en particulier au niveau du foie et du tissu adipeux est bien associée aux altérations métaboliques induites par l'HI. Ainsi des études ont observé une augmentation hépatique de NFkB chez des souris ou des rats exposés respectivement 12 semaines ou 14 jours à l'HI (33; 34), ainsi qu'une élévation des taux de TNF α et de MIP-2 au niveau du foie (243). Concernant le tissu adipeux, une étude a mis en évidence une polarisation des macrophages de type M1 (pro-inflammatoire) dans le tissu adipeux de souris exposées à l'HI pendant 8 semaines (238). Des travaux de notre laboratoire ont récemment confirmé ces résultats, en mettant en évidence une augmentation du rapport M1/M2 dans le tissu adipeux de souris minces et obèses hypoxiques, ainsi qu'une corrélation entre cette polarisation des macrophages et la diminution de réponse à l'insuline (319). Enfin Poulain et al., ont montré que la délétion du récepteur TLR4, supprimait l'inflammation du tissu adipeux viscéral et la résistance à l'insuline induites par l'HI (294).

Des études ont mis en évidence une augmentation de contenu lipidique dans le foie d'animaux exposés à l'HI (33; 37; 243), en accord avec le développement de stéatose hépatique chez le patient apnéique obèse et non obèse (310). On sait à l'heure actuelle que l'accumulation de lipides dans le foie contribuent à l'altération de sa sensibilité à l'insuline (301). Dans nos conditions, nous avons observé une augmentation de l'expression des gènes lipogéniques au niveau hépatique dans les chapitres 1 et 2. Cependant, ces expressions

géniques n'ont pas été associées à des modifications de contenus lipidiques évalués par dosages (étude 1) ou par analyses immunohistologiques (étude 2) chez des animaux non obèses et exposés deux semaines à l'HI.

Le stress oxydant peut lui aussi être associé aux modifications de l'homéostasie du glucose mais n'a pas été étudié dans notre projet. Néanmoins il apparaît clairement, que l'HI induit une élévation du stress oxydant avec par exemple une augmentation de p47phox dans le foie de souris après 4 semaines d'HI (39) ou une augmentation de la peroxydation lipidique hépatique chez des animaux exposés de façon aiguë ou chronique à l'HI (33; 37; 7; 248; 34). Par ailleurs, des études récentes ont montré qu'un traitement avec un antioxydant, le Resvératrol, supprimait la résistance à l'insuline induite par l'HI (1; 30).

Une piste particulièrement intéressante concerne le stress du réticulum endoplasmique (RE) qui est connu pour participer à la résistance à l'insuline en particulier au niveau du foie et du tissu adipeux (40; 41). Cette thématique est en cours de développement dans le laboratoire et des résultats préliminaires suggèrent une augmentation du stress du RE dans le foie et le tissu adipeux de souris exposées 14 jours à l'HI. Ainsi, on observe une augmentation de l'expression des gènes codants pour GRP78 et CHOP dans le foie et le tissu adipeux (**Figure 1**), ainsi qu'une augmentation de la quantité de protéine GRP78 et de la phosphorylation de PERK dans le foie. L'analyse plus détaillée de ces voies de signalisation permettront de confirmer l'implication du stress du RE dans les altérations métaboliques induites par l'HI. Cette hypothèse est notamment supportée par l'activation du stress du RE dans le myocarde de souris exposées 14 jours à l'HI induisant l'augmentation de la susceptibilité à l'ischémie-reperfusion (320).

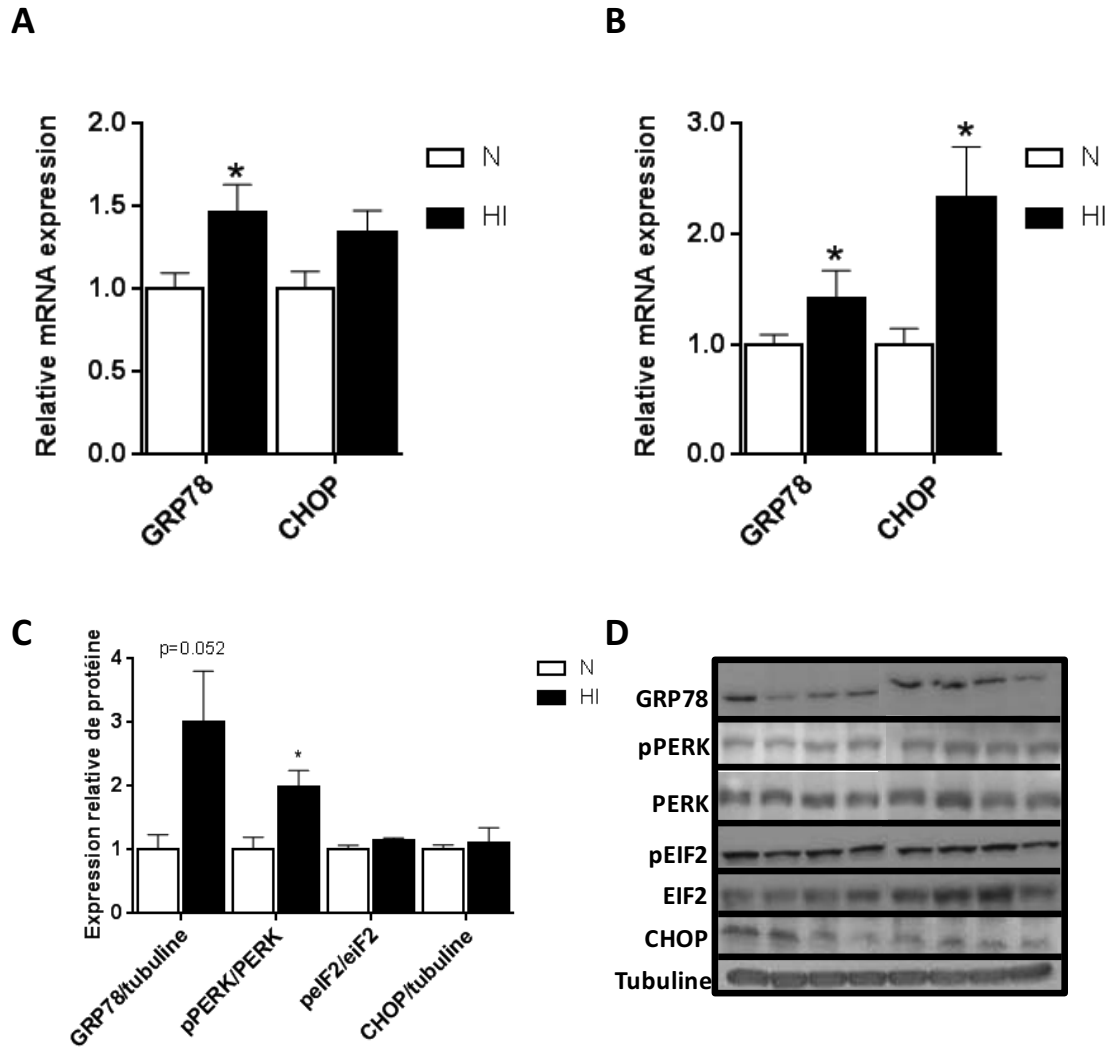


Figure 19: Stress du RE dans le tissu adipeux et le foie.

L'expression des gènes ou des protéines impliqués dans le stress du RE ont été mesurés dans le tissu adipeux (A) ou le foie (B, C, D) de souris N (blanc) ou HI (noir) par RT-qPCR ou WB. Les résultats sont calculés en fonction d'un gène (RPLP0) ou d'une protéine (tubuline) de référence et exprimés relativement par rapport au groupe N. Les valeurs sont moyennées \pm écart standard à la moyenne (n=4-6/groupe). * p<0.05 vs N.

Alors que le muscle est résistant à l'insuline, comme démontré dans notre première étude, nous n'avons mis en évidence ni d'inflammation, ni de stress du RE dans ce tissu (*résultats non montrés*). D'autres voies, qui n'ont pas été étudiées dans ce projet, peuvent être impliquées dans la résistance à l'insuline musculaire induite par l'HI comme un défaut d'oxydation phosphorylante mitochondriale ou une accumulation musculaire de lipides (321).

HIF-1, peut être activé par l'hypoxie seule ou par l'intermédiaire d'un stress oxydant, d'une inflammation ou d'une activation du système nerveux autonome qui sont les trois mécanismes majeurs impliqués dans les conséquences délétères de l'HI tant sur le plan cardiovasculaire que métabolique (261). Dans notre première étude, nous avons mis en évidence une augmentation de la stabilisation de la sous-unité HIF-1 α ainsi qu'une augmentation de la transcription des gènes cibles de HIF-1 dans le foie et le tissu adipeux. La seconde étude a montré une augmentation de la transcription de HIF-1 α dans le foie et le tissu adipeux, en association avec une augmentation de l'expression des gènes de l'inflammation. Ceci est en accord avec les études ayant mis en évidence une élévation de la quantité de HIF-1 α dans le foie (322) ou le tissu adipeux (244). HIF-1 est connu pour être impliqué dans les dysfonctions métaboliques induites par l'hypoxie qui se crée dans le tissu adipeux d'animaux obèses (205). Par ailleurs, l'inhibition pharmacologique ou génétique (48 ; 49 ; 50 ; 51 ; 52) de HIF-1 α diminue les altérations métaboliques induites par un régime riche en graisses en atténuant la fibrose et l'inflammation du tissu adipeux (48) ou la stéatose hépatique (49). Ces résultats suggèrent que l'augmentation de HIF-1 dans le modèle d'HI peut contribuer aux atteintes métaboliques que l'on a observées. La modulation de HIF-1 par les animaux déficients pour la PHD1 permet de confirmer cette hypothèse. En effet, les animaux PHD1 $^{-/-}$ présentent une résistance à l'insuline systémique induite par une diminution drastique de la sensibilité à l'insuline du foie associée à une accumulation et une inflammation de ce tissu, qui n'est pas amplifiée par un régime riche en graisses. Cependant, dans la littérature, il apparaît plutôt que la délétion d'une PHD soit bénéfique pour le métabolisme du glucose. La délétion de la PHD2 dans le tissu adipeux protège les souris des désordres métaboliques induits par un régime riche en graisses (53) et la délétion spécifique de la PHD3 seule ou concomitante avec la délétion de la PHD1 ou 2, améliore aussi la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose (323). Ces effets bénéfiques passent notamment par la diminution de masse grasse, de la taille des adipocytes et de l'inflammation du tissu adipeux lors de la délétion de la PHD2 dans le tissu adipeux (53). Ces discordances peuvent être induites par la suppression spécifique d'une PHD dans les différentes études. Dans notre cas, nous montrons les effets d'une délétion globale qui peut ne pas induire les mêmes effets qu'une délétion spécifique dans un seul tissu. Par ailleurs, la

délétion de la PHD1, n'altère pas la sensibilité à l'insuline du tissu adipeux et du muscle squelettique. Le fait au contraire que l'HI altère la sensibilité à l'insuline aux niveaux des trois tissus suggère qu'en dehors d'une activation de HIF-1, d'autres mécanismes, dont ceux exposés précédemment, interviennent dans la résistance à l'insuline du tissu adipeux et du muscle squelettique induite par l'HI.

HYPOXIE INTERMITTENTE ET TOLERANCE AU GLUCOSE

Un autre résultat majeur, est l'amélioration de la tolérance au glucose induite par l'HI malgré une résistance à l'insuline systémique et tissulaire. Une amélioration de tolérance au glucose en HI avait déjà été observée chez des souris minces ou obèses exposées 5 jours à l'HI (236). Cependant dans cette étude, l'index de résistance à l'insuline (HOMA) était diminué en faveur d'une amélioration de sensibilité à l'insuline. D'autres études ont aussi observé une meilleure tolérance au glucose chez des rats exposés de façon aiguë à l'HI, mais une fois encore, associée à une meilleure sensibilité à l'insuline évaluée par un test de tolérance à l'insuline (233). L'HI est connue en dehors du SAOS, pour induire des effets plutôt bénéfiques lors de courtes expositions induisant chez la souris obèse, une diminution de poids et une amélioration des paramètres métaboliques plasmatiques (314). Cela a conduit à proposer l'exposition à l'hypoxie intermittente comme un traitement dans certaines maladies chroniques et à évoquer dans les mécanismes de réponse à l'hypoxie intermittente un versant délétère (très étudié) et un versant protecteur pré-conditionnant (en début d'évaluation) (324). Une seule étude de la littérature, et en dehors du contexte de l'HI, a montré une dissociation de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline. En effet, les auteurs ont observé une résistance à l'insuline associée à une amélioration de tolérance au glucose chez des rats femelles gestantes. Cette résistance à l'insuline serait nécessaire pour lutter contre les hypoglycémies induites par la gestation (325). Cette étude n'a pas recherché les mécanismes moléculaires pouvant être à l'origine de ces modifications. Nos hypothèses sur cette amélioration de tolérance au glucose ont concerné la voie AMPK. L'AMPK est connue pour activer des voies métaboliques impliquées dans la régulation du métabolisme glucidique (126), dont l'augmentation de l'entrée de glucose dans le muscle

squelettique (58; 59; 60; 128). Nous avons mis en évidence une activation de l'AMPK dans le muscle squelettique des animaux exposés à l'HI qui pourrait induire une augmentation de l'entrée de glucose dans le muscle chez les animaux hypoxiques et de façon indépendante de la signalisation insuline. L'hypoxie est connue pour activer l'AMPK (256). Les études sur l'impact de l'HI sur l'AMPK sont peu nombreuses mais montrent une augmentation de l'activation de l'AMPK dans les muscles génioglosse ou cardiaque de rats exposés à l'HI (63 ; 64). La diminution du ratio ATP/AMP ou ATP/ADP active l'AMPK, mais aucune étude n'a mis en évidence de modification de ce ratio en HI. Par ailleurs, des radicaux libres oxygénés (RLO) produits lors de conditions hypoxiques, peuvent eux aussi intervenir dans l'activation de l'AMPK de façon indépendante d'une diminution du ratio ATP/AMP, par l'activation des kinases activatrices de l'AMPK. En particulier, les RLO peuvent être responsable d'une altération de l'homéostasie calcique entraînant une augmentation Ca^{2+} intracellulaire activant l'AMPK par l'intermédiaire de la CaMKK (326).

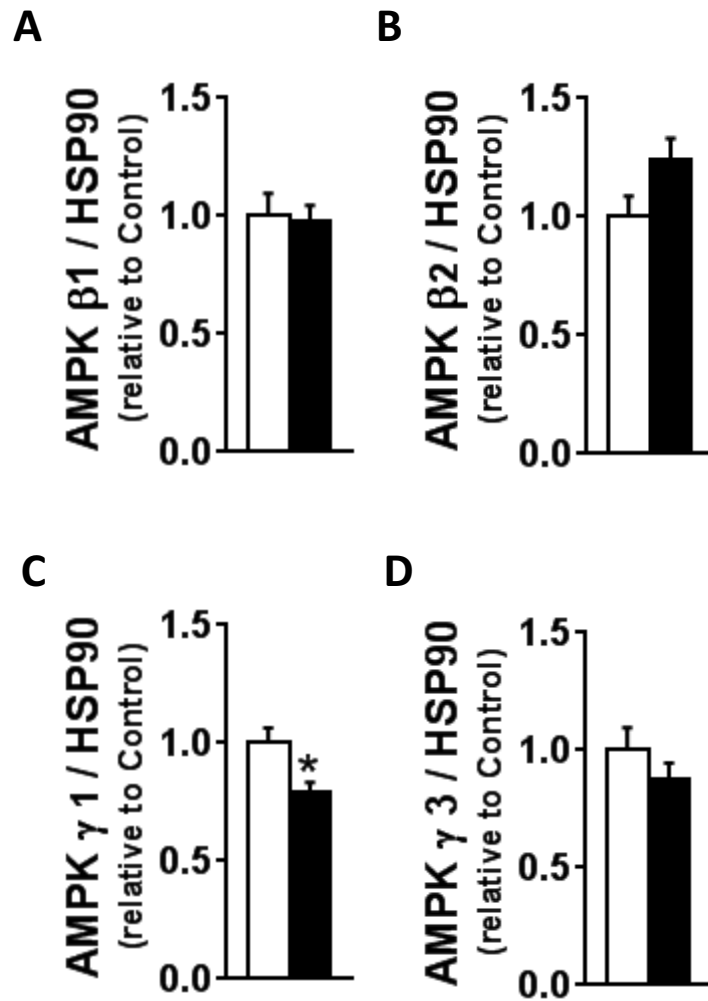


Figure 20: Expression des sous-unités de l'AMPK.

L'expression des sous-unités de l'AMPK dans le muscle squelettique de souris N (blanc) ou HI (noir) ont été étudié par WB. Les résultats sont calculés en fonction d'une protéine de référence HSP90 et exprimés relativement par rapport au groupe N. Les valeurs sont moyennées \pm écart standard à la moyenne (n=6/groupe). * p<0.05 vs N.

L'AMPK est composée de plusieurs sous-unités qui possèdent chacune plusieurs isoformes et donc peuvent former des complexe trimériques différents qui vont modifier leur sensibilité, leur interaction avec des protéines cibles de l'AMPK ainsi que leur localisation cellulaire (327). Dans notre modèle nous avons mis en évidence une diminution de l'expression de la sous-unité γ 1 et une tendance à l'augmentation de l'expression de la sous-unité β 2 dans le muscle des souris exposées à l'HI pendant 14 jours (**Figure 2**). Les effets de ces changements d'expression restent cependant à déterminer.

L'autre hypothèse est l'activation de HIF-1 induite par l'HI. HIF-1 est connu pour activer des gènes impliqués dans la glycolyse (328), ce qui suggère une activation du flux de glucose vers le foie qui pourrait contribuer à l'amélioration de la tolérance au glucose. En effet, une étude a mis en évidence une diminution de la tolérance au glucose chez des animaux déficient pour HIF-1 α dans le foie induit par une diminution de l'entrée et de l'utilisation du glucose (221).

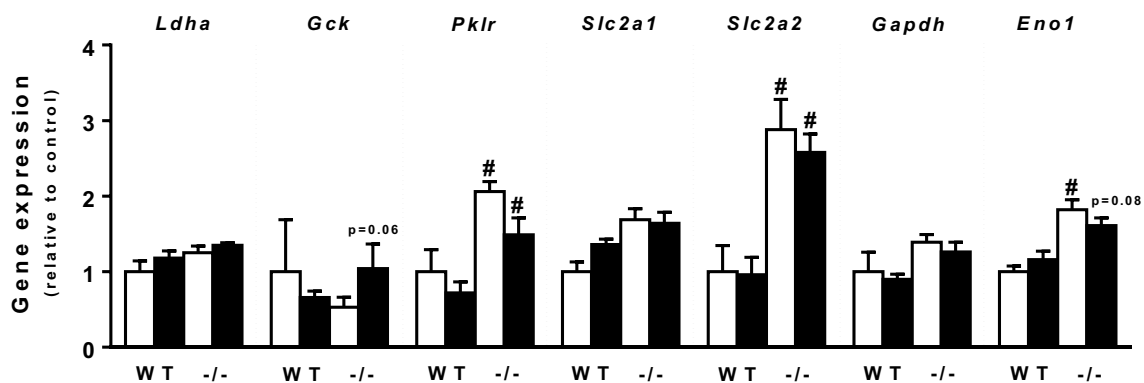


Figure 21: Expression des gènes de la glycolyse.

Les foies de souris WT et PHD1 $^{-/-}$ exposés à un régime pauvre en graisse, LFD (blanc) ou riche en graisse, HFD (noir) ont été prélevés et analysés. L'expression de l'ARNm des gènes impliqués dans la glycolyse ont été mesurés par RT-qPCR (Ldha : LDHa ; Gck : GK ; Pklr : L-PK ; Slc2a1 : GLUT1 ; Slc2a2 : GLUT2 ; Gapdh : GAPDH ; Eno1 : ENO1). Les résultats sont calculés en fonction d'un gène de référence RPLPO et exprimé relativement par rapport au groupe WT-LFD. Les valeurs sont moyennées \pm écart standard à la moyenne (n=4-5/groupe). * p<0.05 vs WT-LFD.

L'amélioration de la tolérance au glucose chez les animaux KO pour la PHD1 par rapport aux WT sous régime HFD peut confirmer le rôle de HIF-1 dans l'amélioration de la tolérance au glucose. La **Figure 3** montre d'ailleurs une augmentation de l'expression de certains gènes codant pour des protéines impliquées dans la glycolyse telles que la *pyruvate kinase* ou l'*enolase 1*, dans le foie des souris PHD1 $^{-/-}$ quel que soit le régime. Par ailleurs, fait intéressant, l'analyse de la voie AMPK montre une tendance à l'activation de cette voie dans le muscle squelettique des souris déficientes en PHD1 par rapport aux WT sous régime HFD, qui peut questionner quant au lien entre l'activation de HIF-1, l'AMPK et la tolérance au glucose. AMPK et HIF partagent en effet un certain nombre de cibles et ont des effets

similaires. Par exemple, HIF1 et l'AMPK activent tous deux la glycolyse (67; 69). Ces deux protéines sont toutes les deux activées par l'hypoxie mais leur interaction dans ces conditions reste encore discutée. Des études ont observé que l'hypoxie induisait une activation d'AMPK dans un modèle de cellules qui précédait l'induction de l'expression de HIF-1 α (70). De plus l'inhibition de l'AMPK abolirait l'expression de HIF-1 induite par l'hypoxie (70). L'AMPK est cruciale pour induire l'activité transcriptionnelle de HIF-1 dans des conditions hypoxiques, mais l'AMPK seule n'est pas suffisante pour stimuler l'activité transcriptionnelle de HIF-1 (70; 71). D'autres études montrent au contraire que l'AMPK n'est pas requis pour l'activation de HIF-1 en hypoxie (329). De plus, la perte de l'AMPK induit une augmentation de la stabilisation de HIF-1 α (73). L'AMPK est activée dans des cellules lors d'une diminution du niveau d'oxygène indépendamment de l'activité de HIF-1 (74).

CONTRIBUTION DES REPONSES TISSUS-SPECIFIQUES A L'HI

L'activation spécifique de l'AMPK musculaire en réponse à l'HI ainsi que l'expression de gènes inversement régulés entre le foie et le tissu adipeux apportent une nouvelle preuve de la spécificité de la réponse à l'HI entre les différents tissus métaboliques. Cette différence est majeure et l'étude approfondie de chaque tissu est cruciale afin de permettre de mieux connaître les mécanismes d'action spécifique induits par l'HI et leurs impacts au niveau systémique. Ceci est d'ailleurs mis en lumière par l'étude des souris déficientes pour la PHD1 caractérisées par une atteinte métabolique plutôt hépatique, suggérant des altérations plus ou moins importante de l'activation de la voie de réponse à l'hypoxie selon les tissus.

PERSPECTIVES A COURT ET MOYEN TERMES

Parmi les perspectives majeures à envisager, la première est de confirmer l'implication de l'activation de l'AMPK dans l'amélioration de la tolérance au glucose induite par l'HI. Pour cela, l'étude des effets de l'HI sur la tolérance au glucose chez des souris spécifiquement déficientes pour la sous-unité $\alpha 2$ de l'AMPK dans le muscle squelettique sera d'une importance capitale, nous permettant de confirmer ou d'invalider cette hypothèse. De plus,

notre étude a pour l'instant étudié l'impact de l'HI sur certaines voies de signalisation impliquées dans la résistance à l'insuline, mais les mécanismes moléculaires responsables de ces altérations n'ont, à l'heure actuelle, pas encore été élucidés. L'étude d'autres mécanismes potentiellement impliqués dans la régulation de la sensibilité à l'insuline, comme par exemple le stress du réticulum endoplasmique, est nécessaire.

Dans notre modèle de souris PHD1^{-/-}, la perte de la PHD1 induisait une compensation par les autres PHDs. Par conséquent, les effets délétères sur l'homéostasie métabolique dans notre modèle pourraient être la conséquence des changements dans la composition ou l'activité des isoformes de PHD dans les différents tissus métaboliques. Des études complémentaires utilisant des délétions de PHD1 inductibles et spécifique à un tissu seront nécessaires pour évaluer la contribution respective de chaque organe impliqués dans la régulation de l'homéostasie métabolique.

HYPOXIE INTERMITTENT ET SAOS

De nombreuses études se sont intéressées aux troubles métaboliques dans le SAOS, mais les effets restent encore discutés car il est difficile de dissocier les effets du SAOS *per se* de ceux induits par l'obésité qui est présente chez la majorité des patients apnéiques (330). Cela suggère que l'obésité joue un rôle essentiel et éventuellement interagit avec les mécanismes liés directement à l'HI. Ainsi le bénéfice d'une perte de poids, associée ou non à de la PPC, apparaît clairement chez les patients apnéiques, alors que la PPC seule ne permet pas toujours d'abolir les altérations métaboliques chez ces patients (330). Cela implique que le traitement des apnées soit combiné au traitement de l'obésité et des co-morbidités. Notre modèle d'HI reproduit une pathologie très sévère qui concerne moins de 10% de la population apnéique (331). De plus, on étudie les conséquences de la composante hypoxique sans tenir compte des autres conséquences de l'HI telle que la fragmentation du sommeil. Or, de nombreuses études chez l'homme ou l'animal ont bien décrit les effets néfastes d'une fragmentation du sommeil sur les paramètres métaboliques (77; 78). Aussi, on peut envisager, que dans le SAOS, les conséquences métaboliques sont également induites par cette composante. Il sera nécessaire dans les expérimentations à venir d'étudier

un groupe d'animaux spécifiquement exposés à une fragmentation de sommeil pour séparer les mécanismes moléculaire et étudier la combinaison d'une HI et d'une fragmentation de sommeil. La principale piste thérapeutique envisagée par ce travail, serait la modulation du facteur de transcription HIF-1. Cependant, nos résultats ne nous permettent pas encore de statuer sur les effets délétères ou bénéfiques de l'activation de HIF-1 dans notre modèle puisqu'il semble intervenir à la fois dans la diminution de sensibilité à l'insuline mise en évidence en HI et chez les animaux déficients pour la PHD1, mais pourrait aussi intervenir dans l'amélioration de la tolérance au glucose par l'activation de la glycolyse hépatique. Nous confirmons par l'analyse transcriptomique, des conséquences organe-spécifiques de l'HI. Ceci peut conduire à différentes combinaisons de co-morbidités chez les patients. Ces résultats ouvrent la voie au développement de nouveaux biomarqueurs pour le phénotypage au diagnostic et permettant d'orienter les patients vers des interventions spécifiques (médecine personnalisée). Certains de ces biomarqueurs pourraient être utilisés pour apprécier au niveau moléculaire la réponse aux différents traitements (médecine de précision du SAOS).

LISTE DES PUBLICATIONS

Thomas A, Rey M, Aubry L, et Pelosi L. A hybrid model to study pathological mutations of the human ADP/ATP carriers. *Biochimie* (2011).

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

Coomans CP, Geerling JJ, van den Berg SAA, van Diepen HC, Garcia-Tardón N, **Thomas A**, Schröder-van der Elst JP, Ouwens DM, Pijl H, Rensen PCN, Havekes LM, Guigas B and Romijn JA. The insulin sensitizing effect of topiramate involves KATP channel activation in the central nervous system. *British Journal of Pharmacology* (2013).

Briançon-Marjollet A, Weiszenstein M, Henri M, **Thomas A**, Godin-ribuot D, Polak J. The Impact of Sleep Disorders on Glucose Metabolism: Endocrine and Molecular Mechanisms. *Diabetology and Metabolic Syndrome* (2015).

Belaïdi E, **Thomas A**, Bourdier G, Lévy P, Pepin JL, Godin-Ribuot D, Arnaud C. 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. *International Journal of Cardiology* (*International Journal of Cardiology, under review*).

Thomas A, Belaïdi E, Van der Zon G, Pepin JL, Levy P, Guigas B. Chronic intermittent hypoxia improves whole-body glucose tolerance by activating skeletal muscle AMP-activated protein kinase in mice, *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*.

Thomas A, Belaïdi E, Aron-Wisnewsky J, Van der Zon G, Godin-Ribuot Diane, Clément K, Levy P, Pepin JL, , Guigas B. Prolyl-4-hydroxylase 1 (PHD1) deficiency impairs whole-body glucose tolerance and insulin sensitivity in mice but does not worsen high-fat diet-induced metabolic dysfunctions (*Scientific Reports under review*).

Aron-wisnewsky J, Gras E, **Thomas A**, Pelloux V, Godin-Ribuot D, Clement K, Pepin JL. Specific transcriptomic signature in response to intermittent hypoxia exposure in liver and fat tissue (*International of obesity, under review*).

BIBLIOGRAPHIE

1. Young T, Peppard PE, Gottlieb DJ: Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *Am J Respir Crit Care Med* 165:1217-1239, 2002
2. Somers VK, White DP, Amin R, Abraham WT, Costa F, Culebras A, Daniels S, Floras JS, Hunt CE, Olson LJ, Pickering TG, Russell R, Woo M, Young T: Sleep apnea and cardiovascular disease: an American Heart Association/American College Of Cardiology Foundation Scientific Statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on Clinical Cardiology, Stroke Council, and Council On Cardiovascular Nursing. In collaboration with the National Heart, Lung, and Blood Institute National Center on Sleep Disorders Research (National Institutes of Health). *Circulation* 118:1080-1111, 2008
3. Tamisier R, Pepin JL, Remy J, Baguet JP, Taylor JA, Weiss JW, Levy P: 14 nights of intermittent hypoxia elevate daytime blood pressure and sympathetic activity in healthy humans. *Eur Respir J* 37:119-128, 2011
4. Buchner S, Satz A, Debl K, Hetzenecker A, Luchner A, Husser O, Hamer OW, Poschenrieder F, Fellner C, Zeman F, Riegger GA, Pfeifer M, Arzt M: Impact of sleep-disordered breathing on myocardial salvage and infarct size in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 35:192-199, 2014
5. Mesarwi OA, Shin MK, Drager LF, Bevans-Fonti S, Jun JC, Putcha N, Torbenson MS, Pedrosa RP, Lorenzi-Filho G, Steele KE, Schweitzer MA, Magnuson TH, Lidor AO, Schwartz AR, Polotsky VY: Lysyl Oxidase as a Serum Biomarker of Liver Fibrosis in Patients with Severe Obesity and Obstructive Sleep Apnea. *Sleep* 38:1583-1591, 2015
6. Dematteis M, Godin-Ribuot D, Arnaud C, Ribuot C, Stanke-Labesque F, Pepin JL, Levy P: Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding the human disease. *Ilar J* 50:262-281, 2009
7. Thompson SR, Ackermann U, Horner RL: Sleep as a teaching tool for integrating respiratory physiology and motor control. *Adv Physiol Educ* 25:101-116, 2001
8. Peppard PE, Young T, Barnet JH, Palta M, Hagen EW, Hla KM: Increased prevalence of sleep-disordered breathing in adults. *Am J Epidemiol* 177:1006-1014
9. Kapur VK: Obstructive sleep apnea: diagnosis, epidemiology, and economics. *Respir Care* 55:1155-1167
10. Malhotra A, Huang Y, Fogel R, Lazic S, Pillar G, Jakab M, Kikinis R, White DP: Aging influences on pharyngeal anatomy and physiology: the predisposition to pharyngeal collapse. *Am J Med* 119:72 e79-14, 2006
11. Resta O, Foschino-Barbaro MP, Legari G, Talamo S, Bonfitto P, Palumbo A, Minenna A, Giorgino R, De Pergola G: Sleep-related breathing disorders, loud snoring and excessive daytime sleepiness in obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25:669-675, 2001
12. Drager LF, Lopes HF, Maki-Nunes C, Trombetta IC, Toschi-Dias E, Alves MJ, Fraga RF, Jun JC, Negrao CE, Krieger EM, Polotsky VY, Lorenzi-Filho G: The impact of obstructive sleep apnea on metabolic and inflammatory markers in consecutive patients with metabolic syndrome. *PLoS One* 5:e12065
13. Kapur V, Strohl KP, Redline S, Iber C, O'Connor G, Nieto J: Underdiagnosis of sleep apnea syndrome in U.S. communities. *Sleep Breath* 6:49-54, 2002
14. McNicholas WT, Bonsignore MR: Sleep apnoea as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence, basic mechanisms and research priorities. *Eur Respir J* 29:156-178, 2007
15. 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* 365:1046-1053, 2005

16. Young T, Finn L, Peppard PE, Szklo-Coxe M, Austin D, Nieto FJ, Stubbs R, Hla KM: Sleep disordered breathing and mortality: eighteen-year follow-up of the Wisconsin sleep cohort. *Sleep* 31:1071-1078, 2008
17. Schulz R: The vascular micromilieu in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 25:780-782, 2005
18. Ciccone MM, Scicchitano P, Mitacchione G, Zito A, Gesualdo M, Caputo P, Damiani MF, Sassara M, Favale S, Resta O, Carratu P: Is there a correlation between OSAS duration/severity and carotid intima-media thickness? *Respir Med* 106:740-746, 2012
19. Kato M, Roberts-Thomson P, Phillips BG, Haynes WG, Winnicki M, Accurso V, Somers VK: Impairment of endothelium-dependent vasodilation of resistance vessels in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation* 102:2607-2610, 2000
20. Ip MS, Tse HF, Lam B, Tsang KW, Lam WK: Endothelial function in obstructive sleep apnea and response to treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 169:348-353, 2004
21. Nieto FJ, Herrington DM, Redline S, Benjamin EJ, Robbins JA: Sleep apnea and markers of vascular endothelial function in a large community sample of older adults. *Am J Respir Crit Care Med* 169:354-360, 2004
22. Monneret D, Tamisier R, Ducros V, Garrel C, Levy P, Baguet JP, Faure P, Pepin JL: The impact of obstructive sleep apnea on homocysteine and carotid remodeling in metabolic syndrome. *Respir Physiol Neurobiol* 180:298-304
23. Ciccone MM, Scicchitano P, Zito A, Cortese F, Boninfante B, Falcone VA, Quaranta VN, Ventura VA, Zucano A, Di Serio F, Damiani MF, Resta O: Correlation between inflammatory markers of atherosclerosis and carotid intima-media thickness in Obstructive Sleep Apnea. *Molecules* 19:1651-1662
24. Zamarron-Sanz C, Ricoy-Galbaldon J, Gude-Sampedro F, Riveiro-Riveiro A: Plasma levels of vascular endothelial markers in obstructive sleep apnea. *Arch Med Res* 37:552-555, 2006
25. Friedlander AH, Yueh R, Littner MR: The prevalence of calcified carotid artery atheromas in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *J Oral Maxillofac Surg* 56:950-954, 1998
26. Drager LF, Yao Q, Hernandez KL, Shin MK, Bevans-Fonti S, Gay J, Sussan TE, Jun JC, Myers AC, Olivecrona G, Schwartz AR, Halberg N, Scherer PE, Semenza GL, Powell DR, Polotsky VY: Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis via activation of adipose angiopoietin-like 4. *Am J Respir Crit Care Med* 188:240-248
27. O'Neill S, O'Driscoll L: Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obes Rev* 16:1-12
28. Bonsignore MR, Borel AL, Machan E, Grunstein R: Sleep apnoea and metabolic dysfunction. *Eur Respir Rev* 22:353-364
29. Peppard PE, Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J: Longitudinal study of moderate weight change and sleep-disordered breathing. *Jama* 284:3015-3021, 2000
30. Vgontzas AN, Tan TL, Bixler EO, Martin LF, Shubert D, Kales A: Sleep apnea and sleep disruption in obese patients. *Arch Intern Med* 154:1705-1711, 1994
31. Lopez PP, Stefan B, Schulman CI, Byers PM: Prevalence of sleep apnea in morbidly obese patients who presented for weight loss surgery evaluation: more evidence for routine screening for obstructive sleep apnea before weight loss surgery. *Am Surg* 74:834-838, 2008
32. Schwartz AR, Patil SP, Squier S, Schneider H, Kirkness JP, Smith PL: Obesity and upper airway control during sleep. *J Appl Physiol (1985)* 108:430-435
33. Steier J, Lunt A, Hart N, Polkey MI, Moxham J: Observational study of the effect of obesity on lung volumes. *Thorax* 69:752-759
34. Munzberg H, Morrison CD: Structure, production and signaling of leptin. *Metabolism* 64:13-23
35. Atwood CW: Sleep-related hypoventilation: the evolving role of leptin. *Chest* 128:1079-1081, 2005

36. Campo A, Fruhbeck G, Zulueta JJ, Iriarte J, Seijo LM, Alcaide AB, Galdiz JB, Salvador J: Hyperleptinaemia, respiratory drive and hypercapnic response in obese patients. *Eur Respir J* 30:223-231, 2007
37. Chen X, Niu X, Xiao Y, Dong J, Lu M, Kong W: Effect of continuous positive airway pressure on leptin levels in patients with obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 152:610-618
38. Phillips BG, Kato M, Narkiewicz K, Choe I, Somers VK: Increases in leptin levels, sympathetic drive, and weight gain in obstructive sleep apnea. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:H234-237, 2000
39. Ong CW, O'Driscoll DM, Truby H, Naughton MT, Hamilton GS: The reciprocal interaction between obesity and obstructive sleep apnoea. *Sleep Med Rev* 17:123-131
40. Ryan S, Crinion SJ, McNicholas WT: Obesity and sleep-disordered breathing--when two 'bad guys' meet. *Qjm* 107:949-954
41. Phillips BG, Hisel TM, Kato M, Pesek CA, Dyken ME, Narkiewicz K, Somers VK: Recent weight gain in patients with newly diagnosed obstructive sleep apnea. *J Hypertens* 17:1297-1300, 1999
42. O'Driscoll DM, Turton AR, Copland JM, Strauss BJ, Hamilton GS: Energy expenditure in obstructive sleep apnea: validation of a multiple physiological sensor for determination of sleep and wake. *Sleep Breath* 17:139-146
43. Fredheim JM, Rollheim J, Omland T, Hofso D, Roislien J, Vegsgaard K, Hjelmessaeth J: Type 2 diabetes and pre-diabetes are associated with obstructive sleep apnea in extremely obese subjects: a cross-sectional study. *Cardiovasc Diabetol* 10:84
44. Meslier N, Gagnadoux F, Giraud P, Person C, Oukel H, Urban T, Racineux JL: Impaired glucose-insulin metabolism in males with obstructive sleep apnoea syndrome. *Eur Respir J* 22:156-160, 2003
45. Reichmuth KJ, Austin D, Skatrud JB, Young T: Association of sleep apnea and type II diabetes: a population-based study. *Am J Respir Crit Care Med* 172:1590-1595, 2005
46. Kent BD, Grote L, Ryan S, Pepin JL, Bonsignore MR, Tkacova R, Saaresranta T, Verbraecken J, Levy P, Hedner J, McNicholas WT: Diabetes mellitus prevalence and control in sleep-disordered breathing: the European Sleep Apnea Cohort (ESADA) study. *Chest* 146:982-990
47. Tamura A, Kawano Y, Watanabe T, Kadota J: Relationship between the severity of obstructive sleep apnea and impaired glucose metabolism in patients with obstructive sleep apnea. *Respir Med* 102:1412-1416, 2008
48. Botros N, Concato J, Mohsenin V, Selim B, Doctor K, Yaggi HK: Obstructive sleep apnea as a risk factor for type 2 diabetes. *Am J Med* 122:1122-1127, 2009
49. Marshall NS, Wong KK, Phillips CL, Liu PY, Knuiman MW, Grunstein RR: Is sleep apnea an independent risk factor for prevalent and incident diabetes in the Busselton Health Study? *J Clin Sleep Med* 5:15-20, 2009
50. Lindberg E, Theorell-Haglow J, Svensson M, Gislason T, Berne C, Janson C: Sleep apnea and glucose metabolism: a long-term follow-up in a community-based sample. *Chest* 142:935-942
51. Muraki I, Tanigawa T, Yamagishi K, Sakurai S, Ohira T, Imano H, Kitamura A, Kiyama M, Sato S, Shimamoto T, Konishi M, Iso H: Nocturnal intermittent hypoxia and the development of type 2 diabetes: the Circulatory Risk in Communities Study (CIRCS). *Diabetologia* 53:481-488
52. Aronsohn RS, Whitmore H, Van Cauter E, Tasali E: Impact of untreated obstructive sleep apnea on glucose control in type 2 diabetes. *Am J Respir Crit Care Med* 181:507-513
53. Pillai A, Warren G, Gunathilake W, Idris I: Effects of sleep apnea severity on glycemic control in patients with type 2 diabetes prior to continuous positive airway pressure treatment. *Diabetes Technol Ther* 13:945-949
54. Priou P, Le Vaillant M, Meslier N, Chollet S, Masson P, Humeau MP, Pigeanne T, Bizieux-Thaminy A, Goupil F, Gagnadoux F: Independent association between obstructive sleep apnea severity and glycated hemoglobin in adults without diabetes. *Diabetes Care* 35:1902-1906

55. Awad KM, Malhotra A, Barnet JH, Quan SF, Peppard PE: Exercise is associated with a reduced incidence of sleep-disordered breathing. *Am J Med* 125:485-490
56. Iftikhar IH, Kline CE, Youngstedt SD: Effects of exercise training on sleep apnea: a meta-analysis. *Lung* 192:175-184
57. Kline CE, Crowley EP, Ewing GB, Burch JB, Blair SN, Durstine JL, Davis JM, Youngstedt SD: The effect of exercise training on obstructive sleep apnea and sleep quality: a randomized controlled trial. *Sleep* 34:1631-1640
58. Norman JF, Von Essen SG, Fuchs RH, McElligott M: Exercise training effect on obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep Res Online* 3:121-129, 2000
59. Cowan DC, Livingston E: Obstructive sleep apnoea syndrome and weight loss: review. *Sleep Disord* 2012:163296
60. Araghi MH, Chen YF, Jagielski A, Choudhury S, Banerjee D, Hussain S, Thomas GN, Taheri S: Effectiveness of lifestyle interventions on obstructive sleep apnea (OSA): systematic review and meta-analysis. *Sleep* 36:1553-1562, 1562A-1562E
61. Johansson K, Hemmingsson E, Harlid R, Trolle Lagerros Y, Granath F, Rossner S, Neovius M: Longer term effects of very low energy diet on obstructive sleep apnoea in cohort derived from randomised controlled trial: prospective observational follow-up study. *Bmj* 342:d3017
62. Grunstein RR, Stenlof K, Hedner JA, Peltonen M, Karason K, Sjostrom L: Two year reduction in sleep apnea symptoms and associated diabetes incidence after weight loss in severe obesity. *Sleep* 30:703-710, 2007
63. Dixon JB, Schachter LM, O'Brien PE: Polysomnography before and after weight loss in obese patients with severe sleep apnea. *Int J Obes (Lond)* 29:1048-1054, 2005
64. Ivanhoe JR, Attanasio R: Sleep disorders and oral devices. *Dent Clin North Am* 45:733-758, 2001
65. Babu AR, Herdegen J, Fogelfeld L, Shott S, Mazzone T: Type 2 diabetes, glycemic control, and continuous positive airway pressure in obstructive sleep apnea. *Arch Intern Med* 165:447-452, 2005
66. Dawson A, Abel SL, Loving RT, Dailey G, Shadan FF, Cronin JW, Kripke DF, Kline LE: CPAP therapy of obstructive sleep apnea in type 2 diabetics improves glycemic control during sleep. *J Clin Sleep Med* 4:538-542, 2008
67. Harsch IA, Schahin SP, Radespiel-Troger M, Weintz O, Jahreiss H, Fuchs FS, Wiest GH, Hahn EG, Lohmann T, Konturek PC, Ficker JH: Continuous positive airway pressure treatment rapidly improves insulin sensitivity in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 169:156-162, 2004
68. Smurra M, Philip P, Taillard J, Guilleminault C, Bioulac B, Gin H: CPAP treatment does not affect glucose-insulin metabolism in sleep apneic patients. *Sleep Med* 2:207-213, 2001
69. Jullian-Desayes I, Joyeux-Faure M, Tamisier R, Launois S, Borel AL, Levy P, Pepin JL: Impact of obstructive sleep apnea treatment by continuous positive airway pressure on cardiometabolic biomarkers: A systematic review from sham CPAP randomized controlled trials. *Sleep Med Rev*
70. Cersosimo E, Triplitt C, Mandarino LJ, DeFronzo RA: Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. 2000
71. Hua Q: Insulin: a small protein with a long journey. *Protein Cell* 1:537-551, 2010
72. Aronoff S: Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. *Diabetes spectrum* 17:183-190, 2004
73. Bedinger DH, Adams SH: Metabolic, anabolic, and mitogenic insulin responses: A tissue-specific perspective for insulin receptor activators. *Mol Cell Endocrinol* 415:143-156, 2015
74. Zhang J, Liu F: Tissue-specific insulin signaling in the regulation of metabolism and aging. *IUBMB Life* 66:485-495, 2014
75. Du Y, Wei T: Inputs and outputs of insulin receptor. *Protein Cell* 5:203-213, 2014
76. Guo S: Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *J Endocrinol* 220:T1-T23, 2014

77. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR: Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6, 2014
78. Boller S, Joblin BA, Xu L, Item F, Trub T, Boschetti N, Spinass GA, Niessen M: From signal transduction to signal interpretation: an alternative model for the molecular function of insulin receptor substrates. *Arch Physiol Biochem* 118:148-155, 2012
79. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR: Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:85-96, 2006
80. Kido Y, Burks DJ, Withers D, Bruning JC, Kahn CR, White MF, Accili D: Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *J Clin Invest* 105:199-205, 2000
81. Tsuruzoe K, Emkey R, Kriauciunas KM, Ueki K, Kahn CR: Insulin receptor substrate 3 (IRS-3) and IRS-4 impair IRS-1- and IRS-2-mediated signaling. *Mol Cell Biol* 21:26-38, 2001
82. Beretta M, Bauer M, Hirsch E: PI3K signaling in the pathogenesis of obesity: The cause and the cure. *Adv Biol Regul* 58:1-15
83. Lietzke SE, Bose S, Cronin T, Klarlund J, Chawla A, Czech MP, Lambright DG: Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. *Mol Cell* 6:385-394, 2000
84. Destefano MA, Jacinto E: Regulation of insulin receptor substrate-1 by mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2). *Biochem Soc Trans* 41:896-901
85. Mackenzie RW, Elliott BT: Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes* 7:55-64
86. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM: Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307:1098-1101, 2005
87. Schultze SM, Jensen J, Hemmings BA, Tschopp O, Niessen M: Promiscuous affairs of PKB/AKT isoforms in metabolism. *Arch Physiol Biochem* 117:70-77, 2011
88. Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB, 3rd, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI, Birnbaum MJ: Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* 292:1728-1731, 2001
89. Hay N: Akt isoforms and glucose homeostasis - the leptin connection. *Trends Endocrinol Metab* 22:66-73, 2011
90. Harris TE, Lawrence JC, Jr.: TOR signaling. *Sci STKE* 2003:re15, 2003
91. Sano H, Kane S, Sano E, Miinea CP, Asara JM, Lane WS, Garner CW, Lienhard GE: Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J Biol Chem* 278:14599-14602, 2003
92. Lodhi IJ, Chiang SH, Chang L, Vollenweider D, Watson RT, Inoue M, Pessin JE, Saltiel AR: Gapex-5, a Rab31 guanine nucleotide exchange factor that regulates Glut4 trafficking in adipocytes. *Cell Metab* 5:59-72, 2007
93. Carnagarin R, Dharmarajan AM, Dass CR: Molecular aspects of glucose homeostasis in skeletal muscle - A focus on the molecular mechanisms of insulin resistance. *Mol Cell Endocrinol*
94. Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI, Magnuson MA, Kahn CR: Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell* 6:87-97, 2000
95. Pilkis SJ, Granner DK: Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol* 54:885-909, 1992
96. Sutherland C, O'Brien RM, Granner DK: New connections in the regulation of PEPCK gene expression by insulin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351:191-199, 1996
97. Wang Y, Inoue H, Ravnskjaer K, Viste K, Miller N, Liu Y, Hedrick S, Vera L, Montminy M: Targeted disruption of the CREB coactivator Crtc2 increases insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:3087-3092
98. Guo S, Rena G, Cichy S, He X, Cohen P, Unterman T: Phosphorylation of serine 256 by protein kinase B disrupts transactivation by FKHR and mediates effects of insulin on insulin-like growth

- factor-binding protein-1 promoter activity through a conserved insulin response sequence. *J Biol Chem* 274:17184-17192, 1999
99. Bergman RN: New concepts in extracellular signaling for insulin action: the single gateway hypothesis. *Recent Prog Horm Res* 52:359-385; discussion 385-357, 1997
100. Guo X: Glycolysis in the control of blood glucose homeostasis. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2:358-367, 2012
101. Raymondjean M, Vaulont S, Cognet M, Decaux JF, Puzenat N, Bergot MO, Kahn A: Positive and negative regulation of gene expression by insulin and glucagon: the model of L-type pyruvate kinase gene. *Biochimie* 73:41-45, 1991
102. Nospikel T, Iynedjian PB: Insulin signalling and regulation of glucokinase gene expression in cultured hepatocytes. *Eur J Biochem* 210:365-373, 1992
103. Iynedjian PB, Jotterand D, Nospikel T, Asfari M, Pilot PR: Transcriptional induction of glucokinase gene by insulin in cultured liver cells and its repression by the glucagon-cAMP system. *J Biol Chem* 264:21824-21829, 1989
104. Gregori C, Guillet-Deniau I, Girard J, Decaux JF, Pichard AL: Insulin regulation of glucokinase gene expression: evidence against a role for sterol regulatory element binding protein 1 in primary hepatocytes. *FEBS Lett* 580:410-414, 2006
105. Gosmain Y, Lefai E, Ryser S, Roques M, Vidal H: Sterol regulatory element-binding protein-1 mediates the effect of insulin on hexokinase II gene expression in human muscle cells. *Diabetes* 53:321-329, 2004
106. Cross DA, Alessi DR, Vandenheede JR, McDowell HE, Hundal HS, Cohen P: The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor 1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf. *Biochem J* 303 (Pt 1):21-26, 1994
107. Proud CG: Regulation of protein synthesis by insulin. *Biochem Soc Trans* 34:213-216, 2006
108. Wong RH, Sul HS: Insulin signaling in fatty acid and fat synthesis: a transcriptional perspective. *Curr Opin Pharmacol* 10:684-691, 2010
109. Yellaturu CR, Deng X, Cagen LM, Wilcox HG, Mansbach CM, 2nd, Siddiqi SA, Park EA, Raghov R, Elam MB: Insulin enhances post-translational processing of nascent SREBP-1c by promoting its phosphorylation and association with COPII vesicles. *J Biol Chem* 284:7518-7532, 2009
110. Penkov DN, Egorov AD, Mozgovaya MN, Tkachuk VA: Insulin resistance and adipogenesis: role of transcription and secreted factors. *Biochemistry (Mosc)* 78:8-18
111. Fruhbeck G, Mendez-Gimenez L, Fernandez-Formoso JA, Fernandez S, Rodriguez A: Regulation of adipocyte lipolysis. *Nutr Res Rev* 27:63-93, 2014
112. Carmen GY, Victor SM: Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cell Signal* 18:401-408, 2006
113. Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Duncan RE, Ahmadian M, Sul HS: Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293:G1-4, 2007
114. Capps KD, White MF: Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia* 55:2565-2582, 2012
115. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE: Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* 293:1673-1677, 2001
116. Mauvais-Jarvis F, Ueki K, Fruman DA, Hirshman MF, Sakamoto K, Goodyear LJ, Iannaccone M, Accili D, Cantley LC, Kahn CR: Reduced expression of the murine p85alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase improves insulin signaling and ameliorates diabetes. *J Clin Invest* 109:141-149, 2002

117. Ueki K, Fruman DA, Yballe CM, Fasshauer M, Klein J, Asano T, Cantley LC, Kahn CR: Positive and negative roles of p85 alpha and p85 beta regulatory subunits of phosphoinositide 3-kinase in insulin signaling. *J Biol Chem* 278:48453-48466, 2003
118. Dibble CC, Cantley LC: Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends Cell Biol* 25:545-555, 2015
119. Keane KN, Cruzat VF, Carlessi R, de Bittencourt PI, Jr., Newsholme P: Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and beta-Cell Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev* 2015:181643, 2015
120. Viollet B, Andreelli F: AMP-activated protein kinase and metabolic control. *Handb Exp Pharmacol*:303-330, 2011
121. Hardie DG: AMPK: positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis. *Curr Opin Cell Biol* 33:1-7, 2015
122. Novikova DS, Garabadzhiu AV, Melino G, Barlev NA, Tribulovich VG: AMP-activated protein kinase: structure, function, and role in pathological processes. *Biochemistry (Mosc)* 80:127-144, 2015
123. Wang S, Song P, Zou MH: AMP-activated protein kinase, stress responses and cardiovascular diseases. *Clin Sci (Lond)* 122:555-573, 2012
124. Lee HJ, Lee JO, Kim N, Kim JK, Kim HI, Lee YW, Kim SJ, Choi JI, Oh Y, Kim JH, Suyeon H, Park SH, Kim HS: Irisin, a Novel Myokine, Regulates Glucose Uptake in Skeletal Muscle Cells via AMPK. *Mol Endocrinol* 29:873-881, 2015
125. Pirkmajer S, Kulkarni SS, Tom RZ, Ross FA, Hawley SA, Hardie DG, Zierath JR, Chibalin AV: Methotrexate promotes glucose uptake and lipid oxidation in skeletal muscle via AMPK activation. *Diabetes* 64:360-369, 2015
126. Ha J, Guan KL, Kim J: AMPK and autophagy in glucose/glycogen metabolism. *Mol Aspects Med*, 2015
127. Koistinen HA, Galuska D, Chibalin AV, Yang J, Zierath JR, Holman GD, Wallberg-Henriksson H: 5-amino-imidazole carboxamide riboside increases glucose transport and cell-surface GLUT4 content in skeletal muscle from subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* 52:1066-1072, 2003
128. Mu J, Brozinick JT, Jr., Valladares O, Bucan M, Birnbaum MJ: A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol Cell* 7:1085-1094, 2001
129. Fujii N, Hirshman MF, Kane EM, Ho RC, Peter LE, Seifert MM, Goodyear LJ: AMP-activated protein kinase alpha2 activity is not essential for contraction- and hyperosmolarity-induced glucose transport in skeletal muscle. *J Biol Chem* 280:39033-39041, 2005
130. Jorgensen SB, Viollet B, Andreelli F, Frosig C, Birk JB, Schjerling P, Vaulont S, Richter EA, Wojtaszewski JF: Knockout of the alpha2 but not alpha1 5'-AMP-activated protein kinase isoform abolishes 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside but not contraction-induced glucose uptake in skeletal muscle. *J Biol Chem* 279:1070-1079, 2004
131. Barnes BR, Marklund S, Steiler TL, Walter M, Hjalm G, Amarger V, Mahlapuu M, Leng Y, Johansson C, Galuska D, Lindgren K, Abrink M, Stapleton D, Zierath JR, Andersson L: The 5'-AMP-activated protein kinase gamma3 isoform has a key role in carbohydrate and lipid metabolism in glycolytic skeletal muscle. *J Biol Chem* 279:38441-38447, 2004
132. Steinberg GR, O'Neill HM, Dzamko NL, Galic S, Naim T, Koopman R, Jorgensen SB, Honeyman J, Hewitt K, Chen ZP, Schertzer JD, Scott JW, Koentgen F, Lynch GS, Watt MJ, van Denderen BJ, Campbell DJ, Kemp BE: Whole body deletion of AMP-activated protein kinase {beta}2 reduces muscle AMPK activity and exercise capacity. *J Biol Chem* 285:37198-37209, 2010
133. Sakamoto K, McCarthy A, Smith D, Green KA, Grahame Hardie D, Ashworth A, Alessi DR: Deficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction. *Embo J* 24:1810-1820, 2005

134. Treebak JT, Birk JB, Rose AJ, Kiens B, Richter EA, Wojtaszewski JF: AS160 phosphorylation is associated with activation of alpha2beta2gamma1- but not alpha2beta2gamma3-AMPK trimeric complex in skeletal muscle during exercise in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292:E715-722, 2007
135. Dreyer HC, Drummond MJ, Glynn EL, Fujita S, Chinkes DL, Volpi E, Rasmussen BB: Resistance exercise increases human skeletal muscle AS160/TBC1D4 phosphorylation in association with enhanced leg glucose uptake during postexercise recovery. *J Appl Physiol (1985)* 105:1967-1974, 2008
136. Treebak JT, Glund S, Deshmukh A, Klein DK, Long YC, Jensen TE, Jorgensen SB, Viollet B, Andersson L, Neumann D, Wallimann T, Richter EA, Chibalin AV, Zierath JR, Wojtaszewski JF: AMPK-mediated AS160 phosphorylation in skeletal muscle is dependent on AMPK catalytic and regulatory subunits. *Diabetes* 55:2051-2058, 2006
137. Yamaguchi S, Katahira H, Ozawa S, Nakamichi Y, Tanaka T, Shimoyama T, Takahashi K, Yoshimoto K, Imaizumi MO, Nagamatsu S, Ishida H: Activators of AMP-activated protein kinase enhance GLUT4 translocation and its glucose transport activity in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E643-649, 2005
138. Gaidhu MP, Perry RL, Noor F, Ceddia RB: Disruption of AMPKalpha1 signaling prevents AICAR-induced inhibition of AS160/TBC1D4 phosphorylation and glucose uptake in primary rat adipocytes. *Mol Endocrinol* 24:1434-1440, 2010
139. Marsin AS, Bertrand L, Rider MH, Deprez J, Beauloye C, Vincent MF, Van den Berghe G, Carling D, Hue L: Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr Biol* 10:1247-1255, 2000
140. Carling D, Hardie DG: The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase. *Biochim Biophys Acta* 1012:81-86, 1989
141. Wojtaszewski JF, Jorgensen SB, Hellsten Y, Hardie DG, Richter EA: Glycogen-dependent effects of 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA)-riboside on AMP-activated protein kinase and glycogen synthase activities in rat skeletal muscle. *Diabetes* 51:284-292, 2002
142. Jorgensen SB, Nielsen JN, Birk JB, Olsen GS, Viollet B, Andreelli F, Schjerling P, Vaulont S, Hardie DG, Hansen BF, Richter EA, Wojtaszewski JF: The alpha2-5'AMP-activated protein kinase is a site 2 glycogen synthase kinase in skeletal muscle and is responsive to glucose loading. *Diabetes* 53:3074-3081, 2004
143. Aschenbach WG, Hirshman MF, Fujii N, Sakamoto K, Howlett KF, Goodyear LJ: Effect of AICAR treatment on glycogen metabolism in skeletal muscle. *Diabetes* 51:567-573, 2002
144. Buhl ES, Jessen N, Schmitz O, Pedersen SB, Pedersen O, Holman GD, Lund S: Chronic treatment with 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside increases insulin-stimulated glucose uptake and GLUT4 translocation in rat skeletal muscles in a fiber type-specific manner. *Diabetes* 50:12-17, 2001
145. Hunter RW, Treebak JT, Wojtaszewski JF, Sakamoto K: Molecular mechanism by which AMP-activated protein kinase activation promotes glycogen accumulation in muscle. *Diabetes* 60:766-774, 2011
146. McBride A, Ghilagaber S, Nikolaev A, Hardie DG: The glycogen-binding domain on the AMPK beta subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor. *Cell Metab* 9:23-34, 2009
147. Foretz M, Ancellin N, Andreelli F, Saintillan Y, Grondin P, Kahn A, Thorens B, Vaulont S, Viollet B: Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver. *Diabetes* 54:1331-1339, 2005
148. Bergeron R, Previs SF, Cline GW, Perret P, Russell RR, 3rd, Young LH, Shulman GI: Effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside infusion on in vivo glucose and lipid metabolism in lean and obese Zucker rats. *Diabetes* 50:1076-1082, 2001

149. Koo SH, Flechner L, Qi L, Zhang X, Sreaton RA, Jeffries S, Hedrick S, Xu W, Boussouar F, Brindle P, Takemori H, Montminy M: The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature* 437:1109-1111, 2005
150. Hong YH, Varanasi US, Yang W, Leff T: AMP-activated protein kinase regulates HNF4 α transcriptional activity by inhibiting dimer formation and decreasing protein stability. *J Biol Chem* 278:27495-27501, 2003
151. Barthel A, Schmoll D, Kruger KD, Roth RA, Joost HG: Regulation of the forkhead transcription factor FKHR (FOXO1a) by glucose starvation and AICAR, an activator of AMP-activated protein kinase. *Endocrinology* 143:3183-3186, 2002
152. Foretz M, Hebrard S, Leclerc J, Zarrinpashneh E, Soty M, Mithieux G, Sakamoto K, Andreelli F, Viollet B: Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest* 120:2355-2369, 2010
153. Winder WW, Hardie DG: Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. *Am J Physiol* 270:E299-304, 1996
154. Winder WW, Wilson HA, Hardie DG, Rasmussen BB, Hutber CA, Call GB, Clayton RD, Conley LM, Yoon S, Zhou B: Phosphorylation of rat muscle acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase and protein kinase A. *J Appl Physiol (1985)* 82:219-225, 1997
155. Collier CA, Bruce CR, Smith AC, Lopaschuk G, Dyck DJ: Metformin counters the insulin-induced suppression of fatty acid oxidation and stimulation of triacylglycerol storage in rodent skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291:E182-189, 2006
156. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE: Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108:1167-1174, 2001
157. Ruderman N, Prentki M: AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome. *Nat Rev Drug Discov* 3:340-351, 2004
158. Assifi MM, Suchankova G, Constant S, Prentki M, Saha AK, Ruderman NB: AMP-activated protein kinase and coordination of hepatic fatty acid metabolism of starved/carbohydrate-refed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E794-800, 2005
159. Foretz M, Carling D, Guichard C, Ferre P, Foufelle F: AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 273:14767-14771, 1998
160. Kawaguchi T, Osatomi K, Yamashita H, Kabashima T, Uyeda K: Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 277:3829-3835, 2002
161. Woods A, Azzout-Marniche D, Foretz M, Stein SC, Lemarchand P, Ferre P, Foufelle F, Carling D: Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase. *Mol Cell Biol* 20:6704-6711, 2000
162. Henin N, Vincent MF, Gruber HE, Van den Berghe G: Inhibition of fatty acid and cholesterol synthesis by stimulation of AMP-activated protein kinase. *Faseb J* 9:541-546, 1995
163. Watt MJ, Steinberg GR, Chan S, Garnham A, Kemp BE, Febbraio MA: Beta-adrenergic stimulation of skeletal muscle HSL can be overridden by AMPK signaling. *Faseb J* 18:1445-1446, 2004
164. Daval M, Diot-Dupuy F, Bazin R, Hainault I, Viollet B, Vaulont S, Hajduch E, Ferre P, Foufelle F: Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes. *J Biol Chem* 280:25250-25257, 2005
165. Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL: Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev* 17:1829-1834, 2003
166. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ: AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30:214-226, 2008

167. Hardie DG: AMPK and Raptor: matching cell growth to energy supply. *Mol Cell* 30:263-265, 2008
168. Gautron L, Elmquist JK, Williams KW: Neural control of energy balance: translating circuits to therapies. *Cell* 161:133-145, 2015
169. Guan JL, Saotome T, Wang QP, Funahashi H, Hori T, Tanaka S, Shioda S: Orexinergic innervation of POMC-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neuroreport* 12:547-551, 2001
170. Morgan DA, McDaniel LN, Yin T, Khan M, Jiang J, Acevedo MR, Walsh SA, Ponto LL, Norris AW, Lutter M, Rahmouni K, Cui H: Regulation of glucose tolerance and sympathetic activity by MC4R signaling in the lateral hypothalamus. *Diabetes* 64:1976-1987, 2015
171. Ikeda H, Ardianto C, Yonemochi N, Yang L, Ohashi T, Ikegami M, Nagase H, Kamei J: Inhibition of Opioid Systems in the Hypothalamus as well as the Mesolimbic area Suppresses Feeding Behavior of Mice. *Neuroscience*, 2015
172. De Vadder F, Mithieux G: [Glucose homeostasis and gut-brain connection]. *Med Sci (Paris)* 31:168-173, 2015
173. Kim JD, Leyva S, Diano S: Hormonal regulation of the hypothalamic melanocortin system. *Front Physiol* 5:480, 2014
174. Schwartz MW, Porte D, Jr.: Diabetes, obesity, and the brain. *Science* 307:375-379, 2005
175. Lam TK, Gutierrez-Juarez R, Poci A, Rossetti L: Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism. *Science* 309:943-947, 2005
176. Parton LE, Ye CP, Coppari R, Enriori PJ, Choi B, Zhang CY, Xu C, Vianna CR, Balthasar N, Lee CE, Elmquist JK, Cowley MA, Lowell BB: Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature* 449:228-232, 2007
177. Kishore P, Boucai L, Zhang K, Li W, Koppaka S, Kehlenbrink S, Schiwiek A, Esterson YB, Mehta D, Bursheh S, Su Y, Gutierrez-Juarez R, Muzumdar R, Schwartz GJ, Hawkins M: Activation of K(ATP) channels suppresses glucose production in humans. *J Clin Invest* 121:4916-4920, 2011
178. Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Muller-Wieland D, Kahn CR: Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289:2122-2125, 2000
179. Obici S, Feng Z, Karkanias G, Baskin DG, Rossetti L: Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat Neurosci* 5:566-572, 2002
180. Spanswick D, Smith MA, Mirshamsi S, Routh VH, Ashford ML: Insulin activates ATP-sensitive K⁺ channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats. *Nat Neurosci* 3:757-758, 2000
181. Niswender KD, Morrison CD, Clegg DJ, Olson R, Baskin DG, Myers MG, Jr., Seeley RJ, Schwartz MW: Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. *Diabetes* 52:227-231, 2003
182. Hill JW, Xu Y, Preitner F, Fukuda M, Cho YR, Luo J, Balthasar N, Coppari R, Cantley LC, Kahn BB, Zhao JJ, Elmquist JK: Phosphatidylinositol 3-kinase signaling in hypothalamic proopiomelanocortin neurons contributes to the regulation of glucose homeostasis. *Endocrinology* 150:4874-4882, 2009
183. Guo S, Copps KD, Dong X, Park S, Cheng Z, Poci A, Rossetti L, Sajan M, Farese RV, White MF: The Irs1 branch of the insulin signaling cascade plays a dominant role in hepatic nutrient homeostasis. *Mol Cell Biol* 29:5070-5083, 2009
184. Inoue H: Central insulin-mediated regulation of hepatic glucose production [Review]. *Endocr J*, 2015
185. Poci A, Lam TK, Gutierrez-Juarez R, Obici S, Schwartz GJ, Bryan J, Aguilar-Bryan L, Rossetti L: Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. *Nature* 434:1026-1031, 2005
186. Inoue H, Ogawa W, Ozaki M, Haga S, Matsumoto M, Furukawa K, Hashimoto N, Kido Y, Mori T, Sakaue H, Teshigawara K, Jin S, Iguchi H, Hiramatsu R, LeRoith D, Takeda K, Akira S, Kasuga M: Role of STAT-3 in regulation of hepatic gluconeogenic genes and carbohydrate metabolism in vivo. *Nat Med* 10:168-174, 2004

187. Ramadoss P, Unger-Smith NE, Lam FS, Hollenberg AN: STAT3 targets the regulatory regions of gluconeogenic genes in vivo. *Mol Endocrinol* 23:827-837, 2009
188. Obici S, Feng Z, Morgan K, Stein D, Karkanas G, Rossetti L: Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes* 51:271-275, 2002
189. Ross R, Wang PY, Chari M, Lam CK, Caspi L, Ono H, Muse ED, Li X, Gutierrez-Juarez R, Light PE, Schwartz GJ, Rossetti L, Lam TK: Hypothalamic protein kinase C regulates glucose production. *Diabetes* 57:2061-2065, 2008
190. Coomans CP, Biermasz NR, Geerling JJ, Guigas B, Rensen PC, Havekes LM, Romijn JA: Stimulatory effect of insulin on glucose uptake by muscle involves the central nervous system in insulin-sensitive mice. *Diabetes* 60:3132-3140, 2011
191. Coomans CP, Geerling JJ, van den Berg SA, van Diepen HC, Garcia-Tardon N, Thomas A, Schroder-van der Elst JP, Ouwens DM, Pijl H, Rensen PC, Havekes LM, Guigas B, Romijn JA: The insulin sensitizing effect of topiramate involves KATP channel activation in the central nervous system. *Br J Pharmacol* 170:908-918, 2013
192. Scherer T, O'Hare J, Diggs-Andrews K, Schweiger M, Cheng B, Lindtner C, Zielinski E, Vempati P, Su K, Dighe S, Milsom T, Puchowicz M, Scheja L, Zechner R, Fisher SJ, Previs SF, Buettner C: Brain insulin controls adipose tissue lipolysis and lipogenesis. *Cell Metab* 13:183-194
193. Coomans CP, Geerling JJ, Guigas B, van den Hoek AM, Parlevliet ET, Ouwens DM, Pijl H, Voshol PJ, Rensen PC, Havekes LM, Romijn JA: Circulating insulin stimulates fatty acid retention in white adipose tissue via KATP channel activation in the central nervous system only in insulin-sensitive mice. *J Lipid Res* 52:1712-1722, 2011
194. Carey M, Kehlenbrink S, Hawkins M: Evidence for central regulation of glucose metabolism. *J Biol Chem* 288:34981-34988, 2013
195. Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AW, Wang Y, Banks AS, Lavery HJ, Haq AK, Maratos-Flier E, Neel BG, Schwartz MW, Myers MG, Jr.: STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature* 421:856-859, 2003
196. Buettner C, Poci A, Muse ED, Etgen AM, Myers MG, Jr., Rossetti L: Critical role of STAT3 in leptin's metabolic actions. *Cell Metab* 4:49-60, 2006
197. Gao S, Kinzig KP, Aja S, Scott KA, Keung W, Kelly S, Strynadka K, Chohan S, Smith WW, Tamashiro KL, Ladenheim EE, Ronnett GV, Tu Y, Birnbaum MJ, Lopaschuk GD, Moran TH: Leptin activates hypothalamic acetyl-CoA carboxylase to inhibit food intake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17358-17363, 2007
198. Morton GJ, Gelling RW, Niswender KD, Morrison CD, Rhodes CJ, Schwartz MW: Leptin regulates insulin sensitivity via phosphatidylinositol-3-OH kinase signaling in mediobasal hypothalamic neurons. *Cell Metab* 2:411-420, 2005
199. Cota D, Proulx K, Smith KA, Kozma SC, Thomas G, Woods SC, Seeley RJ: Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* 312:927-930, 2006
200. Pimentel GD, Ropelle ER, Rocha GZ, Carvalheira JB: The role of neuronal AMPK as a mediator of nutritional regulation of food intake and energy homeostasis. *Metabolism* 62:171-178, 2013
201. Morris DL, Rui L: Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297:E1247-1259, 2009
202. Blanco Martinez de Morentin P, Gonzalez CR, Saha AK, Martins L, Dieguez C, Vidal-Puig A, Tena-Sempere M, Lopez M: Hypothalamic AMP-activated protein kinase as a mediator of whole body energy balance. *Rev Endocr Metab Disord* 12:127-140, 2011
203. Fantino M: Role of lipids in the control of food intake. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 14:138-144, 2011
204. Yang CS, Lam CK, Chari M, Cheung GW, Kokorovic A, Gao S, Leclerc I, Rutter GA, Lam TK: Hypothalamic AMP-activated protein kinase regulates glucose production. *Diabetes* 59:2435-2443, 2010

205. Trayhurn P: Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiol Rev* 93:1-21, 2013
206. Pasarica M, Sereda OR, Redman LM, Albarado DC, Hymel DT, Roan LE, Rood JC, Burk DH, Smith SR: Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes* 58:718-725, 2009
207. Rausch ME, Weisberg S, Vardhana P, Tortoriello DV: Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *Int J Obes (Lond)* 32:451-463, 2008
208. Regazzetti C, Peraldi P, Gremeaux T, Najem-Lendom R, Ben-Sahra I, Cormont M, Bost F, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF, Giorgetti-Peraldi S: Hypoxia decreases insulin signaling pathways in adipocytes. *Diabetes* 58:95-103, 2009
209. Yin J, Gao Z, Liu D, Liu Z, Ye J: Berberine improves glucose metabolism through induction of glycolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:E148-156, 2008
210. Ye J, Gao Z, Yin J, He Q: Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E1118-1128, 2007
211. Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE: Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5680-5684, 1991
212. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, Garcia JG, Semenza GL: Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 105:659-669, 2005
213. Schofield CJ, Ratcliffe PJ: Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:343-354, 2004
214. Freeburg PB, Abrahamson DR: Divergent expression patterns for hypoxia-inducible factor-1beta and aryl hydrocarbon receptor nuclear transporter-2 in developing kidney. *J Am Soc Nephrol* 15:2569-2578, 2004
215. Rapisarda A, Uranchimeg B, Scudiero DA, Selby M, Sausville EA, Shoemaker RH, Melillo G: Identification of small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activation pathway. *Cancer Res* 62:4316-4324, 2002
216. Zhang N, Fu Z, Linke S, Chicher J, Gorman JJ, Visk D, Haddad GG, Poellinger L, Peet DJ, Powell F, Johnson RS: The asparaginyl hydroxylase factor inhibiting HIF-1alpha is an essential regulator of metabolism. *Cell Metab* 11:364-378, 2010
217. Krishnan J, Danzer C, Simka T, Ukropec J, Walter KM, Kumpf S, Mirtschink P, Ukropcova B, Gasperikova D, Pedrazzini T, Krek W: Dietary obesity-associated Hif1alpha activation in adipocytes restricts fatty acid oxidation and energy expenditure via suppression of the Sirt2-NAD+ system. *Genes Dev* 26:259-270, 2012
218. Lee KY, Gesta S, Boucher J, Wang XL, Kahn CR: The differential role of Hif1beta/Arnt and the hypoxic response in adipose function, fibrosis, and inflammation. *Cell Metab* 14:491-503, 2011
219. Sun K, Halberg N, Khan M, Magalang UJ, Scherer PE: Selective inhibition of hypoxia-inducible factor 1alpha ameliorates adipose tissue dysfunction. *Mol Cell Biol* 33:904-917, 2013
220. Shin MK, Drager LF, Yao Q, Bevans-Fonti S, Yoo DY, Jun JC, Aja S, Bhanot S, Polotsky VY: Metabolic consequences of high-fat diet are attenuated by suppression of HIF-1alpha. *PLoS One* 7:e46562, 2012
221. Ochiai D, Goda N, Hishiki T, Kanai M, Senoo-Matsuda N, Soga T, Johnson RS, Yoshimura Y, Suematsu M: Disruption of HIF-1alpha in hepatocytes impairs glucose metabolism in diet-induced obesity mice. *Biochem Biophys Res Commun* 415:445-449, 2011
222. Halberg N, Khan T, Trujillo ME, Wernstedt-Asterholm I, Attie AD, Sherwani S, Wang ZV, Landskroner-Eiger S, Dineen S, Magalang UJ, Brekken RA, Scherer PE: Hypoxia-inducible factor

- 1alpha induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. *Mol Cell Biol* 29:4467-4483, 2009
223. Lin Q, Huang Y, Booth CJ, Haase VH, Johnson RS, Celeste Simon M, Giordano FJ, Yun Z: Activation of hypoxia-inducible factor-2 in adipocytes results in pathological cardiac hypertrophy. *J Am Heart Assoc* 2:e000548, 2013
224. Matsuura H, Ichiki T, Inoue E, Nomura M, Miyazaki R, Hashimoto T, Ikeda J, Takayanagi R, Fong GH, Sunagawa K: Prolyl hydroxylase domain protein 2 plays a critical role in diet-induced obesity and glucose intolerance. *Circulation* 127:2078-2087, 2013
225. Reinke C, Bevans-Fonti S, Drager LF, Shin MK, Polotsky VY: Effects of different acute hypoxic regimens on tissue oxygen profiles and metabolic outcomes. *J Appl Physiol (1985)* 111:881-890, 2011
226. Belaidi E, Beguin PC, Levy P, Ribuot C, Godin-Ribuot D: Prevention of HIF-1 activation and iNOS gene targeting by low-dose cadmium results in loss of myocardial hypoxic preconditioning in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294:H901-908, 2008
227. Belaidi E, Joyeux-Faure M, Ribuot C, Launois SH, Levy P, Godin-Ribuot D: Major role for hypoxia inducible factor-1 and the endothelin system in promoting myocardial infarction and hypertension in an animal model of obstructive sleep apnea. *J Am Coll Cardiol* 53:1309-1317, 2009
228. Yuan G, Nanduri J, Khan S, Semenza GL, Prabhakar NR: Induction of HIF-1alpha expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca²⁺ signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR. *J Cell Physiol* 217:674-685, 2008
229. Yuan G, Nanduri J, Bhasker CR, Semenza GL, 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
230. Ristow M, Zarse K: How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Exp Gerontol* 45:410-418, 2010
231. Jun JC, Shin MK, Devera R, Yao Q, Mesarwi O, Bevans-Fonti S, Polotsky VY: Intermittent hypoxia-induced glucose intolerance is abolished by alpha-adrenergic blockade or adrenal medullectomy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 307:E1073-1083
232. Iiyori N, Alonso LC, Li J, Sanders MH, Garcia-Ocana A, O'Doherty RM, Polotsky VY, O'Donnell CP: Intermittent hypoxia causes insulin resistance in lean mice independent of autonomic activity. *Am J Respir Crit Care Med* 175:851-857, 2007
233. Rafacho A, Goncalves-Neto LM, Ferreira FB, Protzek AO, Boschero AC, Nunes EA, Zoccal DB: Glucose homeostasis in rats exposed to acute intermittent hypoxia. *Acta Physiol (Oxf)* 209:77-89
234. Lee EJ, Alonso LC, Stefanovski D, Strollo HC, Romano LC, Zou B, Singamsetty S, Yester KA, McGaffin KR, Garcia-Ocana A, O'Donnell CP: Time-dependent changes in glucose and insulin regulation during intermittent hypoxia and continuous hypoxia. *Eur J Appl Physiol* 113:467-478
235. Moreau JM, Ciriello J: Effects of acute intermittent hypoxia on energy balance and hypothalamic feeding pathways. *Neuroscience* 253:350-360
236. Polotsky VY, Li J, Punjabi NM, Rubin AE, Smith PL, Schwartz AR, O'Donnell CP: Intermittent hypoxia increases insulin resistance in genetically obese mice. *J Physiol* 552:253-264, 2003
237. Carreras A, Kayali F, Zhang J, Hirotsu C, Wang Y, Gozal D: Metabolic effects of intermittent hypoxia in mice: steady versus high-frequency applied hypoxia daily during the rest period. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 303:R700-709
238. Carreras A, Zhang SX, Almendros I, Wang Y, Peris E, Qiao Z, Gozal D: Resveratrol attenuates intermittent hypoxia-induced macrophage migration to visceral white adipose tissue and insulin resistance in male mice. *Endocrinology* 156:437-443
239. Chen L, Cao ZL, Han F, Gao ZC, He QY: Chronic intermittent hypoxia from pedo-stage decreases glucose transporter 4 expression in adipose tissue and causes insulin resistance. *Chin Med J (Engl)* 123:463-470

240. Fenik VB, Singletary T, Branconi JL, Davies RO, Kubin L: Glucoregulatory consequences and cardiorespiratory parameters in rats exposed to chronic-intermittent hypoxia: effects of the duration of exposure and losartan. *Front Neurol* 3:51, 2012
241. Li J, Thorne LN, Punjabi NM, Sun CK, Schwartz AR, Smith PL, Marino RL, Rodriguez A, Hubbard WC, O'Donnell CP, Polotsky VY: Intermittent hypoxia induces hyperlipidemia in lean mice. *Circ Res* 97:698-706, 2005
242. Wang Q, Sun X, Li X, Dong X, Li P, Zhao L: Resveratrol attenuates intermittent hypoxia-induced insulin resistance in rats: involvement of Sirtuin 1 and the phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase/AKT pathway. *Mol Med Rep* 11:151-158
243. Drager LF, Li J, Reinke C, Bevans-Fonti S, Jun JC, Polotsky VY: Intermittent hypoxia exacerbates metabolic effects of diet-induced obesity. *Obesity (Silver Spring)* 19:2167-2174, 2011
244. Fu C, Jiang L, Zhu F, Liu Z, Li W, Jiang H, Ye H, Kushida CA, Li S: Chronic intermittent hypoxia leads to insulin resistance and impaired glucose tolerance through dysregulation of adipokines in non-obese rats. *Sleep Breath*
245. He Q, Yang QC, Zhou Q, Zhu H, Niu WY, Feng J, Wang Y, Cao J, Chen BY: Effects of varying degrees of intermittent hypoxia on proinflammatory cytokines and adipokines in rats and 3T3-L1 adipocytes. *PLoS One* 9:e86326
246. Li J, Bosch-Marce M, Nanayakkara A, Savransky V, Fried SK, Semenza GL, Polotsky VY: Altered metabolic responses to intermittent hypoxia in mice with partial deficiency of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Physiol Genomics* 25:450-457, 2006
247. Olea E, Agapito MT, Gallego-Martin T, Rocher A, Gomez-Nino A, Obeso A, Gonzalez C, Yubero S: Intermittent hypoxia and diet-induced obesity: effects on oxidative status, sympathetic tone, plasma glucose and insulin levels, and arterial pressure. *J Appl Physiol (1985)* 117:706-719
248. Polak J, Shimoda LA, Drager LF, Udem C, McHugh H, Polotsky VY, Punjabi NM: Intermittent hypoxia impairs glucose homeostasis in C57BL6/J mice: partial improvement with cessation of the exposure. *Sleep* 36:1483-1490; 1490A-1490B
249. Savransky V, Bevans S, Nanayakkara A, Li J, Smith PL, Torbenson MS, Polotsky VY: Chronic intermittent hypoxia causes hepatitis in a mouse model of diet-induced fatty liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293:G871-877, 2007
250. Savransky V, Nanayakkara A, Vivero A, Li J, Bevans S, Smith PL, Torbenson MS, Polotsky VY: Chronic intermittent hypoxia predisposes to liver injury. *Hepatology* 45:1007-1013, 2007
251. Sherwani SI, Aldana C, Usmani S, Adin C, Kotha S, Khan M, Eubank T, Scherer PE, Parinandi N, Magalang UJ: Intermittent hypoxia exacerbates pancreatic beta-cell dysfunction in a mouse model of diabetes mellitus. *Sleep* 36:1849-1858
252. Shin MK, Han W, Bevans-Fonti S, Jun JC, Punjabi NM, Polotsky VY: The effect of adrenal medullectomy on metabolic responses to chronic intermittent hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol* 203:60-67
253. Shin MK, Yao Q, Jun JC, Bevans-Fonti S, Yoo DY, Han W, Mesarwi O, Richardson R, Fu YY, Pasricha PJ, Schwartz AR, Shirahata M, Polotsky VY: Carotid body denervation prevents fasting hyperglycemia during chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol (1985)* 117:765-776
254. Pae EK, Kim G: Insulin production hampered by intermittent hypoxia via impaired zinc homeostasis. *PLoS One* 9:e90192
255. Poulain L, Thomas A, Rieusset J, Casteilla L, Levy P, Arnaud C, Dematteis M: Visceral white fat remodelling contributes to intermittent hypoxia-induced atherogenesis. *Eur Respir J* 43:513-522
256. Kemp BE, Mitchelhill KI, Stapleton D, Michell BJ, Chen ZP, Witters LA: Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase. *Trends Biochem Sci* 24:22-25, 1999
257. Huang H, Jiang X, Dong Y, Zhang X, Ding N, Liu J, Hutchinson SZ, Lu G, Zhang X: Adiponectin alleviates genioglossal mitochondrial dysfunction in rats exposed to intermittent hypoxia. *PLoS One* 9:e109284, 2014

258. Xie S, Deng Y, Pan YY, Wang ZH, Ren J, Guo XL, Yuan X, Shang J, Liu HG: Melatonin protects against chronic intermittent hypoxia-induced cardiac hypertrophy by modulating autophagy through the 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 464:975-981, 2015
259. Gharib SA, Khalyfa A, Abdelkarim A, Ramesh V, Buazza M, Kaushal N, Bhushan B, Gozal D: Intermittent hypoxia activates temporally coordinated transcriptional programs in visceral adipose tissue. *J Mol Med (Berl)* 90:435-445
260. Volgin DV, Kubin L: Chronic intermittent hypoxia alters hypothalamic transcription of genes involved in metabolic regulation. *Auton Neurosci* 126-127:93-99, 2006
261. Briancon-Marjollet A, Weiszenstein M, Henri M, Thomas A, Godin-Ribuot D, Polak J: The impact of sleep disorders on glucose metabolism: endocrine and molecular mechanisms. *Diabetol Metab Syndr* 7:25, 2014
262. Carlson JT, Hedner J, Elam M, Ejnell H, Sellgren J, Wallin BG: Augmented resting sympathetic activity in awake patients with obstructive sleep apnea. *Chest* 103:1763-1768, 1993
263. Somers VK, Dyken ME, Mark AL, Abboud FM: Sympathetic-nerve activity during sleep in normal subjects. *N Engl J Med* 328:303-307, 1993
264. Prabhakar NR, Kumar GK, Peng YJ: Sympatho-adrenal activation by chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol (1985)* 113:1304-1310, 2012
265. Barth E, Albuszies G, Baumgart K, Matejovic M, Wachter U, Vogt J, Radermacher P, Calzia E: Glucose metabolism and catecholamines. *Crit Care Med* 35:S508-518, 2007
266. Deibert DC, DeFronzo RA: Epinephrine-induced insulin resistance in man. *J Clin Invest* 65:717-721, 1980
267. Ribeiro MJ, Sacramento JF, Gonzalez C, Guarino MP, Monteiro EC, Conde SV: Carotid body denervation prevents the development of insulin resistance and hypertension induced by hypercaloric diets. *Diabetes* 62:2905-2916, 2013
268. Goodridge AG, Ball EG: Studies on the metabolism of adipose tissue. 18. In vitro effects of insulin, epinephrine and glucagon on lipolysis and glycolysis in pigeon adipose tissue. *Comp Biochem Physiol* 16:367-381, 1965
269. Bartness TJ, Shrestha YB, Vaughan CH, Schwartz GJ, Song CK: Sensory and sympathetic nervous system control of white adipose tissue lipolysis. *Mol Cell Endocrinol* 318:34-43, 2010
270. Louis M, Punjabi NM: Effects of acute intermittent hypoxia on glucose metabolism in awake healthy volunteers. *J Appl Physiol (1985)* 106:1538-1544, 2009
271. 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
272. Lavie L: Obstructive sleep apnoea syndrome--an oxidative stress disorder. *Sleep Med Rev* 7:35-51, 2003
273. Ramond A, Godin-Ribuot D, Ribuot C, Totoston P, Koritchneva I, Cachot S, Levy P, Joyeux-Faure M: Oxidative stress mediates cardiac infarction aggravation induced by intermittent hypoxia. *Fundam Clin Pharmacol* 27:252-261, 2013
274. Schulz R, Murzabekova G, Egemnazarov B, Kraut S, Eisele HJ, Dumitrascu R, Heitmann J, Seimetz M, Witzenrath M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Grimminger F, Seeger W, Weissmann N: Arterial hypertension in a murine model of sleep apnea: role of NADPH oxidase 2. *J Hypertens* 32:300-305, 2014
275. Jun JC, Shin MK, Yao Q, Bevans-Fonti S, Poole J, Drager LF, Polotsky VY: Acute hypoxia induces hypertriglyceridemia by decreasing plasma triglyceride clearance in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303:E377-388, 2008
276. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM: Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 52:1-8, 2003

277. Bruce CR, Carey AL, Hawley JA, Febbraio MA: Intramuscular heat shock protein 72 and heme oxygenase-1 mRNA are reduced in patients with type 2 diabetes: evidence that insulin resistance is associated with a disturbed antioxidant defense mechanism. *Diabetes* 52:2338-2345, 2003
278. Paolisso G, D'Amore A, Volpe C, Balbi V, Saccomanno F, Galzerano D, Giugliano D, Varricchio M, D'Onofrio F: Evidence for a relationship between oxidative stress and insulin action in non-insulin-dependent (type II) diabetic patients. *Metabolism* 43:1426-1429, 1994
279. Smith SR, Bai F, Charbonneau C, Janderova L, Argyropoulos G: A promoter genotype and oxidative stress potentially link resistin to human insulin resistance. *Diabetes* 52:1611-1618, 2003
280. Muthulakshmi S, Saravanan R: Protective effects of azelaic acid against high-fat diet-induced oxidative stress in liver, kidney and heart of C57BL/6J mice. *Mol Cell Biochem* 377:23-33
281. Alcala M, Sanchez-Vera I, Sevillano J, Herrero L, Serra D, Ramos MP, Viana M: Vitamin E reduces adipose tissue fibrosis, inflammation, and oxidative stress and improves metabolic profile in obesity. *Obesity (Silver Spring)* 23:1598-1606, 2015
282. Takada S, Kinugawa S, Matsushima S, Takemoto D, Furihata T, Mizushima W, Fukushima A, Yokota T, Ono Y, Shibata H, Okita K, Tsutsui H: Sesamin prevents decline in exercise capacity and impairment of skeletal muscle mitochondrial function in mice with high-fat diet-induced diabetes. *Exp Physiol*, 2015
283. Cohen P: Dissection of protein kinase cascades that mediate cellular response to cytokines and cellular stress. *Adv Pharmacol* 36:15-27, 1996
284. Evans JL, Maddux BA, Goldfine ID: The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid Redox Signal* 7:1040-1052, 2005
285. Ren D, Hu Y, Luo Y, Yang X: Selenium-containing polysaccharides from Ziyang green tea ameliorate high-fructose diet induced insulin resistance and hepatic oxidative stress in mice. *Food Funct* 6:3342-3350, 2015
286. Hirashima O, Kawano H, Motoyama T, Hirai N, Ohgushi M, Kugiyama K, Ogawa H, Yasue H: Improvement of endothelial function and insulin sensitivity with vitamin C in patients with coronary spastic angina: possible role of reactive oxygen species. *J Am Coll Cardiol* 35:1860-1866, 2000
287. Caballero B: Vitamin E improves the action of insulin. *Nutr Rev* 51:339-340, 1993
288. Fulghesu AM, Ciampelli M, Muzj G, Belosi C, Selvaggi L, Ayala GF, Lanzzone A: N-acetyl-cysteine treatment improves insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 77:1128-1135, 2002
289. May AM, Mehra R: Obstructive sleep apnea: role of intermittent hypoxia and inflammation. *Semin Respir Crit Care Med* 35:531-544, 2014
290. Unnikrishnan D, Jun J, Polotsky V: Inflammation in sleep apnea: an update. *Rev Endocr Metab Disord* 16:25-34, 2015
291. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR: Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117:175-184, 2007
292. Fujisaka S, Usui I, Bukhari A, Icutani M, Oya T, Kanatani Y, Tsuneyama K, Nagai Y, Takatsu K, Urakaze M, Kobayashi M, Tobe K: Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes* 58:2574-2582, 2009
293. Nguyen MN, Rajapakse JC: Prediction of Protein Secondary Structure with two-stage multi-class SVMs. *Int J Data Min Bioinform* 1:248-269, 2007
294. Poulain L, Richard V, Levy P, Dematteis M, Arnaud C: Toll-like receptor-4 mediated inflammation is involved in the cardiometabolic alterations induced by intermittent hypoxia. *Mediators Inflamm* 2015:620258, 2015
295. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Red Eagle A, Vats D, Morel CR, Goforth MH, Subramanian V, Mukundan L, Ferrante AW, Chawla A: Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* 7:496-507, 2008

296. Crespo J, Cayon A, Fernandez-Gil P, Hernandez-Guerra M, Mayorga M, Dominguez-Diez A, Fernandez-Escalante JC, Pons-Romero F: Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 34:1158-1163, 2001
297. Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, Desimone C, Song XY, Diehl AM: Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 37:343-350, 2003
298. Huang W, Metlakunta A, Dedousis N, Zhang P, Sipula I, Dube JJ, Scott DK, O'Doherty RM: Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Diabetes* 59:347-357, 2010
299. Kritikou I, Basta M, Vgontzas AN, Pejovic S, Liao D, Tsaoussoglou M, Bixler EO, Stefanakis Z, Chrousos GP: Sleep apnoea, sleepiness, inflammation and insulin resistance in middle-aged males and females. *Eur Respir J* 43:145-155, 2014
300. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT: Predictors of elevated nuclear factor-kappaB-dependent genes in obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 174:824-830, 2006
301. Bays H, Mandarino L, DeFronzo RA: Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *J Clin Endocrinol Metab* 89:463-478, 2004
302. Jun J, Reinke C, Bedja D, Berkowitz D, Bevans-Fonti S, Li J, Barouch LA, Gabrielson K, Polotsky VY: Effect of intermittent hypoxia on atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 209:381-386, 2010
303. Arnaud C, Poulain L, Levy P, Dematteis M: Inflammation contributes to the atherogenic role of intermittent hypoxia in apolipoprotein-E knock out mice. *Atherosclerosis* 219:425-431, 2011
304. Drager LF, Li J, Shin MK, Reinke C, Aggarwal NR, Jun JC, Bevans-Fonti S, Sztalryd C, O'Byrne SM, Kroupa O, Olivecrona G, Blaner WS, Polotsky VY: Intermittent hypoxia inhibits clearance of triglyceride-rich lipoproteins and inactivates adipose lipoprotein lipase in a mouse model of sleep apnoea. *Eur Heart J* 33:783-790, 2012
305. Kim JK, Fillmore JJ, Chen Y, Yu C, Moore IK, Pypaert M, Lutz EP, Kako Y, Velez-Carrasco W, Goldberg IJ, Breslow JL, Shulman GI: Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7522-7527, 2001
306. Wang H, Knaub LA, Jensen DR, Young Jung D, Hong EG, Ko HJ, Coates AM, Goldberg IJ, de la Houssaye BA, Janssen RC, McCurdy CE, Rahman SM, Soo Choi C, Shulman GI, Kim JK, Friedman JE, Eckel RH: Skeletal muscle-specific deletion of lipoprotein lipase enhances insulin signaling in skeletal muscle but causes insulin resistance in liver and other tissues. *Diabetes* 58:116-124, 2009
307. Goudriaan JR, Dahlmans VE, Teusink B, Ouwens DM, Febbraio M, Maassen JA, Romijn JA, Havekes LM, Voshol PJ: CD36 deficiency increases insulin sensitivity in muscle, but induces insulin resistance in the liver in mice. *J Lipid Res* 44:2270-2277, 2003
308. Kim JK, Gimeno RE, Higashimori T, Kim HJ, Choi H, Punreddy S, Mozell RL, Tan G, Stricker-Krongrad A, Hirsch DJ, Fillmore JJ, Liu ZX, Dong J, Cline G, Stahl A, Lodish HF, Shulman GI: Inactivation of fatty acid transport protein 1 prevents fat-induced insulin resistance in skeletal muscle. *J Clin Invest* 113:756-763, 2004
309. Sookoian S, Pirola CJ: Obstructive sleep apnea is associated with fatty liver and abnormal liver enzymes: a meta-analysis. *Obes Surg* 23:1815-1825
310. Minville C, Hilleret MN, Tamiel R, Aron-Wisniewsky J, Clement K, Trocme C, Borel JC, Levy P, Zarski JP, Pepin JL: Nonalcoholic fatty liver disease, nocturnal hypoxia, and endothelial function in patients with sleep apnea. *Chest* 145:525-533
311. Rosa DP, Martinez D, Picada JN, Semedo JG, Marroni NP: Hepatic oxidative stress in an animal model of sleep apnoea: effects of different duration of exposure. *Comp Hepatol* 10:1, 2011
312. Li J, Grigoryev DN, Ye SQ, Thorne L, Schwartz AR, Smith PL, O'Donnell CP, Polotsky VY: Chronic intermittent hypoxia upregulates genes of lipid biosynthesis in obese mice. *J Appl Physiol (1985)* 99:1643-1648, 2005

313. Messenger SA, Moreau JM, Ciriello J: Intermittent hypoxia and systemic leptin administration induces pSTAT3 and Fos/Fra-1 in the carotid body. *Brain Res* 1446:56-70, 2012
314. Kayser B, Verges S: Hypoxia, energy balance and obesity: from pathophysiological mechanisms to new treatment strategies. *Obes Rev* 14:579-592, 2013
315. Quintero P, Milagro FI, Campion J, Martinez JA: Impact of oxygen availability on body weight management. *Med Hypotheses* 74:901-907, 2010
316. Vrang N, Madsen AN, Tang-Christensen M, Hansen G, Larsen PJ: PYY(3-36) reduces food intake and body weight and improves insulin sensitivity in rodent models of diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291:R367-375, 2006
317. Bosello O, Armellini F, Zamboni M, Fitchet M: The benefits of modest weight loss in type II diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 21 Suppl 1:S10-13, 1997
318. Hotamisligil GS: Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444:860-867, 2006
319. Murphy A, Thomas A, Crinion S, Kent B, Tambuwala M, Fabre A, Roche H, McNicholas W, Pepin J, Taylor C, Arnaud C, Ryan S: **Intermittent Hypoxia in Obstructive Sleep Apnoea mediates Insulin Resistance through Adipose Tissue Inflammation.** unpublished
320. Belaidi E, Thomas A, Bourdier G, Moulin S, Levy P, Pépin J-L, Korichneva I, Godin-Ribuot D, Arnaud C: 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. *International Journal of Cardiology*, unpublished
321. Dela F, Helge JW: Insulin resistance and mitochondrial function in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 45:11-15
322. da Rosa DP, Forgiarini LF, Baronio D, Feijo CA, Martinez D, Marroni NP: Simulating sleep apnea by exposure to intermittent hypoxia induces inflammation in the lung and liver. *Mediators Inflamm* 2012:879419
323. Taniguchi CM, Finger EC, Krieg AJ, Wu C, Diep AN, LaGory EL, Wei K, McGinnis LM, Yuan J, Kuo CJ, Giaccia AJ: Cross-talk between hypoxia and insulin signaling through Phd3 regulates hepatic glucose and lipid metabolism and ameliorates diabetes. *Nat Med* 19:1325-1330
324. Verges S, Chacaroun S, Godin-Ribuot D, Baillieux S: Hypoxic Conditioning as a New Therapeutic Modality. *Front Pediatr* 3:58
325. Carrara MA, Batista MR, Saruhashi TR, Felisberto AM, Jr., Guilhermetti M, Bazotte RB: Coexistence of insulin resistance and increased glucose tolerance in pregnant rats: a physiological mechanism for glucose maintenance. *Life Sci* 90:831-837, 2012
326. Wang S, Song P, Zou MH: AMP-activated protein kinase, stress responses and cardiovascular diseases. *Clin Sci (Lond)* 122:555-573
327. Novikova DS, Garabadzhiu AV, Melino G, Barlev NA, Tribulovich VG: AMP-activated protein kinase: structure, function, and role in pathological processes. *Biochemistry (Mosc)* 80:127-144
328. Ito K, Suda T: Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:243-256, 2014
329. Emerling BM, Viollet B, Tormos KV, Chandel NS: Compound C inhibits hypoxic activation of HIF-1 independent of AMPK. *FEBS Lett* 581:5727-5731, 2007
330. Levy P, Pepin JL: Obesity: CPAP effects in sleep apnoea-what should be expected? *Nat Rev Endocrinol* 10:517-519, 2014
331. Ayappa I, Rapoport DM: The upper airway in sleep: physiology of the pharynx. *Sleep Med Rev* 7:9-33, 2003