



**HAL**  
open science

## Impact de l'hypoxie intermittente chronique sur la rétine et le nerf optique du rat : aspects vasculaire et inflammatoire.

Marielle Mentek

### ► To cite this version:

Marielle Mentek. Impact de l'hypoxie intermittente chronique sur la rétine et le nerf optique du rat : aspects vasculaire et inflammatoire.. Biologie animale. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAS032 . tel-01691679

**HAL Id: tel-01691679**

**<https://theses.hal.science/tel-01691679>**

Submitted on 24 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 : **Biotechnologie, Instrumentation, Signal**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Marielle MENTEK**

Thèse dirigée par **M. le Pr Christophe CHIQUET** et  
co-dirigée par **Mme le Pr Diane GODIN-RIBUOT**

préparée au sein du **Laboratoire Hypoxie PhysioPathologie (HP2) – INSERM U1042**  
dans l'École Doctorale **INGÉNIERIE POUR LA SANTÉ , LA COGNITION ET L'ENVIRONNEMENT (EDISCE)**

## Impact de l'hypoxie intermittente chronique sur la rétine et le nerf optique du rat : aspects inflammatoire et vasculaire

Thèse soutenue publiquement le **14 décembre 2015**,  
devant le jury composé de :

**M. le Professeur Michel PAQUES**

PU-PH, Université Paris IV Pierre et Marie Curie, Président du jury

**M. le Professeur Vincent RICHARD**

PU-PH, Université de Rouen, Rapporteur

**M. Rene WERKMEISTER**

Assistant Professeur, Medical University of Vienna, Examineur

**M. le Professeur Martial GEISER**

Professeur, Haute Ecole Spécialisée de Suisse Occidentale, Membre du jury invité

**M. le Professeur Christophe CHIQUET**

PU-PH, Université Grenoble Alpes, Directeur de thèse

**Mme le Professeur Diane GODIN-RIBUOT**

PU, Université Grenoble Alpes, Co-directrice de thèse



Je tiens à remercier très sincèrement :

Monsieur le Professeur **Michel Pâques**, de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse et d'examiner ce travail.

Monsieur le Professeur **Vincent Richard**, d'avoir accepté de juger ce manuscrit en qualité de rapporteur.

Monsieur **Rene Werkmeister**, d'avoir accepté de faire partie de ce jury en tant qu'examineur.

Je les remercie vivement pour leur regard éclairé et leurs commentaires constructifs, et leur adresse ma profonde considération.

Je remercie très sincèrement mon directeur de thèse, le Pr **Christophe Chiquet**, pour m'avoir encadré et montré le chemin pendant ces quatre années au laboratoire HP2. Merci pour votre disponibilité, vos conseils avisés, votre énergie et engagement dans ce projet. Merci pour la confiance que vous avez accordé au cours de ce travail. J'espère avoir l'honneur et la chance de pouvoir continuer à travailler avec vous dans le futur...

Je remercie ma co-directrice de thèse, **Diane Godin-Ribuot** de m'avoir accueillie dans son équipe et de m'avoir permis de travailler dans de bonnes conditions. Merci pour l'ensemble de tes précieux conseils.

Je remercie très sincèrement le **Pr Martial Geiser** et **Frederic Truffer** pour ces 4 années de travail en collaboration à distance, pour votre disponibilité et votre humanisme. Merci de m'avoir initiée aux lois passionnantes de l'optique et à la douceur du pays du Valais.

Je remercie très chaleureusement toutes les âmes qui m'ont cotoyée au sein du laboratoire HP2. Merci pour ces quatre années inoubliables.

Je remercie toutes les personnes que j'ai rencontrées au cours de ma thèse et au contact desquelles j'ai énormément appris et qui ont contribué (même sans le savoir) à l'aboutissement de ce travail.

Je remercie la **Fondation de France**, la fondation **Retina France** et la **fondation EGIDE** pour le soutien financier qui m'a permis de faire aboutir ces travaux de recherche.

A **Pierre-François**, pour ton soutien inconditionnel durant ces années, pour ton amour et tout ce que les mots ne suffisent à exprimer...

A **ma famille, mes amis**, présents jour après jour... Merci d'illuminer mon existence de votre joie et votre affection.

*« Je n'ai pas plus fait mon livre que mon livre m'a fait »*

*Montaigne, Les Essais*

## Table des matières

<b>LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX.....</b>	<b>6</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>10</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>13</b>
<b>Première partie : Etude des altérations vasculaires oculaires associées à l'hypoxie intermittente chronique.....</b>	<b>16</b>
<b>1 Introduction.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1 Hypothèses physiopathologiques reliant le SAOS aux atteintes de la rétine et du nerf optique.....</b>	<b>18</b>
1.1.1 Variation des facteurs hémodynamiques et métaboliques durant les apnées.....	19
1.1.2 Conséquences vasculaires biologiques et fonctionnelles.....	24
1.1.3 Effets délétères potentiels des modifications physiopathologiques du SAOS sur le nerf optique et la rétine.....	43
<b>1.2 Neuropathie optique ischémique antérieure aigue non artéritique (NOIAA-NA). 49</b>	<b>49</b>
1.2.1 Définition, épidémiologie et facteurs de risque.....	49
1.2.2 NOIAA-NA et syndrome d'apnées obstructives du sommeil : études épidémiologiques.....	50
1.2.3 NOIAA-NA et syndrome d'apnées obstructives du sommeil : aspects physiopathologiques.....	53
1.2.4 Traitements et effet de la PPC.....	53
<b>1.3 Glaucome primaire à angle ouvert.....</b>	<b>54</b>
1.3.1 Définition, épidémiologie et facteurs de risque.....	54
1.3.2 Glaucome et syndrome d'apnées obstructives du sommeil : études épidémiologiques.....	56
1.3.3 Glaucome et syndrome d'apnées obstructives du sommeil : aspects physiopathologiques.....	63
<b>1.4 Autres Neuropathies optiques.....</b>	<b>66</b>
1.4.1 Evaluation de l'épaisseur de la couche des fibres nerveuses rétiniennes chez le patient apnéique.....	66
1.4.2 HTIC et œdème papillaire.....	71
<b>1.5 Affections rétiniennes.....</b>	<b>72</b>
1.5.1 Rétinopathie diabétique.....	72
1.5.2 Occlusions veineuses rétiniennes.....	77
1.5.3 Chorioretinopathie séreuse centrale (CRSC).....	79
1.5.4 Altérations vasculaires rétiniennes chez les patients apnéique.....	80
<b>Conclusion.....</b>	<b>82</b>
<b>2 Objectifs de ce travail.....</b>	<b>83</b>
<b>3 Matériel et méthodes.....</b>	<b>85</b>
<b>3.1 Matériel biologique.....</b>	<b>86</b>
<b>3.2 Hypoxie intermittente chronique.....</b>	<b>86</b>
<b>3.3 Paramètres hémodynamiques.....</b>	<b>87</b>
3.3.1 Evolution du poids des animaux.....	87
3.3.2 Pression artérielle systémique.....	88
3.3.3 Hématocrite.....	88
<b>3.4 Technique de RT-qPCR.....</b>	<b>88</b>
<b>3.5 Quantification des cytokines pro-inflammatoires par technique de micro-ELISA (Bio-Plex®).....</b>	<b>90</b>
<b>3.6 Mesure des anions superoxyde par marquage au dihydroéthidium.....</b>	<b>91</b>
3.6.1 Cryosection des globes oculaires.....	91

3.6.2	Marquage au dihydroéthidium.....	91
<b>3.7</b>	<b>Analyse structurale de l'artère ophtalmique en microscopie optique et électronique.....</b>	<b>92</b>
3.7.1	Prélèvements tissulaires.....	92
3.7.2	Mesure morphométrique de l'artère ophtalmique.....	92
3.7.3	Analyse en microscopie électronique.....	93
<b>3.8</b>	<b>Techniques de marquage immuno-histologique.....</b>	<b>93</b>
<b>3.9</b>	<b>Technique de myographie vasculaire.....</b>	<b>94</b>
<b>3.10</b>	<b>Analyses statistiques.....</b>	<b>95</b>
<b>4</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>97</b>
4.1	Etude 1 : Effets de l'hypoxie intermittente sur la réactivité de l'artère ophtalmique du rat : rôle de l'endothéline 1, du stress oxydant et des facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium.....	98
4.2	Autres résultats.....	135
4.2.1	Recherche des marqueurs d'inflammation associés à l'HI dans le nerf optique et la rétine du rat.....	135
<b>5</b>	<b>Discussion et perspectives.....</b>	<b>137</b>
<b>6</b>	<b>Autres travaux menés en parallèle.....</b>	<b>145</b>
6.1	Evolution des gaz sanguins artériels du rat au cours des cycles d'hypoxie intermittente avec et sans CO <sub>2</sub> .....	146
<b>Deuxième partie : Développement d'un prototype de fluxmètre laser Doppler pour l'évaluation de la perfusion sanguine rétinienne et de la tête du nerf optique du rat soumis à l'hypoxie intermittente chronique.....</b>		
<b>7</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>153</b>
7.1	Principes physiques de la fluxmétrie laser Doppler.....	154
7.1.1	Interaction laser tissu.....	154
7.1.2	Analyse du signal.....	155
7.2	Vascularisation du nerf optique et de la rétine chez le rat.....	156
<b>8</b>	<b>Objectifs du travail.....</b>	<b>159</b>
<b>9</b>	<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>161</b>
9.1	Prototype de fluxmètre laser Doppler confocal.....	162
9.1.1	Description du système optique.....	162
9.1.2	Acquisition des données et description du logiciel.....	164
9.1.3	Système mécanique.....	164
9.2	Animaux.....	165
9.3	Evaluation de la linéarité des mesures LDF in vitro.....	166
9.4	Procédures de mesure de la perfusion sanguine oculaire in vivo chez le rat sain	167
9.4.1	Reproductibilité du repositionnement de la sonde LDF.....	167
9.4.2	Evaluation de la variabilité du signal en fonction de l'angle de focalisation.....	168
9.4.3	Comparaison du signal LDF des artères rétiniennes et de la choroïde.....	168
9.4.4	Répétabilité des mesures LDF in vivo.....	169
9.4.4	Evolution des paramètres LDF lors d'arrêt de la perfusion sanguine oculaire.....	169
9.4.5	Evaluation de la perfusion sanguine oculaire en réponse à des stimuli pharmacologiques.....	170
9.5	Evaluation de la perfusion sanguine oculaire en réponse à l'hyperoxie chez le rat soumis à l'HI.....	171
9.6	Analyses statistiques.....	172
<b>10</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>173</b>

<b>10.1 Etude 2 : Développement d'un prototype compact de fluxmétrie laser Doppler pour la mesure de la perfusion rétinienne chez le rongeur .....</b>	<b>174</b>
<b>10.2 Evolution du signal en fonction de l'angle de focalisation.....</b>	<b>189</b>
<b>10.3 Caractérisation et évolution des spectres du signal <math>Vel_{ART}</math>.....</b>	<b>191</b>
10.3.1 Evolution des spectres lors des variations d'angles d'incidence du laser .....	191
10.3.2 Comparaison des spectres $Vel_{ART}$ avec les spectres du signal choroidien.....	194
<b>10.4 Evolution de la perfusion rétinienne lors d'hyperoxie.....</b>	<b>197</b>
<b>10.5 Evolution de la perfusion rétinienne lors d'injection intra-carotidienne d'ET-1</b>	<b>198</b>
<b>10.6 Evaluation de la perfusion sanguine oculaire en réponse à l'hyperoxie chez le rat soumis à l'HI.....</b>	<b>202</b>
<b>11 Discussion et perspectives.....</b>	<b>205</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>217</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>220</b>

## LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

- Figure 1.** Evènements respiratoires et enregistrement polysomnographique observables lors des apnées.
- Figure 2.** Illustration schématique des mécanismes associés à l'altération des chémoréflexe et baroréflexe lors d'hypoxie intermittente conduisant à l'augmentation de la pression artérielle systémique.
- Figure 3.** Représentation schématique de la relaxation endothélium dépendante médiée par la voie NO/GMPc.
- Figure 4.** Représentation schématique des cinq principaux *endothelium-derived hyperpolarizing factors* (EDHF).
- Figure 5.** Représentation schématique de la régulation du tonus vasculaire par l'endothéline 1 (ET-1).
- Figure 6.** Représentation schématique de l'interférence réciproque entre les voies de HIF-1 et de NF- $\kappa$ B.
- Figure 7.** Représentation schématique des mécanismes induits par l'HI, et mis en cause dans le remodelage vasculaire et l'athérosclérose.
- Figure 8.** Représentation schématique des hypothèses physiopathologiques reliant le syndrome d'apnée obstructives du sommeil et les atteintes de l'arétine et du nerf optique.
- Figure 9.** Localisation des atteintes significatives de l'épaisseur de la couche des fibres nerveuses rétiniennes décrites dans la littérature.
- Figure 10.** Dispositif d'exposition à l'hypoxie intermittente.
- Figure 11.** Concentration (pg/ml) en cytokines TNF $\alpha$ , IL-4 et IL-10 dans le nerf optique et la rétine de rat soumis à 14 jours de normoxie (NX) ou d'hypoxie intermittente (HI).



- Figure 12.** Variation de la  $PCO_2$ ,  $PO_2$ ,  $SaO_2$  et du pH lors des cycles d'HI actuels (sans  $CO_2$ , cycles 30/30 sec) ou lors de cycles avec 5% de  $CO_2$  (cycles 30/30 sec +  $CO_2$  5%).
- Figure 13.** Tracés de l'évolution de la  $FiO_2$  (%) dans une cage au cours des cycles d'HI, avec le modèle actuel (30 sec/30 sec) et le modèle avec normoxie allongée (40 sec/20 sec).
- Figure 14.** Variation de la  $PCO_2$ ,  $PO_2$ ,  $SaO_2$  et du pH lors des cycles d'HI actuels (cycles 30/30 sec) ou lors de cycles avec 40 sec de phase normoxique (cycles 40/30 sec).
- Figure 15.** Représentation schématique de la diffusion d'un photon par une particule en mouvement (hématie).
- Figure 16.** Représentation schématique de la diffusion des photons dans un tissu vascularisé (A). Exemple de spectre de puissance pondérée par la fréquence de la lumière diffusée dans la tête du nerf optique (B).
- Figure 17.** Représentation schématique de la microvascularisation artérielle de la tête du nerf optique du rat.
- Figure 18.** Schéma de l'unité optique du prototype LDF.
- Figure 19.** Table stéréotaxique avec mobilisation du prototype LDF par un bras articulé.
- Figure 20.** Photo de la cellule de malassez prise avec la caméra CCD après focalisation de l'image sur un point à J1 (position J1) et après focalisation de l'image à J2 à partir des coordonnées enregistrées (position J2).
- Figure 21.** Image du fond d'œil précisant la localisation de la mesure artérielle rétinienne (ART) pour les 3 positions de sonde testées.
- Figure 22.** Evolution des spectres de puissance moyens des mesures de  $Vel_{ART}$  en fonction de la variation de l'angle d'incidence du laser, pour chaque animal.

- Figure 23.** Image du fond d'œil précisant la localisation de la mesure artérielle rétinienne (ART) et des mesures choroïdiennes (CHOR 1 et 2) chez un rat albinos (G1) et un rat pigmenté (E1).
- Figure 24.** Représentation graphique du spectre de puissance moyen pour la mesures de  $Vel_{ART}$  et une mesure de  $Vel_{CHOR}$  chez les rats albinos (n = 5) et chez les rats pigmentés (n = 5).
- Figure 25.** Image du fond d'œil enregistrée pendant la mesure de la vélocité artérielle rétinienne, au début de la mesure (T0, en air ambiant) et en fin d'hyperoxie (T180 sec, 100% O<sub>2</sub>).
- Figure 26.** Variation moyenne (+ SD) de la vélocité artérielle rétinienne lors d'inhalation d'oxygène pur (n = 8 rats) par rapport à la valeur de base (première minute de mesure).
- Figure 27.** Variation de la pression artérielle moyenne (PAM) après injection intra carotidienne de doses croissantes d'endothéline 1
- Figure 28.** Enregistrements de  $Vel_{ART}$  pendant l'injection intra carotidienne d'endothéline 1 à la dose de 150 (A), 200 (C et D) et 250 pmol (B).
- Figure 29.** Exemple de tracés de  $Vel_{ART}$  et du DC correspondant représentant les 3 cas de figure rencontrés.
- Figure 30.** Comparaison des spectres d'une artère rétinienne (rouge), de la choroïde (bleu) et de la tête du nerf optique (vert) d'un même rat après normalisation par l'intensité à 4000 Hz.
- Figure 31.** Représentation schématique des voies impliquées dans la vasoconstriction rétinienne en réponse à l'hyperoxie.
- Tableau 1.** Résumé des travaux ayant étudié l'association entre la NOIAA-NA et le SAOS
- Tableau 2.** Prévalence du GPAO chez les patients atteints de SAOS
- Tableau 3.** Prévalence du SAOS chez patients atteints de Glaucome

- Tableau 4.** Etude de la pression intraoculaire chez les patients apnéiques
- Tableau 5.** Etude de l'épaisseur de la couche des fibres optiques chez les patients SAOS
- Tableau 6.** Etudes épidémiologiques évaluant les relations entre SAOS et rétinopathie diabétique
- Tableau 7.** Tableau récapitulatif des amorces ADN utilisées pour l'amplification des gènes cibles par qPCR
- Tableau 8.** Paramètres mesurés en fluxmétrie laser Doppler
- Tableau 9.** Mesure de la vitesse artérielle rétinienne ( $Vel_{ART}$  en Herz) lors de variation de l'angle d'incidence du laser (moyenne)
- Tableau 10.** Mesure de la vitesse artérielle rétinienne ( $Vel_{ART}$ , en Herz) et choroïdienne ( $Vel_{CHOR}$ )
- Tableau 11.** Variation moyenne de la vitesse artérielle rétinienne à J0 (en %) lors d'inhalation d'oxygène pur (n = 8 rats) par rapport à la valeur de base (première minute de mesure)
- Tableau 12.** Comparaison des résultats obtenus lors de l'hyperoxie à J0 entre les rats sans curarisation et les rats avec 2 ou 5 mg/kg/h de curare
- Tableau 13.** Résultats des études publiées rapportant la réponse de la perfusion sanguine rétinienne en réponse à l'hyperoxie chez le rat

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>Ach</b> : Acétylcholine	<b>ERO</b> : Espèces réactives de l'oxygène
<b>ACT</b> : Actine beta	<b>ET-1</b> : Endothéline 1
<b>ADN</b> : Acide désoxyribonucléique	<b>EtCO<sub>2</sub></b> : End tidal CO <sub>2</sub>
<b>ACP</b> : Artères ciliaires postérieures	<b>FiO<sub>2</sub></b> : Fraction inspirée en oxygène
<b>ACR</b> : Artère centrale de la rétine	<b>ET<sub>R</sub>A/B</b> : Récepteur A/B à l'endothéline 1
<b>Ang II</b> : Angiotensine II	<b>GPN</b> : Glaucome à pression normale
<b>AO</b> : Artère ophtalmique	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> : Péroxyde d'hydrogène
<b>ANOVA</b> : Analyse de variance	<b>HDL</b> : Lipoprotéines de haute densité
<b>ANSM</b> : Activité nerveuse sympathique musculaire	<b>HI</b> : Hypoxie intermittente
<b>ARN</b> : Acide ribonucléique	<b>HIF-1</b> : Hypoxia-inducible factor 1
<b>CaCl<sub>2</sub></b> : Chlorure de calcium	<b>HPRT1</b> : Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase 1
<b>CCD</b> : Charge-coupled device	<b>HR</b> : Hazard ratio
<b>CGR</b> : Cellules ganglionnaires de la rétine	<b>HTA</b> : Hypertension artérielle
<b>CO<sub>2</sub></b> : Dioxyde de carbone	<b>HTIC</b> : Hypertension intracrânienne
<b>COX</b> : Cyclooxygénases	<b>IAH</b> : Index d'apnées-hypopnées
<b>CRSC</b> : Chorioretinopathie séreuse centrale	<b>ICAM-1</b> : Intercellular adhesion molecule 1
<b>CYCA</b> : Cyclophiline A	<b>IL</b> : Interleukine
<b>CYP 450</b> : Cytochrome P450	<b>IMC</b> : Indice de masse corporelle
<b>DC</b> : Direct current	<b>IONDT</b> : The ischemic optic neuropathy decompression trial
<b>DSP</b> : Densité spectrale de puissance	<b>i.v.</b> : Intra-veineux
<b>DT2</b> : Diabète de type 2	<b>KCl</b> : Chlorure de potassium
<b>EDTA</b> : Ethylène diamine tétra-acétique	<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> : Dihydrogénophosphate de potassium
<b>EEG</b> : Electroencéphalogramme	<b>LCS</b> : Liquide cébrospinal
<b>ELISA</b> : Enzyme-linked immunosorbent assay	<b>LDF</b> : Fluxmétrie laser Doppler
<b>EMG</b> : Electromyogramme	<b>LDL</b> : Lipoprotéines de basse densité

**L-NAME** : *N*<sup>G</sup>-nitro-L-arginine

**LPS** : Lipopolysaccharide

**MgSO<sub>4</sub>** : Sulfate de magnésium

**NaCl** : Chlorure de sodium

**NaHCO<sub>3</sub>** : Bicarbonate de sodium

**NF-κB** : Nuclear factor kappa B

**NO** : Monoxyde d'azote

**NOIAA-NA** : Neuropathie optique ischémique antérieure aigue non artéritique

**NOS** : Nitric oxide synthases

**NX** : Normoxie/normoxique

**O<sub>2</sub>** : Oxygène

**OCT** : Tomographie en cohérence optique

**OR** : Odd ratio

**OVR** : Occlusion veineuse rétinienne

**PA** : Pression artérielle

**PBS** : Tampon phosphate salin

**pCO<sub>2</sub>** : Pression partielle en dioxyde de carbone

**PIC** : Pression intracrânienne

**PIO** : Pression intraoculaire

**PDK-1** : Phosphoinositide-dependent kinase-1

**PKCδ** : Protéine kinase C δ

**pO<sub>2</sub>** : Pression partielle en oxygène

**PPC** : Pression positive continue

**PPO** : Pression de perfusion oculaire

**POBF** : Pulsatile ocular blood flow

**qPCR** : Quantitative polymerase chain reaction

**RD** : Rétinopathie diabétique

**RDI** : Index de perturbation respiratoire

**ROK** : Rho-associated kinase

**RNFL** : Couche des fibres optiques rétinienne

**RR** : Risk ratio

**SaO<sub>2</sub>** : Saturation artérielle en oxygène

**SA-SQD** : Sleep apnea scale of the sleep disorders

**SAOS** : Syndrome d'apnées obstructives du sommeil

**SD** : Ecart-type

**TBARS** : Thiobarbituric acid reactive species

**TNFα** : Tumor necrosis factor alpha

**TNO** : Tête du nerf optique

**TPC** : *Trans*-2-phenylcyclopropylamine hydrochloride

**VCAM-1** : Vascular cellular adhesion molecule 1

**VEGF** : Vascular endothelial growth factor

**Vel** : Vitesse

**Vel<sub>ART</sub>** : Vitesse artérielle rétinienne

**Vel<sub>CHOR</sub>** : Vitesse choroïdienne

**Vol** : Volume



## **Introduction générale**

L'œil est un territoire neurovasculaire unique dans l'organisme. Ses structures transparentes permettent une exploration non invasive du milieu endoculaire, en particulier, l'étude des vaisseaux. L'analyse de la régulation vasculaire rétinienne est un enjeu important dans la compréhension physiopathologique des maladies vasculaires oculaires et systémiques, ainsi que des troubles vasculaires du système nerveux central. L'intérêt des cliniciens pour l'étude des effets potentiels du syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) sur l'œil s'est amplifié depuis de nombreuses années dans un contexte d'intérêt scientifique croissant concernant les complications cardiovasculaires associées au SAOS, et d'une augmentation de prévalence de la maladie. Malgré un grand nombre de travaux explorant la relation entre le SAOS et certaines neuropathies et affections rétiniennes, telles que la neuropathie optique ischémique antérieure aigue non artéritique (NOIAA-NA), le glaucome ou l'occlusion veineuse rétinienne, très peu de données cliniques viennent confirmer ou infirmer les hypothèses physiopathologiques avancées. Alors que l'utilisation du modèle de rongeurs soumis à l'hypoxie intermittente (HI) chronique, décrite comme la composante majeure du SAOS, a permis de caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires conduisant aux complications cardiovasculaires associées au SAOS, ce modèle n'a jamais été utilisé pour évaluer l'effet de l'HI sur l'œil et la fonction vasculaire oculaire.

La première partie de cette thèse est ainsi consacrée à l'étude des effets de l'HI chronique sur la régulation vasculaire oculaire du rat. Cette partie évoque tout d'abord les affections vasculaires de la rétine et du nerf optique décrites chez les patients apnéiques et discute les hypothèses physiopathologiques sous-jacentes (article 1, soumission prévue à Sleep Medicine Reviews). Elle se poursuit par l'étude de la régulation vasculaire de l'artère ophtalmique du rat soumis à 14 jours d'HI, et la mise en évidence des altérations moléculaires associées (article 2).

La deuxième partie est consacrée au développement du deuxième modèle d'étude de la régulation vasculaire chez le rat. Dans un premier temps, les principes fondamentaux de la fluxmétrie laser Doppler sont rappelés. Puis la description du prototype et de sa validation in vitro et in vivo font l'objet de la deuxième étude (article 3 : Compact laser Doppler flowmeter (LDF) fundus camera for the assessment of retinal blood perfusion in small animals, PlosOne, 2015). Les travaux sur l'analyse du signal LDF sont ensuite exposés, en particulier sur la caractérisation du profil des spectres de puissance



pondérée par les fréquences. Enfin, l'évaluation de la régulation vasculaire oculaire du rat sain et du rat soumis à l'HI, en réponse à plusieurs stimuli (hyperoxie, endothéline 1) est présentée.

**Première partie : Etude des altérations vasculaires oculaires associées à l'hypoxie intermittente chronique**

# 1 Introduction

Actuellement, les atteintes endoculaires potentiellement associées au SAOS comprennent la neuropathie optique ischémique antérieure aiguë non artéritique, le glaucome à pression normale, le glaucome primitif à angle ouvert, l'œdème papillaire et l'occlusion veineuse rétinienne. Parmi les atteintes extra oculaires décrites, l'hyperlaxité palpébrale, l'ectropion de la paupière inférieure, le blépharochalasis, le kératocône, la xérophtalmie, et les atteintes récidivantes de l'épithélium cornéen ont été cités.

Les mécanismes physiopathologiques liés au SAOS et menant à ces atteintes, notamment au niveau de la rétine et du nerf optique, sont mal connus. Cette synthèse a pour objectif de décrire les affections vasculaires de la rétine et du nerf optique décrites chez les patients apnéiques et de discuter les hypothèses physiopathologiques sous-jacentes.

### **1.1 Hypothèses physiopathologiques reliant le SAOS aux atteintes de la rétine et du nerf optique**

La répétition d'épisodes de collapsus complets ou partiels du pharynx au cours du sommeil est responsable de séquences de désaturation-resaturation sanguine en oxygène entraînant une hypoxie intermittente. Cette dernière est associée à des efforts inspiratoires augmentés qui se caractérisent par des variations de pression intrathoracique associées à des microéveils mettant fin à l'événement obstructif par reprise de la ventilation pulmonaire. La répétition de ces séquences d'HI, de variation de pression intrathoracique et de fragmentation du sommeil définit le SAOS. L'hypoxie intermittente est considérée comme la principale composante du SAOS responsable des effets délétères sur l'organisme. Plusieurs modèles de rongeurs soumis à des cycles d'hypoxie intermittente ont été développés dans le but d'explorer les conséquences biologiques de l'HI et de mieux comprendre la physiopathologie du SAOS. Ces études ont permis de caractériser les mécanismes intermédiaires d'adaptation activés au cours des apnées, tels que l'activation du système nerveux sympathique ou l'activation de facteurs sensibles à l'hypoxie, et de comprendre leur relation avec les effets délétères du SAOS sur l'organisme (hypertension artérielle, dysfonction vasculaire, troubles métaboliques). Plusieurs de ces mécanismes peuvent contribuer à altérer la régulation vasculaire oculaire chez le patient apnéique.

### 1.1.1 Variation des facteurs hémodynamiques et métaboliques durant les apnées

#### 1.1.1.1 Hypoxie et réoxygénation

Une apnée est définie par un arrêt de la respiration durant 10 secondes ou plus. Les patients apnéiques présentent également des hypopnées, qui correspondent à une réduction du débit aérien associée à une désaturation en oxygène d'au moins 4%. L'examen de référence pour le dépistage et le diagnostic de SAOS reste la polysomnographie et permet de définir l'index d'apnées-hypopnées (IAH), correspondant au nombre moyen d'événements apnéiques ou hypopnéiques par heure. Le SAOS est défini par un IAH supérieur ou égal à 15 par heure. L'académie américaine de médecine du sommeil recommande l'utilisation d'un seuil d'IAH de 30 évènements par heure pour distinguer les patients souffrants de SAOS modéré et de SAOS sévère. L'évaluation du risque de SAOS par questionnaire SA-SQD (*sleep apnea scale of the sleep disorders*, sensibilité pour le diagnostic de 80% (68 – 88%) et spécificité 66% (52 – 78%)) (Weatherwax et al. 2003) est moins performante, rapportant que 30 % de patients NOIAA-NA présentant un score compatible avec le SAOS (Li et al. 2007a). Le questionnaire SA-SQD sous-estime significativement le nombre de patients apnéiques, tout comme le questionnaire d'Epworth sur le sommeil (Aptel et al. 2015). Ces observations suggèrent que l'utilisation de questionnaires est limitée dans le diagnostic du SAOS (Arzt et al. 2006).

Durant les apnées, l'obstruction répétée des voies aériennes supérieures conduit à une diminution de la pression partielle en O<sub>2</sub> (PO<sub>2</sub>, hypoxie) et une augmentation de la pression partielle en CO<sub>2</sub> (PCO<sub>2</sub>, hypercapnie) dans le sang (Hudgel et al. 1988). Les patients atteints de SAOS peuvent ainsi présenter des niveaux de désaturation en oxygène pouvant atteindre 70 % de SaO<sub>2</sub> (Tatsumi et al. 2005) et des EtCO<sub>2</sub> d'environ 40 mmHg (Hudgel et al. 1988). Il est généralement admis qu'une hypoxémie est sévère lorsque la SaO<sub>2</sub> chute en dessous de 90%. La fin des épisodes d'apnées se caractérise aussi par une réoxygénation rapide liée à une reprise de la ventilation pulmonaire.

#### 1.1.1.2 Hypoxie/réoxygénation et stress oxydant

La sévérité de la désaturation en O<sub>2</sub> est un facteur prédictif d'épaississement carotidien et de présence de plaque carotidienne chez des patients apnéiques sans complications cardiovasculaires préalables (Baguet et al. 2005). Le taux urinaire de 15-F<sub>2t</sub>-isoprostane, marqueur reconnu de stress oxydant, est augmenté chez les patients apnéiques et corrélé à la sévérité des apnées et de l'hypoxémie (Monneret et al. 2010). Cela souligne à la fois le rôle du degré de désaturation en oxygène mais aussi de la durée et de la répétition des apnées.

L'hypoxie et les séquences répétées d'hypoxie/réoxygénation provoquent une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Duranteau et al. 1998), dont la plus importante est l'anion superoxyde, mais également d'espèces réactives de l'azote, capables d'oxyder un grand nombre de molécules (Ceconi et al. 2000).

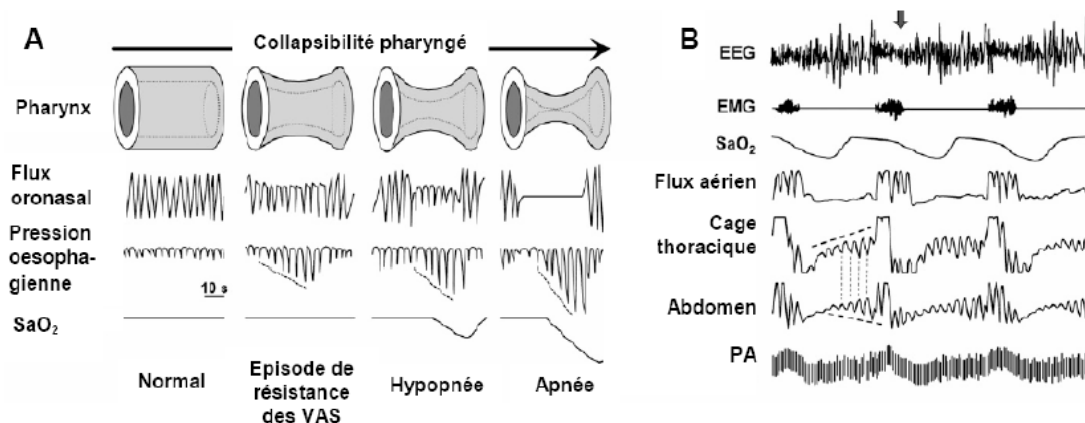
De nombreuses données cliniques supportent l'hypothèse d'une augmentation du stress oxydant chez les patients apnéiques : augmentation du taux plasmatique des métabolites réactifs de l'oxygène (Christou et al. 2003a), des LDL oxydées (Barceló et al. 2000), des *thiobarbituric acid reactive species* (TBARS) et des ions peroxydes (Lavie et al. 2004). De même la stimulation de neutrophiles (Schulz et al. 2000a), de granulocytes et de monocytes CD64+ et CD11c+ (Dyugovskaya et al. 2002) issus de patients apnéiques entraîne une plus forte production d'ERO par rapport aux leucocytes issus de patients sains. En parallèle, l'activité antioxydante du plasma est diminuée chez les patients apnéiques (Christou et al. 2003 ; Barceló et al. 2006). **Ces données sont ainsi en faveur d'un déséquilibre entre la synthèse d'ERO et les capacités antioxydantes, conduisant à un état de stress oxydant.**

Chez le rat soumis à 14 jours d'HI, la réduction de production d'anions superoxyde par le tempol normalise la pression artérielle (PA) après HI (Troncoso Brindeiro et al. 2007). Le stress oxydant est également observé au niveau myocardique avec une augmentation d'anions superoxyde associée à une augmentation de la susceptibilité du myocarde à l'ischémie (Ramond et al. 2013), cette dernière étant également corrigée par un traitement par tempol.

### 1.1.1.3 Variations de la pression intrathoracique

Alors que l'inspiration moyenne chez des individus sains entraîne une dépression d'environ  $-10 \text{ cmH}_2\text{O}$ , les pressions œsophagiennes mesurées en fin d'apnée chez les patients apnéiques s'élèvent à  $-53.6 \pm 2.9 \text{ (SD) cmH}_2\text{O}$ , avec un pic de pression à  $-147.4 \text{ cmH}_2\text{O}$  (Suzuki et al. 2005). Ces efforts inspiratoires s'accompagnent également d'augmentation de la pression intra abdominale qui limite le retour veineux et provoque ainsi une augmentation brutale de la PA (de l'ordre de  $80 \text{ mmHg}$ ) lors de la reprise de la respiration, malgré une chute du débit cardiaque (par diminution du volume d'éjection systolique du ventricule gauche)(Garpestad et al. 1994).

Les apnées obstructives chez l'animal entraînent une augmentation du diamètre aortique (Peters et al. 1988). Il semblerait que la réduction de la pression intrathoracique serait transmise au niveau de la paroi des vaisseaux intrathoraciques, en particulier l'aorte et les artères carotidiennes, ce qui induirait leur dilatation. Cette dilatation comprimerait ainsi les veines avoisinantes et induirait une réduction du retour veineux (Gaisl et al. 2015). De plus les fortes variations de PA associées aux microéveils induisent des contraintes de cisaillement augmentées sur la paroi de ces vaisseaux, facteur favorisant l'évolution de l'athérosclérose (Lovett et al. 2003).



**Figure 1 : Evènements respiratoires et enregistrement polysomnographique observables lors des apnées, d'après Dematteis et al. 2009. (A) le degré de collapsus pharyngé définit les stades de sévérité des évènements respiratoires, dont le plus sévère correspond à l'apnée. La diminution des pressions intra-oesophagiennes et de la saturation en oxygène définissent la sévérité des évènements respiratoires (B)**

Enregistrement polysomnographique : l'électroencéphalogramme (EEG) montre une fragmentation du sommeil et l'électromyogramme (EMG) révèle une activité musculaire périodique lors des microéveils. La désaturation en oxygène (SaO<sub>2</sub>), les efforts respiratoires thoraco-abdominaux et les fluctuations de la PA sont répétés à chaque apnée.

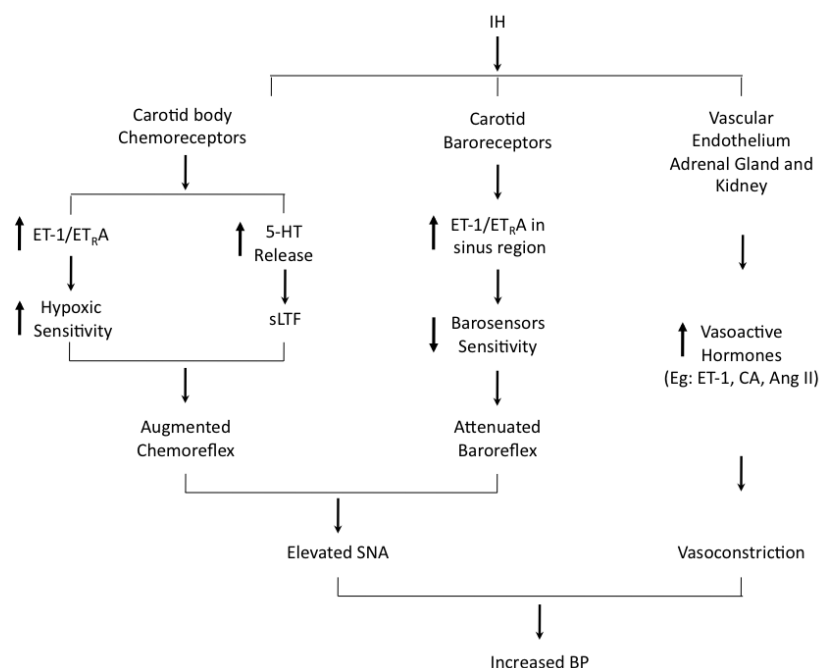
#### ***1.1.1.4 Activation sympathique et variations de la pression artérielle systémique***

L'activité nerveuse sympathique musculaire (ANSM) mesurée par micro-neurographie, reflète le contrôle réflexe de la résistance vasculaire systémique (Carlson et al. 1993). En réponse à la répétition des apnées nocturnes, une augmentation progressive de la PA et de l'ANSM se produit lors des apnées, particulièrement en fin d'épisode. A la reprise de la respiration, l'activité sympathique cesse brutalement et un pic de PA est observé (Somers et al. 1995 ; Carlson et al. 1993 ; Narkiewicz et al. 1998). Ces altérations sont retrouvées dans le modèle de sujets sains exposés à l'HI chronique (Gilmartin et al. 2010 ; Tamisier et al. 2011), ce qui souligne le rôle majeur du stimulus hypoxie intermittente. De même, le traitement des apnées par pression positive continue (PPC) permet de réduire l'activité sympathique et la PA (Somers et al. 1995 ; Imadojemu et al. 2007).

Plusieurs éléments contribueraient à l'élévation de l'activité sympathique : l'association d'une activation du chémoréflexe et d'une diminution de la sensibilité du baroréflexe en réponse à la composante HI (Smith et al. 1996 ; Lusina et al. 2006 ; Braga et al. 2006 ; Fletcher et al. 2001), une activation du système rénine-angiotensine-aldostérone et une stimulation des récepteurs de l'angiotensine II au niveau du système nerveux central (Tamisier et al. 2011).

L'implication du SAOS dans la progression de l'hypertension artérielle (HTA) est bien établie (Nieto et al. 2000 ; Peppard et al. 2000) et l'hyperactivité sympathique contribue en partie à cette progression. La prévalence de l'HTA chez les patients apnéiques est estimée entre 35 et 80% (O'Connor et al. 2009 ; Peppard et al. 2000). L'HTA associée au SAOS est à prédominance diastolique, avec un profil « non dipper » dans 30% des cas (profil défini par la chute nocturne de la PA inférieure à 10%) (Davies et al. 2000).





**Figure 2 : Illustration schématique des mécanismes associés à l’altération des chémoréflexe et baroréflexe lors d’hypoxie intermittente conduisant à l’augmentation de la pression artérielle systémique, d’après Prabhakar et al. 2010.**

#### **1.1.1.5 Hypertension intracrânienne (HTIC)**

Les patients apnéiques présentent une pression intracrânienne (PIC) diurne anormalement élevée, ainsi que des augmentations de la PIC et de la PA au cours des apnées nocturnes (Jennum et al. 1989). L’augmentation lente de la PIC au cours de l’apnée est suivie d’une augmentation fugace et marquée en fin d’apnée. L’enregistrement en continu de la pression du liquide cébrospinal (LCS) chez 3 patients apnéiques a montré la présence d’augmentations marquées et répétées de la pression du LCS lors des épisodes d’apnée/hypopnée. Plus l’épisode apnéique est long, plus l’augmentation de la pression du LCS est importante (Sugita et al. 1985).

L’augmentation de la PIC est liée à une augmentation du volume intracrânien. Plusieurs mécanismes évoqués précédemment semblent contribuer à l’augmentation du volume intracrânien chez les patients atteints de SAOS :

**(1) la diminution du retour veineux au cours des apnées** entraîne une augmentation de la pression veineuse centrale, qui contribue à augmenter le volume intracrânien, la

pression intracrânienne et la pression du LCS (Sugita et al. 1985). L'obésité, associée au SAOS, pourrait également contribuer à la réduction du retour veineux en majorant la pression intra-abdominale (Brazis et al. 1998) et à l'augmentation de la résistance des veines jugulaires par dépôt de graisse au niveau du cou (Bateman 2009)

(2) **l'augmentation de PA systémique**, présente également la nuit, provoque une augmentation de la pression de perfusion cérébrale (Hamer et al. 1977)

(3) **l'hypoxie et l'hypercapnie** jouent localement un rôle favorisant la vasorelaxation cérébrale (Ainslie et al. 2004) alors que la résistance vasculaire systémique est augmentée.

### 1.1.2 Conséquences vasculaires biologiques et fonctionnelles

#### 1.1.2.1 Régulation du tonus vasculaire en conditions physiologiques

Le tonus vasculaire est un état de contraction intermédiaire permanent lié à la fonction vasomotrice des artères musculaires et artérioles. Ces artères douées de vasomotricité participent à la régulation des résistances périphériques à l'écoulement sanguin, dans le but de maintenir un débit constant vers les organes irrigués. Cette fonction est contrôlée à plusieurs niveaux :

- Localement, par la libération de facteurs métaboliques (pH, O<sub>2</sub>, K<sup>+</sup>), de facteurs vasoactifs issus de l'endothélium vasculaire ou encore de produits des plaquettes (sérotonine, adénosine diphosphate, thrombine).
- Centralement, via l'innervation sympathique et la libération de neurotransmetteurs (acétylcholine, noradrénaline, adénosine triphosphate, substance P), et via la régulation hormonale (catécholamines, vasopressine, angiotensine II, insuline).

Généralités sur la fonction endothéliale

En parallèle de son rôle dans l'hémostase, le transport de métabolites du sang vers les tissus et l'angiogenèse, l'endothélium vasculaire joue un rôle essentiel dans le contrôle du tonus vasculaire. Il intervient dans la variation du diamètre vasculaire en réponse au flux sanguin (contraintes de cisaillement) et en réponse à des molécules vasoactives locales ou circulantes. L'endothélium vasculaire est notamment capable de synthétiser et libérer plusieurs composés impliqués dans la régulation de l'état de contraction et de prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV). Ainsi l'état de contraction des artères de résistance dépend d'une balance essentielle entre des facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs libérés par l'endothélium. Parmi les facteurs vasodilatateurs, les trois principaux sont le monoxyde d'azote (NO), la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) et les molécules regroupées sous le terme de facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium ou *l'endothelium-derived hyperpolarizing factor* (EDHF).

#### Facteurs vasoactifs dérivés de l'endothélium

##### Facteurs vasodilatateurs

- Le monoxyde d'azote (NO)

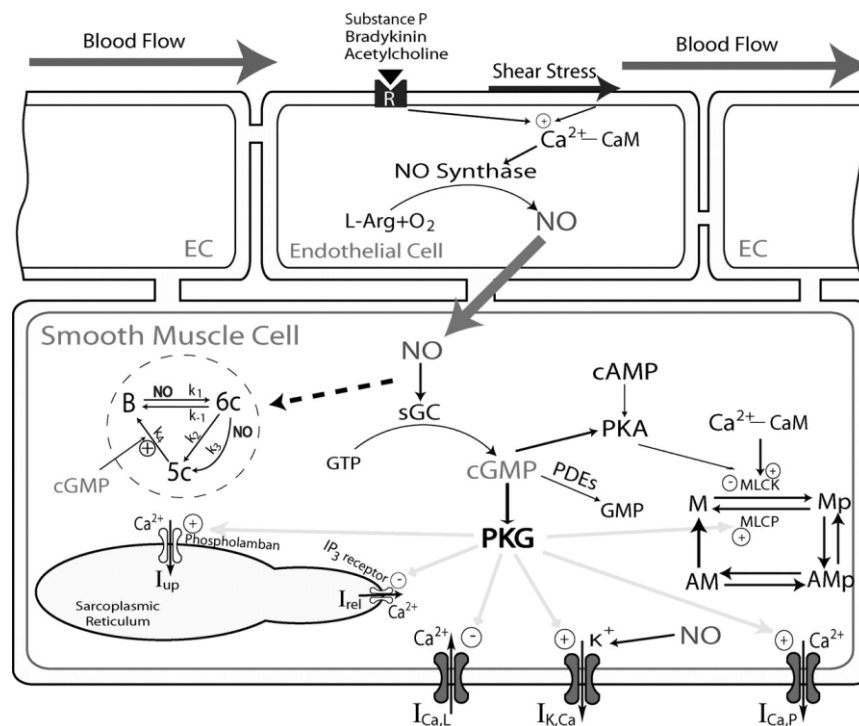
D'abord appelé facteur relaxant dérivé de l'endothélium ou EDRF (Furchgott et al. 1980), le NO est identifié comme le principal facteur endogène relaxant le muscle lisse vasculaire (Ignarro et al. 1988 ; Palmer et al. 1987). Il est synthétisé dans la cellule endothéliale par la NO synthase (NOS) à partir de L-arginine (Palmer et al. 1988), principalement par l'isoforme eNOS. Après libération, le NO agit localement pour diminuer le tonus vasculaire et la migration et la prolifération des CMLV (Jeremy et al. 1999). Il diffuse rapidement dans les CMLV et provoque leur relaxation via l'activation de la protéine kinase G (PKG) activée par la guanosine monophosphate cyclique ou GMPc.

Le NO provoque l'activation de la guanylate cyclase soluble (sGC), une hémoprotéine hétérodimérique qui catalyse la conversion de la guanosine triphosphate (GTP) en GMPc. La PKG, activée par l'accumulation de GMPc, stimule indirectement la

phosphatase de la chaîne légère de la myosine ou *myosin light chain phosphatase* (MLCP) par deux mécanismes (Carjaval et al. 2000) :

- diminution de la sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  (désensibilisation) du système actine-myosine : via la phosphorylation de la télodine (Wu et al. 1998) et l'inactivation de la Rho-kinase A (RhoA).
- diminution de la concentration cytosolique du  $\text{Ca}^{2+}$ .

L'activation de la MLCP diminue la phosphorylation de la chaîne légère régulatrice de la myosine de type II (MLC20), associée à une diminution de la tension développée (Figure 3). Plusieurs stimuli conduisent à la vasodilatation dépendante du NO : acétylcholine, bradykinine et substance P de même que les forces de cisaillement exercées sur l'endothélium.



**Figure 3 : Représentation schématique de la relaxation endothélium dépendante médiée par la voie NO/GMPc, (d'après Yang et al. 2005).** Le NO, synthétisé dans les cellules endothéliales à partir de la L-arginine (L-Arg), diffuse vers les cellules musculaires lisses vasculaires adjacentes. Il y active la guanylate cyclase soluble (sGC) qui augmente la production intracellulaire de GMPc. Le GMPc active ensuite la protéine

kinase G (PKG) qui à son tour régule les flux de  $\text{Ca}^{2+}$  via plusieurs protéines cibles : activation des canaux potassiques dépendants du  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ) et des pompes  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases au niveau de la membrane plasmique et du réticulum sarcoplasmique (par phosphorylation du phospholamban), inhibition des canaux calciques voltage-dépendants de type L ( $\text{Ca}_v\text{L}$ ) et du récepteur à l'inositol triphosphate (IP3). Le GMPc participe également à la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (MLC). M : chaîne légère de la myosine libre,  $\text{M}_p$  : chaîne légère de la myosine phosphorylée,  $\text{AM}_p$  : myosine liée à l'actine,  $\text{AM}$  : myosine liée à l'actine mais déphosphorylée. Finalement, le GMPc est dégradé en GMP par les phosphodiésterases des nucléotides cycliques (PDEs).

- La prostacycline ( $\text{PGI}_2$ )

La prostacycline ( $\text{PGI}_2$ ), eicosanoïde issu du métabolisme de l'acide arachidonique, est synthétisée principalement au niveau de l'endothélium vasculaire. L'acide arachidonique, libéré des phospholipides membranaires par la phospholipase A2 ( $\text{PLA}_2$ ), peut subir des transformations par différentes voies. Sa transformation dans la voie des cyclooxygénases (COX1 et 2), conduit en particulier à la formation de la  $\text{PGI}_2$  vasodilatatrice par la prostacycline synthase (PGIS) et du thromboxane vasoconstricteur par la thromboxane synthase. La  $\text{PGI}_2$  est un puissant vasodilatateur et pourrait également inhiber la prolifération des CMLV (Shirotani et al. 1991). Elle possède une demi-vie plus longue que le NO et diffuse également vers les CMLV où elle se fixe sur son récepteur (IP). La fixation active l'adénylate cyclase et entraîne la formation d'adénosine monophosphate cyclique ( $\text{AMPC}$ ). La protéine kinase dépendante de l' $\text{AMPC}$  (PKA) est alors activée et induit une hyperpolarisation et une diminution du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire menant à la relaxation de la CMLV.

- Facteurs hyperpolarisants de l'endothélium ou EDHF

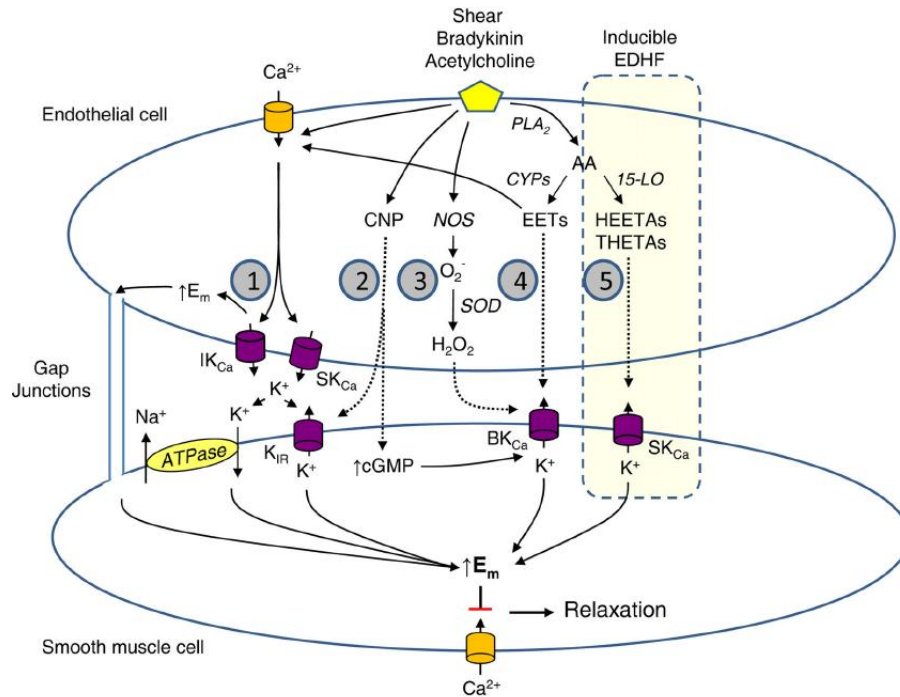
Lorsque la synthèse de NO et de  $\text{PGI}_2$  est bloquée, la relaxation à l'acétylcholine et à la bradykinine peut persister et est associée à une hyperpolarisation de la membrane des CMLV (Cohen et al. 1995 ; Campbell et al. 1996). Cette relaxation a été attribuée à un facteur hyperpolarisant de l'endothélium ou *endothelium-derived hyperpolarizing factor*

(EDHF). Actuellement ce terme regroupe plusieurs molécules dont l'action hyperpolarisante a été mise en évidence dans certains lits vasculaires. Notamment, il apparaît que la contribution de ces EDHF dans la relaxation vasculaire dépendante de l'endothélium est plus marquée dans les artères de résistance (Nagao et al. 1992). La nature de ces composés, discutée depuis longtemps, semble varier d'un lit vasculaire à l'autre et comprend :

- **les métabolites des cytochromes P450 (CYP450) mono-oxygénases : les acides époxyeicosatriénoïques (EETs).** Plusieurs isozymes de la famille du CYP450 sont exprimées dans les cellules endothéliales, en particulier CYP2C et CYP2J qui génèrent les EETs. Les EETs sont libérés en réponse à l'acétylcholine, la bradykinine ou encore les forces de cisaillement (Campbell et al. 2007, 2010, 1996). Leur action hyperpolarisante au sein des CMLV fait intervenir l'activation des canaux potassiques à forte conductance dépendants du  $Ca^{2+}$  ( $K_{Ca}$ ) (Gebremedhin et al. 1992). Ils pourraient également être impliqués dans les mécanismes de prolifération et de migration cellulaire (Fleming et al. 2001).
- **le peptide natriurétique de type C (CNP).** Ce peptide constitué de 22 acides aminés est synthétisé de façon constitutive dans les cellules endothéliales et participe à la relaxation du muscle lisse vasculaire par augmentation du GMPc et hyperpolarisation membranaire (Chauhan et al. 2003).
- **les ions potassiums ( $K^+$ ).** Le concept selon lequel des ions  $K^+$  issus de l'endothélium agissent comme facteur hyperpolarisant des CMLV a été mis en évidence dans plusieurs lits vasculaires chez l'animal (Mc Carron et al. 1990 ; Edwards et al. 1998) et chez l'homme (Chrissobolis et al. 2000 ; Nelli et al. 2003 ; Mc Neish et al. 2005). Une faible augmentation de la concentration en  $K^+$  (de l'ordre du dixième de mM) libérés par les cellules endothéliales par le biais des canaux  $K_{Ca}$  de faible et moyenne conductance provoque l'hyperpolarisation et la relaxation des CMLV par augmentation de la conductance des canaux potassiques rectifiants entrants ou *inwardly rectifying  $K^+$  -channel* ( $K_{IR}$ ) et par activation des pompes  $Na^+/K^+$  ATPase (Mc Carron et al. 1990 ; Edwards et al. 1998).

- **les jonctions gap myo-endothéliales.** Des jonctions gap relient les CMLV aux cellules endothéliales, permettant une diffusion du calcium d'une cellule à l'autre. Il semblerait que la présence et le nombre de ces jonctions soient corrélés à l'importance de la composante EDHF dans les vaisseaux (Sandow et al. 2002) et que leur nombre augmente inversement avec la taille des artères (Sandow et al. 2000). Ainsi, l'hyperpolarisation des cellules endothéliales par activation des canaux  $K_{Ca}$  de faible et moyenne conductance est transmise par les jonctions gap myo-endothéliales vers les CMLV, entraînant leur relaxation.
  
- **le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ),** formé par hydratation des anions superoxydes par la superoxide dismutase (Faraci et al. 2004 ; Shimokawa et al. 2010). Son rôle comme EDHF a notamment été décrit dans les artères mésentériques de souris et d'homme (Matoba et al. 2000, 2002) mais les canaux potassiques impliqués dans la vasorelaxation qu'il induit ne sont pas connus.
  
- **le sulfure d'hydrogène ( $H_2S$ ),** formé dans les cellules endothéliales et les CMLV par trois enzymes : la cystathionine  $\beta$ -synthase, la cystathionine  $\gamma$ -synthase et la 3-mercaptopyruvate sulfurtransférase en coopération avec la cystéine aminotransférase (Kimura et al. 2014). A l'état basal, la concentration en  $H_2S$  est faible car il est rapidement oxydé dans les mitochondries. Cette oxydation est fortement dépendante du taux d'oxygène cellulaire, avec une diminution de l'oxydation de  $H_2S$  lors de l'hypoxie, ce qui laisse penser que  $H_2S$  pourrait être une molécule impliquée dans la réponse tissulaire à l'hypoxie (Olson et al. 2015). Il joue un rôle d'EDHF en activant les canaux  $K_{Ca}$  de faible et moyenne conductance ainsi que les canaux potassiques ATP-dépendants (Tang et al. 2010).
  
- **les métabolites de la 15-lipoxygnase endothéliale (15-LOX) :** acide 15(S)-hydroxy-11,12-époxyeicosatriénoïque (15-HEETA) et acide 11(R), 12(S), 15(S)-trihydroxyeicosatriénoïque (11, 12, 15-THETA). Il semblerait que les métabolites de la 15-LOX provoquent l'hyperpolarisation et la relaxation des CMLV en activant les canaux  $K_{Ca}$  de faible conductance (Campbell et al. 2003). L'expression basale de la 15-LOX est observée chez les jeunes animaux mais pas chez les adolescents et les adultes (Tang et al. 2008). Cependant, il a été montré que son

expression était induite sous l'influence de stimuli variés tels que les cytokines (Tang et al. 2003 ; Xu et al. 2004) ou l'hypoxie (Zhu et al. 2003 ; Bajpai et al. 2007).



**Figure 4 : Représentation schématique des cinq principaux endothelium-derived hyperpolarizing factors (EDHF), d'après Campbell et al. 2013.** Les forces de cisaillement et les agonistes dépendants de l'endothélium tel que l'acétylcholine stimulent la relaxation vasculaire dépendante des EDHF. Ces voies sont constituées de : (1) la transmission électrique de l'hyperpolarisation endothéliale par les jonctions gap myo-endothéliales et la libération des ions potassium par les cellules endothéliales, (2) le peptide natriurétique de type C (CNP), (3) le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), (4) les acides époxyeicosatriénoïques (EETs) et (5) les métabolites de la 15-lipooxygénase (15-LO). Cette dernière voie, inductible, est surlignée sur le schéma.

Il a été montré que le rôle des EDHF est inhibé par le NO en conditions basales et majoré lorsque la voie du NO est altérée ou inhibée (Garland et al. 2011). Il semblerait



également que les mécanismes de contrôle du tonus vasculaire lié aux EDHF soient moins sensibles que la voie du NO à des facteurs externes ou endogènes pouvant induire une dysfonction endothéliale, et qu'ils seraient mieux conservés dans des conditions pathologiques (Jin et al. 2011). De plus, certains des composés évoqués précédemment semblent sujet à une régulation (H<sub>2</sub>S, CYP450) ou ne seraient exprimés que dans certaines conditions (métabolites de la 15-LOX). Ainsi, des mécanismes à la fois constitutifs et inductibles liés aux EDHF participent à la régulation du tonus vasculaire (figure 4). Les données contradictoires sur l'implication de ces mécanismes dans les différents lits vasculaires supportent l'hypothèse selon laquelle les différents EDHF ne participent pas à cette régulation de façon uniforme dans les différentes artères.

### Facteurs vasoconstricteurs

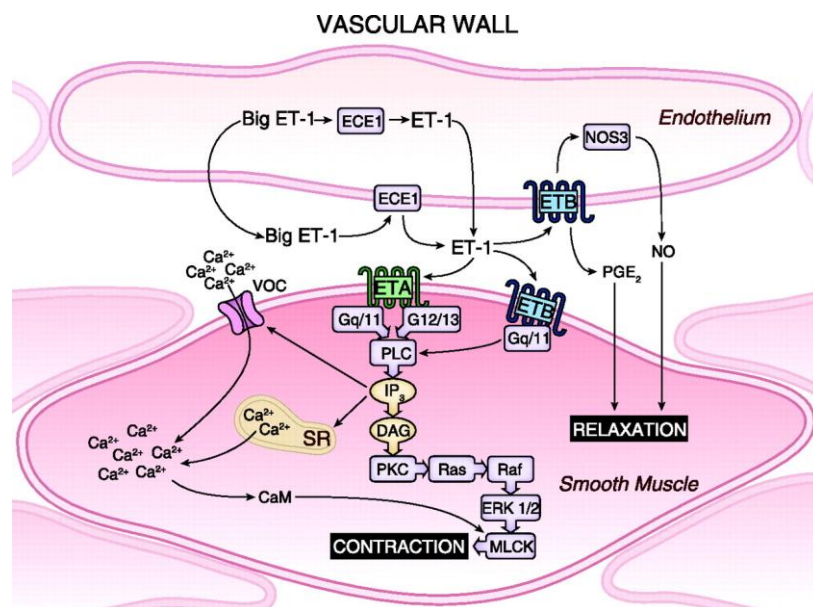
- Les endothélines

Les endothélines sont une famille de peptides composée de 3 isoformes (ET-1, ET-2 et ET-3) possédant une structure de 21 acides aminés voisine et une fonction vasoconstrictrice marquée. Les cellules endothéliales synthétisent majoritairement l'ET-1, sous forme d'une pro-hormone (big-ET-1) ensuite convertie en pre-pro-ET-1 puis en ET-1 notamment par l'enzyme de conversion de l'ET-1 (ECE). L'ET-1 exerce ses effets biologiques par activation de deux récepteurs ET<sub>RA</sub> et ET<sub>RB</sub>. ET<sub>RA</sub> est le sous-type majoritairement exprimé par les CMLV alors que ET<sub>RB</sub> est exprimé majoritairement par les cellules endothéliales mais est présent aussi à la surface des CMLV. La fixation de ET-1 sur les récepteurs ET<sub>RA</sub> et ET<sub>RB</sub> des CMLV induit la vasoconstriction, la croissance cellulaire et l'adhésion cellulaire.

La fixation de ET-1 sur le récepteur ET<sub>RB</sub> des cellules endothéliales stimule la libération de NO et de PGI<sub>2</sub>, entraînant la relaxation des CMLV mais aussi limitant l'apoptose, inhibant l'expression de l'ECE et jouant un rôle important dans la clairance de l'ET-1 (Alonso et al. 2003 ; D'Orléans Juste et al. 2002). Il a été aussi montré que l'ET-1 pouvait stimuler la libération d'eicosanoïdes par les cellules endothéliales (Hollenberg et al. 1994).

L'activation des ETR au niveau des CMLV, associés à des protéines G, stimule l'hydrolyse d'un phospholipide membranaire entraînant la libération de diacylglycérol (DAG) et d'inositol-triphosphate (IP3) qui vont alors activer plusieurs voies au sein de la CMLV :

- IP3 va se fixer sur son récepteur au niveau du réticulum sarcoplasmique et activer la sortie et l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme, provoquant la contraction des CMLV (Figure 5).
- Associé à l'augmentation de la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$ , le DAG va activer la protéine kinase C (PKC), qui va à son tour participer à promouvoir la contraction vasculaire (Görlach et al. 1998) (Figure 5) mais qui est également impliquée dans les mécanismes de prolifération cellulaire (Li 1996)
- La voie de la mitogen-activated protein kinase (MAPK) serait également activée par ET-1 et impliquée dans la prolifération des CMLV (Daou et al. 2004)
- L'activation des voies des phosphatidylinositol-3 kinases (PI3-Ks) et de la protéine kinase B (PKB) par ET-1 est impliquée dans la régulation de la mort cellulaire mais aussi de l'hypertrophie des CMLV.



**Figure 5 : Représentation schématique de la régulation du tonus vasculaire par l'endothéline 1 (ET-1)**, d'après Kohan et al. 2011. Les cellules endothéliales expriment exclusivement l'ET<sub>R</sub>B et sont la principale source vasculaire d'ET-1. L'activation des

ET<sub>RA</sub> et ET<sub>RB</sub> au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) conduit à l'activation d'une cascade impliquant les protéines G, la phospholipase C (PLC), le diacylglycérol (DAG) et l'inositol trisphosphate (IP<sub>3</sub>). L'IP<sub>3</sub> active les canaux Ca<sup>2+</sup> voltage dépendants (VOC), augmente la libération de Ca<sup>2+</sup> par le réticulum sarcoplasmique et active la calmoduline (CaM). L'activation de la CaM associée à celle de la protéine kinase C (PKC) par DAG et à la cascade Ras/Raf/ERK1/2 entraîne l'activation de la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK) et la contraction de la CMLV.

- Les prostaglandines

Les prostaglandines sont une famille de lipides ubiquitaires issus du métabolisme de l'acide arachidonique par la voie des COX. En parallèle de la synthèse de PGI<sub>2</sub> par la PGIS, plusieurs composés sont issus de la transformation de l'endoperoxyde intermédiaire PGH<sub>2</sub> par des enzymes variées : PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> et TXA<sub>2</sub>. Au niveau vasculaire, la PGI<sub>2</sub> et la PGE<sub>2</sub> sont des puissants vasodilatateurs alors que le TXA<sub>2</sub> et la PGF<sub>2α</sub> sont vasoconstricteurs. Le TXA<sub>2</sub> est majoritairement synthétisé par les plaquettes et joue un rôle important dans l'agrégation plaquettaire et l'hémostase. Il peut également être synthétisé par les cellules endothéliales. Par ailleurs la nitration de la PGIS par les peroxy-nitrites (ONOO<sup>-</sup>) réduit son activité catalytique et active les COX, ce qui favorise la production de TXA<sub>2</sub> (Zou et al. 2007). La fixation du TXA<sub>2</sub> sur son récepteur (TP) au niveau des CMLV active la voie de la phospholipase C, menant à la mobilisation des stocks cellulaires de Ca<sup>2+</sup> via IP<sub>3</sub>, à l'activation de la PKC via DAG et à la contraction musculaire. L'activation de la PKC par le TXA<sub>2</sub> est également impliquée dans l'hypertrophie des CMLV.

- L'acide 20 hydroxyeicosatétraénoïque (20-HETE)

Le 20-HETE est un dérivé de l'acide arachidonique par le biais de son ω-hydroxylation catalysée par les cytochromes P450 de la famille 4. Il est produit par les CMLV de certains vaisseaux (artères cérébrales et rénales) par l'isoforme 4A, majoritairement présente dans le système cardio-vasculaire. Le 20-HETE est un vasoconstricteur puissant des artères de faible calibre (rénale, cérébrale, mésentérique et muscle

squelettique) mais n'altère pas le tonus vasculaire des plus gros vaisseaux (aorte et carotide). Il stimule la contraction des CMLV par dépolarisation cellulaire, en inhibant la sortie des ions K<sup>+</sup> par les canaux K<sub>Ca</sub> et les canaux Ca<sup>2+</sup> voltage dépendants de type L (Gebremedhin et al. 1998). Le NO semble jouer un rôle inhibiteur important dans la synthèse du 20-HETE, par inactivation du groupement hème du CYP450 (Harder et al. 1997). Cette inhibition participe à l'activation des canaux K<sub>Ca</sub> et à l'effet vasodilatateur du NO (Sun 1998).

#### **1.1.2.2 Adaptations transcriptionnelles en réponse à l'HI**

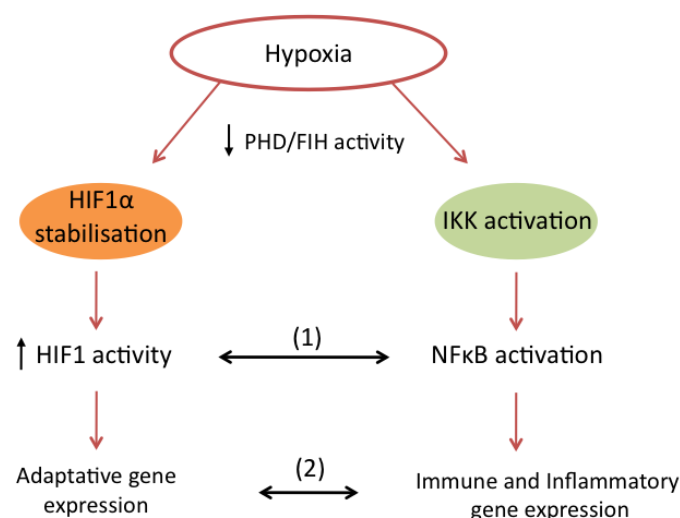
Deux facteurs de transcription sensibles à l'état oxydo-réducteur de la cellule sont activés par l'HI et pourraient jouer un rôle lors du SAOS : *l'hypoxia-inducible factor 1* (HIF-1) et le *nuclear factor kappa B* (NF-κB).

**HIF-1, facteur de transcription majeur lors de variations de l'homéostasie de l'oxygène, régule l'expression de très nombreux gènes intervenant dans la régulation de la fonction endothéliale**, de l'inflammation et du métabolisme énergétique et glucidique (Schofield et al. 2004). Parmi eux les gènes de molécules qui ont un rôle important dans la fonction vasculaire tels que le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Hirota et al. 2006), l'endothéline 1 (ET-1) (Manalo et al. 2005), le récepteur adrénergique α1B (Eckhart et al. 1997) et les *Nitric Oxide Synthases* (NOS) endothéliales et inductibles (Schofield et al. 2004). L'activation de HIF-1 est nécessaire à la surexpression de la pre-pro ET-1, précurseur de l'ET-1, en réponse à l'hypoxie continue (Yamashita et al. 2001).

L'activation de HIF-1 en réponse à l'HI est beaucoup plus importante que celle observée en réponse à l'hypoxie continue (Yuan et al. 2005). De plus, l'HI augmente la synthèse de HIF-1 via un mécanisme impliquant les ERO produites par la NADPH oxydase (Yuan et al. 2008 ; Peng et al. 2006). L'étude de modèles de rongeurs soumis à l'HI ont montré que HIF-1 était impliqué dans les effets délétères cardiaques (Belaidi et al. 2009) et métaboliques (Li et al. 2006). HIF-1 est également retrouvé au sein de la plaque d'athérome et semble jouer un rôle dans le développement et la déstabilisation de la plaque en favorisant l'angiogenèse, l'accumulation lipidique, l'inflammation et l'apoptose (Bitto et al. 2010).

**Le facteur nucléaire kappa B joue un rôle majeur dans la régulation des médiateurs de l'inflammation.** L'activité de NF- $\kappa$ B est augmentée dans les monocytes de patients apnéique (Greenberg et al. 2006), et associée à une augmentation du taux sérique de *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF $\alpha$ ) et d'interleukine 8 (IL-8), deux médiateurs pro-inflammatoires puissants, cibles de NF- $\kappa$ B (Ryan et al. 2006). L'activation de NF- $\kappa$ B en réponse à l'HI a été également mise en évidence dans un modèle cellulaire (Ryan et al. 2005) ainsi qu'au niveau du cœur, de l'aorte et des poumons de souris (Greenberg et al. 2006). NF- $\kappa$ B est activé par l'augmentation du taux d'ERO cellulaire, notamment en réponse à la production de cytokines lors d'inflammation (Gloire et al. 2006).

**Une interaction entre HIF-1 et NF- $\kappa$ B** a été documentée récemment, NF- $\kappa$ B étant capable de se fixer sur le promoteur de HIF-1 $\alpha$ , sous-unité inductible de HIF-1, dans des conditions basales ou après exposition à TNF $\alpha$  (van Uden et al. 2008). L'interférence réciproque entre HIF-1 et NF- $\kappa$ B favorise notamment la survenue de l'inflammation (Eltzschig et al. 2011). Il pourrait être critique dans la capacité du facteur HIF-1 à répondre à un stimulus hypoxique en présence de NF- $\kappa$ B, et pourrait exacerber les conséquences liées au stress oxydant chez les patients apnéiques.



**Figure 6: représentation schématique de l'interférence réciproque entre les voies de HIF-1 et de NF- $\kappa$ B.** Le stimulus hypoxique est capable d'activer les deux voies en inhibant l'activité des hydrolases dépendante de l'oxygène, et en stabilisant la sous-unité

alpha de HIF-1, et le complexe IKK dans la voie de NF- $\kappa$ B. L'interférence entre les deux voies de signalisation a été décrite à plusieurs niveaux, notamment (1) lors de la régulation de l'activité de NF- $\kappa$ B par HIF1 ou (2) lors de l'activation de l'expression de l'ARNm de HIF-1 $\alpha$  par NF- $\kappa$ B. Adapté d'après Taylor et al. 2009.

Abréviations : PHD, prolyl hydroxylases; FIH, facteur inhibiteur de HIF.

### *1.1.2.3 Altérations de la régulation du tonus vasculaire associées au SAOS*

#### Régulation des NOS et biodisponibilité du monoxyde d'azote

L'augmentation de la production d'ERO lors de SAOS est susceptible d'altérer la fonction endothéliale par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes, notamment en modifiant la biodisponibilité du monoxyde d'azote.

**Le monoxyde d'azote (NO)** est un des facteurs vasodilatateurs les plus puissants du système cardiovasculaire. Il est synthétisé par une famille d'enzymes, les NOS, comprenant 3 membres : la **NOS endothéliale** (eNOS), constitutive et principale source de NO dans l'endothélium vasculaire, la **NOS neuronale** (nNOS) présente aussi dans l'endothélium vasculaire de façon constitutive, et la **NOS inducible** (iNOS) qui est exprimée en réponse à de nombreux stimuli, notamment NF- $\kappa$ B et HIF-1. L'expression de iNOS est induite en réponse à l'hypoxie continue (Jung et al. 2000), mais aussi l'HI chronique (Ding et al. 2005), et son activation participe aux effets délétères liés à l'HI (Yuan et al. 2015a ; Yuan et al. 2015b ; da Rosa et al. 2015 ; Liu et al. 2014).

L'effet de l'hypoxie chronique continue sur l'expression de eNOS varie notablement en fonction du tissu et de l'espèce étudiée, pouvant soit stimuler (Coulet et al. 2003 ; Hoffmann et al. 2001 ; Thompson et al. 2000 ; Le Cras et al. 1996) soit inhiber son expression (Liao et al. 1995 ; Takemoto et al. 2002 ; Toporsian et al. 2000 ; Fike et al. 1998). L'effet de l'hypoxie intermittente sur l'expression de eNOS est tout aussi variable : diminution de l'expression de eNOS dans la carotide de rat soumis à 21 jours d'HI (Krause et al. 2015), augmentation de son expression dans les artères pulmonaires de rat soumis à 14 jours d'HI (Snow et al. 2008), ou absence d'altération de l'expression de eNOS dans le cerveau de rats après 14 jours d'HI (Li et al. 2004).

## Activation du système endothéline 1

L'ET-1 est un peptide vasoconstricteur puissant produit par les cellules endothéliales. Il interagit avec deux récepteurs, ET<sub>RA</sub> et ET<sub>RB</sub> (Masaki et al. 1994). Dans la paroi vasculaire, les récepteurs ET<sub>RB</sub> sont majoritairement exprimés au niveau des cellules endothéliales et sont responsables d'un effet vasodilatateur en induisant la libération de NO et participent à la clairance de ET-1 (Kohan et al. 2011). Les cellules musculaires lisses vasculaires contiennent majoritairement des récepteurs ET<sub>RA</sub>, responsables d'un effet vasoconstricteur et de la prolifération cellulaire (Wang et al. 1992).

ET-1 joue un rôle majeur dans le système cardiovasculaire, notamment dans le maintien du tonus vasculaire (Ivy et al. 2001) et est ainsi impliquée dans la physiopathologie de nombreuses atteintes cardiovasculaires : hypertension artérielle systémique (Schiffrin 2005) et pulmonaire (Rubin et al. 2002), athérogénèse (Pinet 2004 ; Ihling et al. 2001), insuffisance cardiaque congestive (Spieker 2001) et complications vasculaires de la sclérodermie (Korn et al. 2004).

L'activation de ET-1 dans le SAOS est liée à l'hypoxie et la production d'HIF-1 (Yamashita et al. 2001), et dans une moindre mesure, aux forces de cisaillement et l'angiotensine II (Ang II). Le taux d'ET-1 circulante est retrouvé élevé dans certaines études chez le patient apnéique (Gjørup et al. 2007 ; Phillips et al. 1999 ; Grimpen et al. 2000) mais aussi chez le rat soumis à l'HI (Kanagy et al. 2001 ; Troncoso Brindeiro et al. 2007). Cette augmentation semble corrélée à la sévérité des hypoxies nocturnes et est diminuée par le traitement par PPC (Phillips et al. 1999). L'ET-1 et son récepteur ET<sub>RA</sub> ont été impliqués dans le mécanisme responsable de l'hypertension observée chez le rat soumis à l'HI, via une augmentation du stress oxydant (Kanagy et al. 2001 ; Troncoso Brindeiro et al. 2007). Nous avons également mis en évidence une augmentation de ET-1 et de son précurseur, la big-ET-1, dans le myocarde de rat soumis à l'HI, associée à une augmentation de la contraction coronaire en réponse à l'ET-1 et de la susceptibilité cardiaque à l'ischémie-reperfusion (Belaidi et al. 2009). De plus, **la vasoconstriction en réponse à ET-1 est augmentée** dans plusieurs lits vasculaires : carotide (Lefebvre et al. 2006), artérioles pulmonaires (Snow et al. 2011) et artérioles mésentériques (Allahdadi et al. 2005, 2007, 2008 ; Webster et al. 2013 ; Friedman et al. 2014). A l'inverse, la

réponse à ET-1 n'est pas modifiée dans l'aorte de rongeurs soumis à l'HI (Lefebvre et al. 2006).

#### Altération de la balance des espèces vasodilatatrices/vasoconstrictrices

La régulation du tonus vasomoteur par un endothélium sain permet de maintenir la balance entre vasorelaxation et vasoconstriction en conditions physiologiques et en réponse à des stimuli physiques ou biochimiques. Une atteinte de la régulation se caractérise par exemple par une diminution de la relaxation endothélium dépendante.

**En l'absence de comorbidité cardiovasculaire, les patients apnéique présentent une altération de la vasorelaxation endothélium-dépendante en réponse à l'acétylcholine** (Kato et al. 2000 ; Carlson et al. 1996) **ou de la vasorelaxation médiée par le flux** (Ip et al. 2000 ; Nieto et al. 2004), suggérant une diminution de la biodisponibilité du NO. En accord avec ces résultats, plusieurs travaux ont mis en évidence une diminution des taux circulants du NO chez les patients apnéique non traités (Ip et al. 2000 ; Schulz et al. 2000b). La vasorelaxation en réponse à l'acétylcholine est également altérée des vaisseaux de résistance chez le rongeur soumis à l'HI, notamment l'artère gracile (Philippi et al. 2010 ; Dopp et al. 2011) et les artères cérébrales centrales (Phillips et al. 2004). Cette altération semble liée à une diminution de la biodisponibilité du NO (Phillips et al. 2004) et au stress oxydant (Philippi et al. 2010).

Le patient apnéique présente également une **capacité vasoconstrictrice augmentée**, comme le suggère l'augmentation de la vasoconstriction périphérique pendant les apnées (Imadojemu et al. 2002). Le taux d'ET-1 circulante est augmenté chez le patient apnéique, en particulier la nuit et au réveil (Phillips et al. 1999 ; Zamarrón-Sanz et al. 2006). En parallèle de l'activation de ET-1, l'HI associée au SAOS stimule la synthèse de plusieurs molécules vasoactives, comme la noradrénaline, l'adrénaline et l'Ang II chez les patients apnéiques (Marrone et al. 1993 ; Møller et al. 2003). Le rôle de l'ET-1 dans l'altération de la régulation vasculaire a été également largement retrouvé chez l'animal comme discuté dans le paragraphe précédent.



#### **1.1.2.4 Inflammation systémique et vasculaire**

L'étude des marqueurs de l'inflammation chez le patient apnéique est en faveur d'une altération de l'homéostasie pro-inflammatoire/anti-inflammatoire. Le rôle des facteurs pro-inflammatoires est en particulier bien reconnu dans les mécanismes liés à la progression de l'athérosclérose (Libby 2002).

Le **stress oxydant** associé aux séquences répétées d'hypoxie/réoxygénation lors des apnées est à l'origine d'une augmentation de l'expression de **médiateurs pro-inflammatoires et de molécules d'adhésion**, notamment certains gènes cibles de NF- $\kappa$ B (TNF $\alpha$ , IL-8). Chez les patients apnéiques, les taux circulants des cytokines TNF $\alpha$  (Ryan et al. 2005), IL-8 (Ohga et al. 2003), (Ryan et al. 2006), IL-6 (Mehra et al. 2006), IL-18 (Minoguchi et al. 2005), de protéine C réactive (Minoguchi et al. 2005) et de molécules d'adhésion telles que ICAM-1, VCAM-1 et L-sélectine (Ryan et al. 2006 ; Minoguchi et al. 2005 ; Ohga et al. 1999) sont augmentés et associés à la sévérité du SAOS, indépendamment d'autres facteurs confondants tels que l'obésité. La production lymphocytaire d'IL-4 pro-inflammatoire est augmentée et associée à une diminution de celle d'IL-10, anti-inflammatoire, chez les patients apnéiques modérés (Dyugovskaya et al. 2005). Le traitement par PPC est associé à une diminution du taux de TNF $\alpha$  circulant (Ryan et al. 2005).

Les **molécules d'adhésion circulantes**, responsable de l'adhésion leucocytaire sur l'endothélium vasculaire, favorisent le recrutement et l'accumulation de cellules inflammatoires au niveau de l'endothélium, étapes clés dans la formation de la plaque athéromateuse. Des signaux d'interaction entre l'endothélium vasculaire et les cellules leucocytaires ont été mis en évidence chez le patient apnéique : les monocytes provenant de patients apnéiques synthétisent plus de TNF $\alpha$  (Minoguchi et al. 2004), expriment plus de molécules d'adhésion CD15 et CD11c à leur surface et adhèrent plus fortement aux cellules endothéliales *in vitro*. Les lymphocytes T et neutrophiles circulants présentent également des phénotypes altérés favorisant leur adhésion ou leur cytotoxicité (Dyugovskaya et al. 2005, 2008). Le traitement par PPC abolit l'augmentation de l'expression monocyttaire de CD15 et CD11c et la production d'ERO par les monocytes CD11c + (Dyugovskaya et al. 2002). Une augmentation du rolling et de l'adhésion des leucocytes avec l'endothélium vasculaire a également été observée

chez le rat soumis à l'HI (Nácher et al. 2007). Ces résultats sont en faveur d'une altération de l'homéostasie endothéliale liée à une inflammation systémique à bas bruit.

#### *1.1.2.5 Altérations du métabolisme lipidique et glycémique*

Les altérations du métabolisme des lipides et du glucose décrits chez le patient apnéique sont des facteurs pro-athérogéniques reconnus.

Plusieurs études rapportent un degré d'insulinorésistance augmenté chez les patients apnéiques, indépendamment de l'obésité (Tassone et al. 2003 ; Ip et al. 2002 ; Punjabi et al. 2004). Le risque de développer **un syndrome métabolique** est approximativement multiplié par 5 chez les patients apnéiques et augmente avec la sévérité du SAOS, à la fois dans les populations occidentales et orientales (Gruber et al. 2006 ; Lam et al. 2006 ; Sasanabe et al. 2006 ; Kono et al. 2007). Le rôle de **l'insulinorésistance** est largement reconnu dans l'altération de la fonction endothéliale (Kim et al. 2006 ; Muniyappa et al. 2007) à travers une augmentation d'acides gras libres, de TNF $\alpha$  ou encore de leptine, et une diminution de la biodisponibilité du NO (Martens et al. 2006 ; Wallace et al. 2001 ; Steinberg & Baron 2002 ; Arcaro et al. 2002). Enfin, de plus en plus d'études soulignent le risque accru de **diabète** chez les patients apnéiques. La prévalence du SAOS chez les patients souffrant de diabète de type 2 (DT2) s'élève jusqu'à 23% (West et al. 2006), (Foster et al. 2009), et la prévalence du DT2 chez les patients apnéiques est rapportée entre 8% et 17% (Reichmuth et al. 2005 ; Ronksley et al. 2009 ; Gottlieb et al. 2010). Le rôle important de l'obésité associée à ces deux affections est un élément qui pourrait être un facteur confondant. Néanmoins, plusieurs résultats montrent une relation indépendante entre le SAOS et le DT2 (Kent et al. 2014 ; Meslier et al. 2003 ; Tamura et al. 2008).

Il semblerait que le SAOS soit associé à une augmentation du cholestérol total, du LDL-cholestérol, des triglycérides plasmatiques et à une diminution du HDL-cholestérol (Newman et al. 2001 ; Roche et al. 2009). Les données animales montrent clairement une association entre l'HI et les troubles du métabolisme lipidique. L'exposition de souris à 5 jours d'HI entraîne une augmentation du taux sérique de cholestérol total, de phospholipides et de triglycérides, du contenu hépatique en triglycéride associé à une

augmentation de la biosynthèse lipidique et une diminution du stockage du cholestérol (Li et al. 2005). Les mécanismes de régulation lipidique en réponse à l'HI font intervenir HIF-1 et sont dépendants de la sévérité de la désaturation en oxygène associée au stimulus (Li et al. 2007b).

#### *1.1.2.6 Conséquences sur le remodelage et la fonction vasculaire*

##### Dysfonction endothéliale

La dysfonction endothéliale vasculaire se définit par une **diminution des capacités vasodilatatrices et une augmentation des capacités vasoconstrictrices**, associées à une activité inflammatoire et pro-thrombotique chronique. Elle représente un signe précoce d'altération de la fonction vasculaire qui accompagne et précède l'expression clinique des maladies cardiovasculaires, et pourrait jouer un rôle majeur dans l'augmentation du risque cardiovasculaire associé au SAOS. Elle constitue notamment la première étape de développement de l'athérosclérose. Ainsi les signes d'inflammation chronique associés aux dysrégulations du tonus vasculaire observés chez le patient apnéique sont des éléments clés signant la présence d'une dysfonction endothéliale.

L'altération de l'homéostasie des facteurs de coagulation contribue à la progression de l'athérosclérose (Davies 1996). Le SAOS est indépendamment associé à une activation plaquettaire excessive (Känel et al. 2003). Enfin, la **capacité de réparation de l'endothélium** est réduite chez les patients apnéiques : diminution du taux de cellules progénitrices endothéliales (Jelic et al. 2008), augmentation du taux de cellules endothéliales apoptotiques circulantes (Solh et al. 2007).

##### Athérosclérose

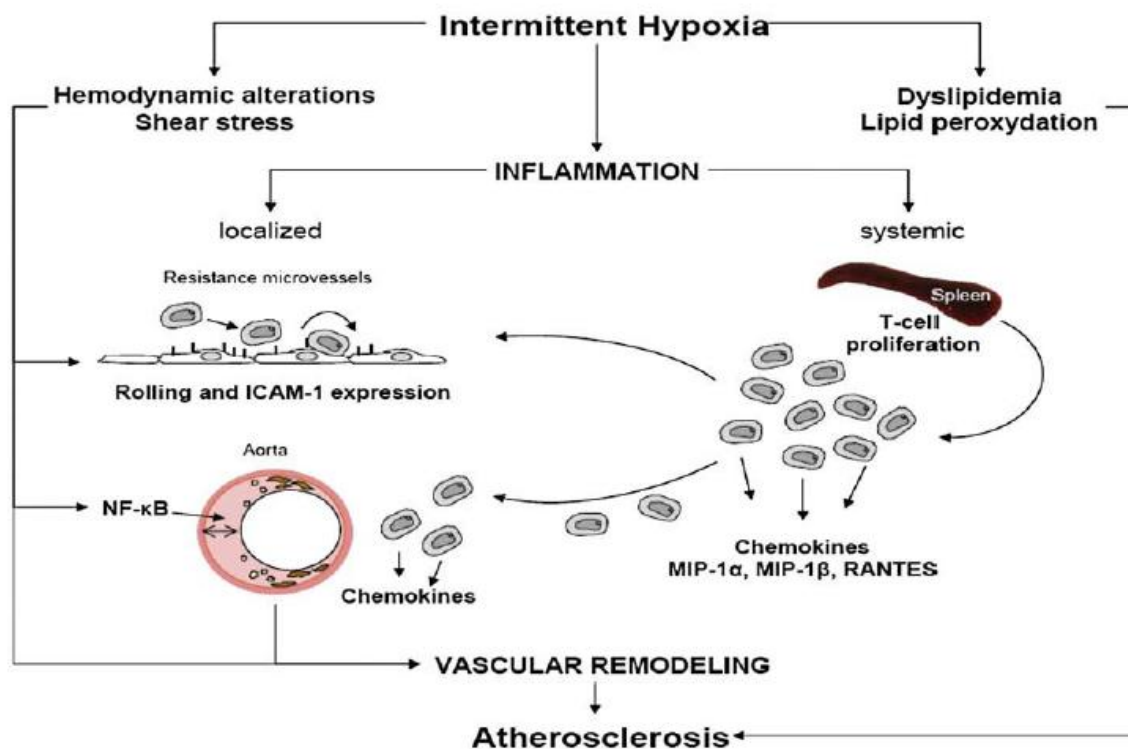
L'athérosclérose est un des mécanismes qui relie le SAOS et ses complications cardiovasculaires associées (Marin et al. 2005). L'athérosclérose se définit par l'apparition de lésions artérielles contenant du cholestérol, un infiltrat leucocytaire et de la fibrose (Hansson 2005 ; Libby 2002). Les principaux facteurs favorisants sont l'hyperlipidémie, l'hypertension artérielle, le tabagisme et le diabète (Lusis 2000), très

souvent liés ou associés au SAOS. L'évolution de cette maladie peut aboutir à une rupture de la plaque, une thrombose et un accident vasculaire (Stary et al. 1995).

Le terrain pro-inflammatoire chronique observé chez les patients apnéiques, associé aux variations de PA systémique, est un terrain favorable à la progression des lésions athéromateuses. Les contraintes de cisaillement, associées aux fortes variations de PA et thoracique lors des apnées, sont imposées à la paroi des gros vaisseaux, en particulier l'aorte et les carotides, et peuvent favoriser le développement de l'athérosclérose (Lovett et al. 2003). De même les altérations du métabolisme lipidique associées au SAOS peuvent contribuer à l'apparition et la progression des mécanismes d'athérogénèse (Lusis 2000).

L'étude de marqueurs prédictifs d'évènements cardiovasculaires chez le patient apnéique est en faveur d'un **remodelage athérosclérotique précoce associé à la maladie**. En effet, l'épaisseur intima-media carotidienne et la fréquence de l'occurrence des plaques sont augmentées en l'absence de comorbidité cardiovasculaire (Drager et al. 2005 ; Baguet et al. 2005 ; Minoguchi et al. 2005). Le degré d'hypertrophie carotidienne et l'importance des plaques semblent corrélés à la sévérité de la désaturation en oxygène durant les apnées (Baguet et al. 2005). De même l'IAH était positivement corrélé au volume des plaques carotidiennes (Turmel et al. 2009). Enfin le traitement du SAOS par PPC est capable de faire régresser les signes précoces d'athérosclérose (Drager et al. 2007).

Les études sur l'animal soumis à l'HI ont mis en évidence les évènements précoces du mécanisme d'athérosclérose observé lors de SAOS. L'exposition de souris à une période prolongée d'HI (12 semaines) associée à une diète enrichie en cholestérol entraîne la formation de plaques athéromateuses aortiques (Savransky et al. 2007). Chez les souris KO pour l'apolipoprotéine E, caractérisée par une dyslipidémie et une inflammation systémique entraînant le développement spontané de plaques d'athéromes, l'exposition à l'IH accélère le développement des lésions d'athéroscléroses (Arnaud et al. 2011). Ces résultats confirment que le développement des plaques athéromateuses est un évènement tardif dans le processus d'athérosclérose et que l'HI chronique est un facteur aggravant.



**Figure 7 : Représentation schématique des mécanismes induits par l’HI, et mis en cause dans le remodelage vasculaire et l’athérosclérose.** Parmi eux, les dyslipidémies, la peroxydation lipidique et les dysrégulations métaboliques sont retrouvées chez les rongeurs soumis à l’HI et également chez le patient apnéique. Ces dysrégulations s’accompagnent du « rolling » des leucocytes, de la prolifération des cellules inflammatoires, de l’activation du nuclear factor kappa B (NFκB), de l’augmentation de l’intercellular adhésion molécule-1 (ICAM-1) et de chémokines, qui contribuent au remodelage vasculaire conduisant à l’athérosclérose. D’après Levy et al. 2009.

### 1.1.3 Effets délétères potentiels des modifications physiopathologiques du SAOS sur le nerf optique et la rétine

La rétine, le nerf optique et la choroïde possèdent des capacités d’autorégulation du flux sanguin ayant pour but de maintenir un flux sanguin constant, donc une pression capillaire et un apport nutritif dans des valeurs physiologiques malgré des variations de la pression de perfusion oculaire (PPO) ou de l’oxygénation du sang (SaO<sub>2</sub>).

### *1.1.3.1 Hypoxie et régulation du flux sanguin oculaire*

Les patients apnéiques sont sujets à des hypoxémies modérées à sévères. Les mécanismes d'autorégulation du flux sanguin, en particulier au niveau rétinien et de la tête du nerf optique (TNO), ont pour but de maintenir une délivrance en O<sub>2</sub> constante. En présence d'altérations vasculaires, ces capacités de régulation sont diminuées, augmentant le risque d'hypoxie tissulaire.

La mesure de la tension en oxygène au niveau de la papille optique et dans les tissus du nerf optique ont mis en évidence une capacité d'autorégulation de la PO<sub>2</sub>, notamment en réponse à des variations de la pression intraoculaire (PIO) (Ernest 1977 ; Riva 1998) mais également en présence d'hypoxie modérée (Bouzas et al. 1997 ; Pournaras et al. 1992). Le maintien d'une PO<sub>2</sub> stable reflète une capacité d'autorégulation du flux sanguin. Un mécanisme d'autorégulation semblable a été mis en évidence au niveau des couches internes de la rétine (Linsenmeier et al. 1992). La régulation de la PO<sub>2</sub> au niveau de la TNO est modifiée en présence de CO<sub>2</sub> : l'inhalation d'un mélange 20% O<sub>2</sub> – 5% CO<sub>2</sub> entraîne une augmentation de la PO<sub>2</sub> au niveau de la TNO chez le porc, sans altération de la PO<sub>2</sub> artérielle, traduisant une augmentation du flux sanguin par vasorelaxation liée au CO<sub>2</sub> (Stefánsson et al. 1999).

L'étude du flux sanguin oculaire lors d'hypoxie chez l'homme a confirmé le rôle des mécanismes de régulation dans le maintien de l'oxygénation tissulaire ainsi que l'action vasodilatatrice du stimulus hypoxique au niveau du nerf optique et de la rétine. Lors d'hypoxie chez des sujets sains, on observe une vasorelaxation de +5 à +9% des capillaires rétiniens (Brinchmann-Hansen et al. 1990 ; Harris et al. 1998) et de la tête du nerf optique (données non publiées). La vasoconstriction rétinienne se traduit par une augmentation du flux sanguin de +15 à +38% (Fallon et al. 1985 ; Strenn et al. 1997). L'association de l'hypoxie et d'un taux de CO<sub>2</sub> augmenté potentialise ce phénomène, avec une augmentation de la vélocité sanguine rétinienne de +53% (Harino et al. 1995). Lorsque les modifications de la pO<sub>2</sub> dépassent ces capacités d'autorégulation, des variations de la tension en O<sub>2</sub> sont alors observables dans la rétine et le nerf optique, entraînant des perturbations fonctionnelles cellulaires au sein des tissus oculaires (Linsenmeier et al. 1983).

### *1.1.3.2 Pression artérielle et pression de perfusion oculaire*

La PPO dépend de deux facteurs majeurs qui sont la PA systémique et la PIO, selon la formule  $PPO = PA - PIO$  (Mäepea 1992). Ainsi, une augmentation de la PIO ou de la PA entraîne respectivement une diminution ou une augmentation de la PPO, ce qui déclenche les mécanismes d'autorégulation du flux sanguin oculaire.

Chez l'homme, l'augmentation de la PA lors d'exercice isométrique entraîne une vasoconstriction rétinienne (Jeppesen et al. 2007) liée à l'ET-1 (Luksch et al. 2006), permettant de maintenir constant le flux sanguin rétinien (Harris et al. 1996 ; Iester et al. 2007) pour des augmentations de la PA jusqu'à 40% (Dumskyj et al. 1996). De même au niveau de la TNO, une autorégulation du flux sanguin est assurée jusqu'à une augmentation de 34% de la PPO (Movaffaghy et al. 1998). Une diminution de la PPO, par augmentation de la PIO (technique de « suction cup ») est associée chez des sujets sains à un maintien du flux sanguin de la TNO constant jusqu'à des augmentations de PIO de l'ordre de 45 mmHg (Riva et al. 1997 ; Pillunat et al. 1997). Au niveau de la rétine, cela se traduit par une vasorelaxation artérielle associée à une régulation du flux sanguin jusqu'à des augmentation de PIO de 30 mmHg (Riva et al. 1986 ; Weigert et al. 2005).

Le SAOS est un facteur de risque indépendant d'hypertension artérielle reconnu (Nieto et al. 2000 ; Peppard et al. 2000). L'exposition de sujets sains à 14 jours d'HI s'est accompagnée d'une augmentation de la PA systolique et diastolique de 5 mmHg et 8 mmHg respectivement, persistante dans la journée (Tamisier et al. 2011). De plus, à la fin des épisodes d'apnée, il existe des augmentations de PA systolique et diastolique jusqu'à 240 et 130 mmHg respectivement (Somers et al. 1995). Ainsi, chez les patients SAOS, les mécanismes d'autorégulation de la PPO sont activés de façon chronique du fait de l'augmentation chronique de la PA mais de façon aiguë lors des apnées par les variations brutales de la PA et des pressions intrathoraciques.

Des variations brutales de PPO lors de ces événements pourraient être délétères pour la vascularisation de la tête du nerf optique et de la rétine chez le patient apnéique, même si l'autorégulation est conservée. A ce jour, des modifications du flux sanguin du nerf optique et de la rétine n'ont jamais été rapportées lors des apnées, les techniques actuelles de mesure du flux sanguin rendant nécessaires le réveil du patient.

### *1.1.3.3 Altération de la balance vasoconstrictive/vasodilatatrice*

Les **effets vasoconstricteurs de l'ET-1 sur la vascularisation oculaire** sont bien connus au niveau de l'artère ophtalmique et des artères ciliaires postérieures chez l'homme (Haefliger et al. 1992). De même, l'administration d'ET-1 entraîne une diminution du flux sanguin de la tête du nerf optique et de la rétine chez l'animal (Takagi et al. 1996 ; Orgül et al. 1996 ; Hein et al. 2009) et chez l'homme (Schmetterer et al. 1997 ; Polak et al. 2001, 2003). Le blocage du récepteur ET<sub>RA</sub> chez des sujets sains lors d'exercice isométrique diminue la vasoconstriction en réponse à l'augmentation de PPO, et donc altère la régulation du flux sanguin rétinien et choroïdien (Luksch et al. 2006).

**Le rôle du NO dans la régulation du flux sanguin oculaire** est également bien décrit. Le NO est libéré par les cellules endothéliales vasculaires dans la rétine et le nerf optique (Bergua 1995 ; Chakravarthy et al. 1995) et par les cellules bipolaires, amacrines et ganglionnaires dans la rétine (Shiells et al. 1992 ; Lau et al. 1994 ; Dawson et al. 1991). Dans la rétine, les péricytes ont un rôle majeur dans le maintien du flux sanguin capillaire, notamment en réponse à l'oxide nitrique (Sakagami et al. 2001 ; Haefliger et al. 1994). Le blocage de la synthèse du NO par un inhibiteur non-spécifique des NOS entraîne une diminution des paramètres du flux sanguin de la TNO chez des sujets sains (Luksch et al. 2000), chez le chat (Buerk et al. 1998) et chez le lapin (Sugiyama et al. 2000), une altération de la régulation du flux sanguin choroïdien chez l'homme lors d'exercice isométrique (Luksch et al. 2003) ou chez le lapin en réponse à une variation de la PA (Kiel 1999).

Ainsi, les principaux agents vasoactifs altérés lors de SAOS sont impliqués dans les mécanismes d'autorégulation du flux sanguin oculaire. Leur impact sur la vascularisation rétinienne et du nerf optique pourrait ainsi modifier l'autorégulation vasculaire, en particulier lors des apnées nocturnes.

### *1.1.3.4 Implication dans les mécanismes neurodégénératifs*

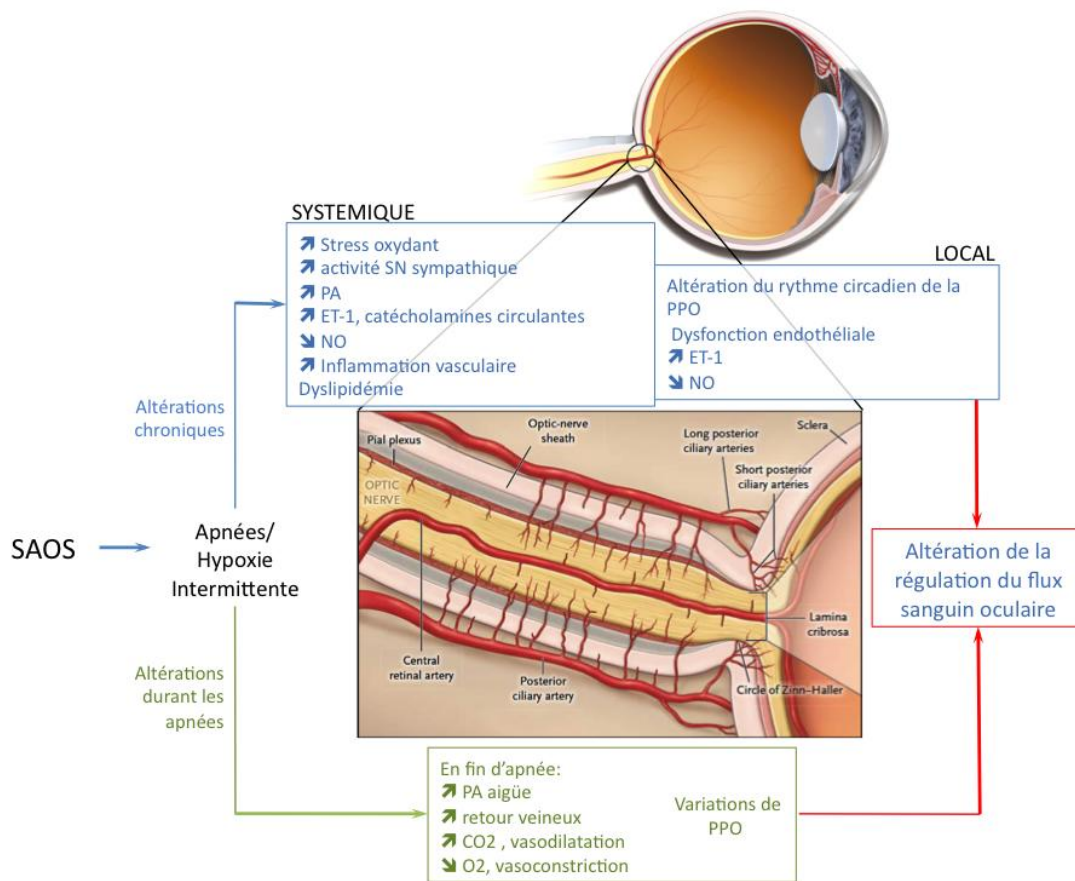


**Les astrocytes et les cellules gliales de la rétine et du nerf optique** contribuent à la fois au maintien de l'homéostasie au sein de ces tissus et aux mécanismes physiopathologiques responsables des altérations des cellules ganglionnaires et du nerf optique (Johnson et al. 2009). Parmi les facteurs impliqués dans l'activation astrogliale et la dégénérescence du nerf optique caractérisant le glaucome, nous retrouvons l'ET-1 (Prasanna et al. 2002), TNF-alpha (Yuan et al. 2000) et le stress oxydant (Tezel et al. 2007).

**L'ET-1** a été identifiée dans les tissus endoculaires, et ses récepteurs spécifiques mis en évidence dans la rétine et la choroïde et nerf optique (Stitt et al. 1996 ; Wollensak et al. 1998 ; Ripodas et al. 2001). Des travaux ont souligné le rôle de ET-1 dans la prolifération des astrocytes de la tête du nerf optique ainsi que l'implication de ses deux récepteurs ET<sub>RA</sub> et ET<sub>RB</sub> (Prasanna et al. 2002 ; Murphy et al. 2010).

Chez des patients glaucomateux, ont été observées une augmentation de l'immunomarquage de HIF-1 $\alpha$  dans la rétine et le nerf optique et de l'immunomarquage de TNF $\alpha$  dans la rétine (Tezel et al. 2001, 2004). En parallèle, le rôle de TNF $\alpha$  sur la libération d'ET-1 au sein de la rétine et du nerf optique a été suggéré par les modèles cellulaires (Prasanna et al. 1998, 2002 ; Desai et al. 2004). Enfin ET-1 a été impliquée dans la mort des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) et la perturbation du transport axonal au sein du nerf optique (Chauhan et al. 2004 ; Stokely et al. 2002 ; Krishnamoorthy et al. 2008 ; Taniguchi et al. 2006).

Ainsi **l'activation de l'axe hypoxie - TNF $\alpha$  - ET-1** semble jouer un rôle majeur dans la physiopathologie des neuropathies optiques. Cet axe, activé également en réponse à l'HI et au SAOS, pourrait donc contribuer à la physiopathologie des neuropathies observées chez les patients apnéiques.



**Figure 8: Représentation schématique des hypothèses physiopathologiques reliant le syndrome d'apnée obstructives du sommeil et les atteintes de la rétine et du nerf optique.**

## 1.2 Neuropathie optique ischémique antérieure aiguë non artéritique (NOIAA-NA)

La neuropathie optique ischémique antérieure aiguë non artéritique (NOIAA-NA) est une atteinte ischémique de la portion antérieure du nerf optique, se caractérisant cliniquement par une atteinte constante du champ visuel et souvent une baisse de vision centrale. L'acuité visuelle initiale est supérieure à 3/10 dans 35% des cas, comprise entre 1 et 3/10 dans 29% des cas et inférieure à 1/10 dans 23-36% des cas (Hayreh et al. 2008 ; The Ischemic Optic Neuropathy Decompression Trial Research Group 1995). Les données de champ visuel automatisé montrent que l'atteinte du champ visuel initial est constante et que le déficit moyen à 6 mois est important puisqu'évalué entre -10,3 et -28 dB en cas de déficit inférieur et entre -16,4 et -27dB en cas de déficit diffus (The Ischemic Optic Neuropathy Decompression Trial Research Group 1995).

### 1.2.1 Définition, épidémiologie et facteurs de risque

La neuropathie optique ischémique antérieure aiguë est la plus fréquente des neuropathies optiques aiguës après 50 ans avec une incidence de 2 à 10 pour 100000 personnes par an (aux Etats-Unis) (Buono et al. 2002 ; Lee et al. 2011). Deux formes cliniques sont définies : la forme artéritique (maladie de Horton) et la forme non artéritique (NOIAA-NA). La NOIAA-NA est une pathologie de la personne âgée avec un âge moyen d'apparition de 61 ans. Les hommes sont légèrement plus touchés que les femmes (58 % versus 41%) (Hayreh et al. 1994).

Plusieurs facteurs de risque, en particulier cardiovasculaires, ont été décrits pour la NOIAA-NA : **syndrome d'apnées du sommeil** (retrouvée dans 70-90%) (Jian Li et al. 2007) Odd Ratio [OR] = 2,82 ; IC 95% 0,62 - 12,94, (Palombi et al. 2006) OR = 4,9 ; IC 95% 4,2 - 5,7 , (Mojon et al. 2002)), l'**hypertension artérielle** (47%) (The Ischemic Optic Neuropathy Decompression Trial Research Group 1996), le **diabète** (10% - 25% (Anon 1996), le Risk Ratio (RR) varie de 1,6 à 2,7 selon les études (Jacobson et al. 1997 ; Chen et al. 2013), les **antécédents d'accident vasculaire cérébral ischémique** (9% versus 3% dans la pop. générale) et **d'ischémie coronarienne** (20% versus 9%)

(Hayreh et al. 1997), la **dyslipidémie**, notamment chez les patients de moins de 50 ans (taux moyen de cholestérol, RR = 3,3) (Deramo et al. 2003).

D'autres facteurs de risque sont controversés, notamment : l'hypoperfusion nocturne de la tête du nerf optique liée à une chute nocturne de la PA (Hayreh et al. 1994, 1999 ; Lacharme et al. 2014 ; Landau et al. 1996), l'élévation de l'homocystéine plasmatique (Kawasaki et al. 1999 ; Pianka et al. 2000) (OR = 5,8 ; IC 95% 1,5 – 21,4 (Weger et al. 2001)), le tabagisme (Hayreh et al. 2007), les inhibiteurs de la 5'phosphodiesterase (sildénafil, tadalafil), notamment chez les patients présentant une HTA ou un infarctus du myocarde (Pomeranz et al. 2005 ; Campbell et al. 2015 ; Nathoo et al. 2015), la chirurgie de la cataracte ainsi que les chirurgies responsables d'une hypoperfusion et/ou d'une hypertonie oculaire (Lam et al. 2007 ; Nguyen et al. 2006).

### 1.2.2 NOIAA-NA et syndrome d'apnées obstructives du sommeil : études épidémiologiques

Dès 1998, Mojon et al. rapporte une altération du champ visuel compatible avec une neuropathie chez 7 patients atteints de SAOS, ainsi qu'une corrélation significative entre l'index de perturbation respiratoire (RDI) et le déficit moyen du champ visuel (Mojon et al. 1998). Par la suite, plusieurs études prospectives ont rapporté la prévalence du SAOS chez les patients NOIAA-NA. Les principales caractéristiques de ces études sont résumées dans le tableau 1. La prévalence du SAOS chez les patients NOIAA-NA varie de 55,6 % (Bilgin et al. 2013) à 89% (Palombi et al. 2006). La prévalence du SAOS chez les patients NOIAA-NA est significativement augmentée par rapport à la prévalence du SAOS dans la population générale (18% (Young et al. 2002)) ou par rapport à la prévalence du groupe témoin (18 à 22,2 %) (Mojon et al. 2002 ; Bilgin et al. 2013). Sur 5 études prospectives utilisant la polysomnographie, seule l'étude de Arda et al. ne montre pas, sur des effectifs réduits (20 patients), de différence significative entre la prévalence du SAOS chez les patients NOIAA-NA et chez les patients sains (85 vs 65 % respectivement)(Arda et al. 2013).

Nous avons démontré récemment que les anomalies du champ visuel retrouvées sur l'œil controlatéral des patients atteints de NOIAA-NA n'étaient pas seulement expliqués par la présence fréquente d'un SAOS, ce qui suggérait que ces anomalies

campimétriques étaient associées à des épisodes sub-cliniques de NOIAA-NA sur l'œil controlatéral (Aryal et al., JAMA soumis). Les yeux de patients apnéiques présentent en effet des atteintes campimétriques moins importantes que les yeux contralatéraux de patients NOIAA-NA et SAOS, mais ces champs visuels ne sont pas normaux : 30% des yeux présentent des déficits campimétriques selon la classification de l'IONDT, 9% présentent une dépression diffuse, et 12% présentent un déficit arciforme supérieur.

Auteur	Méthodologie (1) population	Méthodologie (2)	Evaluation SAOS	Conclusion
<b>Mojon et al. 2002</b>	Prospective, cas-témoin 17 patients NOIAA-NA 17 témoins référés pour polysomnographie	Cas et témoins non appariés pour les facteurs de risque de NOIAA-NA (diabète, hypertension artérielle, athérosclérose, tabagisme)	<b>Polysomnographie</b>  normal : RDI<10 SAOS léger : 10<RDI<20 SAOS modéré : 20<RDI<40 SAOS sévère : RDI>40	Prévalence du SAOS : 71% chez les patients NOIAA-NA contre 18% chez les témoins
<b>Palombi et al. 2006</b>	Prospective 27 patients suspects de NOIAA-NA	Cas et témoins appariés pour les facteurs de risque de NOIAA-NA (diabète sucré, hypertension artérielle, athérosclérose, tabagisme)	<b>Polysomnographie</b>  SAOS : IAH > 15	Prévalence du SAOS : 89% chez les patients NOIAA-NA contre 18% dans la population générale (Young 2002) Risque relatif de SAOS multiplié par 4,9 chez les patients NOIAA-NA (RR : 4,9 ; IC 95% 4,2 – 5,7)
<b>Li et al. 2007</b>	Prospective, cas-témoin 73 patients NOIAA-NA 88 témoins	Cas et témoins appariés pour les facteurs de risque de NOIAA-NA (tabagisme et consommation d'alcool, IMC)	Sleep Apnea scale of the Sleep Disorders Questionnaire (SA-SDQ)	30,1% patients NOIAA-NA et 17,8% témoins présente un score compatible avec le SAOS  Les patients NOIAA-NA ont 2,62 fois plus de chance d'avoir un score compatible avec le SAOS (OR : 2,62 IC 95% 1,03 – 6,6)
<b>Stein et al. 2011</b>	Rétrospective/database 156 336 SAOS	Ajustement vis à vis des facteurs confondants	Codes diagnostiques	Les patients apnéiques non traités ont un risque augmenté de 16% de développer une NOIAA-NA (HR = 1,16 ; IC 95% 1,01 – 1,33) Pas de différence entre les patients apnéiques traités par PPC et les témoins non SAOS
<b>Arda et al. 2013</b>	Prospective, cas-témoin 20 patients NOIAA-NA 20 témoins	Cas et témoins appariés pour les facteurs de risque de NOIAA-NA (diabète, hypertension artérielle, athérosclérose, tabagisme, IMC)	<b>Polysomnographie</b>  SAOS : IAH>5	Prévalence du SAOS : 85% chez les patients NOIAA-NA contre 65% chez les témoins (différence non significative)
<b>Kolb et al. 2013</b>	Prospective 17 patients NOIAA-NA	NC	<b>Polysomnographie</b>  Critères diagnostiques NC	Prévalence du SAOS chez les patients NOIAA-NA: 64,7%
<b>Bilgin et al. 2013</b>	Prospective cas-témoin 27 patients NOIAA-NA 27 témoins	Cas et témoins appariés pour les facteurs de risque de NOIAA-NA (diabète sucré, hypertension artérielle, hypercholestérolémie, tabagisme, IMC)	<b>Polysomnographie</b>  SAOS : IAH>20	Prévalence du SAOS : 55,6% chez les patients NOIAA-NA contre 22,2% chez les témoins Risque relatif de SAOS multiplié par 2,5 chez les patients NOIAA-NA
<b>Aptel et al. 2015</b>	Prospective, de cohorte 89 patients NOIAA-NA	73 patients évalués pour le traitement par PPC	<b>Polysomnographie</b>  SAOS : IAH>15 SAOS sévère : IAH>30	Prévalence du SAOS chez les patients NOIAA-NA: 75% (36% SAOS modéré et 64% SAOS sévère) Atteinte de l'œil controlatéral à 3 ans chez 15,4% des SAOS et 9,5% des non SAOS SAOS sévère non traité par PPC : augmentation du risque d'atteinte du 2 <sup>e</sup> œil x 5,54

**Tableau 1 : Résumé des travaux ayant étudié l'association entre la NOIAA-NA et le SAOS.** Abréviations : NOIAA-NA, Neuropathie optique ischémique antérieure aigue non artéritique ; SAOS, syndrome d'apnées obstructives du sommeil ; IMC, indice de masse corporelle ; RDI, respiratory disturbance index ; IAH, index d'apnée-hypopnée ; SA-SDQ, sleep apnea scale of the sleep disorders, NC, non connu ; RR,risque relatif ; IC, intervalle de confiance ; OR, odd ratio ; HR, hazard ratio ; PPC, pression positive continue.

### 1.2.3 NOIAA-NA et syndrome d'apnées obstructives du sommeil : aspects physiopathologiques

Plusieurs facteurs influençant le flux sanguin oculaire pourrait avoir un rôle crucial dans la survenue de l'évènement ischémique à l'origine de la NOIAA-NA. Notamment, la PPO est un élément important permettant d'évaluer le flux sanguin oculaire. La PPO est la résultante de l'effet de la PA systémique et de la PIO.

La présence d'une hypotension nocturne a été rapportée comme un élément déclencheur potentiel de la NOIAA-NA. Les arguments en faveur de cette hypothèse étaient : (1) une forte prévalence de patients (75%) présentant une baisse d'acuité visuelle le matin au réveil (Hayreh et al. 2001), (2) une plus forte diminution de la PA systolique (25%) chez 52 patients NOIAA-NA comparé à la diminution habituellement observée (13-17%) dans une population de témoins sains (Gatzka et al. 1995), (3) les patients traités pour hypertension artérielle présentant une détérioration du champ visuel avaient une diminution nocturne de PA systolique et diastolique plus marquée que les patients traités pour hypertension artérielle sans altération du champ visuel (Hayreh 1999).

Ces résultats sont discutés car ils n'ont pas été retrouvés par deux autres études. Une première étude ne montre pas de différence dans le nadir de pression diastolique nocturne entre 24 patients atteints de NOIAA-NA et 24 témoins appariés, mais rapporte une plus faible augmentation de la PA au réveil chez les patients apnéique, se poursuivant en journée par une PA systolique et diastolique plus faible chez les patients apnéique. Une étude plus récente évaluant le rythme nyctéméral de la PPO (Lacharme et al. 2014) a montré que 45% des patients NOIAA-NA présentaient une acrophase nocturne de la PPO. La PPO n'étaient pas diminuée de façon significative durant la nuit, ce qui est cohérent avec les données de PA, montrant un faible taux de patients présentant une hypotension nocturne (5%).

### 1.2.4 Traitements et effet de la PPC

Actuellement il n'existe aucun traitement curatif ou préventif validé de la NOIAA-NA (Atkins et al. 2010).

L'association de la NOIAA-NA au SAOS suscite de nombreuses questions concernant le potentiel rôle du traitement du SAOS sur l'évolutivité des NOIAA-NA. Le suivi sur 3 ans de patients NOIAA-NA a montré que les patients NOIAA-NA atteints de SAOS sévère non traités par PPC ont un risque de bilatéralisation de la NOIAA-NA multiplié par 5,5 par rapport aux patients non apnéiques ou atteints de SAOS modéré sans indication de PPC (Aptel et al. 2015). Le traitement spécifique du SAOS par PPC doit être envisagé comme une stratégie thérapeutique de premier ordre car il permet d'annuler les anomalies respiratoires, de restaurer un sommeil physiologique et améliore totalement ou partiellement les complications cardiovasculaires aiguës ou chroniques associées au SAOS, notamment la réactivité vasculaire (Jelic et al. 2008 ; Lattimore et al. 2006). La PPC diminue notamment l'expression de marqueurs d'inflammation systémique comme le taux de TNF $\alpha$  circulant (Ryan et al. 2005) et restaure les taux de NO circulant (Ip et al. 2000).

### **1.3 Glaucome primaire à angle ouvert**

#### **1.3.1 Définition, épidémiologie et facteurs de risque.**

Le glaucome est une neuropathie optique d'évolution progressive constituée par une apoptose accélérée des cellules constituant le nerf optique, les cellules ganglionnaires rétiniennes, se traduisant structurellement par une excavation pathologique de la papille optique et fonctionnellement par une altération du champ visuel pouvant aboutir, à un stade tardif, à la cécité (Weinreb et al. 2004). Il existe de nombreuses classifications des différentes formes de glaucomes, en fonction de l'état anatomique de l'angle irido-cornéen (glaucome à angle ouvert (GPAO) lorsque l'angle formé par l'iris et la cornée est large et permet facilement l'accès de l'humeur aqueuse au trabéculum, ou glaucome à angle fermé lorsque l'iris a tendance à s'apposer contre le trabéculum et la cornée, et à empêcher l'accès de l'humeur aqueuse au trabéculum), de l'étiologie du glaucome (glaucome primitif, ou secondaire à une autre pathologie oculaire ou



générale), etc. Le glaucome primitif à angle ouvert est la forme la plus fréquente des glaucomes en Occident et en Afrique, , et sera détaillé dans la suite de ce chapitre (Quigley 1996 ; Resnikoff et al. 2004).

Le glaucome est la seconde cause de cécité dans le monde, avec environ 80 à 110 millions de personnes atteintes dont environ 3 millions d'aveugles (Congdon et al. 2004). En Occident et en Afrique, le glaucome primitif à angle ouvert représente environ 50 à 70 % de l'ensemble des glaucomes. Dans le monde, le glaucome primitif à angle ouvert représente environ la moitié de l'ensemble des glaucomes, l'autre moitié étant presque exclusivement représentée par les glaucomes par fermeture de l'angle, qui prédominent nettement en Asie. La prévalence du glaucome est d'environ 0,5 à 1 % d'une population adulte de plus de 40 ans en Europe et en Amérique du Nord. Ainsi, en France, on peut estimer le nombre de patients glaucomateux à environ 1 million (Syndicat national des ophtalmologistes de France. Épidémiologie et ophtalmologie 2004. <<http://www.snof.org/accueil/epidemio.html>>). La fréquence du glaucome augmente avec l'âge. De ce fait, des projections évaluent la progression de la prévalence de cette pathologie à environ + 30 % d'ici 2025 (De Pourville G, Chaine G, Nghiem-Buffet S, Noel E, Schwob R. La démographie en ophtalmologie 2000-2020. Paris, Septembre 2003, Direction du Service Médical, CNAMTS).

Les mécanismes physiopathologiques de la neuropathie optique ne sont pas encore parfaitement connus, cependant de nombreux facteurs associés à un risque élevé d'apparition ou d'aggravation d'un glaucome ont été clairement identifiés. Le facteur de risque le plus fréquemment retrouvé et le plus accessible à un traitement est l'élévation de la pression intraoculaire (hypertonie intraoculaire) (Weinreb et al. 2004). L'augmentation de la pression intraoculaire augmente le risque de survenue d'un glaucome, et le risque et la vitesse de progression d'un glaucome en cas de glaucome avéré. Vice-versa, la réduction de la pression intraoculaire réduit le risque d'apparition d'un glaucome chez un patient hypertone, et réduit le risque d'aggravation et la vitesse d'aggravation d'un glaucome chez un sujet ayant un glaucome avéré, quelle que soit la méthode de traitement utilisée pour réduire la pression intraoculaire. Il est à noter qu'un sujet peut développer un glaucome alors que sa pression intraoculaire est dans les limites statistiques de la normale (10 à 21 mmHg). Cette forme de glaucome est appelée glaucome à pression normale (GPN). Le traitement a cependant peu de spécificités car

les études ont également montré que la réduction de la pression intraoculaire réduit le risque d'aggravation et la vitesse d'aggravation d'un glaucome à pression normale.

D'autres facteurs de risque tels que l'âge, le caractère mélanoderme, les antécédents familiaux, la myopie et une fine épaisseur cornéenne sont bien identifiés mais non accessibles à une intervention thérapeutique. Le traitement actuel du glaucome, quelle que soit la méthode, consiste donc actuellement uniquement à réduire la pression intraoculaire, seul facteur de risque pouvant être corrigé (Gordon et al. 2002 ; Leske et al. 2003). D'autres facteurs de risques sont actuellement controversés, comme le diabète, l'hyper- ou l'hypotension artérielle, les vasospasmes, l'hypercoagulabilité, les migraines, et le syndrome d'apnées du sommeil.

### **1.3.2 Glaucome et syndrome d'apnées obstructives du sommeil : études épidémiologiques**

Un résumé des études épidémiologiques ayant évalué la prévalence du glaucome chez des sujets atteints de SAOS est proposé dans le tableau 2 ci-dessous, et un résumé des études ayant évalué la prévalence du SAOS chez des sujets atteints de glaucome est proposé dans le tableau 3 ci-dessous. Les études épidémiologiques ne sont pas unanimes et l'existence d'un risque accru de glaucome primitif à angle ouvert ou de glaucome à pression normale en cas de SAOS reste controversée. La plupart des études réalisées ayant retrouvé un lien entre SAOS et glaucome sont de petites séries de cas dans lesquelles un dépistage du glaucome a été réalisé chez un nombre restreint de patients présentant un SAOS. La moitié de ces études ne comprenaient pas de groupe témoin, empêchant d'estimer si le SAOS est un facteur de risque indépendant. Enfin, dans certaines de ces études, le diagnostic de SAOS était uniquement basé sur des symptômes rapportés par les patients, sans étude objective du sommeil (polysomnographie, polygraphie), ce qui sous-estime la prévalence du SAOS.

A contrario, trois des quatre grandes études cas-témoins (> 1000 sujets inclus) réalisées à partir de bases de données permettant d'inclure un grand nombre de sujets SAOS et de témoins n'ont - en analyse multivariée permettant de prendre en compte d'éventuels facteurs confondants (âge, origine ethnique, caractéristiques cardio-vasculaires, etc.) - pas retrouvées de risque accru de glaucome en cas de SAOS.

Girkin et al. ont analysé les données médicales de 667 vétérans chez qui un glaucome a été nouvellement diagnostiqué lors d'un examen systématique (Girkin et al. 2006). Ces données ont été comparées à celles de 6667 sujets témoins sans glaucome, matchés pour l'âge. En analyse univariée, le risque de développement d'un glaucome n'était pas significativement plus élevé chez les sujets atteints de SAOS (OR = 2,20 ; IC 95% 0,967 - 5,004). En analyse multivariée prenant en compte les éventuels facteurs confondants cardiovasculaires (diabetes, lipid metabolism disorders, hypertension, cardiovascular disease, cerebrovascular disease, arterial disease, and migraines), le risque de développement d'un glaucome n'était pas significativement plus élevé chez les sujets atteints de SAOS (OR = 1,80 ; IC 95% 0,76 - 4,23).

Stein et al. ont analysé les données médicales d'environ 2.3 millions de personnes âgées de plus de 40 ans à partir d'une base de données informatisée d'un réseau d'assurance santé aux Etats-Unis, dont 6,9% avaient un diagnostic de SAOS (Stein et al. 2011). Le risque de glaucome primitif à angle ouvert ne différait pas significativement chez les sujets atteints de SAOS non traité (adjusted hazard ratio [HR] = 1,01 ; IC 95% 0,98 - 1,05) ou traité par pression positive continue (HR = 0,99 ; IC 95% 0,82 - 1,18) comparé aux sujets sans SAOS. De façon similaire, le risque de glaucome à pression normale ne différait pas significativement chez les sujets atteints de SAOS non traité (HR = 0,98 ; IC 95% 0,86 - 1,12) ou traité par PPC (HR = 0,79 ; IC 95% 0,38 - 1,67) comparé aux sujets non SAOS.

Lin et al. n'ont pas évalué la relation entre la prévalence du glaucome et la présence d'un SAOS, mais le risque d'apparition d'un glaucome sur une période de 5 ans suivant le premier diagnostic de SAOS (Lin et al. 2013). Durant un suivi de 5 ans des patients, l'incidence du glaucome pour 1000 personnes/an était respectivement de 11,2 (IC 95% 8,6 - 14,4) et 6,7 (IC 95% 5,8 - 7,8) pour les sujets atteints ou non de SAOS. Après ajustement des facteurs confondants, sur la période d'étude de 5 ans les patients apnéiques présentent un risque relatif de développer un GPAO de 1,67 (IC 95% 1,30 - 2,17; P<0.001).

Aptel et al. ont analysé les données médicales informatisées de 9580 sujets âgés de plus de 50 ans ayant bénéficié d'un enregistrement polysomnographique du sommeil (Aptel et al. 2014). La prévalence du glaucome était de 3,5% chez les sujets atteints de SAOS et de 3,1% chez les sujets témoins. En analyse multivariée prenant en compte les éventuels

facteurs confondants, la présence d'un SAOS n'augmentait pas significativement le risque de glaucome (OR = 1,13 ; IC 95% 0,87 - 1,47).

Auteur	Méthodologie (1) Population	Méthodologie (2)	Evaluation SAOS	Conclusion
<b>Mojon et al. 1999</b>	Etude transversale 69 patients SAOS Corrélation de Spearman	Excavation de la papille optique  Défauts du champ visuels caractéristique du glaucome  PIO>21mmHg AIC ouvert	<b>Polysomnographie</b>  RDI<10 : non SAOS 10<RDI<20 : SAOS léger 20<RDI<40 : SAOS modéré RDI>40 : SAOS sévère	Prévalence glaucome chez patients SAOS (7,2%) > Prévalence observée dans population caucasienne (2%) 3 patients GPAO, 2 patients GPN  Corrélation positive entre RDI et PIO, variance de perte du champ visuel et présence de disque optique glaucomeux
<b>Tsang et al. 2006</b>	Etude cas-témoins 66 patients  36 SAOS 30 témoins  Corrélation de Spearman, ajustement pour âge et IMC	Ratio cup to disk >0,5  PIO<21 mmHg sans traitement  Champ visuel altéré	<b>Polysomnographie</b>  SAOS IAH≥20/h	Différence significative entre SAOS et groupe témoin pour les paramètres du champ visuel  Altérations glaucomeuses du disque optique : SAOS 26,39% > témoin 6,78%  Pas de corrélation entre les index du champ visuel et : IAH et la durée du SAOS non-traité
<b>Sergi et al. 2007</b>	Etude cas-témoins 91 patients  51 SAOS 40 témoins  Corrélation de Spearman	Anomalie glaucomeuse du disque optique  Perte de champ visuel  AIC ouvert  PIO<21 mmHg sans traitement	<b>Polysomnographie</b>  SAOS IAH>10	Prévalence GPN chez patients apnéique (5,9%) > prévalence chez témoin (0%)  Ratio cup to disk semblable entre les 2 groupes  Chez patients apnéique : IAH et PIO supérieur aux valeurs du groupe témoin, champ visuel et épaisseur RNFL inférieurs aux valeurs du groupe témoin.  Corrélation positive entre IAH et PIO, altération du champ visuel, ratio cup/disk et l'épaisseur moyenne RNFL
<b>Bendel et al. 2008</b>	Etude transversale 115 patients SAOS  Test de Kendall	GPAO : PPP's definition	<b>Polysomnographie</b>  SAOS IAH >15	Prévalence glaucome chez patients apnéique : 27% (IC 95% 19 - 37) Corrélation positive entre PIO et IMC croissants (p = 0,006) Pas d'association entre IAH et glaucome
<b>Karakucuk et al. 2008</b>	Etude cas-témoin 56 patients 31 SAOS 25 témoins ANOVA	Ratio cup to disk >0,5 et différence 2 yeux > 0,2 Défauts du champ visuel non expliqué par lésion du fond d'oeil  AIC normal PIO > 21 mmHg pour GPAO et < 21 mmHg pour GPN	<b>Polysomnographie</b>  5<IAH<15 : SAOS léger 15<IAH<30 : SAOS modéré IAH>30 : SAOS sévère	Prévalence glaucome chez patients apnéique : 12,9% (4 patients sur 31)  Pas de différence de PIO entre les groupes  Corrélation positive entre PIO et IAH (r = 0,43 ; p = 0,001)
<b>Nowak et al. 2011</b>	Etude cas-témoins 34 SAOS 18 témoins	Hypertension oculaire  Critère glaucome basé sur l'Ocular Hypertension Treatment Study Group (Keltner:2003jy)	<b>Polysomnographie</b>  SAOS IAH>5/h	Prévalence glaucome chez patients apnéique (5,9%) > prévalence chez témoins (0%)
<b>Lin et al. 2011a</b>	Etude prospective 285 patients  247 SAOS 38 témoins  Corrélation de Pearson	Excavation de la papille optique  AIC ouvert  PIO < 21 mmHg (GPN)  Défauts du champ visuel compatible avec glaucome	<b>Polysomnographie</b>  5<IAH<15 : SAOS léger 15<IAH<30 : SAOS modéré IAH>30 : SAOS sévère	Prévalence glaucome chez patients apnéique (5,7%) > prévalence chez témoins (0%)  Prévalence glaucome chez patients apnéique sévères (7,1%) > prévalence chez patients apnéique modérés + témoins  Corrélation positive entre SaO2 moyenne et minimum et l'épaisseur moyenne RNFL chez patients apnéiques (r = 0,138)
<b>Muniesa et al. 2014</b>	Etude transversale 152 patients  75 SAOS + Hyperlaxité Palpébrale (HP) 52 SAOS sans HP 25 témoins  Corrélation de Spearman, ajustement pour âge et IMC	AIC ouvert  Excavation asymétrique de la papille optique + amincissement du bord neurorétinien et/ou hémorragies du disque optique et/ou amincissement RNFL  Défauts du champ visuel compatible avec glaucome  GPAO : PIO>21 mmHg GPN : PIO<22 mmHg	<b>Polysomnographie</b> ou étude cardiorespiratoire nocturne  10<IAH<20 : SAOS léger 20<IAH<30 : SAOS modéré IAH>30 : SAOS sévère	Prévalence glaucome chez patients apnéiques = 12,9%  Prévalence glaucome chez patients apnéiques sans HP (5,3%, IC 95% 1,5 - 13,1) < prévalence glaucome chez patients apnéiques + HP (23,07%, IC 95% 11,2 - 34,9), après ajustement Aucun patient non SAOS ne présentait de glaucome  Absence d'association entre IAH et la présence de glaucome après ajustement Absence de corrélation entre IAH et la PIO, les défauts de champ visuel, et l'épaisseur moyenne de la RNFL

<b>Lin et al. 2013</b>	Etude rétrospective, de cohorte, cas-témoins  7084 patients  1012 SAOS 6072 témoins  Calcul de Hazard Ratio	Exclusion : patients < 40 ans, absence de suivi ophtalmologique, glaucome non traité.	<b>Polysomnographie</b>  Critères classification NC	Incidence GPAO dans les 5 ans suivant le diagnostic de SAOS (11,26 %, IC 95% 8,61 – 14,49) > incidence GPAO dans les 5 ans d'étude chez témoins (6,76 %, IC 95% 5,8 – 7,83)  Risque de diagnostic de GPAO chez patients OSA est augmenté par rapport au témoins (HR = 1,67 ; IC 95% 1,04 – 2,31)
<b>Moghimi et al. 2013</b>	Etude transversale  105 patients  51 SAOS 54 témoins matchés  Régression linéaire	Altérations de la tête du nerf optique (rétrécissement/échancrure focale/diffus de la tête du nerf optique, et/ou hémorragies au sein des fibres optiques)  défauts des fibres optiques rétinienues associés à une altération du champ visuel.	<b>Polysomnographie</b>  5<IAH<15 : SAOS léger 15<IAH<30 : SAOS modéré IAH>30 : SAOS sévère	Prévalence glaucome chez patients apnéiques (3,9%) > prévalence chez témoins (0%)  Corrélation positive entre IAH et PIO ( r = 0,33 ; p = 0,007 après correction de la PIO avec l'épaisseur cornéenne centrale)
<b>Geyer et al. 2003</b>	Etude transversale  228 patients SAOS  Régression multivariée Ajustement IMC	Ratio cup to disk >0,6  Asymétrie cup-disk > 0,3  Perte de champ visuel  AIC ouvert  PIO<21 mmHg sans traitement	<b>Polysomnographie</b>  19 SAOS léger (10<RDI<19) 129 SAOS modéré (20<RDI<39) 80 SAOS sévère (RDI>40)	Prévalence GPAO chez patients apnéique : 2% (5 patients sur 228) = prévalence population caucasienne  Pas d'association entre RDI et : présence de glaucome et PIO
<b>Kadyan et al. 2010</b>	Etude cas-témoins  115 patients  89 SAOS 26 témoins	Ratio cup to disk ≥ 0,6  Différence 2 yeux ≥ 0,3  ± excavation totale ou partielle de la tête du NO ± hémorragies Péripapillaires  PIO > 21 mmHg pour GPAO  AIC ouvert	Oxymétrie transcutanée  5<ODI<15 : SAOS léger 15<ODI<30 : SAOS modéré ODI>30 : SAOS sévère	Prévalence glaucome chez patients apnéique (3,4%) comparable à celle observée dans la population générale (1,7-3%)
<b>Stein et al. 2011</b>	Etude rétrospective, longitudinale de cohorte. 156 336 patients SAOS Régression multivariée, ajustement facteurs confondants	Codes diagnostiques	ND	Prévalence GPAO comparable chez patients apnéique non traités (0,94%), SAOS traités PPC (0,83%) et non SAOS (0,93%).  Prévalence GPN patients non SAOS (0,08%) > prévalence GPN SAOS non traités  Risque de GPAO et GPN non augmenté chez patients apnéiques avec ou sans traitement PPC
<b>Aptel et al. 2014</b>	Etude rétrospective, longitudinale de cohorte  9580 patients  6754 SAOS 330 glaucomes Régression uni et multivariée, ajustement facteurs confondants	Codes diagnostiques	<b>Polysomnographie</b>  SAOS IAH>15 Groupe non-SAOS IAH<15	Prévalence glaucome chez patients apnéiques (3,55%) = témoin (3,14%)  Le SAOS n'influe pas sur le risque de glaucome (univariée : OR = 1,13 ; IC 95% 0,87 – 1,46)  Absence de différence en fonction IAH : IAH 15-30/h (4,95%), IAH 30-50/h (3,79%), IAH >50/h (3,14%)

**Tableau 2 : Prévalence du GPAO chez les patients atteints de SAOS.** Les études suggérant une augmentation de la prévalence du glaucome chez le patient apnéique sont indiquées en gris. Abréviations : GPAO, glaucome primaire à angle ouvert ; GPN, glaucome à pression normale ; SAOS, syndrome d'apnées obstructives du sommeil ; HP, hyperlaxité palpébrale ; IMC, indice de masse corporelle ; AIC, angle irido cornéen ; PPP's, Preferred Practice Pattern's ; RDI, respiratory disturbance index ; ODI, oxygen disturbance index ; IAH, index d'apnée-hypopnée ; PIO, pression intra oculaire ; NC, non connu ; IC 95%, intervalle de confiance à 95% ; OR, odd ratio ; HR, hazard ratio ; PPC, pression positive continue ; NO, nerf optique ; RNFL, couche des fibres optiques rétinienues.

Etude	Méthodologie (1) population	Méthodologie (2)	Evaluation SAOS	Conclusion
<b>Onen et al. 2000</b>	Etude cas-témoins 430 patients 212 GPAO, 218 témoins	Ratio cup to disk >0,5 PIO<21 mmHg sans traitement Champ visuel altéré	Questionnaire semi structuré : NC classification : ronfleur, somnolence diurne excessive et insomnies.	Chez GPAO : Prévalence augmentée pour : ronflement (47,6%), ronflement + somnolence diurne excessive (27,3%) et ronflement + somnolence diurne excessive + insomnies (14,6%)
<b>Mojon et al. 2000</b>	30 patients GPAO	Ratio cup to disk >0,5 PIO<21 mmHg sans traitement Champ visuel altéré	Oxymétrie transcutanée SAOS ODI≥20	Prévalence SAOS chez patients GPAO (20%) > prévalence chez témoin (11%)
<b>Marcus et al. 2001</b>	Etude cas-témoins 67 patients 23 GPN 14 suspects de GPN 30 témoins	Anomalie du disque optique unilatérale ou bilatérale + défauts du champ visuel caractéristiques du glaucome PIO<24 mmHg	Historique nocturne ± <b>Polysomnographie</b> Pas de classification, critères ND	57% des patients GPN et 43% des suspects GPN et 3% des témoins rapportent des troubles du sommeil 7 patients GPN sur 9 et 4 patients suspects GPN sur 4 ont été diagnostiqués SAOS par polysomnographie
<b>Mojon et al. 2002</b>	16 patients GPN	Ratio cup to disk >0,5 PIO<21 mmHg sans traitement Champ visuel altéré	<b>Polysomnographie</b> 10>RDI : non SAOS 10<RDI<20 : SAOS léger 20<RDI<40 : SAOS modéré RDI>40 : SAOS sévère	Prévalence SAOS chez patients GPN: 44% En fonction de l'âge : <45 ans : 0% 45-64 ans : 50% >64 ans : 63%
<b>BlumenOhana et al. 2010</b>	Etude prospective unicentrique 62 patients 31 Glaucome : 25 GPAO 6 GPN + ronflements		<b>Polysomnographie</b> SAOS IAH>10 SAOS sévère IAH>30	Prévalence du SAOS :49% Prévalence du SAOS dorsal uniquement : 16%
<b>Bilgin et al. 2014</b>	Etude prospective 48 patients 24 GPN, 24 témoins appariés	idem	<b>Polysomnographie</b> SAOS IAH>20	Prévalence SAOS chez patients GPN (41,7%) > prévalence chez témoin (12,5%) Risque relatif (RR) pour le SAOS est augmenté chez patient GPN par rapport au groupe témoin (RR = 3,34)
<b>Girkin et al. 2006</b>	Etude rétrospective, cas-témoins 7334 patients 667 glaucomes 6667 témoins Régression multivariée ajustement facteurs confondants	Codes diagnostiques	ND	Absence d'association significative entre SAOS et glaucome (OR = 1,8 ; IC95% 0,76 - 4,23)
<b>GutierrezDiaz et al. 2012</b>	Etude transversale 20 patients 10 SAOS 10 SAOS + GPN Corrélation de Spearman	Ratio cup to disk >0,5 Différence 2 yeux > 0,2 Perte de champ visuel AIC ouvert PIO<21 mmHg sans traitement	<b>Polysomnographie</b> 5<IAH<15 : SAOS léger 15<IAH<30 : SAOS modéré IAH>30 : SAOS sévère	PEVm : 40% erreur chez SAOS et 90% d'erreur chez SAOS+ GPN Altération PEVm : 60% yeux chez SAOS et 100% yeux chez SAOS + GPN <b>SAOS non-GPN :</b> Association des amplitudes/latences PEVm avec PA systolique, SaO2 moyenne et temps passé < 90% SaO2 <b>SAOS + GPN :</b> association entre amplitudes /latences PEVm et IAH

**Tableau 3 : Prévalence du SAOS chez patients atteints de Glaucome.** Les études suggérant une augmentation de la prévalence du SAOS chez le patient atteint de GPAO et/ou GPN sont indiquées en gris. Abréviations : GPAO, glaucome primaire à angle ouvert ; GPN, glaucome à pression normale ; SAOS, syndrome d'apnées obstructives du sommeil ; IMC, indice de masse corporelle ; AIC, angle irido cornéen ; RDI, respiratory disturbance index ; ODI, oxygen disturbance index ; IAH, index d'apnée-hypopnée ; PIO, pression intra oculaire ; NC, non connu ; IC 95%, intervalle de confiance à 95% ; OR, odd ratio ; HR, hazard ratio ; RR, risque relatif ; PPC, pression positive continue ; NO, nerf optique ; RNFL, couche des fibres optiques rétiniennes ; PEVm, potentiels évoqués visuels multifocaux.





### 1.3.3 Glaucome et syndrome d'apnées obstructives du sommeil : aspects physiopathologiques

Plusieurs hypothèses sont actuellement avancées pour étudier le rôle du SAOS dans l'apparition de la neuropathie glaucomateuse :

- atteintes vasculaires du nerf optique : comme développé dans le chapitre 1 ci-dessus, la relation entre SAOS et neuropathie optique/glaucome pourrait s'expliquer par une dysrégulation de la vascularisation du nerf optique (atteinte de l'autorégulation) secondaire à des apnées répétées (hypoxie prolongée et répétée), l'hypertension artérielle et l'artériosclérose induites par le SAOS, le déséquilibre entre stimuli vasodilatateurs (monoxyde d'azote) et vasoconstricteurs (endothéline-1), l'agrégation plaquettaire anormale et l'augmentation de la pression intracrânienne.
- rôle de la PIO: le SAOS ainsi que le traitement du SAOS par PPC semblent pouvoir modifier la PIO ainsi que les rythmes nyctéméraux de la PIO.

Un résumé des études évaluant l'effet potentiel du SAOS sur la PIO ou sur les rythmes nyctéméraux de la PIO est proposé dans le tableau 4 ci-dessous. Les résultats de l'évaluation de la PIO chez les patients apnéiques sont également contradictoires. Les trois études ayant exclus les patients avec une PIO > 21 mmHg ne sont pas en accord : deux études rapportent une augmentation significative de la PIO chez les patients apnéiques (Sergi et al. 2007 ; Huseyinoglu et al. 2014) alors que la dernière ne montre pas de différence de PIO entre les patients apnéiques et les témoins non apnéiques (Lin et al. 2011a). De plus seule l'étude de Sergi et al. montre une corrélation entre la sévérité du SAOS (IAH) et la PIO.

Parmi les études qui n'ont pas exclu les PIO > 21 mmHg et ont comparé la PIO entre les patients apnéiques et les cas témoins, deux études retrouvent une augmentation significative de la PIO chez les patients apnéiques (Moghimi et al. 2013 ; Lin et al. 2011b) alors que les deux autres études ne montrent pas de différence de PIO entre ces deux populations (Nowak et al. 2011 ; Karakucuk et al. 2008). Les corrélations entre l'IAH et la PIO sont également discutables.

Etude	Nombre de sujets	Mesure PIO	Exclusion des PIO>21 mmHg	PIO SAOS > PIO témoins	Corrélation
Mojon et al. 1999	69 SAOS	Applanation	Non	NC	+ entre PIO et RDI
Geyer et al. 2003	228 SAOS	Applanation	Non	NC	Pas de corrélation entre PIO et RDI
Sergi et al. 2007	51 SAOS et 40 témoins	Applanation (Goldmann)	Oui	Oui	+ entre PIO et IAH
Karakucuk et al. 2008	31 SAOS et 25 témoins	NC	Non	Non SAOS modéré > SAOS sévère	+ entre PIO et IAH
Bendel et al. 2008	100 SAOS	NC	Non	NC	Pas de corrélation entre PIO et IAH
Nowak et al. 2011	34 SAOS et 19 témoins	Applanation	Non	Non	ND
Lin et al. 2011a	209 SAOS et 38 témoins	Applanation (Perkins)	Oui	Non	Pas de corrélation entre PIO et IAH
Lin et al. 2011b	105 SAOS et 22 témoins	Applanation (Perkins)	Non	Oui	Pas de corrélation entre PIO et épaisseur RNFL
Moghimi et al. 2013	51 SAOS	Applanation (Goldmann)	Non	Oui	+ entre PIO et IAH
Huseyinoglu et al. 2014	101 SAOS et 20 témoins	Applanation (Goldmann)	Oui	Oui	Pas de corrélation entre PIO et IAH ou épaisseur RNFL
Shiba et al. 2014	214 SAOS	Applanation	Non	NC	+ entre PIO et épaisseur RNFL nasale
Muniesa et al. 2014	127 SAOS et 25 témoins	Applanation (Goldmann)	Non	NC	Pas de corrélation entre PIO et IAH

#### **Tableau 4 : Etude de la pression intraoculaire chez les patients apnéiques.**

Abréviations : SAOS, syndrome d'apnées obstructives du sommeil ; RDI, respiratory disturbance index ; IAH, index d'apnée-hypopnée ; PIO, pression intra oculaire ; NC, non connu ; RNFL, couche des fibres optiques rétinienne.

Concernant les rythmes nyctéméraux de la PIO chez les sujets avec SAOS, Pepin et Chiquet (Pépin et al. 2010) ont analysé la variation horaire de la PIO sur 24 heures chez 18 patients apnéiques (IAH  $\geq$  15/h). Seulement 28% des patients SAOS présentaient un rythme circadien normal de la PIO (acrophase nocturne), les autres patients présentant soit une absence de rythme circadien (50%), soit un rythme diurne (acrophase diurne, 22%). En ce qui concerne la PPO, un rythme nocturne normal était le plus souvent rencontré (78%), alors qu'une absence de rythme était retrouvée dans 22% des cas. Cette absence ou inversion de rythme circadien de la PIO pourrait s'expliquer par une réduction du sommeil paradoxal chez les patients apnéiques, sommeil qui a été associé chez les individus sains avec les plus haute valeur de PIO (Buguet et al. 1994 ; Noël et al. 2001). Des données très récentes de notre équipe sur l'évolution de PIO nocturne chez des individus sains, mesurée par lentille de contact capteur (Sensimed®) et donc sans réveil des individus, ne sont pas en accord avec les résultats précédents. Pendant la période nocturne, la PIO est plus faible au cours de l'éveil que pendant la phase de

sommeil paradoxal et les phases 1, 2 et 3 du sommeil sans mouvements oculaires rapides. Au cours des différents stades du sommeil, la PIO est plus élevée pendant le sommeil paradoxal et diminue progressivement avec la progression du sommeil lent (Aptel et al. 2015b).

D'autres mécanismes sont avancés pour expliquer ces observations. Notamment, la déshydratation associée à l'augmentation de la diurèse nocturne chez les patients apnéiques pourrait être liée à l'élévation du peptide natriurétique atrial sanguin. Ces paramètres sont connus pour diminuer la PIO chez l'homme sain (Kita et al. 1998).

Lors d'apnées obstructives simulées chez 7 patients sains, la pression intrathoracique négative associée aux efforts inspiratoires a été reproduite par la manœuvre de Mueller (Lundmark et al. 2003). Cette étude a permis de mettre en évidence une diminution significative de la PIO durant les efforts respiratoires mimant l'apnée. La diminution de PIO était d'autant plus forte que la pression négative infligée, c'est à dire l'effort respiratoire, était importante. Les auteurs attribuent cette réponse à une augmentation du retour veineux vers le cœur (Magder et al. 1983). Cette augmentation du retour veineux entraînerait une réduction de la pression veineuse épisclérale, diminuant ainsi la résistance au flux sortant d'humeur aqueuse et menant à une baisse de PIO. Ainsi la diminution de PIO observée lors d'efforts inspiratoires simulés pourrait possiblement impliquée dans la disparition de l'acrophase nocturne de PIO observée chez les patients apnéiques Cette étude montre que les variations brusques de PIO de l'ordre de -4 à -33% existent lors de chaque apnée (apnée simulée avec une pression négative de -40 mmHg). Certaines études ont montré que ces fluctuations importantes de la PIO pouvaient être un facteur de risque d'aggravation d'un glaucome (Asrani et al. 2000 ; Bengtsson & Heijl 2005).

Des études se sont également intéressées à l'effet de la PPC sur la PIO ou sur les rythmes nyctéméraux de la PIO. A contrario, aucune étude longitudinale randomisée n'a évalué l'effet de la PPC sur l'évolution du glaucome chez les patients apnéiques. L'effet de la PPC sur les variations journalières de PIO a été rapporté chez 21 patients apnéiques (Kiekens et al. 2008), le traitement par PPC entraînant une augmentation globale de la PIO nocturne. Dans notre expérience (Pépin et al. 2010), la PPC entraîne une

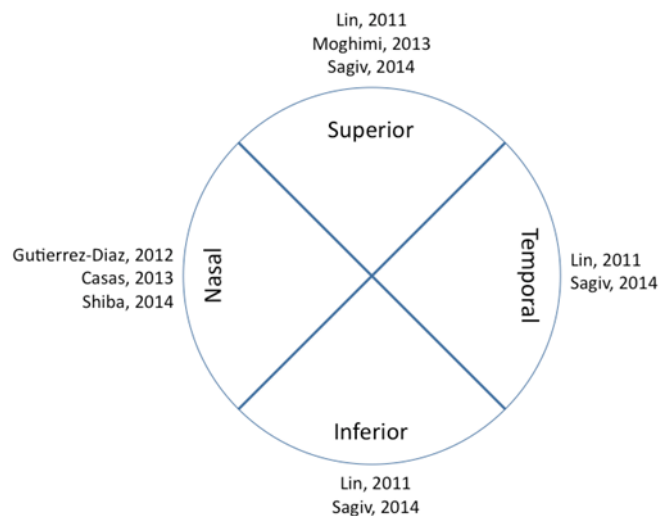
augmentation du pic nocturne de PIO (de 14,8 à 18,3 mmHg) et une normalisation du rythme circadien de PIO. Le rétablissement du rythme normal de la PIO après une seule nuit de PPC suggère l'effet direct des efforts inspiratoires nocturnes sur la diminution de PIO observées chez les patients apnéiques (Pépin et al. 2010) et chez les volontaires sains lors de la manœuvre de Mueller (Lundmark et al. 2003). A ce jour aucune étude longitudinale sur un grand nombre de sujets n'a évalué l'effet à long terme du traitement par PPC chez les patients apnéiques atteints de glaucome/GPAO. . Les descriptions de la littérature (case reports) (Sebastian et al. 2006 ; Kremmer et al. 2003) ne permettent pas d'évaluer l'effet de la PPC.

## **1.4 Autres Neuropathies optiques**

### **1.4.1 Evaluation de l'épaisseur de la couche des fibres nerveuses rétiniennes chez le patient apnéique**

L'utilisation de la tomographie en cohérence optique (OCT), technique d'imagerie oculaire non-invasive récente, chez les patients glaucomateux permet de mettre en évidence et de quantifier la diminution de l'épaisseur la couche des fibres optiques (RNFL, retinal nerve fiber layer) associée à l'élargissement de l'excavation du nerf optique (Lee et al. 1999). Cette diminution de l'épaisseur des fibres nerveuses rétiniennes, mesurée en OCT, correspond à une perte des cellules ganglionnaires de la rétine et notamment de leurs axones et précède les déficits visuels détectables (Alasil et al. 2014 ; Quigley et al. 1992). Il a ainsi été montré qu'un patient glaucomateux pouvait perdre 40% de ses cellules ganglionnaires rétiniennes avant l'apparition de déficits du champ visuel (Quigley et al. 1989). De ce fait, l'évaluation de l'épaisseur de la RNFL a pris une place importante dans le diagnostic précoce et le suivi des glaucomes débutants. Il faut néanmoins noter qu'une diminution isolée de l'épaisseur de la couche des fibres optiques n'est pas suffisante pour porter le diagnostic de glaucome, celui-ci étant généralement posé lors de la mise en évidence d'altérations caractéristiques de la tête du nerf optique constatées lors de l'examen du fond d'œil, souvent associées à des anomalies correspondantes du champ visuel.

En complément des études épidémiologiques sur la relation SAOS-glaucome, plusieurs études ont évalué l'épaisseur de la RNFL chez le patient SAOS. Les caractéristiques de ces études sont résumées dans le tableau 5. Les résultats de ces études concordent à montrer que les patients SAOS exempts de signes associés de neuropathie optique (notamment glaucomateuse) présentent souvent une diminution significative de l'épaisseur de la RNFL moyenne ou localisée à certains quadrants rétiniens. La sévérité du SAOS est notamment corrélée à une plus forte diminution de l'épaisseur de la RNFL dans certaines études (Shiba et al. 2014 ; Kargi et al. 2005 ; Huseyinoglu et al. 2014 ; Lin et al. 2011b). Plusieurs travaux rapportent une corrélation négative entre l'épaisseur de la RNFL et l'IAH (Shiba et al. 2014 ; Huseyinoglu et al. 2014 ; Kargi et al. 2005 ; Lin et al. 2011b) ou la SaO<sub>2</sub> minimale (Lin et al. 2011b). Concernant la localisation des diminutions significatives de l'épaisseur de la RNFL, les données ne montrent pas d'atteinte préférentielle d'un des quadrants rétiniens péri-papillaires (figure 6).



**Figure 9 : Localisation des atteintes significatives de l'épaisseur de la couche des fibres nerveuses rétiniennes décrites dans la littérature.** Diagramme représentant les 4 quadrants rétiniens péri-papillaires et les données correspondantes à chaque quadrant.

Ces résultats suggèrent un effet du SAOS sur l'épaisseur de la RNFL. Cette réduction pourrait être associée à une neuropathie glaucomateuse débutante c'est à dire à une atteinte structurelle des axones au sein de la RNFL précédant les autres signes de glaucome (excavation de la papille, déficits du champ visuel), ou à une atteinte directe des cellules ganglionnaires rétiniennes entraînant ensuite la disparition des axones. En particulier l'augmentation de l'endothéline 1 et du stress oxydant associé au SAOS pourrait avoir un impact sur les cellules ganglionnaires. Notamment L'ET-1 favorise le développement de la réaction astrogliale (Prasanna et al. 2002) et la mort des cellules ganglionnaires de la rétine par stimulation directe (Chauhan et al. 2004) (Krishnamoorthy et al. 2008) ou par perturbation du transport axonal au sein du nerf optique (Stokely et al. 2002).

Etude	Méthodologie (1) population	Evaluation SAOS	Méthodologie (2) Critères d'exclusion	Examens	Conclusion
<b>Casas et al. 2013</b>	Etude prospective cas-témoins monocentrique  83 patients  50 SAOS (96 yeux) 33 témoins (64 yeux) matchés pour l'âge  Corrélation de Pearson	<b>Polysomnographie</b>  SAOS IAH > 4	Traitement antiglaucomeux, trauma/chirurgie oculaire, uvéite chronique Défauts champ visuel compatible avec glaucome, PIO>21 mmHg, Pathologies du pôle postérieur, opacification des milieux	Champ Visuel (CV) OCT (épaisseur RNFL)	Chez SAOS : altération significative des paramètres du CV, du VIRA ( <i>Vertical integrated rim area</i> ), du HIRW ( <i>horizontal integrated rim width</i> ) et de l'aire du disque optique  SAOS sévères associés à aire du disque optique augmentée par rapport aux témoins SAOS modérés : épaisseur de la macula temporale plus importante que chez SAOS sévères  Pas de différence dans la RNFL péripapillaire entre les groupes  Absence de corrélation entre IAH et les variables du CV et de la RNFL étudiées.
<b>Sagiv et al. 2014</b>	Etude prospective cas-témoins monocentrique  216 patients  108 SAOS (62 modérés, 46 sévères) 108 témoins  Régression linéaire (ajustement âge et genre) Corrélation de Pearson	<b>Polysomnographie</b>  SAOS RDI>10 SAOS modéré : 20<RDI<39 SAOS sévère : RDI>40	Acuité visuelle <6/12 PIO>21 mmHg, AIC anormal Anomalie du fond d'oeil évocatrice de glaucome Maladie oculaire déjà présente	OCT (épaisseur RNFL)	Epaisseur RNFL moyenne, du quadrant supérieur, inférieur et temporal significativement diminuées chez SAOS Pas de différences entre SAOS modérés et sévères  <u>Corrélations</u> de Pearson:  Négative entre âge et épaisseur RNFL moyenne dans groupe SAOS ( $r = -0,27$ ; $p = 0,004$ ) et témoin ( $r = -0,3$ ; $p = 0,001$ ) Positive entre RDI et épaisseur RNFL du quadrant inférieur chez SAOS ( $r = 0,2$ ; $p = 0,04$ ) Positive entre épaisseur RNFL des 4 quadrants et IMC chez SAOS  <u>Régression linéaire</u> :  L'épaisseur RNFL moyenne est diminuée de 4,2 $\mu\text{m}$ (IC95% -6,97 à -1,43) dans le groupe SAOS comparé au groupe contrôle.
<b>Shiba et al. 2014</b>	Etude prospective  124 patients SAOS  Corrélation de Pearson Régression multivariée	<b>Polysomnographie</b>  IAH<15 : SAOS absent à léger 15<IAH<30 : SAOS modéré IAH>30 : SAOS sévère	Apnée centrale, glaucome, uvéite chronique, neuropathie optique, maladie vasculaire rétinienne ou choroïdienne	Mesure épaisseur intima média carotidienne (US haute résolution) OCT (épaisseur RNFL)	Epaisseur RNFL nasale diminue significativement et graduellement en fonction de la sévérité du SAOS  Régression multiple : L'IAH est un facteur indépendant de variation de l'épaisseur RNFL (Pearson, $r = -0,24$ ; $p = 0,03$ et analyse multivariée, $r = -0,3$ ; $p = 0,007$ )
<b>Huseyinoglu et al. 2014</b>	Etude prospective  121 patients  101 SAOS 20 témoins  Corrélation de Spearman	<b>Polysomnographie</b>  5<IAH<15 : SAOS léger 15<IAH<30 : SAOS modéré IAH>30 : SAOS sévère	Glaucome, uvéite chronique, neuropathie optique, rétinite pigmentaire, trauma/chirurgie oculaire, sclérose multiple, maladie de Parkinson, infarctus. PIO>21 mmHg, Acuité visuelle <20/40	Champ visuel OCT (épaisseur RNFL)	BMI et PIO sont significativement augmentés dans groupe SAOS Epaisseur RNFL moyenne chez SAOS sévères plus faible que dans les autres groupes  Corrélation négative entre IAH et épaisseur RNFL ( $r = -0,33$ ; $p < 0,001$ ) et positive entre RNFL et SaO2 minimale ( $r = 0,16$ ; $p < 0,05$ )
<b>Moghimi et al. 2013</b>	Etude prospective transversale  105 patients  51 SAOS 54 témoins matchés  Régression linéaire	<b>Polysomnographie</b>  5<IAH<15 : SAOS léger 15<IAH<30 : SAOS modéré IAH>30 : SAOS sévère	neuropathie optique, NOIAA, anomalie du disque optique, uvéite chronique	Champ visuel Scanning laser polarimetry (épaisseur RNFL) Epaisseur cornéenne centrale (ECC)	Diminution significative des paramètres <i>DISK</i> , <i>superior average</i> et <i>nerve fiber indicator</i> dans le groupe SAOS  Corrélation positive entre IAH et PIO ( $r = 0,33$ ; $p = 0,007$ après correction de la PIO avec l'épaisseur cornéenne centrale)

<b>Kargi et al. 2005</b>	Etude prospective 54 patients  34 patients SAOS 20 témoins  Corrélation de Pearson	Polygraphie 6<IAH<20 : SAOS léger IAH>20 : SAOS sévère	Glaucome Acuité visuelle <6/6 PIO>21 mmHg, trauma oculaire Autres maladies systémiques	Champ visuel Scanning laser polarimetry (épaisseur RNFL)	Diminution de tous les paramètres de mesure de l'épaisseur RNFL chez les SAOS sévères, et de quelques paramètres chez les SAOS légers ( <i>symmetry, superior ratio et maximum modulation</i> ) Corrélation forte entre IAH et diminution de l'épaisseur RNFL (r = 0,78 ; p = 0,01)
<b>Lin et al. 2011b</b>	Etude prospective  127 patients SAOS 22 témoins (IAH<5)  Corrélation de Pearson	<b>Polysomnographie</b>  5<IAH<15 : SAOS léger 15<IAH<30 : SAOS modéré IAH>30 : SAOS sévère	Glaucome, chirurgie/trauma oculaire, uvéite chronique	Champ visuel OCT (épaisseur RNFL)	PIO plus haute dans le groupe SAOS modérés + sévères par rapport au groupe témoins + SAOS légers  Epaisseur RNFL moyenne dans les quadrants inférieurs, supérieurs et temporal est diminuée dans le groupe SAOS modérés + sévères  <u>SAOS modérés + sévères :</u>  Corrélation significative négative entre IAH et épaisseur RNFL dans les quadrants supérieur (r = -0,22 ; p = 0,01) et nasal (r = -0,17 ; p = 0,04) Absence de corrélation entre la PIO et épaisseur RNFL Corrélation positive entre la SaO <sub>2</sub> minimale et l'épaisseur RNFL moyenne dans les quadrants supérieur (r = 0,2 ; p = 0,02) et nasal (r = 0,16 ; p = 0,007)
<b>Gutierrez Diaz et al.2012</b>	Observationnelle cross-sectionnelle  20 patients  10 SAOS 10 SAOS+ GPN	<b>Polysomnographie</b>  5<IAH<15 : SAOS léger 15<IAH<30 : SAOS modéré IAH>30 : SAOS sévère		OCT (épaisseur RNFL)- Champ visuel Humphrey PEVm	Diminution significative de l'épaisseur RNFL chez SAOS+ NTG et chez SAOS  <u>SAOS non-GPN :</u> Corrélation positive entre épaisseur RNFL et efficacité du sommeil (r = 0,76 ; p = 0,03) et SaO <sub>2</sub> moyenne (r = 0,68 ; p = 0,03)  <u>SAOS + GPN:</u> Corrélation positive entre épaisseur RNFL et efficacité du sommeil et SaO <sub>2</sub> moyenne, IAH, temps passé < 90% SaO <sub>2</sub> PA systolique

**Tableau 5 : Etude de l'épaisseur de la couche des fibres optiques chez les patients SAOS.** Abréviations : GPAO, glaucome primaire à angle ouvert ; GPN, glaucome à pression normale ; SAOS, syndrome d'apnées obstructives du sommeil ; RDI, respiratory disturbance index ; IAH, index d'apnée-hypopnée ; PIO, pression intra oculaire ; RNFL, couche des fibres optiques rétinienne ; OCT, tomographie en cohérence optique ; IMC, indice de masse corporelle ; ECC, épaisseur cornéenne centrale ; CV, champ visuel ; US, ultrason ; PEVm, potentiel évoqués visuels moyens ; SaO<sub>2</sub>, saturation artérielle en oxygène ; PA, pression artérielle.



#### 1.4.2 HTIC et œdème papillaire

La perte de la fonction visuelle liée à l'œdème papillaire est considérée comme l'une des plus graves complications de l'hypertension intracrânienne. Actuellement deux théories sont avancées pour expliquer par quel mécanisme l'HTIC entraîne l'apparition d'œdème papillaire. La théorie mécanique postule qu'une PIC élevée entraîne une compression directe des axones du nerf optique au niveau de la lame criblée (Trobe 2011). La théorie ischémique postule que la PIC élevée provoque une diminution de la perfusion vasculaire du nerf optique. L'augmentation de la pression dans l'espace subarachnoïdien comprime la circulation ciliaire et réduit l'apport sanguin vers la région laminaire du nerf optique, en interférant avec le flux sanguin choroïdien. Cette ischémie chronique altère le métabolisme lié au flux axoplasmique, avec accumulation locale de métabolites toxiques (Killer et al. 2009). Il est très probable qu'une association de ces facteurs tels que pression du LCS, la PIO et la PA systémique soit impliquée (Hayreh 1977).

Au regard de la relation entre l'œdème papillaire et l'HTIC, des altérations de la PIC, de la pression du LCS et de la PA systémique associées au SAOS, la suspicion d'un risque d'œdème papillaire chez les patients atteints de SAOS semble légitime. De plus, l'obésité, facteur de risque connu pour l'œdème papillaire (Johnson et al. 1998), est une condition les plus fréquemment rencontrée chez les patients SAOS. Plusieurs rapports de cas cliniques ont abordés l'association de l'œdème papillaire au SAOS (Bucci et al. 1988 ; Purvin et al. 2000 ; Quinn et al. 2008). La mesure de la PIC nocturne révèle des variations cycliques associées aux apnées (Purvin et al. 2000 ; Jennum 1989).

Seulement deux études ont analysé la prévalence de l'œdème papillaire chez les patients apnéiques (Peter et al. 2007 ; Fraser et al. 2013). Sur 162 patients atteints de SAOS inclus dans ces deux études, aucun œdème papillaire n'a été diagnostiqué après examen du fond d'œil. Des études à plus grande échelle sont nécessaires afin de confirmer ces résultats et permettre de conclure sur le lien entre SAOS et œdème papillaire. Il doit notamment être noté qu'aucune étude cas-témoin comparant des patients apnéiques et des sujets appariés pour différents facteurs – et notamment les caractéristiques morphologiques – ne prouve à ce jour formellement que le risque d'œdème papillaire soit accru en cas de SAOS.

## 1.5 Affections rétinienne

### 1.5.1 Rétinopathie diabétique

La rétinopathie diabétique (RD) est la complication microvasculaire du diabète la plus fréquente dans la population mondiale et constitue une cause majeure de perte visuelle. On estime actuellement la prévalence de la RD, de sa forme proliférative (RDP) et de l'œdème maculaire diabétique à 34,6%, 7% et 6,8 % (Zheng et al. 2012 ; Yau et al. 2012). Les facteurs de risque de la RD classiquement reconnus sont l'hypertension artérielle, l'hyperglycémie et la durée du diabète. Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'apparition de la RD incluent l'augmentation du stress oxydant et de l'inflammation associée à l'activation de certains facteurs comme VEGF, TNF $\alpha$  et insulin-like growth factor (Sang et al. 2008).

Les altérations du métabolisme du glucose et le risque accru de développer un DT2 associé au SAOS indépendamment du facteur obésité (Meslier et al. 2003 ; Tamura et al. 2008 ; Kent et al. 2014) ont conduit plusieurs équipes à s'intéresser à l'impact potentiel du SAOS sur l'évolution de la RD. Un résumé des études épidémiologiques ayant évalué la relation entre le SAOS et la RD est proposé dans le tableau 6 ci-dessous.

Auteur	Méthodologie, population	Evaluation SAOS et diabète	Critères exclusion	Examen ophtalmologique	Résultats
Merritt et al. 2007	Etude prospective 44 patients diabète type 2 23 RD sans menace pour le pronostic visuel 21 RD menaçant le pronostic visuel	SAOS : oxymétrie de pouls (ODI 4%) Diabète : base de données Diabeta 3®	NC	Examen et photographie du fond d'œil	ODI 4% plus élevé chez les patients avec RD menaçant le pronostic visuel (13,55 ± 16,5) par rapport aux patients avec RD sans menace pour le pronostic visuel (3,78 ± 3,1). Les patients du groupe RD menaçant le pronostic visuel passe plus de temps avec une SaO <sub>2</sub> <90% (12,6 ± 18% contre 1,8 ± 2,6%)
Shiba et al. 2009	Etude transversale, cas-témoin 166 patients diabète type 2 116 RDP 48 RDNP Régression multiple	SAOS : oxymétrie de pouls Sleep-disordered breathing diagnosed if ODI4%>5 times/hour Diabète : NC	NC	NC	L'ODI 4% est plus élevé chez patients RDP par rapport aux patients RDNP Diagnostic de SAOS plus fréquent dans le groupe RDP : l'ODI 4% est un facteurs contribuant indépendamment au diagnostic de SAOS (coefficient de régression standard = 0,2, valeur t = 2,15) Pas de différence de SpO <sub>2</sub> moyenne entre les deux groupes
Unver et al. 2009	Etude de cohorte 44 patients diabète type 1 et 2 22 SAOS 22 non SAOS appariés pour l'âge, le poids, la durée d'évolution du diabète	SAOS : questionnaire (Score de Epworth > 10) + polygraphie Diabète : NC	NC	Examen et photographie du fond d'œil + angiographie en fluorescence	RD observée chez tous les patients apnéiques et seulement 5 non SAOS Maculopathie observée chez 20 patients apnéiques et 9 non SAOS Après traitement de l'œdème maculaire par photocoagulation : Pas d'amélioration chez 7 patients apnéiques/7 Amélioration de l'œdème chez 8 patients non SAOS/9
Shiba et al. 2010	Etude transversale comparative 219 patients diabète type 2 151 RDP 68 RDNP Régression logistique	SAOS : oxymétrie de pouls IAH<15 : SAOS absent IAH>15 : SAOS Diabète : NC	NC	NC Dossier médical	Dans le groupe RDNP, l'ODI 4% moyen et le temps cumulé passé <90 % SaO <sub>2</sub> est plus faible et la SpO <sub>2</sub> moyenne minimale est plus élevée que dans le groupe RDP Une valeur élevée de SpO <sub>2</sub> minimale est un facteur protecteur pour la RDP (OR = 0,93; IC 95% 0,88 - 0,99)
Kosseifi et al. 2010	Etude rétrospective 98 patients SAOS et diabète type 2	SAOS : polygraphie à domicile Diabète : NC Inclusion de patients avec Hb glyquée ≤ 6,5 %.	NC	NC	La présence d'anomalies microvasculaires et de rétinopathie est associée avec des IAH plus élevés et désaturation en O <sub>2</sub> plus basse
Borel et al. 2010	Etude prospective 37 patients diabète type 1 non obèses	SAOS : oxymétrie de pouls ± polysomnographie (n = 18) IAH<15 : SAOS absent 15<IAH<30 : SAOS modéré IAH≥30 : SAOS sévère	NC	NC	RD plus fréquente chez les patients présentant une oximétrie nocturne anormale (11 patients, 73%) par rapport au groupe avec oximétrie normale à limite (5 patients, 44%)
West et al. 2010	Etude de cohorte 118 patients	SAOS : oxymétrie de pouls ODI 4% > 10	NC	Photographie du fond d'œil gradation de la RD par 2	Signes de RD plus fréquent dans le groupe SAOS : RD grade 2 : 36% de SAOS contre 4% de non SAOS

	diabètes type 2 24% SAOS 76% non SAOS  Régression multiple	Diabète : database de l'Oxford Center for Diabetes, endocrinology and Metabolism		examineurs indépendants (English National Screening Program for Diabetic retinopathy )	maculopathie : 29% de SAOS contre 4% de non SAOS microanévrismes rétinien : 26% de SAOS contre 8% de non SAOS
Schober et al. 2011	Etude de cohorte  556 patients diabète type 1 (58) diabète type 2 (498)	SAOS : oxymétrie de pouls  IAH<15 : SAOS absent IAH>15 : SAOS modéré à sévère  Diabète : NC	Historique de tumeur maligne, maladie hépatique, maladie endocrinienne, et troubles psychiatriques sous traitement.	NC Dossier médical	Fréquence de RD croissante avec l'augmentation de l'IAH (15 pour IAH<5, 25 pour 5<IAH<14 et 29 pour IAH≥15)  37% de SAOS on pourrait peut être enlever cet article du tableau et juste citer dans notre texte la prévalence du SAOS
Rudrappa et al. 2012	Etude de cohorte  31 diabètes type 2 17 SAOS 16 non SAOS  Régression multiple	SAOS : polygraphie à domicile  IAH<5 : SAOS absent 5<IAH<15 : SAOS léger 15<IAH<30 : SAOS modéré IAH≥30 : SAOS sévère  Diabète : NC	NC	Basé sur le English National Screening Program for Diabetic retinopathy	Le score de RD est plus élevé dans le groupe SAOS (score NC)  Le score de maculopathie n'était pas associé à la présence d'un SAOS
Altaf et al. 2013	Etude observationnelle longitudinale  199 patients diabète type 2  Régression multiple	SAOS : polygraphie à domicile (IAH>5)  Diabète : NC	SAOS connu, insuffisance rénale sévère, et rétinopathie non-diabétique	Photographie du fond d'œil  RD avancée : RDP ou pré-proliférative  RD menaçant le pronostic visuel : RDP ou pré-proliférative, maculopathie ou cicatrices de photocoagulation	Prévalence du SAOS : 62,8%  Indépendamment des autres facteurs de risque, le SAOS est associé à :  - la RD menaçant le pronostic visuel, (OR = 3,7 ; IC 95% 1,6 - 8,9) - la maculopathie diabétique (OR = 4,5 ; IC 95% 1,8 - 11,4) - la RD avancée (OR = 3,9 ; IC 95% 1,02 - 15,3)  Sur un suivi de 4,4±1 an, les patients apnéiques présente un risque supérieur de développement défavorable vers la RD avancée (OR = 6,6 ; IC 95% 1,2 - 35,1)  Le statut SAOS ne prédit pas l'évolution vers la maculopathie diabétique
Manin et al. 2015	Etude transversale multicentrique  67 patients diabète type 1  Régression logistique multivariée	SAOS : polysomnographie ou polygraphie à domicile (13 patients)  10<IAH<30 : SAOS léger à modéré IAH>30 : SAOS sévère  Diabète : paramètres sanguins	NC	Examen et photographie du fond d'œil ± chirurgie rétinienne laser	84% des patients apnéiques+ présente une RD contre seulement 42% des non SAOS  Présence de RD associée à la présence de SAOS (OR = 4,54 ; IC 95% 1,09 - 18,82)
Nishimura et al. 2015	Etude prospective  136 patients diabète type 2 37 RD 99 Non RD  Régression logistique multivariée	SAOS : polygraphie Pas de classification du SAOS  Diabète : glycémie > 126 mg/dl, test de tolérance orale au glucose (> 200 mg/dl), prise de médicaments hypoglycémiant	Insuffisance cardiaque, maladie pulmonaire obstructive chronique, hémodialyse, évaluation de la RD par un ophtalmologiste du site de l'étude	Examen ou photographie du fond d'œil  Non-RD ou RD (proliférative ou non)	Pas de différence de IAH, temps passé <90% SaO <sub>2</sub> , ODI 4% ou 3% entre les groupes présentant une RD ou non RD  La SaO <sub>2</sub> minimale est corrélée avec la présence de RD (OR = 0,89 ; IC 95% 0,83 - 0,95)
Mehta et al. 2012	Etude prospective  80 patients	SAOS : polysomnographie (IAH)	Maladie coronaire, insuffisance cardiaque aigue ou chronique,	Examen du fond d'œil + angiographie en fluorescence	SAOS retrouvé chez 66% des cas de RD, dont 90% des cas de RDP et 50% des cas de RDNP

	diabète type 2 50 RD (30 RDNP et 20 RDP) 30 Non RD  Régression multiple	Diabète : NC	hypothyroïdisme, SAOS associé au diabète connu, maladie respiratoire connue		Sévérité du SAOS (IAH) : Plus élevée chez les patients RD par rapport aux patients non RD Plus élevée chez les patients RDP par rapport aux patients RDNP
Laaban et al. 2009	Etude prospective  303 patients diabète type 2, mal contrôlé	SAOS : polygraphie  5<RDI<15 : SAOS léger 16<RDI<29 : SAOS modéré RDI>30 : SAOS sévère  Diabète : NC	SAOS connu, insuffisance cardiaque, maladie valvulaire sévère, insuffisance rénale sévère et maladie cardiaque ou respiratoire instable	NC Dossier médical	Pas de différence de présence de RD entre les patients apnéiques léger, modéré et sévère et le groupe témoin sans SAOS
Mason et al. 2012a	Etude prospective  80 patients diabète type 2 œdème maculaire diabétique (diagnostic OCT) 1 traitement laser ou plus	SAOS : polygraphie à domicile  Classification du SAOS basé sur IAH et ODI 4%	Apnée centrale ou SAOS connus Insuffisance cardiaque Maladie respiratoire sévère	Photographie du fond d'œil Mesure de l'épaisseur rétinienne maculaire centrale par OCT	Forte prévalence du SAOS chez les patients avec œdème maculaire diabétique : 54% avec ODI 4% ≥ 10 et 31% avec IAH ≥ 15.  Absence de relation entre l'épaisseur rétinienne maculaire et les caractéristiques des apnées (notamment temps passé à une SaO <sub>2</sub> < 90%)  Absence de différences concernant les signes de RD entre le groupe SAOS et le groupe non SAOS
Furukawa et al. 2013	Etude prospective  219 patients diabète type 2  Régression logistique multivariée		NC	Examen et photographie du fond d'œil + angiographie en fluorescence	Absence d'association entre l'HI nocturne et la présence de neuropathie ou RD
Banerjee et al. 2013	Etude de cohorte  93 patients diabète type 2  Régression logistique multivariée	SAOS : polygraphie à domicile  IAH<15 : SAOS absent IAH>15 : SAOS  Diabète : NC	NC	Basé sur le English National Screening Program for Diabetic retinopathy	Pas de différence significative entre SAOS et non-SAOS chez les patients avec rétinopathie diabétique ou maculopathie diabétique.  Absence d'association entre RD ou MD et IAH, SaO <sub>2</sub> moyenne et temps passé <90% SaO <sub>2</sub>  Seule la SaO <sub>2</sub> minimale est un facteur prédicteur de maculopathie diabétique (OR = 0,79 ; IC 95% 0,65 - 0,95)

**Tableau 6 : études épidémiologiques évaluant les relations entre SAOS et rétinopathie diabétique.** Les études suggérant une relation positive entre SAOS et rétinopathie diabétique sont indiquées en gris. Abréviations : SAOS, syndrome d'apnées obstructives du sommeil ; RD, rétinopathie diabétique ; MD, maculopathie diabétique ; RDP, rétinopathie diabétique proliférante ; RDNP, rétinopathie diabétique non proliférante ; ODI, oxygen disturbance index ; IAH, index d'apnée-hypopnée ; Hb, hémoglobine ; NC, non connu ; OCT, Tomographie en cohérence optique ; IC 95%, intervalle de confiance à 95% ; OR, odd ratio ; O<sub>2</sub>, oxygène ; SpO<sub>2</sub>, saturation pulsée en oxygène ; SaO<sub>2</sub>, saturation artérielle en oxygène.

Quatre types d'études suggèrent une relation entre rétinopathie diabétique et SAOS.

**(1) les études de prévalence du SAOS chez les patients diabétiques développant une rétinopathie diabétique :** 11 études épidémiologiques sur 15 suggèrent que le SAOS est associé à une plus grande fréquence d'anomalies microvasculaires (Kosseifi et al. 2010 ; West et al. 2010), de rétinopathie (West et al. 2010 ; Rudrappa et al. 2012 ; Manin et al. 2015) ou de maculopathie diabétique (West et al. 2010). D'autres études montrent que la SO<sub>2</sub> est associée de façon indépendante avec la présence d'une RD (Nishimura et al. 2015 ; Shiba et al. 2009). Les résultats semblent donc montrer que la RD est plus fréquemment observée chez les patients atteints de DT2 et de SAOS par rapport aux patients DT2 non apnéiques (West et al. 2010 ; Borel et al. 2010 ; Altaf et al. 2013).

Parmi les 4 études ne suggérant pas cette association, une ne rapporte pas de différence de prévalence de RD entre le groupe apnéique (39%) et le groupe non apnéique (38%) (Banerjee et al. 2013). Une autre étude ne met pas en évidence de différence de prévalence de la RD entre les patients atteints de SAOS léger (48%), modéré (53%), sévère (68%) et non apnéiques (66%) (Laaban et al. 2009). De plus, aucune relation entre les apnées nocturnes et la présence de RD n'a été objectivée au sein de 219 patients DT2 (Furukawa et al. 2013). Enfin, la dernière étude ne montre pas de relation entre l'épaisseur rétinienne maculaire centrale (mesurée par OCT) et la sévérité du SAOS chez des patients atteints d'œdème maculaire diabétique (Mason et al. 2012a).

**(2) Une seule étude longitudinale** a pour l'instant étudié le rôle du SAOS dans l'apparition et la progression de la RD (Altaf et al. 2013). Cette étude rapporte une plus forte prévalence de la RD évoluée menaçant le pronostic visuel chez les patients apnéiques atteints de DT2 (48,8%) par rapport aux non apnéiques (21,6%). Le suivi des patients sur une période d'environ 5 ans a également montré que les patients atteints de SAOS présentaient une évolution plus fréquente vers des stades plus avancés de RD (15,3%) comparativement au groupe non-SAOS (3%).

**(3) Les études rapportant l'effet de la sévérité du SAOS sur la rétinopathie diabétique :** 3 études montrent que la fréquence de la RD augmente avec la sévérité du

SAOS (Schober et al. 2011 ; Mehta et al. 2012 ; Kousseifi et al. 2010) alors qu'une étude ne rapporte pas de corrélation (Laaban et al. 2009).

**(4) Une étude rapporte l'effet du traitement par PPC sur l'évolution des RD chez 35 patients apnéiques et diabétiques** (Mason et al. 2012b) : une bonne observance du traitement par PPC était associée à une amélioration du champ visuel après 6 mois de traitement, supérieure à celle observée chez les patients peu observants. Néanmoins, aucune étude longitudinale randomisée n'a évalué l'effet de la PPC sur l'évolution de la RD chez les patients apnéiques et diabétiques.

Une méta-analyse récente (Leong et al. 2015) suggère que le SAOS est associé à un stade plus avancé de rétinopathie diabétique chez les patients atteints de DT2, et que la SaO<sub>2</sub> minimale est associée à la maculopathie (adjusted OR 0,79 ; IC 95% 0,65 – 0,95) et la rétinopathie diabétique (pooled OR = 0,91 ; IC 95% 0,87–0,95 ; I<sup>2</sup> = 0%). Cette analyse met l'accent sur les faiblesses des études citées ci-dessus, qui résident principalement dans l'hétérogénéité des méthodes de diagnostic et des critères de définition du SAOS, la variabilité des critères et des méthodes de diagnostic de la RD ou encore dans le biais de sélection des patients inclus dans les études. Ainsi, les auteurs insistent sur l'importance de rapporter les appareils utilisés pour l'évaluation du sommeil, la définition des apnées et hypopnées, ainsi que les critères utilisés pour définir le SAOS. De même, une analyse en aveugle des études du sommeil et des signes de rétinopathie est un critère important renforçant la portée de l'étude.

Il est intéressant de noter que les deux seules études obtenant une note de qualité globale maximale ne sont pas en accord concernant la relation entre le SAOS et la RD (Banerjee et al. 2013 ; West et al. 2010).

### 1.5.2 Occlusions veineuses rétiniennes

La physiopathologie de l'Occlusion Veineuse Rétinienne (OVR) est complexe et multifactorielle. Elle est souvent schématisée par la triade de Virchow, comprenant les anomalies de la paroi vasculaire (dysfonction endothéliale), celles du contenu vasculaire (hypercoagulabilité) et les anomalies hémodynamiques (Rehak et al. 2010). Les facteurs de risque actuellement reconnus sont l'âge, l'hypertension artérielle, l'hyperlipidémie, le

glaucome, le diabète et les facteurs de risque associé à l'athérosclérose (Rogers et al. 2010 ; O'Mahoney et al. 2008 ; Chou et al. 2012) L'analyse du score de Framingham sur 10 ans chez les patients atteints d'OVR montrent un risque plus important chez ces patients de développer une maladie cardiovasculaire (Khan et al. 2013). Au regard des conséquences cardiovasculaires et métaboliques du SAOS et des hypothèses physiopathologiques de l'OVR, il est logique de s'interroger sur le rôle du SAOS dans la survenue d'OVR.

Les premières observations d'OVR chez des patients atteints de SAOS ont été rapportées en 2009 (Leroux les Jardins et al. 2009). Plus récemment, deux cas d'OVR centrale (OCVR) bilatérale et simultanée, présentation rare de la maladie, ont été récemment décrits chez des patients avec SAOS (Turati et al. 2009 ; Govetto et al. 2014), une obésité morbide et une hémocrite élevée. Un des deux cas présentait également des taux sanguins élevés de fibrinogène et de protéine C réactive, évoquant un état inflammatoire chronique associé à une dysrégulation des mécanismes de thrombogenèse (Govetto et al. 2014).

Sur le plan épidémiologique, la prévalence du SAOS a été estimée à 37% sur des populations de 40 et 63 patients atteints d'OVR (Glacet-Bernard et al. 2010 ; Kanai et al. 2012), avec une majorité de SAOS léger à modéré (IAH<30). Ces études présentent cependant des limitations importantes (utilisation de l'oxymétrie nocturne, sélection de patients référés pour polysomnographie, absence de groupe témoin) et ces résultats préliminaires méritent d'être complétés par des études de plus grande ampleur. La réalisation de polysomnographie systématique a montré que les patients apnéiques avaient un risque relatif de 1,94 (HR = 1,94 ; IC 95% 1,03 – 3,65) de développer une OVR. Le SAOS était considéré dans cette étude comme un facteur de risque indépendant (Chou et al. 2012).

Les facteurs physiopathologiques associés au SAOS potentiellement impliqués dans le genèse des OVRs seraient multiples : les vasodilatations et le ralentissement vasculaire associés aux hypercapnies nocturnes répétées, la diminution du retour veineux lié aux efforts inspiratoires durant les phases d'apnée, les modifications brutales de PA lors des microéveils, la présence d'un état d'hypercoagulabilité en réponse à l'inflammation systémique et au stress oxydant (O'Brien 2012). Localement, l'hypoxie et l'hypercapnie durant les apnées peuvent entraîner une dilatation de l'artère



centrale de la rétine, comprimant ainsi la veine centrale adjacente et localisée dans la même gaine adventitielle (Glacet-Bernard et al. 2010). De plus, les affections cardiovasculaires associées au SAOS sont des facteurs de risque connus de l'OVR (Parish et al. 1990).

### 1.5.3 Chorioretinopathie séreuse centrale (CRSC)

Les facteurs de risque de la chorioretinopathie séreuse centrale (CRSC) actuellement sont le sexe masculin (Daruich et al. 2015), une prédisposition génétique (incluant des polymorphismes sur les gènes du facteur H du complément (Miki et al. 2014 ; de Jong et al. 2015) ou de la cadhérine 5 (Schubert et al. 2014 ; Weenink et al. 2001), la prise de corticostéroïdes, de médicaments sympathomimétiques, et la maladie de Cushing. Les facteurs de risque cardiovasculaires associés à la CRSC comme l'hypertension artérielle (Eom et al. 2012 ; Tittl et al. 1999), une augmentation de l'activité sympathique et une diminution de l'activité parasympathique (Tewari et al. 2006), ont suscité des études pour connaître les relations entre SAOS et CRSC.

Le rôle du SAOS dans l'apparition des CRSC est controversé. Une étude utilisant le questionnaire de Berlin (évaluant les signes fonctionnels de SAOS, sensibilité pour le diagnostic de 86% et spécificité de 77%) (Leveque et al. 2007) suggèrent une plus forte prévalence de SAOS chez les patients CRSC (58,6%) par rapport au groupe témoin (31%) apparié pour l'âge et le sexe. Ces résultats n'ont pas été confirmés dans une autre étude utilisant le même questionnaire (46% versus 44%) (Brodie et al. 2015). Dans une population de 113 patients CRSC et 339 sujets témoins appariés pour l'âge et le sexe, Eom et al. ont montré rétrospectivement que le ronflement (34,5%) et les troubles du sommeil étaient plus souvent rapportés (Eom et al. 2012). Néanmoins, l'utilisation de questionnaires pour évaluer le risque de SAOS reste une limite importante de ces études.

Le dépistage par polysomnographie a été réalisé chez 14/36 patients CRSC (Kloos et al. 2008) ayant obtenu un score Epworth sleepiness Scale supérieur à 10. Finalement le diagnostic de SAOS a été porté chez 8 patients permettant d'évaluer l'incidence du SAOS à 22%. Cette incidence est proche de l'incidence de 17% chez les

hommes de 50 à 70 ans (Peppard et al. 2013). Des études à plus grande échelle sont ainsi nécessaires pour confirmer ces résultats préliminaires.

#### 1.5.4 Altérations vasculaires rétiniennes chez les patients apnéique

##### 1.5.4.1 Altérations anatomiques

L'analyse des photographies rétiniennes en couleur chez des patients apnéique issus de la *Wisconsin Sleep Cohort study* (Shankar et al. 2013) (Young et al. 2009) montrent une association positive entre l'IAH et le diamètre des veines rétiniennes, indépendamment de l'effet de l'âge, du sexe, de l'IMC, du diabète, de l'hypertension artérielle et du taux de lipides sériques. L'IAH n'était pas associé à un rétrécissement artériolaire.

L'analyse prospective de photographies du fond d'œil de 215 patients apnéiques a montré que le SAOS sévère ( $IAH \geq 20$ ) était associé aux altérations artériolaires rétiniennes (OR = 1,09 pour une augmentation de 5 unités d'IAH) contrairement au SAOS léger ( $IAH < 5$ ) (Fraser et al. 2013).

Une troisième étude (Boland et al. 2004) ne montre pas d'association significative entre altérations microvasculaires rétiniennes (*arteriole to venule ratio*) et troubles respiratoires nocturnes après ajustement pour l'âge, l'IMC, l'hypertension artérielle et le diabète. Cependant, l'utilisation du *arteriole to venule ratio* dans cette étude pourrait être insuffisant pour révéler les altérations du diamètre vasculaire rétinien (Liew et al. 2007).

Il pourrait exister une synergie entre HTA et SAOS pour l'effet observé sur le calibre des vaisseaux rétiniens, artériels (Chew et al. 2012 ; Wong et al. 2003 ; Sharrett et al. 1999) ou veineux (Liew et al. 2007).

##### 1.5.4.2 Modifications du flux sanguin

Plusieurs études ont décrit la régulation vasculaire et le flux sanguin oculaire chez le patient apnéique, notamment au niveau des vaisseaux rétrobulbaires (artère ophtalmique (AO), artères ciliaires postérieures (ACP), artère centrale de la rétine (ACR)) et des vaisseaux choroïdiens.

Comparativement au groupe témoin, il existe une augmentation significative de la *peak systolic velocity* et de la *end-diastolic velocity* dans l'AO, la CRA et les ACP latérales et médiales chez les patients atteints de SAOS sévère (IHA>20) (Erdem et al. 2003). De même les vitesses dans l'AO et les ACP médiales et latérales des patients apnéiques sévères étaient significativement augmentées par rapport aux SAOS modérés. Par contre, l'index de résistance ne montrait pas d'altérations. En accord avec ces données, une autre étude n'a pas mis en évidence de modification de l'index de résistance au niveau de l'AO et de l'ACR entre le groupe apnéique et le groupe témoin (Karakucuk et al. 2008). Il est possible que les vaisseaux de petit calibre soient touchés plus précocement par les variations de CO<sub>2</sub> liées aux apnées (Erdem et al. 2003).

L'évaluation de la régulation du flux sanguin choroïdien est une opportunité d'étudier la régulation d'un lit microvasculaire puisque la choroïde, contrairement aux vaisseaux de la rétine et du nerf optique, est contrôlée par le système nerveux autonome (Alm et al. 1973, 1977 ; Delaey et al. 2000) Nous avons montré que les patients apnéiques exempts de comorbidités cardiovasculaires présentaient une réponse du flux choroïdien normale à l'hypercapnie, hyperoxie (Tonini et al. 2010), au changement postural et à l'exercice isométrique (augmentation de la pression de perfusion oculaire) par rapport à celle observée dans le groupe témoin (Khayy et al. 2011). Ces résultats suggèrent qu'en l'absence de comorbidités cardiovasculaires, la régulation du flux sanguin choroïdien est probablement maintenue normale grâce à des systèmes de régulation encore efficaces. Ces résultats sont concordants avec une étude utilisant la technique de POBF (*pulsatile ocular blood flow*) évaluant indirectement le flux sanguin choroïdien, notamment sa fraction pulsatile. Avec cette technique, aucune relation n'a été retrouvée entre SAOS et le flux sanguin choroïdien pulsatile (Nowak et al. 2011).

## Conclusion

Le SAOS est une pathologie fréquente, affectant 18% de la population au delà de 50 ans. Le SAOS contribue à l'apparition d'hypertension artérielle, d'athérosclérose, de dysfonction autonome, de dysfonction endothéliale, d'inflammation systémique et de modifications métaboliques (notamment insulino-résistance), tous ces éléments étant susceptibles d'interagir avec la régulation vasculaire de l'œil. La relation forte entre le SAOS et la NOIAA-NA est maintenant bien documentée et admise. De nombreuses questions persistent néanmoins en ce qui concerne les mécanismes d'apparition de cette neuropathie et comment le SAOS y contribue. Le rôle de la PPC sur l'évolution de la maladie reste controversé et des études à plus grande échelle sont nécessaires pour l'évaluer. L'évaluation de traitements alternatifs dans cette neuropathie, comme le bosentan, semble donc indispensable. La relation entre le SAOS et d'autres neuropathies optiques (glaucome, œdème papillaire) n'est pas clairement définie. Les données actuelles, contradictoires et assez limitées, méritent d'être complétées. La rétinopathie diabétique, la CRSC et l'occlusion veineuse rétinienne sont également suspectées être liées au SAOS. Des études transversales et longitudinales de grande ampleur sont nécessaires pour montrer une relation avec le SAOS.

## **2 Objectifs de ce travail**

Les différentes hypothèses émises à ce jour pour relier le SAOS avec les neuropathies optiques qui lui sont associées convergent vers une altération vasculaire fonctionnelle et/ou structurelle qui aboutirait à un ou plusieurs évènements ischémiques en amont ou au sein du nerf optique. Cependant, les données cliniques obtenues chez les patients apnéiques ne permettent pas de conclure à un mécanisme causal. Actuellement, il n'existe aucune donnée sur l'effet de l'HI au niveau de la rétine et du nerf optique. Ainsi, aucun traitement étiologique ou préventif spécifique n'a été envisagé.

L'objectif principal de ce travail de thèse a donc été d'étudier l'effet de l'HI sur la vascularisation oculaire. Dans ce but, nous nous sommes attaché à rechercher des altérations structurelles et fonctionnelles au niveau de l'artère ophtalmique du rat, équivalent anatomique des artères ciliaires postérieures chez l'homme.

En parallèle nous nous sommes attachés à rechercher les voies activées par l'HI et menant aux altérations vasculaires observées.

Ainsi nous décrirons les altérations fonctionnelles et structurelles de l'artère ophtalmique du rat soumis à 14 jours d'HI. Par une approche pharmacologique et moléculaire, nous nous sommes en particulier intéressés à l'implication de l'ET-1 et ses récepteurs, du NO et des NOS, dans la régulation de l'artère ophtalmique en réponse à l'HI.

### **3 Matériel et méthodes**

### 3.1 Matériel biologique

Les animaux exposés à l'hypoxie intermittente chronique sont des rats mâles adultes de souche Wistar Han (Elevage Janvier, Le Genest St Isle, Mayenne, France) âgés de 7 semaines (poids à l'arrivée : 275-299 g). Ils sont hébergés au sein de la plate-forme de Haute Technologie Animale (Institut Jean Roget, Grenoble, France), dans des conditions constantes de température et d'humidité, avec des cycles de 12h de jour/12h de nuit, et un accès libre à l'eau et à la nourriture. Les recommandations du « Guide for the Care and Use of Laboratory Animals » publiées par l'US National Institute of Health (NIH Publication No.85-23, revised 1996) ont été respectées lors de ces expérimentations. Les protocoles d'expérimentation ont été approuvés par le comité d'éthique de rattachement du laboratoire (Cometh Grenoble, numéro d'autorisation : 38 10 42).

### 3.2 Hypoxie intermittente chronique

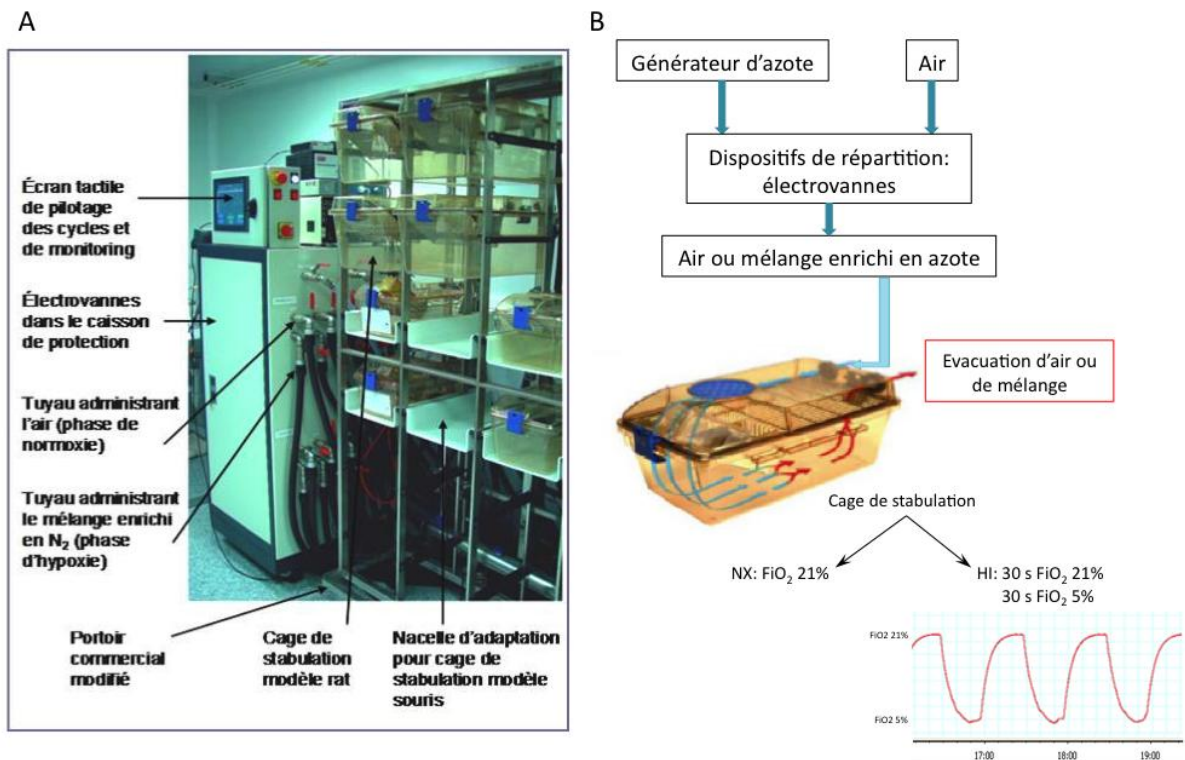
Le dispositif d'HI développé au laboratoire permet d'exposer les animaux à des cycles d'HI dans des cages de stabulation classiques. L'hypoxie est obtenue par un enrichissement du milieu en azote, à pression barométrique constante, ce qui correspond à une hypoxie normobarique. Le mélange air + azote (hypoxie) ou air seul (normoxie) est distribué dans les cages par des électrovannes dont l'ouverture et la fermeture sont commandées de façon électronique par un système de pilotage informatisé. Le développement du dispositif et du système de pilotage informatisé a été réalisé au sein du laboratoire en collaboration étroite avec un partenaire industriel (Entreprise André Cros S.A., France).

Après une semaine d'acclimatation dans l'animalerie, les rats sont aléatoirement soumis à la normoxie (groupes NX) ou à l'hypoxie intermittente (groupes HI).

Le stimulus d'HI utilisé est le suivant : cycle de 1 min, 30 sec de normoxie ( $FiO_2 = 21\%$ ) et 30 sec d'hypoxie ( $FiO_2 = 5\%$ ). Des cycles caractéristiques sont présentés sur la figure 7.



Les animaux sont exposés à ces cycles répétés 8h par jour, et ce pendant 14 jours. Les animaux témoins (groupe NX) sont soumis aux mêmes conditions environnementales, pour lesquelles l'ouverture et la fermeture des électrovannes n'engendrent que la circulation d'air à 21% de  $FiO_2$  dans les cages. La teneur en oxygène à l'intérieur des cages est vérifiée fréquemment aux cours des expositions à l'aide d'un oxymètre dont la sonde est placée dans la cage (ML-206, AD Instrument).



**Figure 10 : (A) Dispositif d'exposition à l'hypoxie intermittente. (B) Représentation schématique du fonctionnement du dispositif**

### 3.3 Paramètres hémodynamiques

#### 3.3.1 Evolution du poids des animaux

Afin de contrôler la prise de poids des animaux, ceux-ci sont pesés avant le début de l'exposition à l'HI ou à la normoxie (J1), puis les deux jours suivants et enfin le jour de leur sacrifice (J15).

### 3.3.2 Pression artérielle systémique

La PA est mesurée sur tous les rats utilisés pour l'étude de la réactivité de l'artère ophtalmique par myographie (3.9). Elle est mesurée invasivement par cathétérisme de l'artère carotide. Les animaux sont anesthésiés par injection i.p. de pentobarbital à 60 mg/kg. Après vérification de l'absence de perception de la douleur, la peau de l'animal est incisée ventralement au niveau du cou, sur 1 à 2 cm. Les tissus sous-cutanés et muscles sont dilacérés avec précaution afin de dégager la carotide droite. Un cathéter relié à un capteur de pression et un système d'acquisition (PowerLab, AD Instruments) est inséré dans la carotide et maintenu par une ligature. La PA est enregistrée en continu pendant 5 minutes environ, afin d'atteindre une valeur stable. La PA moyenne est calculée a posteriori comme  $(\text{Pression systolique} + 2 \text{ pression diastolique})/3$ .

### 3.3.3 Hématocrite

Lors du sacrifice des animaux, le sang est recueilli par ponction cardiaque dans un tube EDTA puis transféré dans un tube à micro-hématocrite, ensuite centrifugé à 12 000 rpm pendant 7 min. La valeur d'hématocrite est lue sur une réglette à hématocrite.

## 3.4 Technique de RT-qPCR

Le prélèvement des tissus (rétine, nerf optique et artère ophtalmique) est réalisé rapidement après sacrifice des rats. Les rétines sont prélevées en premier après ouverture de la cornée, retrait du cristallin et du corps vitré adhérent, et traction sur la rétine. Les nerfs optiques sont ensuite rapidement sectionnés en arrière du globe oculaire, puis retirés par traction légère au niveau du chiasma optique, après ouverture de la boîte crânienne et excision de l'encéphale. Les tissus sont immédiatement congelés dans des cryotubes dans l'azote liquide et conservés à -80°C.

L'extraction d'ARN est réalisée après nettoyage attentif de la paillasse et des instruments avec du RNase Remover (Bioassay, Hayward, Etats-Unis). L'extraction d'ARN est réalisée sur les 2 rétines et 2 nerfs optiques poolés pour chaque rat. L'extraction est réalisée à l'aide du kit d'extraction miRNeasy micro kit (Quiagen,

Valence, CA, Etats-Unis) en suivant les recommandations du fabricant. Les tissus sont initialement broyés à l'aide de l'homogénéisateur de tissu Precellys (Ozyme, France). En fin d'extraction, la concentration d'ARN ainsi que sa pureté sont analysées par spectrophotométrie à l'aide d'un Nanodrop (Nanodrop, Thermo Scientific). Les ratios d'absorbance 260/280 et 260/230 sont utilisés pour vérifier respectivement la pureté et l'absence de contamination de l'ARN.

La rétro-transcription des ARNm en ADN complémentaires est réalisée en suivant à l'aide du kit iScript Ready-to-Use cDNA Supermix (BioRad, Hercules, CA, Etats-Unis) à partir de 1 µg d'ARNm. Les ADN complémentaires (ADNc) obtenus après la RT-PCR sont conservés à -80°C.

Les gènes cibles sont: les gènes de l'ET-1 et des ses récepteurs ET<sub>RA</sub> et ET<sub>RB</sub>, et les gènes des 3 isoformes des NOS (endothéliale, neuronale et inducible). Les gènes de référence utilisés sont les gènes de l'hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1), de la cyclophiline A (CYCA) et de l'actine beta (ACT). Les ADNc sont amplifiés avec le même cycle sur un thermocycleur (C1000™ Thermal Cycler couplé à un CFX96 Real-Time System, BioRad). Les conditions d'amplification sont les suivantes : dénaturation initiale (95°C, 30 s), 40 cycles de dénaturation (95°C, 5 s), annealing (60°C, 10 s), extension (72°C, 30 s), extension finale (72°C, 4 min, suivi par 5 min à 25°C).

Les amorces utilisées pour chaque gène sont décrites dans le tableau 7. L'eau milliQ a été utilisée comme témoin négatif. Les produits des qPCR de tous les gènes ont été séparés sur gel d'agarose pour comparer leur poids moléculaire au poids moléculaire théorique de l'amplicon correspondant.

Les résultats sont analysés selon la méthode de comparaison des Ct, avec ajustement des efficacités d'amplification (Schmittgen et al. 2008). Les résultats sont exprimés en fonction du gène de référence présentant le moins de variation en réponse à l'HI (fold increase).

Gène	Amorce sens	Amorce anti-sens	Taille de l'amplicon (pb)
HPRT1	GGGGGACATAAAAAGTTATTGGTGGGA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCTTG	172
CYCA	TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG	CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC	125
ACT	GGGTATGGAATCCTGTGGCATCC	GCTCAGGAGGAGCAATGATCTTGA	203
ET1	CACTCCCGAGCGCGTCGTCC	TGGCATCTGTTCCCTTGGTCTGTGG	107
ETRA	CGCTCTCAGTGTGGACAGGTACAG	ACCATGACGAAGCCGATTGCT	150
ETRB	AGAGACGAGAAGTGGCCAAGACAG	TTAATGCAGGAATTCAAAGAAGCCA	196
eNOS	CTGCTTCATCAGGGGGGCTC	CCGGAAGGGTGCAATACCAGT	97
nNOS	AGGAACACTGCTCTGGGTGTCATC	CGCTGCTTCTCTTTCTCATTAGTGG	167
iNOS	GCAATGGGCAGACTCTGAAGAAA	AGCAAAGGCACAGAAGTGGGTA	116

**Tableau 7 : Tableau récapitulatif des amorces ADN utilisées pour l'amplification des gènes cibles par qPCR**

### 3.5 Quantification des cytokines pro-inflammatoires par technique de micro-ELISA (Bio-Plex®)

Les protéines totales sont extraites à partir de rétines et nerfs optiques poolés par 2 pour chaque rat (n = 7 NX et 8 HI) à l'aide du Kit d'extraction Bio-Plex Cell Lysis Kit (BioRad, Hercules, CA, Etats-Unis) en suivant les instructions du fabricant. Les échantillons sont ensuite dilués au 10<sup>e</sup> dans le tampon de lyse pour atteindre la gamme de concentration de travail pour le dosage Bio-Plex® (200-900 µg/ml).

Les extraits protéiques de rétines et de nerfs optiques sont ensuite utilisés pour la quantification de cytokines par utilisation d'un kit de micro-ELISA (Bio-Plex Rat Cytokine Group I 6-plex Assay, BioRad, Hercules, CA, Etats-Unis). Le kit a été conçu spécialement pour la mise en évidence de 6 molécules cibles dans notre problématique : IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) et TNF $\alpha$ . Le traitement des échantillons a été réalisé en suivant les instructions du fabricant.

Le dosage BCA a été utilisé pour la quantification des protéines totales. Une gamme étalon BSA (Bovine Serum albumine) est réalisée puis les extraits des échantillons sont

testés (25  $\mu\text{L}$  d'échantillons pour 200  $\mu\text{L}$  de réactif). Après 30 min d'incubation à 37°C, avec le réactif du kit de dosage Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific, Rockford, Etats-Unis), la densité optique (DO) est mesurée à 562 nm. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g/ml}$ . En moyenne, à la dilution 1/10<sup>e</sup>, les concentrations de protéines obtenues sont comprises entre 570 et 880  $\mu\text{g/ml}$  pour les rétines, et entre 300 et 450  $\mu\text{g/ml}$  pour les nerfs optiques.

### **3.6 Mesure des anions superoxyde par marquage au dihydroéthidium**

#### **3.6.1 Cryosection des globes oculaires**

Les globes oculaires sont prélevés sur animal vivant et anesthésié par injection de pentobarbital sodique (60 mg/kg, i.p.). La profondeur de l'anesthésie est vérifiée avec attention avant le prélèvement. Les globes sont rapidement rincés puis immergés dans un agent cryoprotecteur (optimum cutting temperature compound, Tissue Tek). Ils sont ensuite congelés progressivement dans de l'isopentane refroidi par immersion dans de l'azote liquide. Les yeux sont alors conservés à -80°C en attendant d'être coupés. Le jour du marquage, des coupes de 12  $\mu\text{m}$  d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un cryostat et déposées sur des lames Superfrost, et conservées à -20°C jusqu'au marquage.

#### **3.6.2 Marquage au dihydroéthidium**

Le dihydroéthidium (DHE), molécule capable de traverser librement les membranes cellulaires, a été utilisé pour évaluer la production in situ de l'ion superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ). En présence de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , le DHE est oxydé en éthidium, un produit fluorescent, qui marque les noyaux en s'intercalant dans l'ADN. De plus, les radicaux hydroxyles, le  $\text{NO}^{\bullet}$ , les peroxy-nitrites, l' $\text{H}_2\text{O}_2$  et l'hypochlorite n'oxydent pas le DHE de manière significative. Les membranes cellulaires n'étant pas perméables à l'éthidium, sa fluorescence est spécifique de l'anion  $\text{O}_2^{\bullet-}$  au sein de la cellule fluorescente, permettant donc de déterminer le niveau de stress oxydant cellulaire car directement proportionnel à la quantité de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  dans la cellule.

Une fois tous les blocs coupés, les coupes transversales d'artères ophtalmiques entourées de tissus rétro-bulbaires (3 coupes par rat) sont incubées en présence de DHE (10  $\mu$ M) dilué dans une solution de PBS, 15 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. La fluorescence in situ est évaluée par microscopie confocale à fluorescence (LSM 510 - Confocor 2, Carl Zeiss, Allemagne). L'éthidium est excité à 488 nm avec un spectre d'émission à 610 nm. La fluorescence résultante est directement proportionnelle au niveau de stress oxydant. Les images sont analysées avec le logiciel Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

### **3.7 Analyse structurelle de l'artère ophtalmique en microscopie optique et électronique**

#### **3.7.1 Prélèvements tissulaires**

Le jour suivant le dernier jour d'exposition à l'HI ou la normoxie, les rats sont anesthésiés par une injection de pentobarbital sodique (60 mg/kg, i.p.). Le sang est rapidement prélevé par ponction cardiaque dans un tube EDTA en vue de la mesure de l'hématocrite. Le sang est centrifugé dans un tube microcapillaire à 12 000 rpm pendant 7 minutes.

Les deux globes oculaires accompagnés de l'ensemble des tissus rétro-bulbaires sont prélevés et fixés 24h dans le PFA 4% puis déshydraté et inclus en paraffine.

#### **3.7.2 Mesure morphométrique de l'artère ophtalmique**

Des sections de 5  $\mu$ m d'épaisseur sont coupées transversalement au nerf optique (2 mm en arrière du globe) dans les blocs de paraffine contenant les globes oculaires. Les coupes sont colorées à l'hématoxyline-éosine. Les mesures de l'épaisseur de la paroi de l'artère ophtalmique sont réalisées sur des images de coupes prises en microscopie optique au grossissement 400 (Nikon Eclipse 80i, Champs-sur-Marne, France). L'analyse morphométrique est réalisée à l'aide du logiciel d'analyse d'image 3.10 NIS-Element AR. L'épaisseur de l'intima-média est obtenue en moyennant les valeurs de 12 sections pour chaque coupe d'artère ophtalmique (4 coupes par animal). Le périmètre

interne moyen est déterminé en moyennant la valeur de deux cercles, l'un reliant le sommet et l'autre le fond des plis endothéliaux.

### 3.7.3 Analyse en microscopie électronique

Les deux globes oculaires accompagnés de l'ensemble des tissus rétro-bulbaires sont prélevés sur 6 rats (3 NX et 3 HI) et fixés dans une solution contenant 1% PFA/2.5% glutaraldehyde dans du PBS durant une nuit. Le lendemain, les globes sont fixés dans un tampon isotonique de tetroxide d'osmium 2% pendant 1 h, puis déshydratés dans l'éthanol et inclus en résine epoxy pour la microscopie électronique en transmission. Des sections ultrafines (50 nm d'épaisseur) sont coupées à l'aide d'un ultramicrotome (UltraCutR, Leica) et contrastées avec des solutions d'acétate d'uranyle et de citrate de plomb avant analyse.

## 3.8 Techniques de marquage immuno-histologique

Le marquage des récepteurs ET<sub>RA</sub> en immunohistologie a été utilisé pour quantifier l'expression de ET<sub>RA</sub> au sein de l'artère ophtalmique.

Des sections de 5 µm d'épaisseur sont coupées transversalement au nerf optique (2 mm en arrière du globe) dans les blocs de paraffine contenant les globes oculaires et sont montées sur lames. Après blocage de l'activité des peroxydases endogènes, démasquage des antigènes et blocages des antigènes non spécifiques, les sections sont incubées une nuit à 4°C avec un anticorps anti-ET<sub>RA</sub> (AER001, Alomone Laboratories, Jerusalem, Israel) dilué au 1:100. La révélation est réalisée par technique Streptavidine-biotine-peroxydase, à l'aide d'un kit de révélation contenant l'anticorps secondaire biotynilé (Vectastain Elite® ABC kit, Vector laboratories, CA, Etats-Unis), et la solution de révélation contenant le substrat de la peroxydase (ImmPACT™ DAB, Vector laboratories, CA, Etats-Unis). L'intensité de la coloration brune correspond à l'intensité du marquage ET<sub>RA</sub>.

### 3.9 Technique de myographie vasculaire

Après prélèvement de sang intracardiaque pour la mesure de l'hématocrite, le cœur est excisé. La dissection de l'artère ophtalmique est ensuite réalisée telle que l'a décrite Jarajapu et al. (Jarajapu et al. 2004). Après ouverture de la boîte crânienne, le cerveau et la paroi osseuse de l'orbite oculaire sont rapidement retirés. Le crâne est ensuite placé dans une solution de liquide physiologique maintenue à 0°C (glace) et oxygénée par un mélange de 95% d'O<sub>2</sub> et 5% de CO<sub>2</sub> (liquide PSS, contenant en mM : NaCl 130 ; NaHCO<sub>3</sub> 14,9 ; KCl 3,7 ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 ; MgSO<sub>4</sub> 1,2 ; CaCl<sub>2</sub> 1,6 et glucose 11). Les deux artères ophtalmiques de chaque rat sont disséquées avec précaution le long du nerf optique et la partie proximale au globe oculaire est utilisée pour l'étude vasculaire. Chaque artère est montée dans une chambre de myographie pour la mesure de la tension isométrique (Danish MyoTechnology, Aarhus, Denmark) à l'aide de 2 tiges de tungstène de 40 µm de diamètre.

Après 20 min d'équilibration, la procédure de normalisation est réalisée et a pour but de mettre en tension le vaisseau de façon optimale. Nous avons déterminé dans une phase préliminaire la tension optimale pour l'étude de l'artère ophtalmique, jamais réalisée avec cette technique. Le calcul de la tension optimale pour une pression cible de 70 mmHg (Jarajapu et al. 2004) a permis de trouver une force de mise en tension de 6mN. Cette force a été appliquée à toutes les artères lors des expériences. Après une stabilisation de 20 min, la contraction de l'artère à une solution de potassium à 60mM (KCl 60 mM) est testée 3 fois, à 3 minutes d'intervalle, et la réponse maximale au KCl 60 mM est utilisée comme force de contraction de référence. Après rinçage et 10 min d'équilibration, la présence d'un endothélium fonctionnel est testée par ajout d'acétylcholine (Ach) à la concentration de 10<sup>-6</sup> M sur le vaisseau pré-contracté avec de la phényléphrine (2.10<sup>-5</sup> M). Toutes les artères dilatant au minimum de 70% sont considérées comme possédant un endothélium fonctionnel et sont utilisées pour les études vasculaires.

La réponse contractile de l'AO à des concentrations cumulées de l'agoniste α<sub>1</sub>-adrénergique phényléphrine (10<sup>-9</sup>-10<sup>-4</sup> M) et de sérotonine (10<sup>-10</sup>-3.10<sup>-6</sup> M) a été obtenue. La réponse à l'ET-1 a été évaluée par ajouts de concentrations cumulées (10<sup>-10</sup>-



$10^{-6}$  M) ou pour une concentration unique d'ET-1 ( $3.10^{-8}$  M). Pour explorer le rôle de chacun des récepteurs de l'ET-1, la réponse à  $3.10^{-8}$  M d'ET-1 a été évaluée en présence d'un antagoniste spécifique du récepteur ET<sub>RA</sub> (BQ-123,  $10^{-6}$  M) ou du récepteur ET<sub>RB</sub> (BQ-788,  $10^{-6}$  M). Les artères sont incubées durant 30 min en présence des bloqueurs avant d'évaluer la réponse à ET-1.

La fonction endothéliale des AO a été évaluée en étudiant la vasorelaxation en réponse à l'Ach ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M) sur des artères pré-contractées avec de la sérotonine (80% de la réponse maximale). Pour étudier le rôle de la libération de monoxyde d'azote (NO) dans la relaxation des AO, la relaxation à l'Ach est évaluée sur des artères pré-incubées avec l'inhibiteur non-spécifique des NOS N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine (L-NAME,  $10^{-4}$  M pendant 40 min).

Afin d'étudier la relaxation liée à l'endothélium et indépendante du NO, la relaxation à l'Ach est évaluée sur des artères pré-incubées avec de l'indométhacine ( $10^{-4}$  M, 30 min), un inhibiteur non spécifique de la voie des cyclooxygénases (COX) ou avec du *trans*-2-phenylcyclopropylamine hydrochloride (TPC,  $10^{-4}$  M, 30 min), un inhibiteur de la prostacycline synthase, avec et sans co-incubation avec du L-NAME ( $10^{-4}$  M).

Afin d'étudier l'implication des facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium dans la relaxation dépendante de l'endothélium, la relaxation à l'Ach est évaluée en présence de fluconazole ( $5. 10^{-5}$  M), un inhibiteur non spécifique du cytochrome P450 (CYP 450), avec et sans co-incubation avec du L-NAME ( $10^{-4}$  M).

### 3.10 Analyses statistiques

Les valeurs des paramètres étudiés sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type et le nombre n correspond au nombre d'animaux. Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, Etats-Unis). La normalité des données est analysée par le test de Shapiro-Wilk. Dans le cas de données normales, les groupes des rats HI et NX sont comparés avec le test *t* de Student. Dans le cas de données avec une distribution ne suivant pas la loi normale, les groupes de rats sont comparés avec le test U de Mann et Whitney.

Pour les résultats de réactivité vasculaire, les réponses vasoconstrictrices sont exprimées en pourcentage de la réponse maximale induite par 60 mm de KCl. La relaxation à l'Ach est exprimée en pourcentage de la pré-contraction induite par la sérotonine. L'effet maximal d'un agoniste ( $E_{max}$ ) correspond à la plus forte réponse obtenue avec cet agoniste. La concentration d'agoniste induisant 50% de l'effet maximal ( $EC_{50}$ ) est déterminée à partir de chaque courbe à l'aide d'une régression logistique. La valeur  $pEC_{50}$  correspond au logarithme négatif de  $EC_{50}$ . La comparaison des doses-réponses des agonistes est réalisée avec une ANOVA 2 voies pour mesures répétées, avec test post hoc de Bonferroni.

Le seuil de significativité est fixé à 5% ( $p < 0,05$ ).

## **4 Résultats**

#### 4.1 Etude 1 : Effets de l'hypoxie intermittente sur la réactivité de l'artère ophthalmique du rat : rôle de l'endothéline 1, du stress oxydant et des facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium.

**Effects of intermittent hypoxia on rat ophthalmic artery reactivity: role of endothelin 1, oxidative stress and endothelium derived hyperpolarizing factors.**

Marielle Mentek<sup>1,2</sup>, Marie Baldazza<sup>1,2</sup>, Jessica Morand<sup>1,2</sup>, Gilles Faury<sup>1,2</sup>, Florent Aptel<sup>1,2,3</sup>, Diane Godin-Ribuot<sup>1,2</sup>, Christophe Chiquet<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>HP2 laboratory, Grenoble Alpes University, 38000 Grenoble, France

<sup>2</sup>INSERM U1042 laboratory, 38000 Grenoble, France

<sup>3</sup>Department of Ophthalmology, Grenoble University Hospital, Grenoble Alpes University, 38000 Grenoble, France

**\*Corresponding author**

Christophe Chiquet

Department of Ophthalmology,

Grenoble University Hospital, Grenoble Alpes University,

38000 Grenoble, France

Tel : +33 4 76768457

Fax : +33 4 76765757

Email : christophe.chiquet@inserm.fr

## **Abstract**

Obstructive sleep apnea (OSA) is a common disease, characterized by recurrent episodes of partial or complete upper airway obstructions during sleep associated with desaturation-reoxygenation sequences. Due to its cardiovascular deleterious effects, intermittent hypoxia (IH) has been proposed as major component of OSA. OSA has been recently associated with a higher frequency of optic neuropathies, especially non-arteritic anterior ischemic optic neuropathy (NAAION). There are currently no pathophysiological data regarding the effect of IH or OSA on ocular vascular system.

**Purpose:** This study aims to characterize IH impact on rat ophthalmic artery (OA) morphology and vascular reactivity. Particularly, the role of endothelin 1 (ET-1), oxidative stress and endothelium derived hyperpolarizing factors (EDHF) were studied.

**Methods:** Rats were exposed to 14 days IH (IH rats) or normoxia (NX rats). Ophthalmic artery reactivity was studied using wire myography. Endothelin 1 and its receptors, and endothelial, neuronal and inducible Nitric Oxide Synthase (e, n, iNOS) genes expression was studied by qPCR in retina and optic nerve. Endothelin A receptor (ET<sub>R</sub>A) expression in OA was assessed by immunohistolabeling. Superoxide anions production was assessed in OA. Ophthalmic artery structural alterations were assessed by optical and electron microscopy.

**Results:** After 14 days IH, ET<sub>R</sub>A immunohistolabeling and superoxide ions expression in ophthalmic artery were increased by 22 % ( $p = 0.015$ ) and 23 % ( $p = 0.04$ ) respectively in IH rats. Histological analyses do not show arterial or optic nerve head morphological alterations.

Ophthalmic artery contraction to  $3.10^{-8}$  M ET-1 was increased by 16% ( $p < 0.05$ ) whereas contraction to phenylephrine was unaltered in IH rats. ET<sub>R</sub>A blockage by specific antagonist BQ 123 almost completely abolished contractile response to ET-1 in both NX and IH rats. Endothelin B receptor (ET<sub>R</sub>B) blockage by specific antagonist BQ 788 decreased response to ET-1 in NX rats but induced no significant change in ET-1 response in IH rats.

Relaxation to acetylcholine (Ach) was significantly delayed in IH rats ( $p < 0.0001$ ). After NOS blockade with L-NAME, difference in Ach induced relaxation between IH and NX rats was abolished. In the absence of NO, cyclooxygenase (COX) and prostacyclin

synthase blockage did not alter significantly Ach induced relaxation. Fluconazole pre-treatment had an opposite effect on response to Ach in NX and IH rats, increasing relaxation to Ach in IH rats and delaying it in NX rats.

**Conclusion:** 14-day IH-exposure induces endothelial dysfunction in rat OA, associated with increase in oxidative stress and change in EDHF contribution to endothelial function. The increased contractile response to ET-1 in IH rats was associated to a decrease in ET<sub>R</sub>B-mediated vasorelaxation.

Keywords : Intermittent hypoxia, ophthalmic artery, endothelin 1, oxidative stress, nitric oxide, rat, acetylcholine, cyclooxygenase, prostacyclin, endothelin receptor, endothelium derived hyperpolarizing factors

Journals : Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, Journal of Physiology, American Journal of Physiology - Heart and Circulation Physiology, Investigative Ophthalmology and Visual Science

## Introduction

OSA is a common condition affecting 5% of the general population and 18% of those over 50<sup>1</sup> and is characterized by repetitive apneas causing hypoxemia and sleep fragmentation. OSA is a well-known independent risk factor for hypertension<sup>2</sup>, myocardial ischemia<sup>3</sup>, atherosclerosis, coronary disease, autonomic dysfunction and stroke<sup>4</sup>. Deleterious consequences of OSA on the human vascular system includes endothelial dysfunction<sup>5</sup>, elevated levels of circulatory inflammatory mediators<sup>6</sup> transient vasoconstriction after apneic episodes<sup>7</sup> and increased vascular sensitivity to vasoconstrictors<sup>8</sup> associated with elevated circulating ET-1 concentration during night<sup>9</sup>.

On the other hand, endothelium-dependent vasorelaxation in response to acetylcholine or flow-mediated is also impaired in OSA patients<sup>5</sup>. Decrease nitric oxide (NO) bioavailability has been linked to the hypoxemia/reoxygenation sequences<sup>10</sup> and to enhanced release of superoxide by polymorphonuclear in OSA patients leukocytes<sup>11</sup>.

Animal studies reproducing the intermittent hypoxic stimulus of OSA show that alterations in vasoreactivity affect particularly resistance arterial beds. Studies on rodents exposed to intermittent hypoxia (IH) showed that vasorelaxation in response to acetylcholine is decreased mainly in resistance arteries (gracilis<sup>12</sup> and in middle cerebral artery<sup>12</sup>) but not in conductance arteries (carotid, aorta<sup>13, 14</sup>). The vasoconstriction / vasorelaxation balance is affected in rats submitted to IH with an increase in vasoconstriction to ET-1 observed in rat carotid<sup>14</sup>, mesenteric<sup>15</sup> and pulmonary artery<sup>16</sup> whereas a decreased vasorelaxation capacity was observed in gracilis arterioles<sup>17</sup>.

Recent evidences in the literature suggest that OSA may impair the ocular vascular function, being a risk factor of non-arteritic anterior ischemic optic neuropathy (NAAION)<sup>18, 19</sup>, normal tension glaucoma<sup>20</sup>, papilloedema<sup>21</sup> and retinal vein occlusion<sup>22</sup>. The relationship between OSA and retinal or optic nerve complications are not well understood, the main hypotheses including the potential role of activating ET-1 system<sup>23</sup>, oxidative stress<sup>24</sup> and inflammatory pathways<sup>25</sup>. Endothelin 1 and his specific receptors, ET<sub>RA</sub> and ET<sub>RB</sub> have been anatomically described in retina, choroid and optic nerve<sup>26, 27</sup>. Endothelin 1 mediates a dose-dependant vasoconstriction in human ophthalmic and posterior ciliary arteries<sup>28</sup>. On the other hand, the NO system plays a

major role in arterial vasorelaxation in ocular vasculature, as shown in isolated porcine perfused eyes and ophthalmic artery<sup>29, 30</sup>. In human, L-NNA totally inhibits bradykinin and acetylcholine-induced ophthalmic artery relaxations<sup>28</sup>. Thus, alteration in NO and endothelin 1 synthesis or bioavailability could be deleterious to the regulation of ocular vascular tone.

In the present study, we investigated the effect of intermittent hypoxia on rat ocular vascular function while characterizing the reactivity of the OA, and the involvement of ET-1, oxidative stress and vascular inflammatory remodeling in OA.

## **Material and methods**

### *Ethics statement*

Adult male Wistar Han rats (7 weeks old, 275-299 g ; Janvier Labs, France) were used for all experiments. The experiments were conducted in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Council of Europe, European Treaties ETS 123, Strasbourg, 18 March 1986) and with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health (Publication No. 85-23, revised 1996). The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of Grenoble Alpes University (Comité d'éthique ComEth Grenoble, permit number: 38 10 42). The rats were housed under diurnal lighting conditions and given free access to food and water. All surgery was performed under general anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

### *Chronic Intermittent Hypoxia protocol*

Rats were exposed to either normoxia (NX) or intermittent hypoxia (IH) conditions for 14 days as previously described (Joyeux-Faure, 2005). Briefly, rats were exposed to IH cycling between ambient air (FiO<sub>2</sub> of 21%, 30 sec) and hypoxia (FiO<sub>2</sub> of 5%, 30 sec), whereas normoxia cycling consisted of exposure to room air only. IH and normoxia



cycling consisted in nitrogen or compressed air distributed at the same flow rate to plexiglas chambers, thereby submitting normoxic and hypoxic animals to similar noise and airflow disturbances. The level of  $\text{FiO}_2$  in the chambers was controlled throughout the hypoxia protocol using a Beckman OM11  $\text{O}_2$  analyzer (Fullerton, CA, USA). Rats were exposed to 1-min cycles for 8h/day during rat sleep period (day time).

#### *Arterial blood pressure recording.*

Arterial blood pressure was recorded in rats that were harvested for ophthalmic artery studies. The day after the completion of the 14-day IH period, the rats were anesthetized by an intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (60 mg/kg, Ceva, France). Heparin (550 U/kg, Choay, France) was injected intraperitoneally before the beginning of the surgery. As soon as deep anesthesia was reached (loss of deep sensitivity), the left carotid of the rats was cannuled with polyethylene tubing (PE-50, marque) connected to a pressure transducer (Edwards Lifesciences, Guyancourt, France), and arterial blood pressure was recorded on a data-acquisition system (Powerlab, ADInstruments, Oxford, UK). Blood was collected on heparin-tubes by cardiac puncture. Hematocrit was measured in microhematocrit glass tube after centrifugation for 7 min at 13000 rpm.

#### *Isolated ophthalmic artery preparation.*

A total of 101 animals were used for these experiments.

After blood collection, rats were killed by heart excision and were decapitated. Ophthalmic artery dissection was performed as previously described<sup>31</sup>. The brain was rapidly removed, and the skull was placed in ice-cold oxygenated physiological buffer (PSS, containing in mM: NaCl 130,  $\text{NaHCO}_3$  14.9, KCl 3.7,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2,  $\text{MgSO}_4$  1.2,  $\text{CaCl}_2$  1.6 and Glucose 11). Both right and left OA from a single rat were carefully dissected along the optic nerve and the closest part from the ocular globe was used for vascular studies. Each artery was mounted in a small-vessel myograph for isometric tension recording (Danish MyoTechnology, Aarhus, Denmark). The artery was threaded onto two 40- $\mu\text{m}$  tungsten wires. After 20-min equilibration, normalization procedure was performed. For OA, a normalization procedure was performed in preliminary

experiments to standardize the baseline resting internal circumference (calculated from the distance between the wires) of each artery using LabChart DMT normalisation module (ADInstruments, Oxford, UK), and a targeted pressure of 70mmHg<sup>31</sup>. A resting force of 6 mN was found and then applied on all opthalmic arteries throughout the experiments. After 20-min equilibration period, contraction in response to KCl (60 mM) was repeated 3 times and maximal response was taken as reference contraction. The presence of functional endothelium in the OA was tested by applying  $10^{-6}$  M acetylcholine on phenylephrine pre-contracted vessels ( $2 \cdot 10^{-5}$  M). All arteries that showed at least 70% dilation were considered to have intact endothelium.

Contractile response to the  $\alpha_1$ -adrenergic receptor agonist phenylephrine (PHE,  $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M) and serotonin (SE,  $10^{-10}$ - $3 \cdot 10^{-6}$  M) was assessed. Response to ET-1 was assessed after cumulative concentrations ( $10^{-10}$ - $10^{-6}$  M) and single dose ( $3 \cdot 10^{-8}$  M). To further explore endothelin receptors implication, response to  $3 \cdot 10^{-8}$  M ET-1 was assessed in intact arteries, in the presence of ET<sub>RA</sub> antagonist (BQ-123,  $10^{-6}$  M) or ET<sub>RB</sub> antagonist (BQ-788,  $10^{-6}$  M). Vessel preparations were incubated with the antagonist 30 min before assessing ET-1 response.

Endothelial function was assessed by studying response to acetylcholine (ACh,  $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M) in arteries precontracted with SE (80% of their maximal response). To investigate the basal release of endogenous nitric oxide (NO), OA were pretreated with the NO synthase inhibitor *N*<sup>G</sup>-nitro-L-arginine (L-NAME,  $10^{-4}$  M for 40 min).

To assess endothelium-dependent, NO-independent relaxation, the L-NAME resistant, ACh-induced relaxations were assessed in the presence of unspecific cyclo oxygenase (COX) inhibitor indomethacin ( $10^{-4}$  M, 30 min) or the prostacyclin synthase (PGI<sub>2</sub>) inhibitor *trans*-2-Phenylcyclopropylamine hydrochloride (TPC,  $10^{-4}$  M, 30 min). ACh-induced relaxations were also assessed in the presence of each inhibitor alone.

To investigate endothelium derived hyperpolarizing factors implication in endothelium-dependent relaxation, ACh-induced relaxations were assessed in the presence of fluconazole ( $5 \cdot 10^{-5}$  M), a non-specific cytochrome P450 inhibitor (CYP-450) alone and with (L-NAME,  $10^{-4}$  M).

### *Quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction*

**Tissue harvesting.** Rats were anesthetized and sacrificed as described in the previous section. Retinas from 9 NX and 9 IH rats were harvested quickly after sacrifice, after corneal aperture and lens and vitreous body excision. After retinal excision, optic nerves were cut just behind the globe and were harvested after skull and brain removal. All tissues were quickly snap frozen in liquid nitrogen after removal and stored at -80°C until RNA extraction.

**Reverse-transcriptase polymerase chain reaction.** Total RNA was extracted and isolated from tissues with a miRNeasy micro kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) following the manufacturer's instructions. RNA concentration (mg/ml) and quality was assessed by nanodrop (Nanodrop, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Absorbance ratio 260/280 and 260/230 was used to assess RNA purity and contamination respectively. RNA concentrations typically ranged from 1000 to 1900 µg/ml for retinas and from 110 to 320 µg/ml for optic nerves.

cDNA was synthesized from 0.5 µg of total RNA by reverse transcribing the RNA with iScript Reverse transcriptase and reaction mix (BioRad, Hercules, CA, USA).

**Primers for quantitative real-time polymerase chain-reaction.** Primers for rat hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1), cyclophilin A (CYCA), actin beta (ACT), ET-1, ET<sub>RA</sub>, ET<sub>RB</sub>, endothelial, neuronal and inducible nitric oxide synthase (eNOS, nNOS and iNOS) were designed to flank an intron using Vector NTI® software (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), tested in silico for specificity against sequences for *Rattus norvegicus* using BLAST software (NCBI, Bethesda, MD, USA) and synthesized by Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) (table 1).

**Quantitative real-time polymerase chain reaction.** RT-PCR was performed with a Biorad C1000™ Thermal Cycler (BioRad, Hercules, CA, USA). Each 20 µL reaction mixture contained 10 µL of SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (BioRad, Hercules, CA, USA), 2 µL of each forward and reverse primers and 4 µL of cDNA sample diluted ¼ with milliQ water.

Reaction conditions were as follows: initial denaturation (95°C, 30 sec), 40 cycles of denaturation (95°C, 5 s), annealing (60°C, 10 s), extension (72°C, 30 s), final extension (72°C, 4 min, followed by 25°C, 5 min).

Every sample was tested in triplicate, and milliQ water was used as negative control.

RT-PCR products of all genes were separated on agarose gels and molecular weight was compared to predicted weight for each amplicon.

Analysis of gene expression data with adjustment relative to a standard sample. Relative quantification of gene expression was performed using the comparative Ct method, with adjustment for amplification efficiency (Schmittgen 2008). Amplification efficiencies ranged 92,5 – 115,9 % for retinas and 94,7 – 118,5 % for optic nerves. Relative expression of target genes are expressed as fold increase compared to NX rats.

#### *Tissue harvesting for histological studies*

Rats were anesthetized and sacrificed as described in the previous section. Ocular globes with surrounding retrobulbar tissues were harvested and either:

- 1) frozen in optimum cutting temperature (OCT) compound (TissueTek, Sakura Finetek) and stored at -80°C until assayed (O<sub>2</sub><sup>•-</sup> production),
- 2) or 24h fixed in 4% paraformaldehyde (PFA, in 0,1M phosphate buffer, pH 7.4), dehydrated and embedded in paraffin (morphometry and immunolabelling).
- 3) or fixed in 1% PFA/2.5% glutaraldehyde in PBS overnight then fixed further in buffered isotonic 2% osmium tetroxide solution for 1h, followed by dehydration in ethanol and subsequent embedding in epoxy resin for transmission electron microscopy (n = 3 eyes/ group). Ultrathin sections (50 nm thick) were cut on a ultramicrotome (UltraCutR, Leica), followed by contrasting with uranyl acetate/lead citrate before analysis on a transmission electron microscope.

#### *Morphometry*

Five micron-thick cross sections of tissues were cut 1 mm behind the globe, then hematoxylin and eosin stained. Intima-media thickness (IMT) was evaluated with line measurements tools by averaging 12 equally spaced positions around the vessel circumference. The mean internal perimeter was determined by averaging the sizes of two circles (at the top of endothelial folds and at the hollows). Both were evaluated using computer image analysis (MetaMorph6 software, Zeiss microscope). Five sections of ophthalmic artery per rat were analyzed and averaged.

#### *Measurement of $O_2^{\cdot-}$ production*

In situ production of  $O_2^{\cdot-}$  was assessed using Dihydroethidium (DHE), a molecule freely permeable to cells and oxidized in ethidium, a fluorescent product, in the presence of  $O_2^{\cdot-}$ . Five frozen sections (12  $\mu$ m) of ocular tissues containing ophthalmic artery for each rat (n = 7 NX and 8 IH rats) were incubated with DHE in PBS at room temperature for 5 min in a light-protected bath. In situ fluorescence was assessed using confocal fluorescence microscope (LSM 510 - Confocor 2, Carl Zeiss, Deutschland). Images were analyzed using IMAGE J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

#### *Immunolabelling*

ET<sub>R</sub>A immunolabelling was used to quantify ET<sub>R</sub>A expression in rat OA in paraffin embedded sections. Five micron-thick sections were cut and mounted onto glass slides. After rehydration in graded alcohol baths, mounted sections were washed twice in 1X Tris-Buffered Saline (TBS) with 0.1% Tween 20. Tissue peroxidase activity was blocked by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% incubation (5min). After washing in 1X TBS, antigen retrieval was achieved by incubating mounted sections in citrate buffer (10 mM, pH = 6) during 45 min. After washing in 1X TBS with 0.1% Tween 20, unspecific antigen were blocked by incubating mounted sections in 1X TBS containing 10% Goat serum during 2 h. Sections were then incubated overnight at 4°C with ET<sub>R</sub>A antibody (AER001, Alomone Laboratories, Jerusalem, Israel) at dilution 1:200. After incubation, sections were washed in 1X TBS and then revealed by Streptavidine-biotine-peroxydase method using revelation kit containing biotinylated secondary antibody (Vectastain Elite® ABC kit,

Vector laboratories, CA, USA) and revelation solution with peroxydase substrate (ImmPACT™ DAB, Vector laboratories, CA, USA). Brown coloration intensity was quantified using IMAGE J software and corresponds to ET<sub>RA</sub> labeling intensity.

### *Drugs*

Acetylcholine, phenylephrine, serotonin, endothelin 1, BQ-123, BQ-788, L-NAME, indomethacin, *trans*-2-Phenylcyclopropylamine hydrochloride (TPC) and fluconazole were obtained from Sigma. Drugs were kept in accordance to manufacturer's recommendations until preparation of working-concentration solutions. All drugs were dissolved in distilled water, except BQ-123 and BQ-788 dissolved in Dimethyl sulfoxide. Aliquots of working-concentration solutions are stored at -20°C and thawed once prior to use.

### *Statistical analysis*

All data are expressed as mean ± SD and the values of *n* refer to the number of animals in each group. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Normality of data was assessed using Shapiro-Wilk normality test. In the case of normal data, NX and HI groups were compared using Student *t*-test. In the case of non-normal data, groups were compared using the non parametric Mann-Whitney U test.

For organ bath experiments, vasoconstrictor responses were expressed as a percent of the maximal contraction induced by 60 mM KCl solution. Relaxation to acetylcholine was expressed as percentage of serotonin-induced tone. The maximal effect ( $E_{max}$ ) was the greatest response obtained with the agonist. The concentration of agonist producing 50% of the maximal effect ( $EC_{50}$ ) was determined from each curve using a non-linear curve fitting equation. The  $pEC_{50}$  value is the negative logarithm of the  $EC_{50}$ . After normality checking, statistical analyses of agonist responses were performed using ANOVA. Post hoc was conducted with Bonferroni-corrected *t*-tests.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## **Results**

### **Hemodynamic parameters**

After 14 days IH exposure, hematocrit was significantly increased by 12.7%. Mean, systolic and diastolic arterial blood pressures were also significantly increased by 8.1, 7.8 and 8.2 % respectively after 14 days of IH. Heart rate did not vary significantly after 14 days IH exposure (table 2).

### **IH effect on vascular remodeling**

Intermittent hypoxia did not induce vascular remodeling of OA, as shown by the unaltered intima-media thickness, arterial area and perimeter (table 3). Macroscopic observations of intra-arterial cushions in serial sections of the rat ophthalmic artery are in accordance with the previously described structure in rat <sup>32</sup> and mouse <sup>33</sup>. We observed V-shaped extension of the OA wall into the lumen of the vessel, before the branching of the central retinal artery and long posterior ciliary arteries (figure 1). Localization and macroscopic structure of these intra-arterial cushions was not altered by 14 days IH exposure (n = 3 rats/group).

Electron microscopy study of OA and optic nerve axons did not show any ultrastructural alteration of the endothelial, vascular smooth muscle cells and basal lamina of the vessel, nor in the myelin sheet and morphology of axons (figure 1).

### **Contractile response of ophthalmic artery after IH**

Mean response to 60mM of KCl solution in NX ( $7.49 \pm 1.5$  mN, n = 37) and HI rats ( $7.9 \pm 1.6$  mN, n = 36) was not significantly different. Increasing doses of PHE and SE induced a dose-dependant increase in vascular tone in both groups (figure 2-A and B). No statistical difference was observed after 14 days IH exposure.

Vascular responses to cumulative doses of ET-1 show an increase in contraction of OA of IH rats at the dose of  $3.10^{-8}$  M compared to NX rats (figure 2-C,  $p = 0.09$ ). In response to a single ET-1 dose of  $3.10^{-8}$  M, OA contraction was also significantly increased by 18.6% in IH rats ( $n = 6$ ) compared to NX rats (figure 2-D,  $n = 7$ ,  $^{\square}p = 0.005$ ).

ET<sub>RA</sub> and ET<sub>RB</sub> antagonists effect were thus studied by contracting OA with a single ET-1 dose of  $3.10^{-8}$  M. ET<sub>RA</sub> antagonist BQ-123 almost completely abolishes ET-1 induced contraction in both groups, with a greater decrease in IH rats (figure 2-D,  $^{\text{¥}}p$  and  $^{\text{❖}}p = 0.003$  in NX and IH groups respectively). After ET<sub>RA</sub> blockade, response to ET-1  $3.10^{-8}$  M was similar in NX ( $n = 6$ ) and IH ( $n = 7$ ) rats (figure 2-D,  $^{\text{b}}p = 0.12$ ).

ET<sub>RB</sub> antagonist BQ-788 had a differential effect on ET-1 induced response of OA, producing a significant increase in contraction of OA in NX rats (figure 2-D,  $n = 6$ ,  $^{\text{h}}p = 0.004$ ), and no significant effect on the ET-1 induced contraction of OA in IH rats ( $n = 7$ ,  $^{\square}p = 0.67$ ). After ET<sub>RB</sub> blockade, NX rats showed a higher contraction to ET-1  $3.10^{-8}$  M compared to IH rats ( $^{\#}p = 0.04$ ). These data suggest that the increased vasoconstrictive response to ET-1 in IH rats is due to a decreased vasodilatory role of ET<sub>RB</sub>.

### **Relaxant response of ophthalmic artery after IH**

Acetylcholine caused concentration-dependent dilation in OA precontracted with SER in both groups. Vasodilatory response of OA to Ach was delayed in IH rats compared to NX rats ( $^{\ast}p < 0.025$ , figure 3-A), as confirmed by  $pD_2$  values (table 3).

In presence of the non-selective NOS inhibitor L-NAME ( $10^{-4}$  M), OA from both groups showed a significant decrease in vasorelaxation from  $10^{-7}$  M to  $3.10^{-6}$  M of ACh ( $^{\#}p$  and  $^{\text{¥}}p < 0.0001$ ). L-NAME induced a more important right-shift of Ach-induced vasorelaxation in NX group than in IH group, resulting in similar final ACh-dependent dilation in both group in presence of L-NAME (figure 3-A). These data suggest that the decrease in vasodilatory capacity of OA observed in IH rats can be associated to a decreased NO bioavailability.



SNP-mediated relaxation was assessed after ET-1 dose-response curve. Normoxic and IH rats showed similar relaxation in response to  $10^{-4}$  M SNP (Figure 3-B), confirming that vasodilatory capacity was similar in both groups.

In presence of L-NAME and non-selective COX inhibitor indomethacin, responses to Ach were similar in both groups (NX vs. IH) and did not significantly differ from Ach response in presence of L-NAME alone (figure 4-A). To further assess the specific involvement of PGI<sub>2</sub> pathway, we studied OA response to Ach in presence of TPC ( $5.10^{-5}$  M) and TPC with L-NAME. In presence of NO-mediated vasorelaxation (TPC alone, figure 4-B), TPC induced a significant right shift in Ach dose-response curve from  $10^{-7}$  to  $3.10^{-7}$  M in NX rats ( $^{\#}p<0.013$ ) and at  $3.10^{-7}$  M in IH rats ( $^{\#}p<0.013$ ), but did not modify the significant delay in IH rats relaxation in response to Ach at  $3.10^{-7}$  M ( $^* p<0.0001$ ). This was confirmed by  $pD_2$  value significantly higher in NX rats compared to IH rats (table 3)

In absence of NO-mediated vasorelaxation (TPC + L-NAME, figure 4-C), TPC induced a significant right shift in Ach dose-response curve from  $10^{-6}$  to  $3.10^{-6}$  M in IH rats ( $^h p<0.0001$ ) and at  $10^{-6}$  M in NX rats ( $^* p<0.0001$ ). In this condition, IH and NX rats showed similar relaxation to Ach. These results support an unaltered response linked to PGI<sub>2</sub> in OA of IH rats.

To assess involvement of endothelium derived hyperpolarizing factors (EDHF) in OA relaxation after IH exposure, we studied CYP450 products involvement in Ach-induced relaxation, as they are potent vasoactive species in mouse OA <sup>34</sup>. In presence of NO-mediated vasorelaxation (fluconazole alone, figure 5-A), fluconazole induced a right shift in Ach dose-response curve at  $3.10^{-7}$  M in NX rats ( $^{\#}p<0.0001$ ) and an opposite effect in IH rats, with a left shift in Ach dose-response curve, without reaching statistical significance. In absence of NO-mediated vasorelaxation (fluconazole + L-NAME, figure 5-B), Ach dose-response curve showed a significant left shift in the IH group at  $3.10^{-7}$  M ( $^h p<0.0001$ ) and a non-significant right shift in the NX group. Vasorelaxation of OA was significantly higher in IH rats compared to NX rats at  $3.10^{-7}$  and  $10^{-6}$  M of Ach ( $^b p<0.0001$ ).  $pD_2$  value was significantly higher in IH rats compared to NX rats (table 4).

## **Effect of IH on ET1 and receptors A and B**

To further explore the increase in ET-1 vasoconstriction of OA after IH and the implication of ET<sub>RA</sub>, we studied the expression of ET<sub>RA</sub> in OA by immunohistochemistry (figure 6). The quantification of ET<sub>RA</sub> staining in OA from NX (n = 6) and IH rats (n = 8) showed an increase in ET<sub>RA</sub> expression (+22 %, p = 0.015) after 14 days of IH exposure.

In the retina and optic nerve (figure 6 - A), ET-1 gene expression tended to be increased in IH rats, without reaching statistical significance (p = 0.09 and 0.07, respectively). ET<sub>RA</sub> gene expression was significantly increased in the optic nerve after 14 days IH exposure (n = 9 rats/ group, p = 0.012). This increase was not reported in the retina.

## **IH induced oxidative stress in ophthalmic artery**

The *in situ* production of O<sub>2</sub><sup>•</sup> in OA, evaluated by DHE fluorescence (figure 6 - B), was significantly enhanced in the IH group (n = 8) compared with the NX group (n = 7, p = 0.03).

Study of NOS genes expression by qPCR was performed in the retina, optic nerve and ophthalmic artery of IH and NX rats (figure 7). A significant increase in eNOS gene expression after 14 days IH exposure (n = 9 rats/ group, p = 0.009) and a trend to increase in nNOS gene expression (p = 0.12) were noted in the optic nerve and were not detected in the retina.

## **Discussion**

In this study, we reported for the first time the impact of a 14-day IH exposure on the ocular vasculature of the rat. The major findings are: (1) IH exposure does not induce vascular remodeling of rat OA; (2) IH increases vasoconstrictive effects of ET-1 on OA via a decreased ET<sub>RB</sub>-mediated vasorelaxation; (3) IH is associated with an increase in oxidative stress in OA; (4) relaxation of OA after IH is impaired, in relation with a

decreased NO bioavailability and an imbalance in CYP450 products; (5) IH exposure induces an overexpression of ET<sub>RA</sub>, eNOS and nNOS in optic nerve but not in retina. Taken together, these results demonstrate that a 14-day IH exposure is associated with altered OA vasoactive responses, which are critical in ocular blood flow regulation.

**Rat OA IMT was assessed on histological sections** as previously described<sup>25</sup>. An increase in IMT is considered to be an early sign of arterial wall remodeling and has been linked to vascular smooth muscle cells hypertrophy or proliferation<sup>35</sup>. Well-known contributors to arterial remodeling include increased shear stress, associated with hypertension or arterial ramifications<sup>36</sup>, as well as shear stress-associated ROS production<sup>37</sup>. In our rat model however, increased arterial blood pressure and vascular oxidative stress after 14 days of IH were not associated with OA wall thickening. Our results are consistent with the fact that IH induces preferential remodeling of large vessels, such as the aorta<sup>25</sup> or carotid artery<sup>38</sup>. Our results are therefore consistent with that found in gracilis arteries of rats exposed to up to 56 days of IH<sup>17, 39</sup>. Thus, the absence of OA remodeling is probably due to the absence of large blood flow fluctuations and high shear stress.

Since absence of structural modifications<sup>17</sup> may be associated with a decrease in endothelium-dependent relaxation of gracilis arteries after 14 days of IH, we planned to explore both vasodilator and vasoconstrictive responses of OA in rats submitted to 14 days of IH. We observed a significant ET<sub>RA</sub>-mediated increased contractile response to ET-1 and an upregulation of ET<sub>RA</sub> expression. ET-1 is a potent vasoconstrictor that acts through activation of two types of receptors: ET<sub>RA</sub> are predominantly expressed in vascular smooth muscle (VSM) cells and ET<sub>RB</sub> are found in both endothelial and VSM cells. In general, ET<sub>RA</sub> stimulation mediates vasoconstriction whereas endothelial ET<sub>RB</sub> stimulation induces vasorelaxation. Regarding the ocular circulation, ET-1 is the most potent vasoconstrictor of OA<sup>31</sup> and posterior ciliary arteries<sup>28, 40</sup>.

**The increased OA reactivity to ET-1 after IH exposure, associated with ET<sub>RA</sub> overexpression**, is consistent with the response of the cardiovascular system, i.e. the role of ET-1 in IH-induced systemic hypertension<sup>41</sup> and vascular dysfunction. The increase in blood pressure is abolished by selective ET<sub>RA</sub> antagonists<sup>41</sup> as well as by

superoxide ion scavenging<sup>42</sup>. Increased contractile response to ET-1 is reported in other small vessels such as pulmonary arterioles<sup>16</sup> and small mesenteric arteries in IH models<sup>43, 15</sup>.

**The higher contractile response to ET-1 in IH-exposed rats** was not associated with an increased ET<sub>R</sub>B-mediated response, in contrast with that found in posterior cerebral arteries (PCAs) of a rat model of OSA induced by repeated tracheal occlusion<sup>44</sup>. Indeed, we observed that exposure to IH elicited a significant decrease in ET<sub>R</sub>B-mediated relaxation of the OA in response to ET-1 stimulation. We also found that, after ET<sub>R</sub>A blockade by BQ-123, ET<sub>R</sub>B stimulation did not elicit significant contractions in normoxic, but also in IH-exposed, rats. This suggests a minor involvement of ET<sub>R</sub>B in the vasoconstrictive effect of ET-1 on OA. On the other hand, ET<sub>R</sub>B blockade by BQ-788 in normoxic rats resulted in a higher contractile response to ET-1, confirming that ET<sub>R</sub>B stimulation in rat OA produces a vasorelaxant effect.

We have shown that ETRA, gene was significantly upregulated in rat optic nerve after 14 days exposition to IH and this was associated with a clear trend in increased ET-1 and ETRB gene expression. ET-1 and its receptors are expressed in ocular structures<sup>45, 46</sup>. Besides its potent vasoconstrictive effects on the optic nerve head after intravitreal injection<sup>47</sup>, ET-1 is thought to be involved in degenerative optic neuropathies, like glaucoma, by promoting reactive astrogliosis<sup>48</sup> and retinal ganglion cell death, either directly<sup>49</sup> or by disruption of axonal transport in the optic nerve<sup>50</sup>. It has been shown that ET-1 can induce chronic optic neuropathy at doses that do not alter ocular blood flow<sup>49</sup>, suggesting a direct effect on retinal and optic nerve cells.

**The increased OA reactivity to ET-1 was associated with enhanced superoxide ion production in OA of IH-exposed rats.** In contrast with this, other studies reported increased<sup>17</sup> or decreased<sup>39</sup> systemic biomarkers of oxidative stress. These systemic biomarkers could not accurately reflect the level of tissue oxidative stress. There is a major interplay between oxidative stress and ET-1 in the development of cardiovascular alterations in response to IH. Indeed, oxidative stress plays a critical role in activating the ET-1 system to induce vascular remodeling<sup>42</sup>, but it is also enhanced by vascular ET-1 and ET<sub>R</sub>A overexpression<sup>51</sup> in response to IH. Moreover, reactive oxygen species production are known to be associated with a decrease in NO bioavailability, by inducing

eNOS uncoupling, leading to preferential superoxide ion formation<sup>52</sup> or by NO scavenging by superoxide ions, resulting in peroxynitrite formation<sup>53</sup>.

**We observed a significant decrease in NO-mediated vasorelaxation of OA in IH-exposed rats**, without alteration in the vasodilatory response to exogenous NO (SNP). NO-mediated vasorelaxation has been studied in other resistance arteries of animals submitted to IH and was impaired in middle cerebral artery<sup>12</sup>, gracilis artery<sup>12, 39, 17</sup> and cremaster arteriole<sup>54</sup>. This impaired NO bioavailability may also explain the altered ET<sub>R</sub>B-mediated vasorelaxation seen in IH-exposed rats<sup>55, 52</sup>. In ocular vessels, NO is a major mediator of vascular relaxation in human OA<sup>28</sup> as well as in porcine OA and ciliary arteries<sup>30, 40, 29</sup>, in canine OA<sup>56</sup> and bovine anterior ciliary arteries<sup>57</sup>. These in vitro data has been confirmed by experimentations evaluating blood flow of the optic nerve head<sup>58</sup>, the retina<sup>59</sup> or the choroid<sup>58</sup>. In the rat OA, the involvement of NO and other vasorelaxing endothelium-released molecules has not been investigated yet. We observed a potent vasorelaxation of rat OA in response to Ach, that was not abolished but only delayed by inhibition of NO release (L-NAME), and by inhibition of both NO and PGI<sub>2</sub> release (L-NAME + TPC). Thus NO release appears to play a major role in OA relaxation in humans compared to rats. This suggests that, in OSA patients, the reduction in NO bioavailability<sup>60</sup>, associated with a decreased endothelium-dependent vascular relaxation<sup>61</sup> could have a detrimental effect on the ophthalmic circulation.

We have shown that eNOS and nNOS gene was significantly upregulated in rat optic nerve after 14 days exposition to IH. Interestingly, the significant increase in eNOS and nNOs expression was not observed in the retina, supporting the idea that regulation of these genes is tissue-dependent, as previously shown in the carotid<sup>62</sup>, pulmonary arteries<sup>63</sup>, and brain<sup>64</sup>. Similarly, nNOS expression was decreased in specific brain regions after IH<sup>64</sup>. In physiologic conditions, nNOS is expressed in astrocytes, pericytes and vascular nitrergic neurons in the optic nerve head whereas eNOS is confined to endothelial cells. Nitric oxide is thought to play a signaling role between astrocytes and between astrocytes and axons<sup>65</sup>. The detrimental role of iNOS in optic nerve after chronic IOP increase<sup>65</sup> and in optic nerve head astrocytes of glaucoma patients<sup>66</sup> underlines the potential of neuronal and vascular damage of the IH-induced eNOs and nNOS upregulation.

Our results support a **major role of EDHF in the vasodilatory mechanisms of rat OA, as previously reported in mouse OA** <sup>34, 67</sup>. The cyclooxygenase pathway appears to be unaffected by IH since the effects of indomethacin and TPC are not altered in IH-exposed rats. Cytochrome P450 (CYP450) products are known to be involved in the vasorelaxation of the mouse OA<sup>34</sup>. In our study, blockade of all CYP450 products with the non-specific inhibitor fluconazole produced opposite effects in NX and IH rats, suggesting that IH impairs the balance between vasodilating and vasoconstrictive CYP450 products. In normoxic rats, fluconazole delayed Ach-induced relaxation, revealing a dominant role of vasodilating EETs in the response to Ach. In contrast, in IH-exposed rats, the Ach-induced relaxation of the OA was shifted to the left by fluconazole, suggesting a primary contribution of vasoconstrictor 20-HETE. The imbalance could be explained by an increase in 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) expression/activity, and/or a decrease in epoxyeicosatrienoic acids (EETs) expression/activity or an increased degradation by soluble epoxide hydrolase (sHE). EETs are vasodilatory molecules with angiogenic and anti-inflammatory properties<sup>68</sup> and are metabolized by sHE into less biologically active dihydroxyeicosatrienoic acids (DHETs). Cytochrome P450 requires oxygen to transform arachidonic acid into its vasoactive metabolites<sup>69</sup> and hypoxia reduces the synthesis of 20-HETE<sup>70</sup>. These observations suggest that IH could alter 20-HETE synthesis. 20-HETE synthesis is also involved in ischemia-reperfusion brain damages in several models<sup>71, 72</sup>. To our knowledge, there is no actual information regarding the function of cardiovascular CYP450 enzymes in IH-exposed animals and OSA patients. Further investigation of the function of cardiovascular CYP450 enzymes in IH-exposed animals and OSA patients is thus necessary to fully investigate the impact of IH/OSA on CYP450 function.

## **Conclusion**

In the present study, we have shown that chronic IH exposure induces vascular dysregulation in the rat ophthalmic artery, characterized by increased reactivity to ET-1, impaired NO-mediated vasorelaxation and an imbalance in the contribution of CYP 450 products to vascular tone. This was associated with increased oxidative stress markers

in OA. These results suggest that the endothelin system could be a potential target for the prevention of ocular vascular dysfunction associated with OSA. An ongoing clinical trial (ENDOTHELION Study Group, Effect of Bosentan in NAION Patients, ClinicalTrials.gov identifier: NCT02377271) is exploring the beneficial effect of a dual ET1 antagonist, bosentan, at the early onset period of NAION.

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank the Health Ministry (DGOS), Fondation de France (Berthe Fouassier grant), le fonds AGIR pour les maladies chroniques, RETINA FRANCE, and ARFO (Association for Research in Ophthalmology, Grenoble) for their support.

## References:

1. Young, T. *et al.* The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N. Engl. J. Med.* **328**, 1230–1235 (1993).
2. Peppard, P. E., Young, T., Palta, M. & Skatrud, J. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1378–1384 (2000).
3. Peker, Y., Carlson, J. & Hedner, J. Increased incidence of coronary artery disease in sleep apnoea: a long-term follow-up. *Eur. Respir. J.* **28**, 596–602 (2006).
4. McNicholas, W. T., Bonsignore, M. R., Bonsignore, M. R. Management Committee of EU COST ACTION B26. Sleep apnoea as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence, basic mechanisms and research priorities. *Eur. Respir. J.* **29**, 156–178 (2007).
5. Kato, M. *et al.* Impairment of endothelium-dependent vasodilation of resistance vessels in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation* **102**, 2607–2610 (2000).
6. Ryan, S., Taylor, C. T. & McNicholas, W. T. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation* **112**, 2660–2667 (2005).
7. Imadojemu, V. A., Gleeson, K., Gray, K. S., Sinoway, L. I. & Leuenberger, U. A. Obstructive apnea during sleep is associated with peripheral vasoconstriction. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **165**, 61–66 (2002).
8. Hedner, J. A., Wilcox, I., Laks, L., Grunstein, R. R. & Sullivan, C. E. A specific and potent pressor effect of hypoxia in patients with sleep apnea. *Am. Rev. Respir. Dis.* **146**, 1240–1245 (1992).
9. Zamarrón-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).
10. Nieto, F. J., Herrington, D. M., Redline, S., Benjamin, E. J. & Robbins, J. A. 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).
11. Schulz, R. *et al.* Decreased plasma levels of nitric oxide derivatives in obstructive sleep apnoea: response to CPAP therapy. *Thorax* **55**, 1046–1051 (2000).
12. Phillips, S. A., Olson, E. B., Morgan, B. J. & Lombard, J. H. Chronic intermittent hypoxia impairs endothelium-dependent dilation in rat cerebral and skeletal muscle resistance arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **286**, H388–93 (2004).
13. Joyeux-Faure, M. *et al.* Chronic intermittent hypoxia increases infarction in the isolated rat heart. *J. Appl. Physiol.* **98**, 1691–1696 (2005).
14. Lefebvre, B. *et al.* Functional assessment of vascular reactivity after chronic intermittent hypoxia in the rat. *Respir Physiol Neurobiol* **150**, 278–286 (2006).
15. Allahdadi, K. J., Walker, B. R. & Kanagy, N. L. ROK contribution to endothelin-mediated contraction in aorta and mesenteric arteries following intermittent hypoxia/hypercapnia in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, H2911–8 (2007).
16. Snow, J. B., Gonzalez Bosc, L. V., Kanagy, N. L., Walker, B. R. & Resta, T. C. Role for PKC $\beta$  in enhanced endothelin-1-induced pulmonary vasoconstrictor reactivity following intermittent hypoxia. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **301**, L745–54 (2011).
17. Philippi, N. R. *et al.* Time course of intermittent hypoxia-induced impairments in resistance artery structure and function. *Respir Physiol Neurobiol* **170**, 157–163 (2010).
18. Palombi, K. *et al.* Non-arteritic anterior ischaemic optic neuropathy is nearly systematically associated with obstructive sleep apnoea. *Br J Ophthalmol* **90**, 879–882 (2006).
19. Aptel, F. *et al.* Association of Nonarteritic Ischemic Optic Neuropathy With Obstructive Sleep Apnea Syndrome: Consequences for Obstructive Sleep Apnea Screening and Treatment. *JAMA Ophthalmol* **133**, 797–804 (2015).



20. Bilgin, G. Normal-tension glaucoma and obstructive sleep apnea syndrome: a prospective study. *BMC Ophthalmol* **14**, 27 (2014).
21. Purvin, V. A., Kawasaki, A. & Yee, R. D. Papilledema and obstructive sleep apnea syndrome. *Arch. Ophthalmol.* **118**, 1626–1630 (2000).
22. Leroux les Jardins, G. *et al.* [Retinal vein occlusion and obstructive sleep apnea syndrome]. *J Fr Ophtalmol* **32**, 420–424 (2009).
23. Belaidi, E. *et al.* 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).
24. Ramond, A. *et al.* Oxidative stress mediates cardiac infarction aggravation induced by intermittent hypoxia. *Fundam Clin Pharmacol* **27**, 252–261 (2013).
25. Arnaud, C. *et al.* The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **184**, 724–731 (2011).
26. de Juan, J. A., Moya, F. J., Fernandez-Cruz, A. & Fernandez-Durango, R. Identification of endothelin receptor subtypes in rat retina using subtype-selective ligands. *Brain Res.* **690**, 25–33 (1995).
27. Dibas, A., Prasanna, G. & Yorio, T. Localization of endothelin-converting enzyme in bovine optic nerve and retina. *J Ocul Pharmacol Ther* **21**, 288–297 (2005).
28. Haefliger, I. O., Flammer, J. & Lüscher, T. F. Nitric oxide and endothelin-1 are important regulators of human ophthalmic artery. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **33**, 2340–2343 (1992).
29. Meyer, P., Flammer, J. & Lüscher, T. F. Endothelium-dependent regulation of the ophthalmic microcirculation in the perfused porcine eye: role of nitric oxide and endothelins. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **34**, 3614–3621 (1993).
30. Yao, K., Tschudi, M., Flammer, J. & Lüscher, T. F. Endothelium-dependent regulation of vascular tone of the porcine ophthalmic artery. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **32**, 1791–1798 (1991).
31. Jarajapu, Y. P. R., Grant, M. B. & Knot, H. J. Myogenic tone and reactivity of the rat ophthalmic artery. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**, 253–259 (2004).
32. Lassmann, H., Pamperl, H. & Stockinger, G. [Morphological-functional aspects of intima pads in the rat ophthalmic artery]. *Z Mikrosk Anat Forsch* **85**, 139–148 (1972).
33. May, C. A. & Lütjen-Drecoll, E. Morphology of the murine optic nerve. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 2206–2212 (2002).
34. Manicam, C., Staubitz, J. I., Pfeiffer, N. & Gericke, A. Mechanisms of endothelium-dependent vasodilation in the ophthalmic artery of mice. in (2014).
35. Shaw, A. & Xu, Q. Biomechanical stress-induced signaling in smooth muscle cells: an update. *Curr Vasc Pharmacol* **1**, 41–58 (2003).
36. Asakura, T. & Karino, T. Flow patterns and spatial distribution of atherosclerotic lesions in human coronary arteries. *Circ. Res.* **66**, 1045–1066 (1990).
37. Satoh, K., Nigro, P. & Berk, B. C. Oxidative stress and vascular smooth muscle cell growth: a mechanistic linkage by cyclophilin A. *Antioxid. Redox Signal.* **12**, 675–682 (2010).
38. Totoston, P. *et al.* Atorvastatin protects against deleterious cardiovascular consequences induced by chronic intermittent hypoxia. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **238**, 223–232 (2013).
39. Dopp, J. M. *et al.* Xanthine oxidase inhibition attenuates endothelial dysfunction caused by chronic intermittent hypoxia in rats. *Respiration* **82**, 458–467 (2011).
40. Haefliger, I. O., Flammer, J. & Lüscher, T. F. Heterogeneity of endothelium-dependent regulation in ophthalmic and ciliary arteries. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **34**, 1722–1730 (1993).
41. Kanagy, N. L., Walker, B. R. & Nelin, L. D. Role of endothelin in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension* **37**, 511–515 (2001).
42. Troncoso Brindeiro, C. M., da Silva, A. Q., Allahdadi, K. J., Youngblood, V. & Kanagy, N. L. Reactive oxygen species contribute to sleep apnea-induced hypertension in rats. *Am. J.*

- Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, H2971–6 (2007).
43. Allahdadi, K. J., Walker, B. R. & Kanagy, N. L. Augmented endothelin vasoconstriction in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension* **45**, 705–709 (2005).
  44. Durgan, D. J., Crossland, R. F., Lloyd, E. E., Phillips, S. C. & Bryan, R. M. Increased cerebrovascular sensitivity to endothelin-1 in a rat model of obstructive sleep apnea: a role for endothelin receptor B. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **35**, 402–411 (2015).
  45. MacCumber, M. W. & D'Anna, S. A. Endothelin receptor-binding subtypes in the human retina and choroid. *Arch. Ophthalmol.* **112**, 1231–1235 (1994).
  46. de Juan, J. A., Moya, F. J., Garcia de Lacoba, M., Fernandez-Cruz, A. & Fernandez-Durango, R. Identification and characterization of endothelin receptor subtype B in rat retina. *J. Neurochem.* **61**, 1113–1119 (1993).
  47. Sasaoka, M. *et al.* Intravitreal injection of endothelin-1 caused optic nerve damage following to ocular hypoperfusion in rabbits. *Exp. Eye Res.* **83**, 629–637 (2006).
  48. Prasanna, G., Krishnamoorthy, R., Clark, A. F., Wordinger, R. J. & Yorio, T. Human optic nerve head astrocytes as a target for endothelin-1. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 2704–2713 (2002).
  49. Krishnamoorthy, R. R. *et al.* Role of the ETB receptor in retinal ganglion cell death in glaucoma. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **86**, 380–393 (2008).
  50. Stokely, M. E., Brady, S. T. & Yorio, T. Effects of endothelin-1 on components of anterograde axonal transport in optic nerve. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 3223–3230 (2002).
  51. Capone, C. *et al.* Endothelin 1-dependent neurovascular dysfunction in chronic intermittent hypoxia. *Hypertension* **60**, 106–113 (2012).
  52. Cai, H. & Harrison, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* **87**, 840–844 (2000).
  53. Steiner, D. R. S., Gonzalez, N. C. & Wood, J. G. Interaction between reactive oxygen species and nitric oxide in the microvascular response to systemic hypoxia. *J. Appl. Physiol.* **93**, 1411–1418 (2002).
  54. Tahawi, Z., Orolinova, N., Joshua, I. G., Bader, M. & Fletcher, E. C. Altered vascular reactivity in arterioles of chronic intermittent hypoxic rats. *J. Appl. Physiol.* **90**, 2007–13–discussion 2000 (2001).
  55. Karaki, H. *et al.* ETB receptor antagonist, IRL 1038, selectively inhibits the endothelin-induced endothelium-dependent vascular relaxation. *Eur. J. Pharmacol.* **231**, 371–374 (1993).
  56. Toda, M., Okamura, T., Ayajiki, K. & Toda, N. Neurogenic vasoconstriction as affected by cholinergic and nitrooxidergic nerves in dog ciliary and ophthalmic arteries. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, 1753–1760 (1999).
  57. Buckley, C. H., Hadoke, P. W. & O'Brien, C. J. Role of the endothelium in modulating functional responses of isolated bovine anterior ciliary arteries to vasoconstrictor agonists. *Br J Ophthalmol* **82**, 826–829 (1998).
  58. Luksch, A. *et al.* Effects of systemic NO synthase inhibition on choroidal and optic nerve head blood flow in healthy subjects. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**, 3080–3084 (2000).
  59. Izumi, N. *et al.* Role of nitric oxide in regulation of retinal blood flow in response to hyperoxia in cats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **49**, 4595–4603 (2008).
  60. Ip, M. S. *et al.* Circulating nitric oxide is suppressed in obstructive sleep apnea and is reversed by nasal continuous positive airway pressure. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **162**, 2166–2171 (2000).
  61. Carlson, J. T., Rångemark, C. & Hedner, J. A. Attenuated endothelium-dependent vascular relaxation in patients with sleep apnoea. *J. Hypertens.* **14**, 577–584 (1996).
  62. Krause, B. J. *et al.* Arginase-endothelial nitric oxide synthase imbalance contributes to endothelial dysfunction during chronic intermittent hypoxia. *J. Hypertens.* **33**, 515–24–discussion 524 (2015).
  63. Snow, J. B. *et al.* Differential effects of chronic hypoxia and intermittent hypocapnic and eucapnic hypoxia on pulmonary vasoreactivity. *J. Appl. Physiol.* **104**, 110–118 (2008).

64. Li, R. C. *et al.* Nitric oxide synthase and intermittent hypoxia-induced spatial learning deficits in the rat. *Neurobiol. Dis.* **17**, 44–53 (2004).
65. Shareef, S., Sawada, A. & Neufeld, A. H. Isoforms of nitric oxide synthase in the optic nerves of rat eyes with chronic moderately elevated intraocular pressure. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, 2884–2891 (1999).
66. Neufeld, A. H., Hernandez, M. R. & Gonzalez, M. Nitric oxide synthase in the human glaucomatous optic nerve head. *Arch. Ophthalmol.* **115**, 497–503 (1997).
67. Laspas, P. *et al.* Role of nitric oxide synthase isoforms for ophthalmic artery reactivity in mice. *Exp. Eye Res.* **127**, 1–8 (2014).
68. Fleming, I. Vascular cytochrome p450 enzymes: physiology and pathophysiology. *Trends Cardiovasc. Med.* **18**, 20–25 (2008).
69. Oliw, E. H., Guengerich, F. P. & Oates, J. A. Oxygenation of arachidonic acid by hepatic monooxygenases. Isolation and metabolism of four epoxide intermediates. *J. Biol. Chem.* **257**, 3771–3781 (1982).
70. Gebremedhin, D., Yamaura, K. & Harder, D. R. Role of 20-HETE in the hypoxia-induced activation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel currents in rat cerebral arterial muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **294**, H107–20 (2008).
71. Omura, T. *et al.* Effect of a new inhibitor of the synthesis of 20-HETE on cerebral ischemia reperfusion injury. *Stroke* **37**, 1307–1313 (2006).
72. Renic, M. *et al.* Protective effect of 20-HETE inhibition in a model of oxygen-glucose deprivation in hippocampal slice cultures. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **302**, H1285–93 (2012).

## Figures and table legends

**Figure 1:** A) Example of ophthalmic artery transversal section (haematoxylin and eosin, objective 40), used to evaluate intima-media thickness, mean perimeter and area. B) Example of transversal section at the level of arterial cushions (haematoxylin and eosin, objective 40). C and D) Ultrastructure of ophthalmic artery wall. Electron microscopy was performed on ultrathin cross sections of the ophthalmic artery. Representative images are shown from normoxic (C) and intermittent hypoxic (D) rats. Asterisks denote smooth muscle cells from media, arrowheads denote internal elastic lamina and stars denote endothelial cells. Scale bars A and B: 20  $\mu\text{m}$ , C and D: 5  $\mu\text{m}$ .

**Figure 2: Vasoconstrictive responses of AO from IH and NX rats to: A)** phenylephrine  $10^{-9}$  to  $10^{-4}$  M. **B)** serotonin  $10^{-10}$  to  $3 \cdot 10^{-6}$  M **C)** ET-1  $10^{-10}$  to  $10^{-6}$  M **D)** a single dose of  $3 \cdot 10^{-8}$  M ET-1, alone (ET-1) and after ET<sub>R</sub>A antagonist BQ-123 (ET-1 + BQ-123) or ET<sub>R</sub>B antagonist BQ-788 (ET-1 + BQ-788) incubation. <sup>□</sup>p = 0.005 HI vs. NX (ET-1); <sup>¥</sup>p and <sup>✳</sup>p = 0.003 ET-1 vs. ET-1 + BQ-123 in NX and IH groups respectively; <sup>b</sup>p = 0.12 HI vs. NX (ET-1 + BQ-123); <sup>h</sup>p = 0.004 and <sup>□</sup>p = 0.67 ET-1 vs. ET-1 + BQ-788 in NX and IH groups respectively; <sup>#</sup>p = 0.04 HI vs. NX (ET-1 + BQ-788).

**Figure 3: Ophthalmic artery relaxation to cumulative doses of acetylcholine (Ach) (A), to single dose sodium nitroprusside (SNP,  $10^{-4}$  M) (B) and basal response after 30 min-incubation with inhibitors (C).** A) Ach-induced relaxation in presence and absence of non-specific NOS inhibitor (L-NAME,  $10^{-4}$  M). IH rats showed a significant delayed response to Ach compared to NX rats (\* p<0.0001). L-NAME induced a significant right shift in Ach response from  $10^{-7}$  to  $10^{-6}$  M in NX rats (<sup>#</sup>p<0.0001), and in Ach response from  $10^{-7}$  to  $10^{-6}$  M in IH rats (<sup>¥</sup>p<0.0001). B) SNP-induced relaxation is similar in NX and IH rats. C) L-NAME-induced increase in basal tone in ophthalmic artery was higher in IH rats than in NX rats (\* p<0.05). TPC induced a similar increase in basal vascular tone in both groups. Fluconazole did not elicit a significant variation of basal vascular tone.

**Figure 4: Ophthalmic artery relaxation to cumulative doses of acetylcholine (Ach) after 30-min incubation with L-NAME and indomethacin ( $10^{-4}$  M each) (A), TPC ( $10^{-4}$  M) (B) and L-NAME plus TPC ( $10^{-4}$  M each) (C).** A) Ach-induced relaxation in

presence of L-NAME and a cyclo-oxygenase inhibitor (indomethacin,  $10^{-4}$  M) was similar in NX and IH rats. B) TPC induced a significant right shift in Ach response from  $10^{-7}$  to  $3.10^{-7}$  M in NX rats ( $^{\#}p<0.013$ ), and in Ach response to  $3.10^{-7}$  M in IH rats ( $^{\forall}p<0.013$ ). Relaxation to Ach  $3.10^{-7}$  was stronger in NX rats compared to HI rats ( $^*p<0.0001$ ). E) Ach-induced relaxation in presence of L-NAME and TPC ( $10^{-4}$  M). TPC induced a significant right shift in Ach+L-NAME response from  $10^{-6}$  to  $3.10^{-6}$  M in IH rats ( $^{\text{h}}p<0.0001$ ) and at  $10^{-6}$  M in NX rats ( $^{\text{v}}p<0.0001$ ).

**Figure 5: Ophthalmic artery relaxation to cumulative doses of acetylcholine (Ach) after 30-min incubation with fluconazole ( $10^{-4}$  M) (A) and L-NAME plus fluconazole ( $10^{-4}$  M each) (B).** A) Fluconazole induced a significant right shift in Ach response at  $3.10^{-7}$  M in NX rats ( $^{\#}p<0.0001$ ). B) In presence of L-NAME + fluconazole, IH rats showed a significant increase in response to  $3.10^{-7}$  and  $10^{-6}$  M Ach compared to NX rats ( $^{\text{b}}p<0.0001$ ). Ach dose-response curve showed a significant left shift in the IH group at  $3.10^{-7}$  M ( $^{\text{h}}p<0.0001$ ).

**Figure 6: mRNA expression of endothelin 1 (ET-1), endothelin receptors A (ET<sub>RA</sub>) and B (ET<sub>RB</sub>), endothelial, neuronal and inducible nitric oxide synthases (eNOS, nNOS and iNOS) in retina (A) and optic nerve (B) of rats exposed to 14 days of intermittent hypoxia or normoxia.** Relative expression of genes is expressed as fold increase compared to NX rats.

**Figure 7: Endothelin A receptor (ET<sub>RA</sub>) expression and superoxide ions production in ophthalmic artery.** A and B) Representative images of ET<sub>RA</sub> immunolabelling using HRP-DAB staining from intermittent hypoxic (A) and normoxic (B) rats (objective 40). C and D) Representative confocal images of Dihydroethidium (DHE) fluorescence in ophthalmic arteries from intermittent hypoxic (C) and normoxic (D) rats (immersion objective 40). Scale bar (A-D): 20  $\mu\text{m}$ .

**Table 1: qPCR primers.**

**Table 2: Mean hemodynamic parameters after 14 days exposure to normoxia (NX) or intermittent hypoxia (IH).**

**Table 3: Morphometric parameters of ophthalmic artery**, evaluated in NX (n = 7) and HI rats (n = 11), in hematoxylin and eosin stained cross sections.

**Table 4:  $E_{max}$  and  $pD_2$  values.** For phenylephrine, endothelin 1 and serotonin,  $E_{max}$  values are expressed as percentage of contraction to KCl 60 mM. For SNP and acetylcholine  $\pm$  inhibitors,  $E_{max}$  values are expressed as percentage of contraction to Serotonin. Results are expressed as mean  $\pm$  SD. Number  $n$  of ophthalmic arteries is indicated in parenthesis. \* p = 0.01 IH vs. NX, \*\*p < 0.0001 IH vs. NX, \*\*\*p = 0.026 IH vs. NX.

Table 1: qPCR primers

Gene	Forward Primer	Reverse Primer	Amplicon size (bp)
HPRT1	GGGGGACATAAAAAGTTATTGGTGGGA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCTTG	172
CYCA	TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG	CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC	125
ACT	GGGTATGGAATCCTGTGGCATCC	GCTCAGGAGGAGCAATGATCTTGA	203
ET1	CACTCCCGAGCGCGTCCGTC	TGGCATCTGTTCCCTTGGTCTGTGG	107
ETRA	CGCTCTCAGTGTGGACAGGTACAG	ACCATGACGAAGCCGATTGCT	150
ETRB	AGAGACGAGAAGTGGCCAAGACAG	TTAATGCAGGAATTCAAAGAAGCCA	196
eNOS	CTGCTTCATCAGGGGGGCTC	CCGGAAGGGTGAATACCAGT	97
nNOS	AGGAACACTGCTCTGGGTGTCATC	CGCTGCTTCTCTTTCTCATTAGTGG	167
iNOS	GCAATGGGCAGACTCTGAAGAAA	AGCAAAGGCACAGAAGTGGGTA	116

Table 2: Mean hemodynamic parameters after 14 days exposure to normoxia (NX) or intermittent hypoxia (IH). (n = 19 rats in each group)

	NX	IH	p value
Hematocrit (%)	43.4 ± 2.2	49.7 ± 2.9	0.000
Mean	113 ± 11.5	122.1 ± 12.1	0.02
Arterial blood pressure (mmHg)			
Systolic	137.2 ± 14.7	147.9 ± 15.2	0.02
Diastolic	100.8 ± 12.5	109 ± 12	0.04
Heart Rate (HB/min)	355 ± 32	370 ± 26	0.12

Table 3: Morphometric parameters of ophthalmic artery evaluated in NX (n = 7) and HI rats (n = 11), in hematoxylin and eosin stained cross sections.

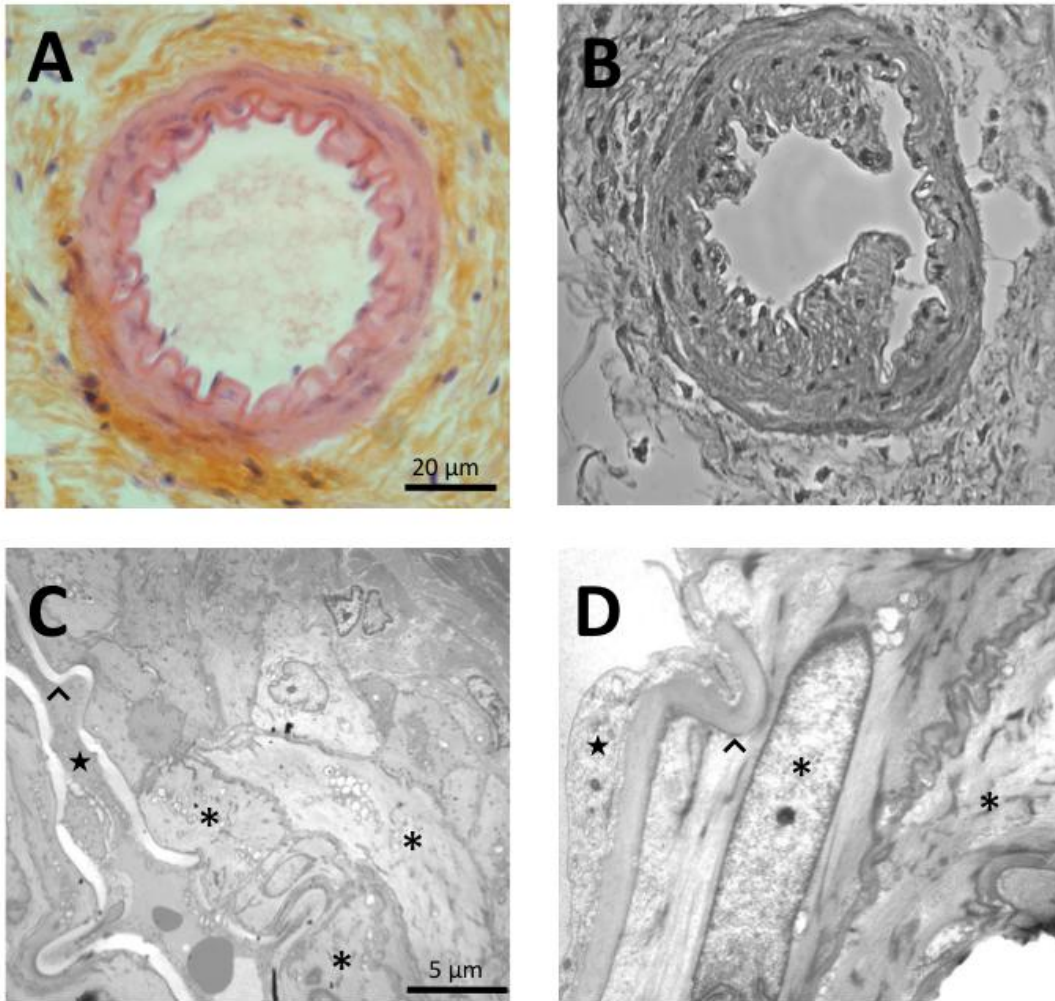
Parameter	NX	HI	P value
Mean intima-media thickness thickness (µm)	17.3 ± 2.1	16.5 ± 2.7	0.4
Mean perimeter (µm)	342.2 ± 126	349.8 ± 45.9	0.3

Table 4:  $E_{\max}$  and  $pD_2$  values.

		NX	HI
KCl 60 mM	$E_{\max}$ (mN)	7.5 ± 1.5 (37)	7.9 ± 1.6 (36)
Phenylephrine	$E_{\max}$ (%)	127.8 ± 15.6 (10)	121.7 ± 9.4 (15)
	$pD_2$	5.6 ± 0.2	5.8 ± 0.2
Serotonin	$E_{\max}$ (%)	174.6 ± 22 (12)	175.2 ± 2.8 (13)
	$pD_2$	7.1 ± 0.0	7.1 ± 0.0
Endothelin 1	$E_{\max}$ (%)	161 ± 18 (6)	143.7 ± 29 (8)
	$pD_2$	7.2 ± 0.1	7.4 ± 0.2
Acetylcholine (Ach)	$E_{\max}$ (%)	1.6 ± 3.6 (16)	3.0 ± 3.3 (16)
	$pD_2$	6.8 ± 0.2 *	6.6 ± 0.2
SNP 10 <sup>-4</sup> M	$E_{\max}$ (%)	20.8 ± 6 (6)	22.9 ± 9.4 (6)
Ach + L-NAME	$E_{\max}$ (%)	6.8 ± 7.5 (16)	4.4 ± 4.5 (16)
	$pD_2$	6.3 ± 0.2	6.2 ± 0.2
Ach + L-NAME + Indomethacin	$E_{\max}$ (%)	1.3 ± 3.8 (8)	0 ± 5.0 (9)
	$pD_2$	6.2 ± 0.2	6.2 ± 0.2
Ach + TPC	$E_{\max}$ (%)	-3.5 ± 3.3 (10)	-1.3 ± 1.8 (8)
	$pD_2$	6.5 ± 0.2	6.3 ± 0.1
Ach + L-NAME + TPC	$E_{\max}$ (%)	0 ± 2.5 (10)	1.7 ± 3.5 (8)
	$pD_2$	5.9 ± 0.3 **	6.0 ± 0.4
Ach + Fluconazole	$E_{\max}$ (%)	1.5 ± 6 (6)	2.3 ± 6.4 (6)
	$pD_2$	6.5 ± 0.2	6.7 ± 0.2
Ach + L-NAME + Fluconazole	$E_{\max}$ (%)	2.1 ± 8.7 (5)	0.4 ± 5.2 (6)
	$pD_2$	5.9 ± 0.4 ***	6.4 ± 0.3



Figure 1



**Figure 2**

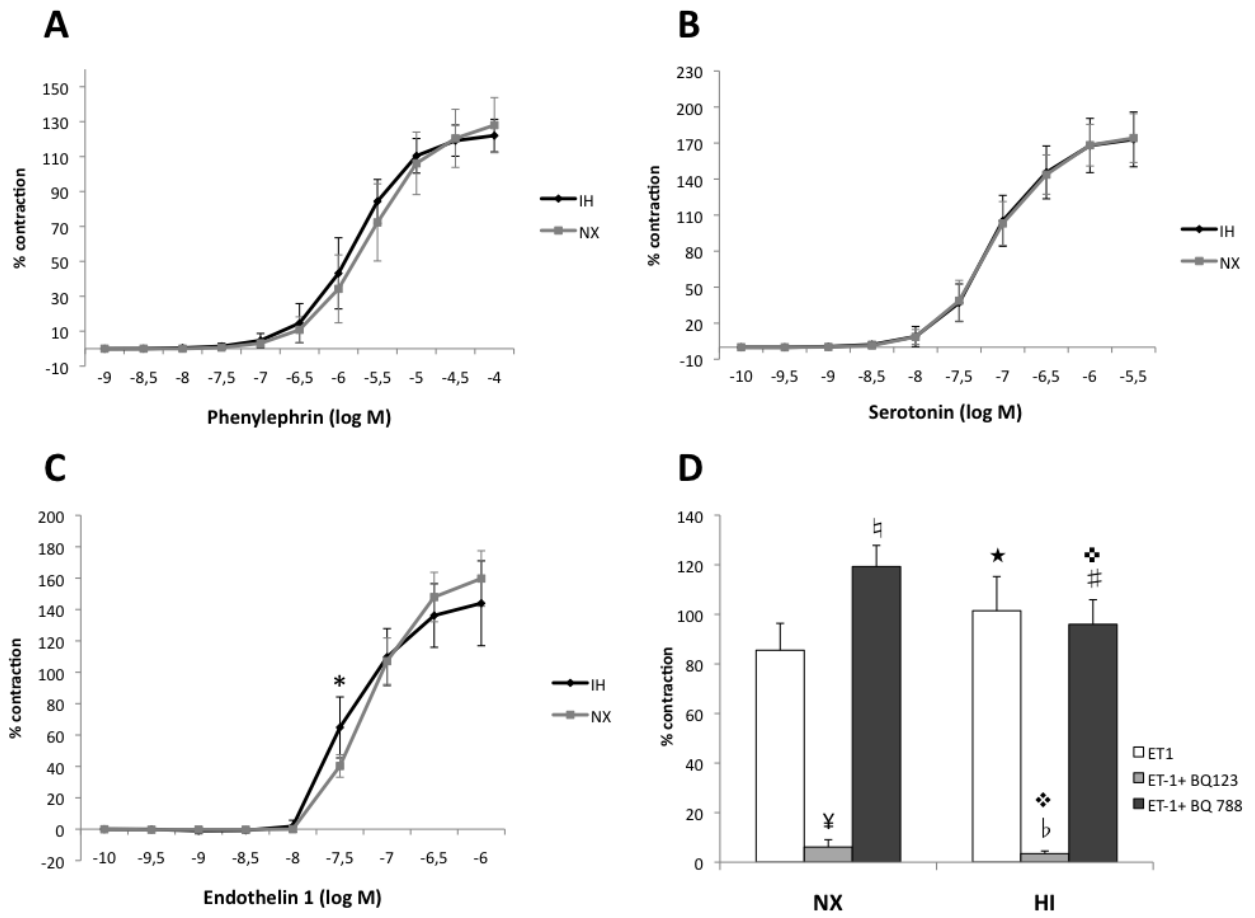


Figure 3

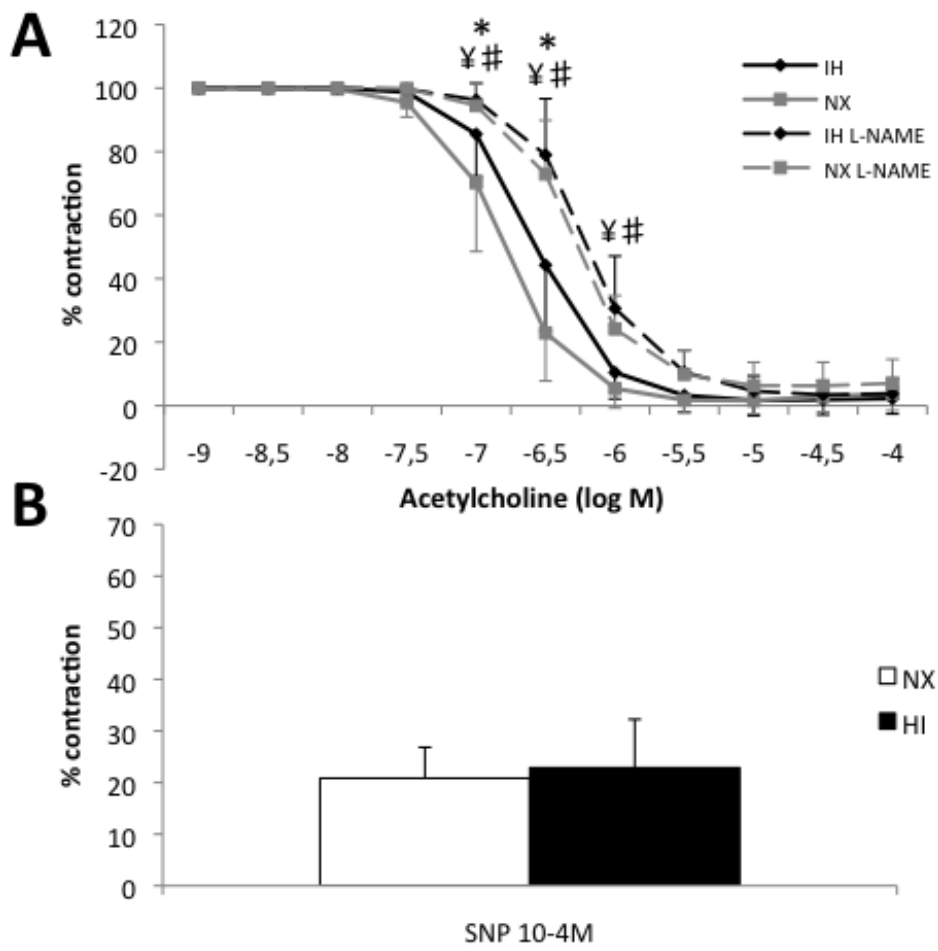


Figure 4

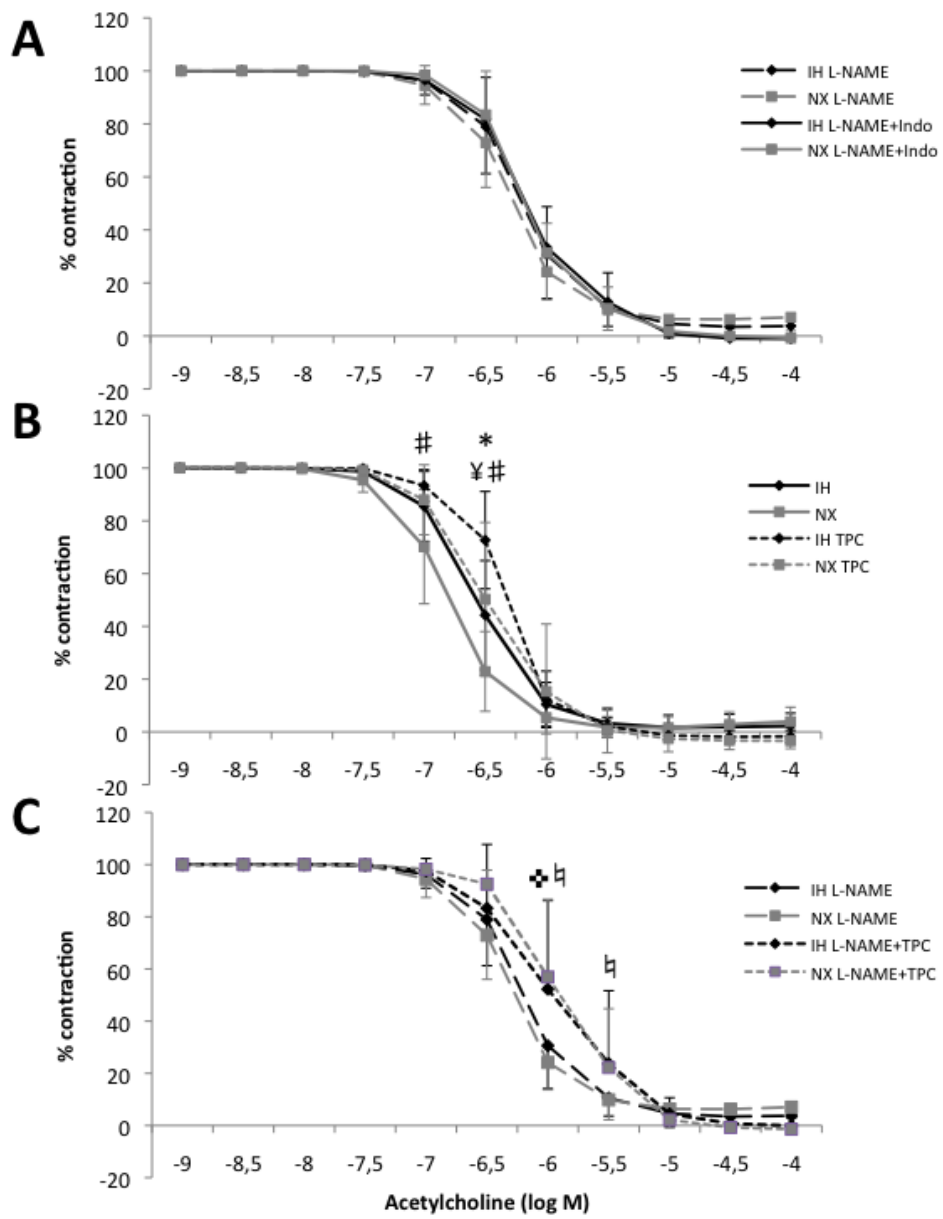


Figure 5

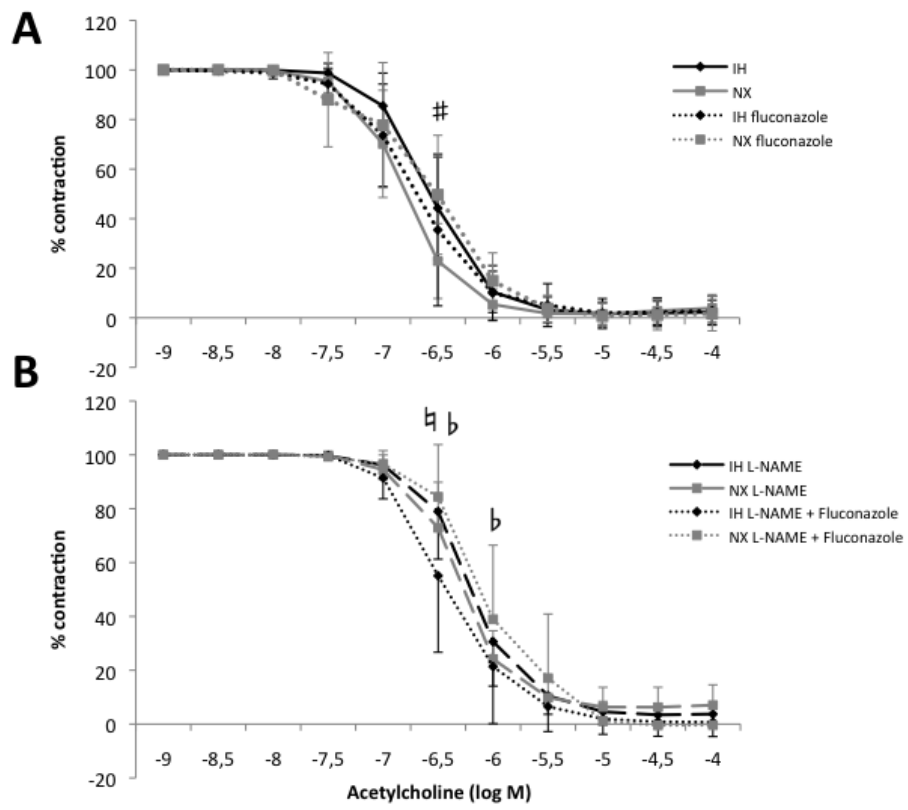


Figure 6

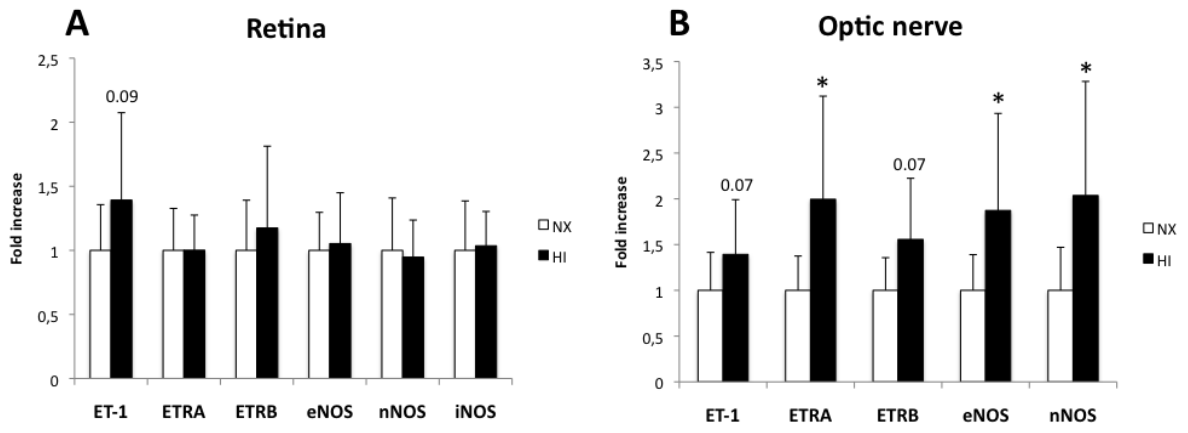
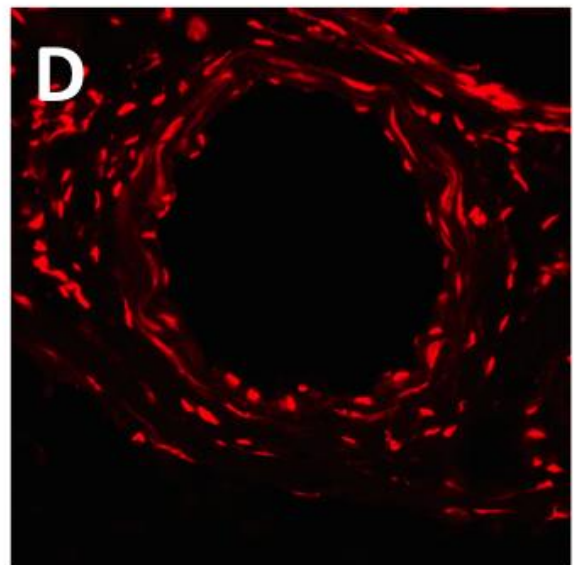
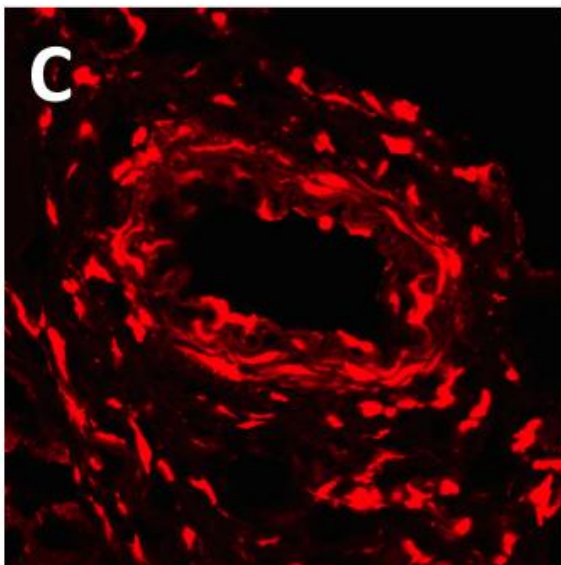
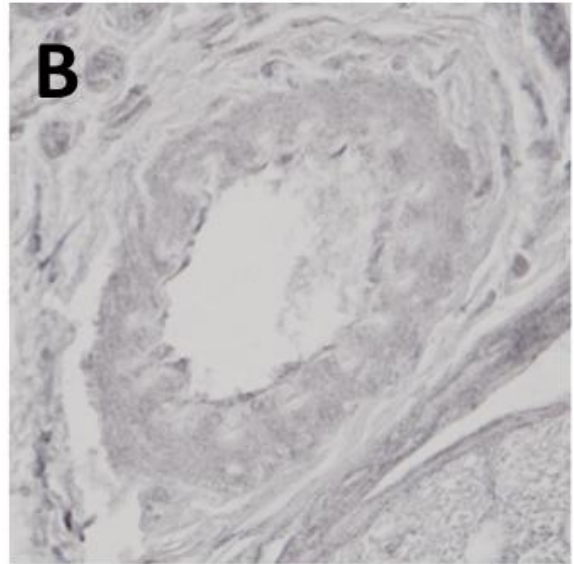
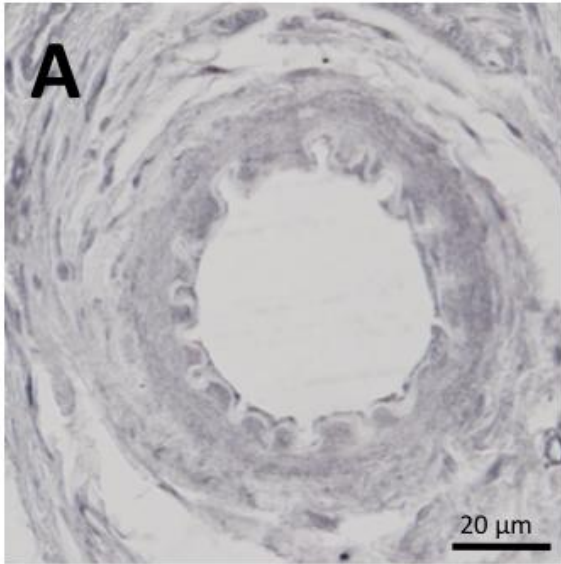


Figure 7







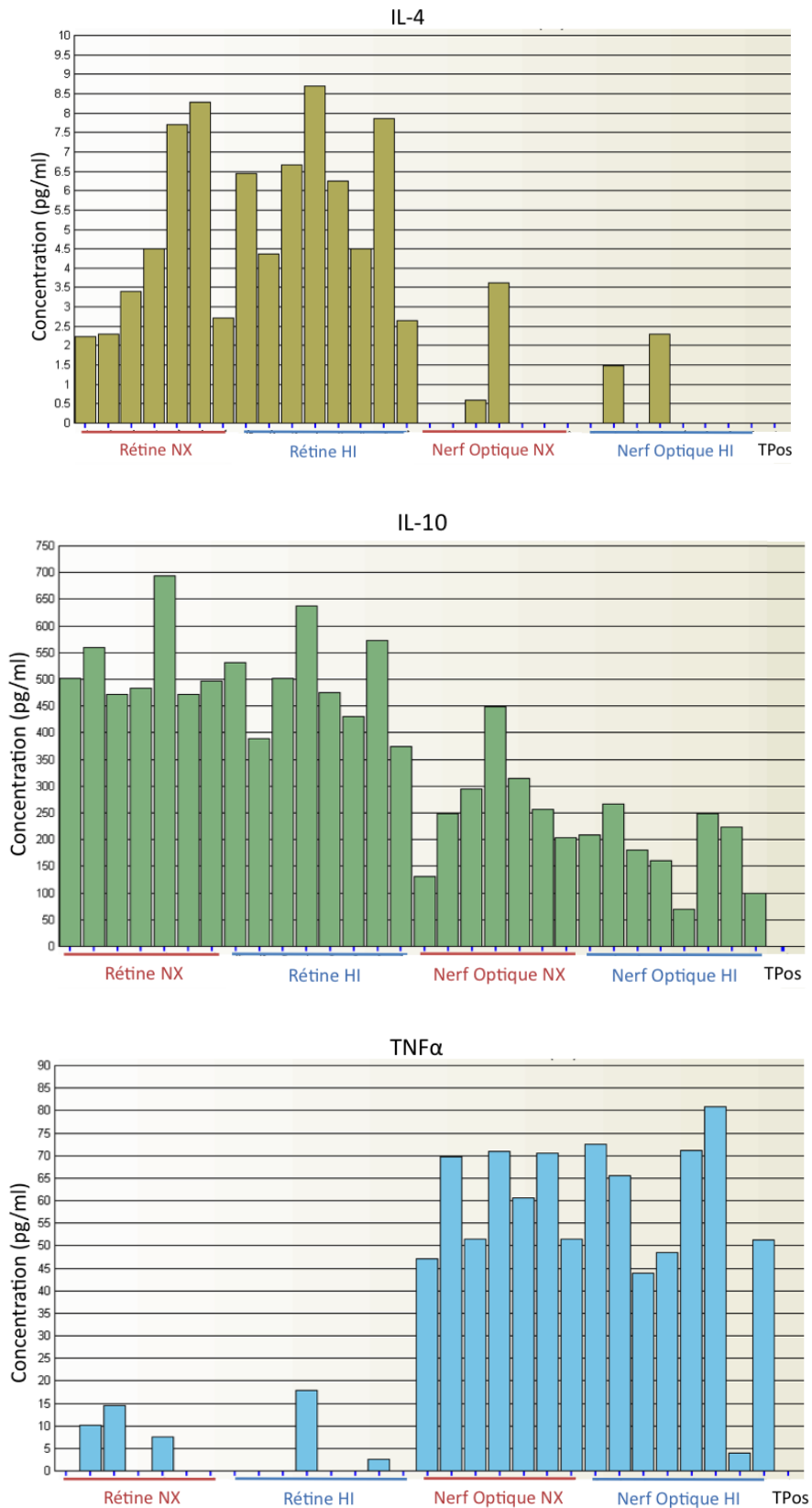
## 4.2 Autres résultats

### 4.2.1 Recherche des marqueurs d'inflammation associés à l'HI dans le nerf optique et la rétine du rat

L'analyse des résultats de la quantification des cytokines par technique BioPlex a révélé un signal très faible pour toutes les cytokines, inférieur au seuil de détection pour IL-1  $\beta$ , IL-6 et MCP-1 dans le nerf optique et dans la rétine, pour IL-4 dans le nerf optique et pour TNF $\alpha$  dans la rétine.

L'analyse du signal fluorescent pour les autres cibles (IL-4, IL-10 et TNF $\alpha$ ) n'a pas révélé de différences de concentration entre les rats NX et HI (Figure 8). De plus, le signal provenant du tissu utilisé comme témoin positif (rate de rat injecté au LPS) n'a pas été détecté pour ces 3 cytokines.

Par conséquent, les résultats de cette quantification n'ont pas permis de conclure sur l'expression de marqueurs de l'inflammation dans la rétine et le nerf optique de rat soumis à l'HI.



**Figure 11 : Concentration (pg/ml) en cytokines TNFα, IL-4 et IL-10 dans le nerf optique et la rétine de rat soumis à 14 jours de normoxie (NX) ou d'hypoxie intermittente (HI).**

## **5 Discussion et perspectives**

Plusieurs études ont mis en évidence une association forte entre le SAOS et la NOIAA-NA, rapportant une prévalence du SAOS jusqu'à 89% chez les patients atteints de NOIAA-NA (Palombi et al. 2006). D'autres travaux ont souligné la présence de défauts du champ visuel et d'amincissement localisé ou diffus de la couche des fibres optiques chez les patients SAOS en l'absence de glaucome avéré (Mojon et al. 1998 ; Tsang et al. 2006 ; Lin et al. 2011b). L'association entre le SAOS et d'autres neuropathies ou atteintes vasculaire rétiniennes fait actuellement l'objet de nombreux travaux. Au regard de la physiopathologie du SAOS, certaines altérations comme la dysfonction endothéliale, l'inflammation, l'activation du système sympathique et les variations de PA systémique sont susceptibles de contribuer à une altération de la régulation vasculaire oculaire. Actuellement, les conséquences de l'inflammation, reconnues à l'origine des complications dues au SAOS (Bergeron et al. 2005), et des altérations de la fonction vasculaire périphérique précoces (Kato et al. 2000 ; Ip et al. 2004) sur la fonction vasculaire oculaire n'ont pas été mises en évidence chez le patient apnéique ni chez le rongeur soumis à l'HI.

Dans cette première partie, nous avons montré que l'HI modifie la réponse de l'AO du rat, par une augmentation de la contraction liée à l'ET-1 et une diminution de la relaxation liée au NO. **L'augmentation de la réponse à ET-1 est** associée à une augmentation de la contraction liée à ET<sub>RA</sub> et une diminution de la relaxation liée à ET<sub>RB</sub>. La PGI<sub>2</sub> et l'ensemble des produits de la voie des COX ne participent pas à l'altération de la relaxation de l'AO. L'étude de la voie du CYP450 révèle un déséquilibre entre les effets des espèces vasodilatatrices et vasoconstrictrices. En parallèle nous avons observé une surexpression des ions superoxyde au niveau de l'AO. Cette observation supporte l'hypothèse d'une implication du stress oxydant dans l'altération de la réactivité de l'AO en réponse à l'HI chronique.

**L'augmentation de l'expression de ET<sub>RA</sub>** dans la paroi de l'artère ophtalmique pourrait contribuer à la réponse accrue à ET-1. Dans les artères mésentériques de rats soumis à l'HI, la réactivité majorée à ET-1 s'accompagne également d'une surexpression de ET<sub>RA</sub>, et est liée à une sensibilité accrue au calcium (Allahdadi et al. 2005). Dans ce lit vasculaire, cette augmentation de la réponse à ET-1 est liée à l'activation de la protéine kinase C  $\delta$  (PKC $\delta$ , enzyme capable d'inhiber la myosin light chain phosphatase) par le biais de la phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1) (Allahdadi et al. 2008)

(Webster et al. 2013), mais n'est pas liée à une activation de la Rho-associated kinase (ROK) (Allahdadi et al. 2007). Le rôle de la ROK dans la régulation du tonus myogénique de l'AO de rat prédomine sur celui de la phospholipase C et de PKC (Ito et al. 2007), mais leur implication respective dans la réponse à l'ET-1 n'est pas décrite. Les mécanismes cellulaires responsables de l'augmentation de ET-1 varient selon les lits vasculaires étudiés (Allahdadi et al. 2007), ainsi l'étude spécifique de ces mécanismes au sein de l'AO est nécessaire pour appréhender les effets spécifiques sur l'oeil.

L'augmentation des ions superoxyde au sein de l'AO suggère un **état de stress oxydant** qui pourrait participer à l'activation du système ET-1 et à la diminution de la biodisponibilité du NO. L'implication du stress oxydant dans les conséquences cardiovasculaires liées à l'HI a été montrée par plusieurs équipes, (cf discussion de l'étude 1). Néanmoins l'implication directe de cette augmentation dans l'altération de la réponse de l'AO n'a pas été évaluée. Il est donc important d'étudier l'effet d'un traitement antioxydant, comme le tempol, sur l'altération de la réponse de l'AO liée à l'HI pour valider cette hypothèse.

De même l'activation du système endothéline pourrait contribuer à l'aggravation du stress oxydant associé à l'HI (Sandoval et al. 2014) au sein de l'AO et participer à une boucle d'amplification délétère pour la fonction vasculaire locale. **L'utilisation d'un antagoniste mixte des récepteurs de l'ET-1 chez le rat soumis à l'HI** (bosentan, macitentan) permettrait de vérifier cette hypothèse et d'évaluer l'intérêt de ce traitement dans la prévention des troubles vasculaires oculaires chez les patients SAOS. Dans le cas de la NOIAA-NA, aucun traitement curatif ni préventif ne permet de prise en charge spécifique des patients atteints ou à risque. L'intérêt du traitement de référence du SAOS par PPC (Sullivan et al. 1981) sur le risque de NOIAA-NA fait encore l'objet de discussion. Récemment notre équipe (Aptel et al. 2015a) a montré que les patients NOIAA-NA atteints de SAOS sévère non traités par PPC ont un risque de bilatéralisation de la NOIAA-NA multiplié par 5,54 par rapport aux patients non apnéiques et aux patients atteints de SAOS modérés sans indication de traitement, pouvant suggérer un effet bénéfique de ce traitement sur l'évolution de la maladie. Néanmoins, les limites liées à la mise en place et à l'observance de la PPC (Weaver 2013) soulignent la nécessité de développer d'autres alternatives thérapeutiques. L'administration per os de bosentan pendant 14 jours augmente significativement le flux sanguin rétinien, choroïdien et de la

tête du nerf optique chez le sujet sain (Resch et al. 2009). Ainsi l'utilisation d'un antagoniste mixte de l'ET-1 pourrait constituer une alternative dans le traitement des dysfonctions vasculaires oculaires associées au SAOS. Dans cette optique une étude multicentrique randomisée française a débuté en juillet 2015 sous la coordination du Pr Christophe CHIQUET et du Pr Florent APTEL pour évaluer les effets du traitement par bosentan sur l'évolution de NOIAA-NA nouvellement diagnostiquée (Etude ENDOTHELION, Effet du bosentan chez les patients NOIAA-NA, identifiant ClinicalTrials.gov : NCT02377271).

En parallèle de l'étude de la réactivité de l'AO, nous avons évalué les effets de l'HI sur l'expression de facteurs pro-inflammatoires et des gènes pouvant être impliqués dans la réponse vasculaire et inflammatoire au sein de la rétine et du nerf optique. Nous avons ainsi observé une surexpression significative de ET<sub>RA</sub>, eNOS et nNOS dans le nerf optique du rat après 14 jours d'HI. Ces résultats suggèrent une possible altération de la balance des espèces vasoconstrictrices et vasodilatatrices au niveau du nerf optique.

Au delà de son pouvoir vasoconstricteur, l'ET-1 pourrait être impliquée dans la progression des neuropathies dégénératives comme le glaucome par action sur les cellules rétinienne et du nerf optique. L'ET-1 favorise le développement de la réaction astrogliale (Prasanna et al. 2002) et la mort des cellules ganglionnaires de la rétine par stimulation directe (Chauhan et al. 2004) (Krishnamoorthy et al. 2008) ou par perturbation du transport axonal au sein du nerf optique (Stokely et al. 2002). Elle induit notamment en culture cellulaire la prolifération et l'hypertrophie des astrocytes de la tête du nerf optique de l'homme via ET<sub>RA</sub> et ET<sub>RB</sub> (Prasanna et al. 2002 ; Murphy et al. 2010). De plus, l'infusion rétrobulbaire d'ET-1 est une technique couramment utilisée comme modèle animal de neuropathie optique chronique (Cioffi et al. 1995 ; Orgül et al. 1996 ; Wang et al. 2009 ; Chauhan et al. 2004). L'ET-1 est en effet capable d'induire une neuropathie optique chronique à des doses sans effet sur le flux sanguin oculaire (Krishnamoorthy et al. 2008), suggérant un effet direct sur les cellules de la rétine et du nerf optique. Nous n'avons pas observé, par microscopie électronique, d'altérations morphologiques des axones du nerf optique chez le rat après 14 jours d'HI (données non présentées). De plus, d'autres travaux sont nécessaires afin de caractériser l'impact potentiel de l'HI sur la fonction cellulaire de la rétine et du nerf optique.

Malgré l'utilisation d'une technique adaptée aux faibles concentrations de protéines, nous n'avons pas obtenu de résultats concluants concernant la quantification de cytokines dans la rétine et le nerf optique du rat. Ce résultat soulève une des limitations majeures de cette étude, qui est l'absence de quantification des protéines étudiées, en raison de la faible taille des tissus étudiés. Cette faible taille d'échantillon ne nous a pas permis de réaliser des quantifications protéiques par Western blot ou par dosage ELISA, et a donc été un frein dans la réalisation de ces techniques utilisées en routine au laboratoire. Seule la qPCR a donné des résultats pertinents. Néanmoins, l'expression génique ne reflète pas toujours l'expression ou le fonctionnement protéique. Poursuivre la caractérisation des voies impliquées dans les effets de l'HI au sein de la rétine et du nerf optique chez le rat nécessitera de pooler de nombreux échantillons et d'augmenter de façon critique le nombre de rats utilisés. Un modèle cellulaire serait une alternative intéressante. Un modèle d'exposition de cultures cellulaires à des cycles d'HI est actuellement en cours de mise au point au laboratoire et permettrait d'étudier des lignées comme les cellules astrocytaires et les cellules ganglionnaires rétiniennes (Krishnamoorthy et al. 2008).

Au delà des limites techniques liées à la taille des organes étudiés, plusieurs points limites de cette étude doivent être mentionnés.

#### Limites liées au modèle d'HI :

Le modèle d'HI du laboratoire a été validé sur la base de ses effets sur la pression artérielle, tout comme l'ont été les modèles d'HI développés par d'autres équipes (Fletcher et al. 2001; Kanagy et al. 2001). Son utilisation a été en particulier déterminante pour la compréhension des mécanismes d'activation du système sympathique associés au SAOS (Fletcher et al. 2001). Néanmoins, ce modèle, basé sur la variation de la fraction en oxygène de l'air inspiré, ne reproduit pas d'autres altérations liées au SAOS telles que les variations de pression intrathoracique lors des efforts inspiratoires infructueux, la fragmentation du sommeil ou encore l'hypercapnie accompagnant l'hypoxémie lors des apnées.

Notamment, la fragmentation du sommeil a un impact délétère sur le métabolisme glucidique, qui n'est pas reproduit dans ce modèle. De même, l'hypercapnie associée aux apnées a des effets controversés. Elle pourrait avoir des effets délétères mais également bénéfiques sur l'oxygénation cérébrale pendant les apnées, en induisant une vasorelaxation (Brzecka 2007). De même, elle pourrait également modifier la régulation du flux sanguin au niveau de la rétine et du nerf optique (Harino et al. 1995 ; Fallon et al. 1985 ; Strenn et al. 1997). Actuellement, seuls des modèles de rongeurs soumis à une HI eucapnique sont décrits. Il semblerait que l'atteinte d'un état d'hypercapnie soit difficilement réalisable dans notre modèle d'exposition à l'HI puisque les animaux sont capables d'hyperventiler pendant les phases d'hypoxie, en réponse à l'augmentation de la pCO<sub>2</sub>.

En ce qui concerne les variations de pression intrathoracique au cours des apnées, elles pourraient avoir une implication particulière dans les altérations de la perfusion vasculaire oculaire. Comme évoqué dans l'introduction, les fortes variations de pression thoracique sont associées à un blocage du retour veineux et à une forte augmentation de la pression artérielle lors de la reprise de la respiration. La simulation d'apnées obstructives par la manœuvre de Mueller chez des sujets sains a révélé des variations brusques de PIO de l'ordre de -4 à -33% lors de chaque apnée (Lundmark et al. 2003). Les auteurs attribuent cette réponse à une augmentation du retour veineux, entraînant une réduction de la pression veineuse épisclérale, et une diminution de la résistance au flux sortant d'humeur aqueuse, avec comme conséquence une baisse de la PIO. Les effets de la variation de pression thoracique sur le retour veineux semblent varier en fonction de l'organe étudié. Cependant, les variations de PIO observées lors de cette simulation ou chez les patients apnéiques (Pepin et al. 2010) indiquent une implication importante de cette composante du SAOS dans la régulation vasculaire oculaire.

Une alternative pour étudier cette composante chez le rongeur serait d'utiliser un modèle obstructif d'HI. Dans ce modèle, les hypoxies sont créées par obstruction intermittente de la trachée par un ballonnet gonflable, ce qui rend impossible l'hyperventilation et est associé à des efforts inspiratoires comparables à ceux observés chez l'homme (Crossland et al. 2013 ; Durgan et al. 2014). Ce modèle présenterait également l'avantage de reproduire l'hypercapnie associée aux apnées et caractéristique du SAOS.



### Limites liées à la durée du stimulus :

La durée d'exposition de 14 jours a été choisie en premier intention car :

- des travaux précédents de notre équipe ont montré que cette durée d'exposition était associée à des altérations cardiovasculaires significatives (Belaidi et al. 2009 ; Arnaud et al. 2011b ; Lefebvre et al. 2006, Poulain et al. 2014) liées notamment au stress oxydant (Ramond et al. 2011), à une activation de l'axe HIF-1/endothéline (Belaidi et al. 2009) et à des mécanismes pro-inflammatoires (Poulain et al. 2015 ; Arnaud et al. 2011a). Ainsi, une absence d'effet au niveau de la fonction vasculaire oculaire ne pouvait pas être liée à une absence d'effets systémiques.
- Les données publiées concernant les altérations vasculaires associées à l'HI sont essentiellement associées à une durée d'exposition de 14 jours ou plus rarement de 35 jours.

Ainsi, les résultats présentés dans cette thèse reflètent une altération à un temps donné, sans qu'il soit possible de prédire son évolution à plus long terme. Le SAOS est une maladie qui évolue sur de longues périodes avant que des altérations cardiovasculaires ou que des signes cliniques évocateurs ne soient détectés. Il semblerait donc que l'exposition de rongeurs à 14 jours d'HI ne puisse refléter entièrement la physiopathologie du SAOS. Notre modèle d'HI n'a en effet pas pour vocation de refléter cette évolution, mais a pour but dans un laps de temps court, de mettre en évidence les conséquences délétères liées aux séquences d'hypoxie-réoxygénation qui accompagnent les apnées nocturnes, dans le but d'explorer les mécanismes sous jacents et de nouvelles cibles thérapeutiques.

### Limites liées au rongeur :

Les limites liées à l'utilisation d'un modèle de rongeur dans cette étude sont principalement :

- la réponse à l'hypoxie: le rongeur semble plus résistant à des niveaux d'hypoxie considérés comme sévères chez l'homme. Notre stimulus hypoxique, caractérisé par une  $FiO_2$  de 5%, est associé à une  $SaO_2$  moyenne de  $51 \pm 14\%$ , ce qui correspond à une apnée très sévère chez l'homme. Néanmoins, les altérations cardiovasculaires observées chez ces rongeurs après 14 jours d'exposition à l'HI sont modérées, ce qui ne signe pas l'effet d'un stimulus exagéré.
  
- la physiologie et l'anatomie oculaire du rat: l'anatomie oculaire du rat diffère sensiblement de celle de l'homme, notamment en ce qui concerne la vascularisation rétrobulbaire et de la tête du nerf optique.  
En particulier, l'organisation sectorielle de l'apport vasculaire au niveau de la tête du nerf optique par les artères ciliaires postérieures chez l'homme ne se retrouve pas chez le rat, pour lequel l'artère ophtalmique constitue la seule branche nourricière pour l'ensemble des tissus oculaires. De plus, ce travail a mis en évidence une différence entre le rat et l'homme en ce qui concerne l'implication du NO dans la relaxation liée à l'endothélium de l'artère ophtalmique.

## **6 Autres travaux menés en parallèle**

## 6.1 Evolution des gaz sanguins artériels du rat au cours des cycles d'hypoxie intermittente avec et sans CO<sub>2</sub>

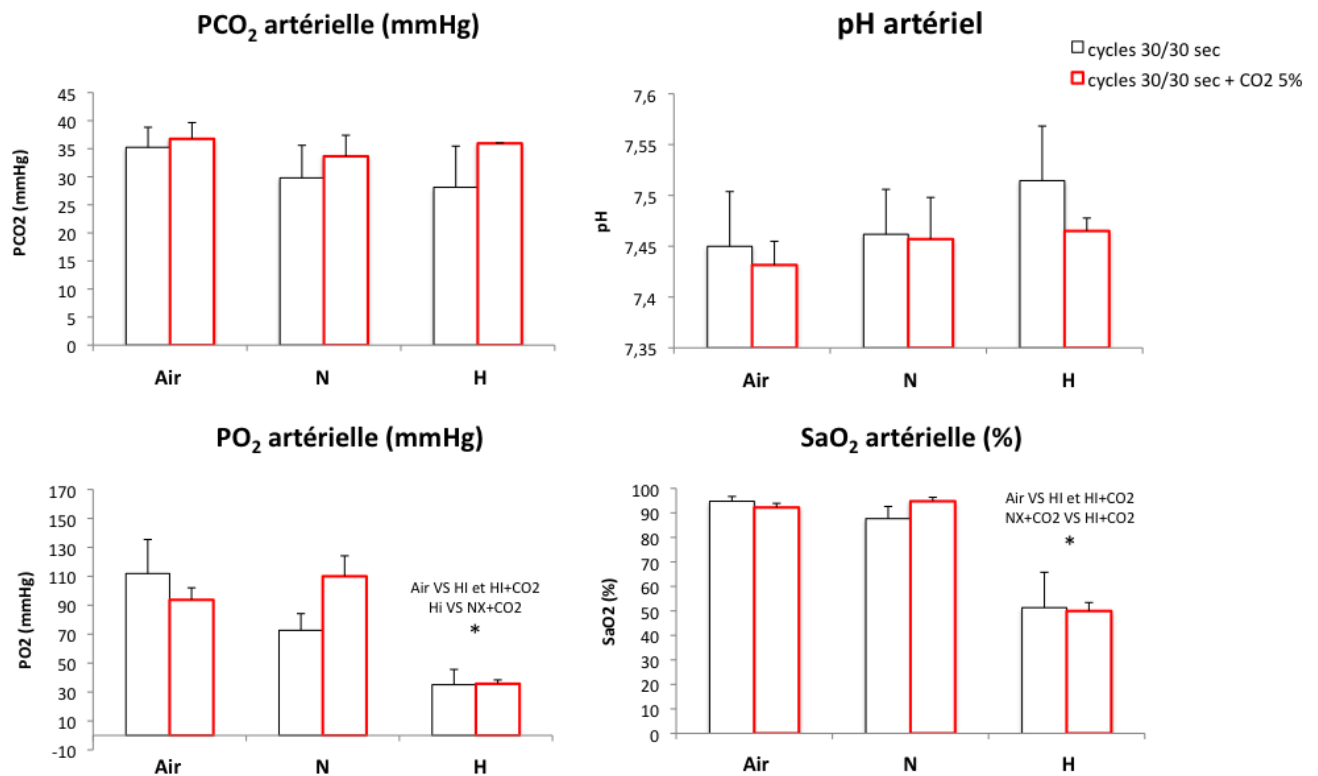
Chez les patients apnéiques, les apnées sont associées à une augmentation de la pression partielle artérielle en CO<sub>2</sub> (pCO<sub>2</sub>) en parallèle de la diminution de la SaO<sub>2</sub>. Le rôle de l'augmentation de la pCO<sub>2</sub> dans les altérations cardiovasculaires associées au SAOS est controversé. Il pourrait avoir des effets délétères mais également bénéfiques sur l'oxygénation cérébrale pendant les apnées, en induisant une vasorelaxation (Brzecka 2007). De même, le CO<sub>2</sub> pourrait également modifier la régulation du flux sanguin au niveau de la rétine et du nerf optique. Il a été montré notamment que l'association de l'hypoxie et d'un taux de CO<sub>2</sub> augmenté potentialise la vasoconstriction rétinienne induite par l'hypoxie, résultant en une augmentation de la vitesse sanguine rétinienne de +53% (Harino et al. 1995) contre +15 à +38% lors d'hypoxie isocapnique (Fallon et al. 1985 ; Strenn et al. 1997).

Contrairement au modèle de rongeurs soumis à l'HI eucapnique décrit par Kanagy et al. (Kanagy et al. 2001), les cycles d'HI de notre modèle actuel consistent en une diminution de la FiO<sub>2</sub> à 5% sans supplémentation avec du CO<sub>2</sub>. De plus, les rats soumis à l'HI sont capables d'hyperventiler pour compenser la diminution de FiO<sub>2</sub> dans la cage, ce qui a pour conséquence de favoriser l'élimination pulmonaire du CO<sub>2</sub> et possiblement de diminuer la pCO<sub>2</sub>.

Ainsi, le premier objectif de ce travail a été d'analyser les variations des paramètres des gaz sanguins artériels, en particulier la pCO<sub>2</sub> et le pH, associées au modèle d'HI actuel et avec supplémentation au CO<sub>2</sub>.

La mesure de la SaO<sub>2</sub> transcutanée au cours des cycles d'HI a par ailleurs révélé que lors des phases normoxiques, les valeurs de SaO<sub>2</sub> pouvaient descendre jusqu'à 85%, et donc être plus basses que la SaO<sub>2</sub> physiologique (95-100%). Cette observation suggère que la réoxygénation lors des phases de normoxie n'est pas complète. Néanmoins, les valeurs de SaO<sub>2</sub> transcutanées mesurées chez le rat (capteur d'oximétrie collier) sont sous-estimées par rapport aux valeurs réelles. Le deuxième objectif de cette expérience est donc de confirmer ou d'infirmer cette observation.

Un cathéter permanent a été mis en place dans la carotide droite de 4 rats. Ce cathéter permet des prélèvements de sang artériel au cours des cycles d'HI sur rat vigile, et donc l'analyse des gaz sanguins artériels correspondant à chaque phase des cycles (hypoxique et normoxique). Le matin des prélèvements, les rats étaient prémédiqués avec de la buprénorphine (0,1 mg/kg, s.c.) et anesthésiés à l'isoflurane. Un tube en polyéthylène (PE-50, 23G) est inséré dans la carotide droite comme précédemment décrit (3.3.2) et suturée par 3 points au fil non résorbable. La peau du cou était ensuite légèrement décollée entre la face ventrale et la zone interscapulaire afin de laisser passer le tube artériel et de le faire sortir à travers la peau entre les omoplates. Le tube était ensuite fixé à un harnais relié à un tube serti dans un ressort métallique, protégeant le tube dans la cage. Le ressort métallique était relié à un pivot en plastique fixé sur la grille de la cage, permettant une rotation sans fin du tube et du ressort en fonction des mouvements du rat dans la cage. (Phymep, France). Le tube artériel sort du pivot puis de la cage par les ouvertures d'aération du couvercle en Plexiglas de la cage. Le cathéter était rempli de liquide physiologique (NaCl 0,9%) contenant de l'héparine (10 U/ml) et flushé toutes les heures pour prévenir son obstruction. Quatre heures après le réveil de l'animal, trois échantillons de sang artériel étaient prélevés en duplicatas pour évaluer les gaz du sang (analyseur de gaz du sang ABL5, Radiometer Medical, Danemark): le premier prélèvement était réalisé en air ambiant puis, pendant les cycles d'HI, lors des plateaux hypoxiques ( $FiO_2 = 5\%$ ) et lors des plateaux normoxiques ( $FiO_2 = 21\%$ ). Les résultats de gaz du sang dans les trois conditions (air, phases HI et NX) ont été comparés par un test de Friedman.



**Figure 12 : Variation de la pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, SaO<sub>2</sub> et du pH lors des cycles d'HI actuellement utilisés au laboratoire (sans CO<sub>2</sub>, cycles 30/30 sec) ou lors de cycles avec 5% de CO<sub>2</sub> (cycles 30/30 sec + CO<sub>2</sub> 5%). Les gaz du sang sont mesurés lors des plateaux de chaque phase : normoxie (N) et hypoxie (H), et en air ambiant (Air).**

Les résultats des gaz du sang sont représentés sur la figure 9.

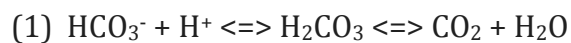
Evolution de la pO<sub>2</sub> et SaO<sub>2</sub> :

En air ambiant, la SaO<sub>2</sub> artérielle du rat est de 94,8 ± 2% et la pO<sub>2</sub> est de 112 ± 23,5 mmHg. La pO<sub>2</sub> diminue fortement à 35 ± 10 mmHg lors des phases d'hypoxie alors que la SaO<sub>2</sub> atteint la valeur de 51 ± 14%. L'ajout de 5% de CO<sub>2</sub> pendant les cycles ne modifie pas les valeurs de pO<sub>2</sub> (35,7 ± 2,7 mmHg) et de SaO<sub>2</sub> (49,95 ± 3,5%) lors de la phase hypoxique. En phase normoxique, la pO<sub>2</sub> (72,65 ± 11,6 mmHg) et la SaO<sub>2</sub> (87,7 ± 5%) ont des valeurs inférieures à celles observées en air ambiant. La SaO<sub>2</sub> est semblable aux valeurs enregistrées par oxymétrie transcutanée. **Ces résultats confirment que la pO<sub>2</sub> et la SaO<sub>2</sub> ne reviennent pas à une valeur physiologique lors des phases de normoxie, et que la réoxygénation n'est pas totale.**

**L'ajout de CO<sub>2</sub> au cours des cycles est associé à des valeurs de SaO<sub>2</sub> et pO<sub>2</sub> plus élevées en normoxie (94,8% et 110 mmHg respectivement), par rapport aux cycles sans CO<sub>2</sub> (87,6% et 72,7 mmHg respectivement).**

Evolution du pH et de la pCO<sub>2</sub> :

Aucune variation significative de ces deux paramètres n'est observée. **Une légère hypocapnie non significative (28,1 ± 7,3 mmHg) et une variabilité de la pCO<sub>2</sub> (SD augmenté), sont observées lors de la phase hypoxique par rapport à l'air ambiant et à la normoxie** (cycles sans CO<sub>2</sub>), associé à une légère alcalémie (pH = 7,51 ± 0,05). Cette diminution de pCO<sub>2</sub> pourrait être liée à l'hyperventilation des rats lors de la phase hypoxique, afin de compenser la diminution en O<sub>2</sub> dans l'air inspiré. L'augmentation du pH peut être expliquée par la baisse de pCO<sub>2</sub> observée : la diminution de la pCO<sub>2</sub> déplace l'équilibre acido-basique (1) pour favoriser la formation de CO<sub>2</sub>, ce qui entraîne une diminution de la quantité d'ions H<sup>+</sup> et une augmentation du pH :



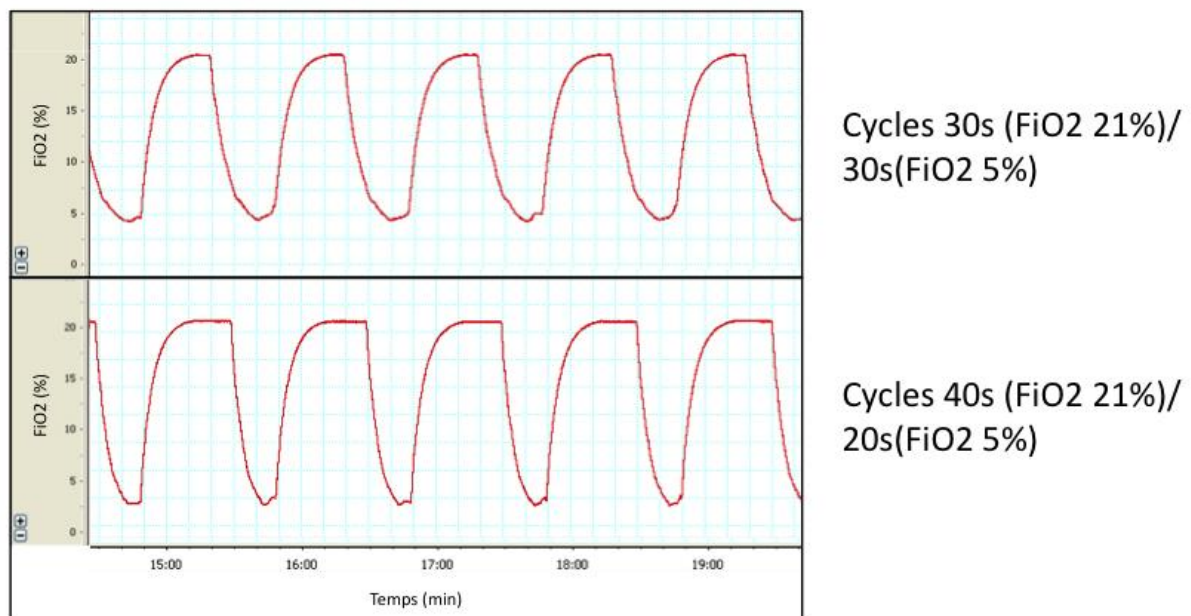
Lors des cycles avec 5% de CO<sub>2</sub>, la pCO<sub>2</sub> et le pH sont stables au cours des cycles.

**Ainsi notre modèle d'HI actuel est associé à une légère hypocapnie et alcalose, ainsi qu'une resaturation en oxygène incomplète**, se traduisant par une SaO<sub>2</sub> inférieure à 90% lors de la phase normoxique. **L'ajout de 5% de CO<sub>2</sub> pendant les cycles stabilise le pH et la pCO<sub>2</sub> dans des valeurs physiologiques.**

Le modèle d'HI décrit par Kanagy et al. se caractérise par une répétition de cycles de 3 min, avec 90 sec d'hypoxie eucapnique (FiO<sub>2</sub> 5% et FiCO<sub>2</sub> 5%) et 90 sec de normoxie (air, FiO<sub>2</sub> 21%). La durée de chaque cycle (3 min) dans ce modèle est donc trois fois plus longue que dans notre modèle (1 min). Dans leur modèle, les résultats des gaz sanguins lors d'HI hypocapnique montrent une très forte diminution de la pCO<sub>2</sub> lors de l'hypoxie (environ 15 Torr = 15 mmHg), associée à une alcalose très marquée (pH ≈ 7,65) (Snow et al. 2008). Ainsi dans ce modèle, la durée trois fois plus importante des phases hypoxiques et normoxiques entraîne des modifications plus marquées de la pCO<sub>2</sub> et du pH sanguin. Ce modèle est qualifié d'hypocapnique et nécessite une supplémentation au CO<sub>2</sub> en phase hypoxique. Par contre, la pO<sub>2</sub> retrouve une valeur basale normale lors des phases de normoxie.

Nos résultats de gaz sanguins ne montrent que de légères variations de la  $p\text{CO}_2$  et du pH comparées aux variations décrites par Kanagy et al. Ainsi **l'utilisation de cycles plus courts permet d'éviter les altérations marquées de la  $p\text{CO}_2$  et du pH**, qui n'ont pas le temps de s'installer. Mais **en contrepartie, la  $\text{SaO}_2$  ne revient pas à sa valeur de base, et les rats restent en hypoxie légère au court des phases normoxiques des cycles d'HI.**

Pour permettre une meilleure réoxygénation, la phase de normoxie pourrait être prolongée pour avoir un plateau à 21% de  $\text{FiO}_2$  plus long et pour améliorer la resaturation sanguine en  $\text{O}_2$ . Des cycles constitués d'une phase normoxique de 40 sec associée à une phase hypoxique de 20 sec ont été testés. Les 20 sec d'hypoxie intermittente sont suffisantes pour atteindre un plateau à 5% de  $\text{FiO}_2$  (figure 10).

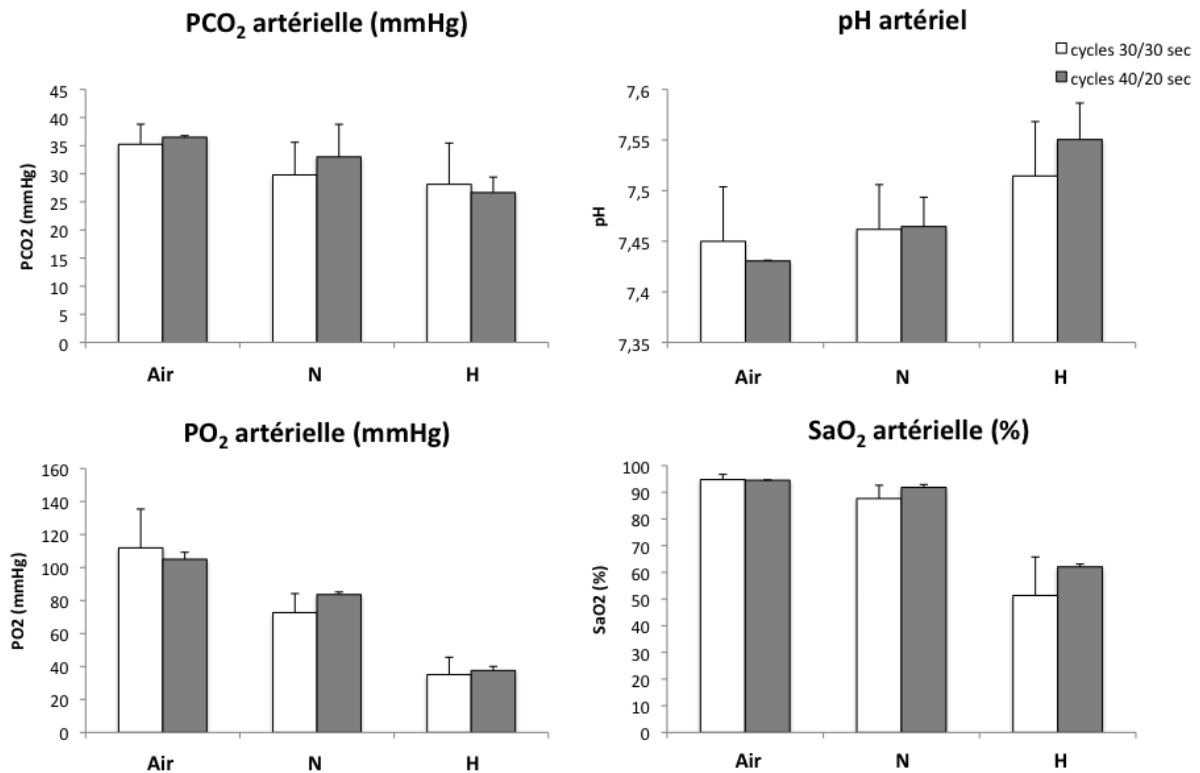


**Figure 13 : Tracés de l'évolution de la  $\text{FiO}_2$  (%) dans une cage au cours des cycles d'HI actuellement utilisés au laboratoire (30 sec/30 sec) et le modèle avec normoxie allongée (40 sec/20 sec).**

La mesure des gaz du sang lors de ces cycles montre que la  $\text{SaO}_2$  artérielle lors des phases de normoxie est plus élevée de 4% environ ( $92 \pm 1,1\%$ ) par rapport à la  $\text{SaO}_2$  mesurées lors des cycles 30 sec/30 sec (figure 11). On retrouve également une diminution de la  $p\text{CO}_2$  et une augmentation du pH lors de la phase hypoxique, comparable à celle observée dans les cycles 30 sec/30 sec actuels. La  $\text{SaO}_2$  en phase



hypoxique semble augmentée dans les cycles 40 sec/20 sec par rapport aux cycles actuels. Très probablement, la phase hypoxique étant plus courte (20sec), le temps de désaturation est moins long et donc la SaO<sub>2</sub> atteints des valeurs moins basses.



**Figure 14 : Variation de la pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, SaO<sub>2</sub> et du pH lors des cycles d'HI actuellement utilisés au laboratoire (cycles 30/30 sec) ou lors de cycles avec 40 sec de phase normoxique (cycles 40/30 sec). Les gaz du sang sont mesurés lors des plateaux de chaque phase : normoxie (N) et hypoxie (H), et en air ambiant (Air).**

**Les faibles variations de pCO<sub>2</sub> et de pH sanguin associé à notre modèle actuel ne semblent pas assez marquées pour être qualifiée d'hypocapnie.** Il est néanmoins difficile de savoir si ces faibles variations peuvent modifier la réponse de l'organisme à l'HI. Dans le but d'améliorer la réoxygénation, phase critique durant laquelle les ERO sont synthétisées, l'utilisation de cycles avec 40 sec de normoxie et 20 sec d'hypoxie serait une alternative intéressante.

**Deuxième partie : Développement d'un prototype de fluxmètre laser Doppler pour l'évaluation de la perfusion sanguine rétinienne et de la tête du nerf optique du rat soumis à l'hypoxie intermittente chronique.**

## **7 Introduction**

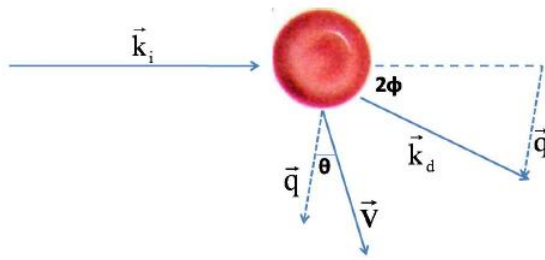
La fluxmétrie laser Doppler est un outil permettant l'investigation non invasive de la perfusion sanguine tissulaire. Riva et al. furent les premiers chercheurs à utiliser cette technique pour mesurer la vitesse de globules rouges circulant dans un tube en verre et dans les artères rétinienne (Riva et al. 1972). Cette technique mesure la vitesse des particules en appliquant l'effet Doppler au rayonnement laser. Dans cette partie seront rappelés dans un premier temps, les principes physiques de la fluxmétrie laser Doppler et dans un deuxième temps, l'organisation vasculaire de la rétine et du nerf optique du rat, tissus qui feront l'objet de cette étude.

## **7.1 Principes physiques de la fluxmétrie laser Doppler**

### **7.1.1 Interaction laser tissus**

La lumière, constituée d'ondes électromagnétiques est caractérisée par sa longueur d'onde et sa phase. Lorsqu'elle se propage dans un tissu, en fonction de sa longueur d'onde, elle peut être diffusée ou absorbée. Les ondes d'énergie faible, comme les ondes infrarouges et proches infrarouges utilisées en fluxmétrie laser Doppler, ne se propagent pas en ligne droite en raison des multiples diffusions subies. Les lasers, caractérisés par une lumière monochromatique et une bonne cohérence temporelle et spatiale sont la principale source lumineuse utilisée en fluxmétrie laser Doppler.

Lorsqu'un photon (de fréquence donnée) rencontre une particule immobile, l'onde est réfléchiée et subit un décalage en phase uniquement (Oberg 1990). Lorsqu'il rencontre une particule en mouvement (hématie) dans le tissu, le photon est diffusé et subit un décalage en fréquence déterminé par l'angle de diffusion, la longueur d'onde et la vitesse du diffuseur. Ce phénomène est lié à l'effet Doppler.



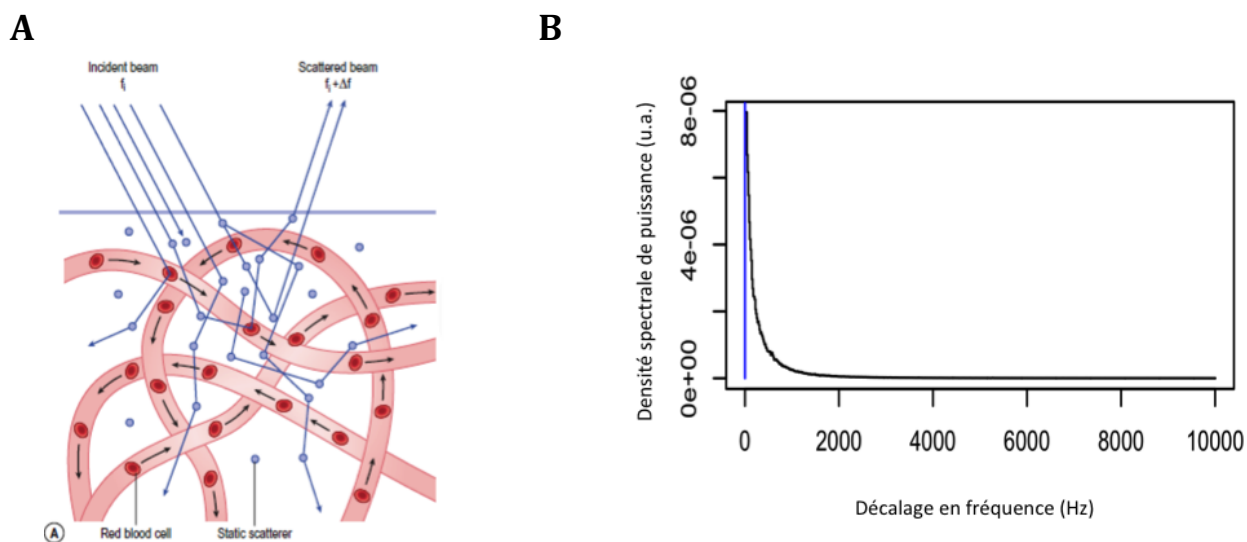
**Figure 15 : Représentation schématique de la diffusion d'un photon par une particule en mouvement (ici hématie).**

### 7.1.2 Analyse du signal

Il est important que la source lumineuse soit caractérisée par une seule longueur d'onde donc fréquence (monochromatique) car la fréquence du photon après diffusion est ensuite comparée à la fréquence de départ pour évaluer le décalage subit lors de la diffusion. Dans un tissu, les photons peuvent également subir plus d'un décalage en fréquence. Le décalage fréquentiel détecté par un fluxmètre laser Doppler de longueur d'onde 780 nm est compris entre 0 et 20kHz (Leahy et al. 1999). Les photons réfléchis et diffusés sont captés par une fibre optique, et dirigés vers un photodétecteur qui les convertit en signal électrique d'intensité proportionnelle à la vitesse moyenne et au nombre de particules en mouvement dans le volume de tissu illuminé. Le spectre de puissance pondérée par la fréquence de la lumière diffusée par les hématies est généré à partir du mélange hétérodyne de la lumière diffusée ou non diffusée, et permet le calcul des paramètres de perfusion sanguine selon la théorie de Bonner et Nossal (Bonner et al. 1981).

Paramètres	Unité	Définition	Formule
Vélocité (Vel)	Hz	Moyenne pondérée des décalages en fréquence de la lumière diffusée	$\frac{\int f \cdot P(f)df}{\int P(f)df}$
Volume (Vol)	a.u	Intégrale des puissances des décalages en fréquence de la lumière diffusée	$\frac{1}{DC^2} \int P(f)df$
Flux (F)	a.u		F = Vel x Vol

**Tableau 8 : Paramètres mesurés en fluxmétrie laser Doppler.**



**Figure 16 : Représentation schématique de la diffusion des photons dans un tissu vascularisé (A). Exemple de spectre de puissance pondérée par la fréquence de la lumière diffusée dans la tête du nerf optique (B).**

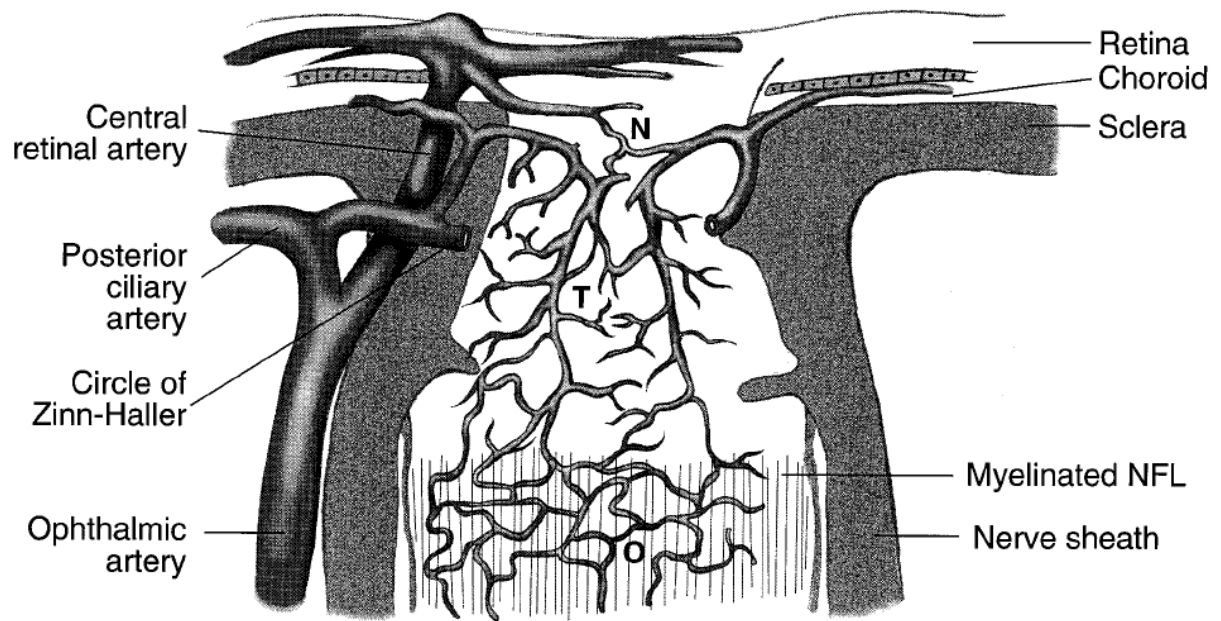
## 7.2 Vascularisation du nerf optique et de la rétine chez le rat

Deux principales études ont décrit la vascularisation du nerf optique chez le rat par le biais de moulages (*corrosion cast*) des vaisseaux rétrobulbaires, ensuite analysés en microscopie électronique. Les deux études décrivent une organisation similaire des vaisseaux mais avec une nomenclature différente. Une artère principale, artère ciliaire postérieure (ACP) pour Sugiyama et al. (Sugiyama et al. 1999) et artère ophtalmique (AO) pour Morrison et al. (Morrison et al. 1999), longe le nerf optique et le contourne latéro-médialement pour ensuite pénétrer la gaine du nerf optique juste en arrière du globe. Nous avons choisi de qualifier cette artère « artère ophtalmique », notamment dans la première partie de cette thèse, car il s'agit de la nomenclature la plus souvent utilisée dans la littérature pour le rat (Jarajapu et al. 2004) et la souris (Manicam et al. 2014).

Juste avant de rentrer dans la sclère, l'AO se divise pour donner naissance à deux ACP latérales et une artère centrale de la rétine (ACR) qui va donner à son tour naissance aux artères rétiniennes. Les variations observables chez le rat sont une absence de contournement du nerf optique par l'AO, ou la présence de 2 AOs courant de chaque côté du nerf optique (observations personnelles).

La vascularisation rétinienne chez le rat est de type holangiotique, et se compose en général de 7 à 9 artères rétiniennes rectilignes, caractérisées par un diamètre luminal jusqu'à 50  $\mu\text{m}$  (Ninomiya et al. 2001). Ces artères se ramifient en artérioles précapillaires (8 à 12  $\mu\text{m}$  de diamètre) qui donnent ensuite naissance à un réseau microvasculaire (4 à 6  $\mu\text{m}$  de diamètre) organisé en 2 niveaux au sein de la couche des fibres optiques rétiniennes. Ce très faible diamètre est en général associé au phénomène d'« écrémage » du plasma (*plasma skimming*), caractérisé par un passage du plasma et non des hématies dans les vaisseaux de très petit diamètre. En effet, les propriétés de déformations des hématies sont limitées et ne leur permettent pas la circulation des hématies dans les réseaux capillaires les plus fins.

Dans la région de la choroïde péripapillaire, le nerf optique reçoit des branches provenant des ACP latérales qui irriguent la majeure partie des régions prélaminaire, laminaire et rétrolaminaire. Des branches donnent naissance à des ramifications multiples dans la choroïde et dans la région laminaire du nerf optique. Des branches vasculaires provenant de l'ACR irriguent la partie prélaminaire du nerf optique. Le lit capillaire observé au niveau du nerf optique est continu entre la zone rétrobulbaire et la zone la plus superficielle de la TNO. En particulier, les artérioles rétiniennes envoient des capillaires vers la couche des fibres optiques rétiniennes au niveau de la TNO en continuité avec le réseau capillaire issu de l'ACR. La figure 1 représente l'organisation de la vascularisation de la TNO chez le rat (Morrison et al. 1999). Contrairement aux vaisseaux rétiniens, la littérature ne rapporte pas de diamètre des lits capillaires observés dans le nerf optique. Il est très probable que ce lit capillaire possède des dimensions semblables à celles observées dans la rétine.



**Figure 17 : Représentation schématique de la microvascularisation artérielle de la tête du nerf optique du rat. (N) zone superficielle (T) zone de transition, (O) nerf optique avec fibres myélinisées. D'après Morrison et al. 1999.**



## **8 Objectifs du travail**

L'objectif principal de la deuxième partie de ce travail de thèse était de mettre au point et valider l'utilisation d'un prototype de fluxmètre laser Doppler pour la mesure de la perfusion sanguine rétinienne et de la tête du nerf optique chez le rat. Pour cela, nous avons collaboré avec l'équipe de physique optique du Pr Martial Geiser de la Haute Ecole Spécialisée de Suisse occidentale (HES//SO, Haute école d'ingénierie, Sion, Valais), qui a conçu et développé le prototype de LDF pour le rat. Les résultats de la validation in-vitro et in-vivo chez le rat sain sont présentés dans cette deuxième partie. En particulier, nous nous sommes attachés à vérifier la pertinence du signal LDF provenant d'artères rétiniennes et de la tête du nerf optique et à vérifier la répétabilité des mesures entre plusieurs jours.

Le second objectif de cette partie était d'évaluer la régulation de la perfusion sanguine rétinienne chez le rat soumis à 14 jours d'HI grâce par fluxmétrie laser Doppler. Dans ce but, nous avons évalué les variations de perfusion sanguine des artères rétiniennes à des stimuli mettant en jeu la libération d'ET-1, voie potentiellement altérée en réponse à l'HI : vasoconstriction en réponse à l'hyperoxie et à l'injection intra-artérielle d'ET-1. Nous présenterons donc l'état d'avancée actuel de cet objectif qui consistait à la mise au point des mesures de perfusion sanguine en réponse à l'hyperoxie et à l'injection intra-artérielle d'ET-1 chez le rat sain et chez le rat HI.

## 9 Matériel et méthodes

## 9.1 Prototypé de fluxmètre laser Doppler confocal

### 9.1.1 Description du système optique

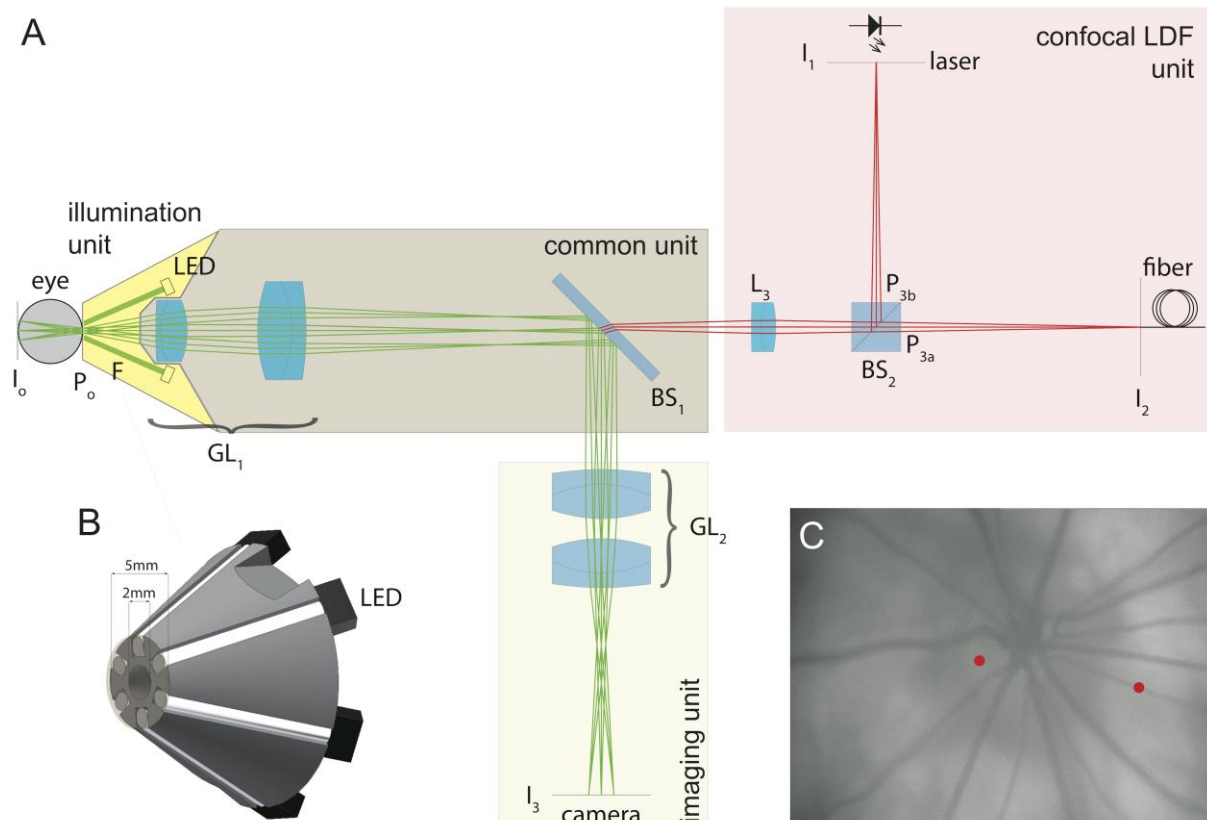
Le système optique a été développé à partir du modèle général de l'œil de rat de Campbell et Hughes (Campbell et al. 1981). Il est constitué d'une source d'illumination externe, d'une unité commune, d'une unité d'acquisition d'images et d'une unité de fluxmétrie laser Doppler confocale (Geiser et al. 1999) (figure 1).

L'unité commune transforme l'image  $I_0$  du fond d'œil avec la lentille  $GL_1$  en une image intermédiaire ( $I_0'$ ), reprise par l'unité LDF confocale et l'unité d'acquisition d'images. La focalisation est ajustée grâce à la lentille frontale  $GL_1$  le long de l'axe optique. Un miroir froid ( $BS_1$ ) divise le chemin optique en deux entre l'unité d'acquisition d'images et l'unité LDF confocale. Dans cette dernière, l'image de la pupille du rat ( $P_0$ ) donne naissance à 2 images  $P_3a$  et  $P_3b$ . L'extrémité de 6 fibres optiques, arrangées de façon circulaire, est protégée de l'entrée de poussière et de liquide par une lamelle de verre de  $125\ \mu\text{m}$ . Ces fibres optiques délivrent une lumière jusqu'au fond d'œil d'une puissance allant jusqu'à  $830\ \mu\text{W}$  (source d'illumination externe). Une diode électroluminescente (DEL) blanche (LW P4SG-U2AA-5K8L-Z, Osram, Munich, Allemagne) associée à un filtre coloré (longueur d'onde centrale  $530\ \text{nm}$ ; Edmund Optics, Karlsruhe, Allemagne) est collée à l'autre extrémité des fibres optiques.

L'unité d'acquisition d'images ( $GL_2$ ) permet la focalisation de la lumière vers une caméra CCD caractérisée par  $640 \times 480$  pixels actifs ((0K13XUSB, Videology, Pays Bas). La caméra permet de visualiser la rétine et de focaliser le laser sur la zone cible à mesurer (Figure 1). Du fait de la taille du capteur CCD, le champ de vision obtenu est limité à  $28 \times 20$  degré dans l'air et magnifié de 1,3.

L'unité LDF est construite de façon confocale (Figure 1). Le laser incident  $I_1$  ( $780\ \text{nm}$ ,  $5\ \text{mW}$ , Thorlabs, Munich, Allemagne) passe à travers un séparateur de faisceau 50/50 ( $BS_2$ ) et pénètre dans l'œil avec une puissance ajustable de  $300$ ,  $400$  ou  $500\ \mu\text{W}$ . Ces valeurs de puissance sont bien inférieures aux valeurs d'intensité lumineuse minimale ( $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) entraînant une phototoxicité au niveau des cellules photoréceptrices chez le rat (Rapp et al. 1990). Le laser est focalisé sur la zone rétinienne d'intérêt du rat, d'un diamètre estimé à environ  $10\ \mu\text{m}$ . Une partie de la lumière est rétrodiffusée par les

hématies, avec un décalage Doppler proportionnel à la vitesse des hématies. La lumière réfléctée par le tissu se mélange avec la lumière rétrodiffusée par les hématies et l'ensemble est collecté par le système optique et dirigé vers la fibre optique  $I_2$  (200  $\mu\text{m}$  diameter; Thorlabs, Munich, Allemagne). Celle-ci guide la lumière vers un détecteur à photodiode avalanche (C5460-01, Hamamatsu, Japan). Comme le diamètre de la portion de fond d'œil échantillonnée est d'environ 80  $\mu\text{m}$ , la fibre optique  $I_2$  collecte la lumière diffusée autour du point d'illumination.



**Figure 18 : Schéma de l'unité optique du prototype LDF.** (A) système optique avec les différentes unités. In sont les images conjuguées et  $P_n$  sont les ouvertures conjuguées. F : fibre illuminatrice ; GL1 : premier relai avec réglage du focus ; BS1 : miroir semi-perméable ; L3 : lentille relai ; BS2 : séparateur de faisceau ; I1 : source laser ; I2 : fibre de détection ; GL2 : lentille relai associée à la caméra CCD en I3 ; (B) Vue en trois dimensions de l'extrémité de la sonde LDF, avec les fibres optiques et les LEDs pour l'illumination du fond d'œil. L'ouverture centrale de 2mm de diamètre correspond à  $P_0$ . (C) Image du fond d'œil prise avec l'unité d'imagerie. Les deux points rouges

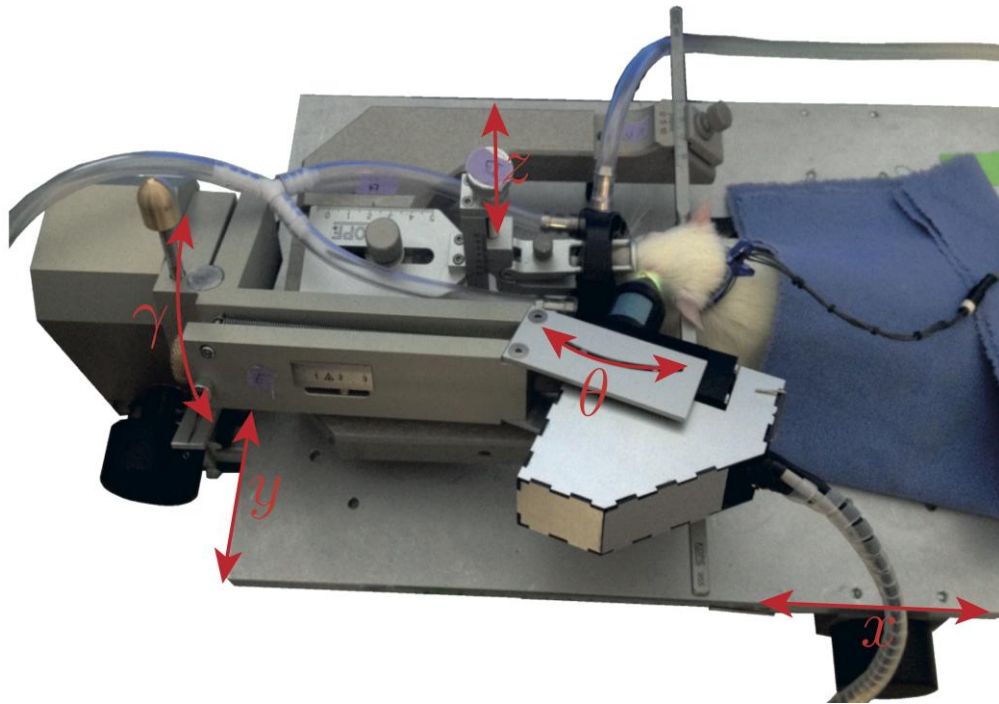
représentent des exemples de localisations typiques de mesure des paramètres LDF sur une artère rétinienne et sur la tête du nerf optique.

### 9.1.2 Acquisition des données et description du logiciel

A cause de la construction confocale et des valeurs de vitesse sanguine physiologique, le décalage Doppler maximum pouvant être enregistré est fixé à 5 kHz. Ce signal est analysé par transformée de Fourier 14 fois par seconde. Le *direct current* (*DC*) correspond à l'intensité de la lumière collectée. Les paramètres de perfusion sanguine (vitesse, *Vel* et volume, *Vol*) sont calculés respectivement comme le premier moment du spectre de puissance (*Vel*) et comme l'intégrale du spectre de puissance normalisée par le  $DC^2$  (*Vol*). La moyenne pondérée de *Vel* (exprimée en Hz) renseigne sur le décalage en fréquence proportionnel à la vitesse des hématies. L'analyse du signal est similaire à celle décrite précédemment (Geiser et al. 1999). Le *DC* est utilisé pour estimer la stabilité de l'œil et la diffusion de la lumière.

### 9.1.3 Système mécanique

Le rat est installé sur une table stéréotaxique modifiée (Kopf instruments, Tujunga, CA, Etats-Unis). Le système optique est fixé sur un bras mécanique spécialement adapté, qui permet un déplacement de la sonde LDF dans les 3 dimensions (x, y, z) afin d'aligner l'axe de la sonde avec l'axe de l'œil du rat avec une précision de 10  $\mu\text{m}$ . Aucun contact ni pression ne sont exercés sur l'œil de l'animal. Deux axes de rotation supplémentaires ( $\theta$ ,  $\gamma$ ) permettent d'ajuster au maximum l'alignement et de fixer la zone de mesure rétinienne désirée.



**Figure 19 : Table stéréotaxique avec mobilisation du prototype LDF par un bras articulé.** Le LDF est porté par un bras articulé mobile dans les trois dimensions. Les mouvements fins sont permis par cinq vis micrométriques.  $x$  et  $y$  permettent de mobiliser la table sur le plan horizontal,  $z$  permet un mouvement vertical de la tête du rat.  $\theta$  et  $\gamma$  permettent de faire varier l'angle d'entrer de a lumière dans l'œil.

## 9.2 Animaux

Les mesures LDF sont réalisées sur des rats mâles adultes de souche Wistar Han (Elevage Janvier, Le Genest St Isle, Mayenne, France) âgés de 7 semaines (poids à l'arrivé : 275-299 g). Ils sont hébergés dans les mêmes conditions que dans la première partie. Les protocoles d'expérimentation LDF ont été approuvés par le comité d'éthique de rattachement du laboratoire (Cometh Grenoble, numéro de permit : 38 10 42).

Les animaux sont anesthésiés pendant les mesures de perfusion sanguine oculaire. Le protocole anesthésique consiste en une prémédication à la buprénorphine (0,1 mg/Kg, s.c. Buprecare®, Axience, France) 20 min avant l'induction avec une injection i.m de xylazine (6 mg/kg, Rompun®, Bayer, France) et une injection i.p. de diazepam (5 mg/kg, Valium®, Roche, France). Ce protocole a été spécialement développé et testé chez le rat

dans le but d'induire une dépression cardiovasculaire minimale et une sédation suffisante, nécessaire à une stabilité maximale du globe oculaire. Il a été adapté à partir du protocole décrit par Mohammed et al. (Mohammed & Abdelnabi 2012). La multiplication des molécules et des voies d'administration permet de réduire efficacement les doses d'anesthésiques utilisés. La profondeur de l'anesthésie est contrôlée par vérification fréquente de l'absence de perception de la douleur profonde (pincement des doigts de la patte arrière avec un clamp), par observation d'une fréquence cardiaque et d'un oeil stables.

Lors des expériences nécessitant le suivi de la PA invasive (par cathétérisme de la carotide), une dose de kétamine (20 mg/kg, i.m., kétamine 1000, Virbac, France) est associée à la xylazine.

Les animaux sont intubés et ventilés via un respirateur pour rongeur (modèle 683, Harvard Apparatus, MA, Etats-Unis). Les paramètres cardiovasculaires sont suivis et enregistrés en continu (Powerlab, ADInstruments, Oxford, Royaume-Uni) : la SaO<sub>2</sub> (MouseOx Mouse Oxymeter, STARR Life Sciences Corporation, Etats-Unis), la fréquence cardiaque et la PA moyenne (par plethysmographie). La température corporelle est maintenue à 37-38°C par un tapis chauffant (Physitemp Instruments, NJ, Etats-Unis). Les animaux sont placés en décubitus ventral sur la table stéréotaxique. La tête est maintenue par le biais de barres auriculaires atraumatiques et d'une pince réglable sur le chanfrein (Figure 17). La pupille de l'œil gauche est dilatée par instillation de tropicamide 1% (Mydriaticum®, Théa, Clermont-Ferrand, France), puis la cornée est anesthésiée par instillation de chlorohydrate d'oxybuprocaine (Théa, Clermont-Ferrand, France). Un gel ophtalmique est mis en place entre la cornée de l'œil gauche et l'extrémité du LDF, ainsi que sur l'œil contralatéral non étudié pour prévenir la sécheresse oculaire (Lacrigel®, Europhtha, Monaco).

### 9.3 Evaluation de la linéarité des mesures LDF in vitro

La linéarité du signal LDF est évaluée dans un premier temps en focalisant la sonde LDF sur une roue en Teflon, simulant le shift Doppler. Dans un deuxième temps, la sonde LDF est focalisée sur un système de tubes capillaires en verre (200 µm de diamètre) dans

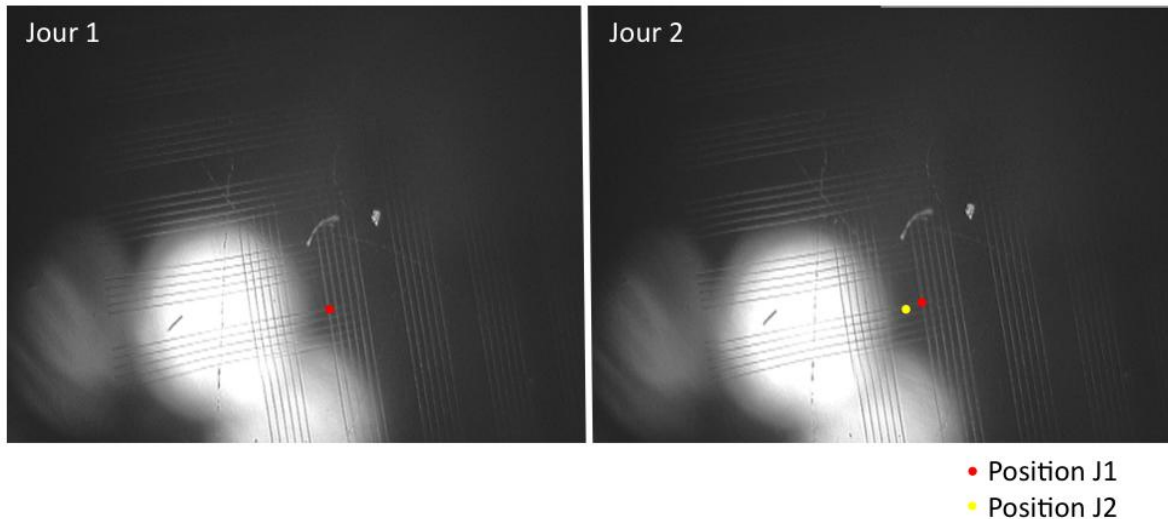


lesquels circulent des microsphères de latex en suspension dans l'eau (1  $\mu\text{m}$  de diamètre, Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Allemagne). Les microsphères subissent un mouvement de flux laminaire à l'aide d'une pompe. La vitesse de la roue et des microsphères est modifiée par paliers de 40 sec et les paramètres de perfusion de la mesure LDF sont moyennés sur cette période. Dans ces conditions, *Vel* devrait varier de façon linéaire avec la vitesse de la roue et des microsphères, alors que *Vol* devrait rester constant.

## 9.4 Procédures de mesure de la perfusion sanguine oculaire in vivo chez le rat sain

### 9.4.1 Reproductibilité du repositionnement de la sonde LDF

La précision du repositionnement de la sonde LDF sur une même localisation à l'aide des coordonnées stéréotaxiques des vis micrométriques a été testée. Pour cela, une cellule de Malassez a été utilisée comme cible. Le premier jour, la sonde est mise au point sur la grille micrométrique de la cellule de Malassez et des images de différentes parties de la grille sont enregistrées (5 positions différentes), et les coordonnées des vis micrométriques notées. Le lendemain, la sonde est repositionnée sur la cellule de Malassez à l'aide uniquement des coordonnées des vis micrométriques notées la veille, et les images correspondantes enregistrées. La déviation entre les points ciblés lors des 2 jours est estimée par comparaison des images et en utilisant les graduations de la grille (figure 17).



**Figure 20 : Photo de la cellule de malassez prise avec la caméra CCD après focalisation de l'image sur un point à J1 (position J1) et après focalisation de l'image à J2 à partir des coordonnées enregistrées (position J2).**

#### 9.4.2 Evaluation de la variabilité du signal en fonction de l'angle de focalisation

Dans le but de poursuivre l'évaluation de la pertinence de mesures répétées sur plusieurs jours, nous avons évalué l'impact d'une variation de l'angle d'entrée du laser sur la vitesse artérielle  $Vel_{ART}$ . Le laser est focalisé dans un premier temps sur une artère, et  $Vel_{ART}$  est enregistré pendant 5 min (position 0). Deux mesures sont ensuite réalisées : 1) après variation de l'angle  $\theta$  (rotation médio-latérale par rapport à l'œil, position 1) et après variation de l'angle  $\gamma$  (rotation dorso-ventrale par rapport à l'œil, position 2). Entre la position 1 et 2, la sonde LDF reprend sa position initiale (position 0) et un seul angle est modifié à la fois.

#### 9.4.3 Comparaison du signal LDF des artères rétiniennes et de la choroïde

La vitesse de base a été enregistrée pendant 5 min au niveau d'une artère rétinienne ( $Vel_{ART}$ ) et de deux régions choroïdiennes adjacentes, de part et d'autre de l'artère ( $Vel_{CHOR}$ ). Ces mesures ont été réalisées chez 5 rats albinos et 5 rats pigmentés. Les valeurs moyennes de  $Vel_{ART}$ ,  $Vel_{CHOR}$ ,  $DC$  sur les 5 min de mesure, ainsi que la présence d'une variation de la densité spectrale de puissance au niveau du spectre de puissance moyen sont comparés entre l'artère et la choroïde et entre les rats albinos et pigmentés.

#### 9.4.4 Répétabilité des mesures LDF in vivo

Les mesures ont été réalisées sur 2 jours (J1 et J8) espacés d'une semaine.

A J1, la répétabilité des paramètres  $Vel_{ART}$  et  $Vel_{ONH}$  a été évaluée pendant et entre 3 sessions de mesures de 5 min, séparées de 10 min, sur 6 et 10 rats respectivement. La stabilité de l'œil durant les mesures a été évaluée par analyse à posteriori des images du fond d'œil, prises toutes les 30 secondes au cours de la mesure (Image J software, National Institutes of Health, Bethesda, MD, Etats-Unis). Les coordonnées stéréotaxiques de chaque vis micrométrique, caractérisant la localisation de chaque mesure LDF, sont notées. A la fin des mesures, les rats sont réveillés par injection d'atipamezole (0.1 mg/kg, Antisedan®, Orion Pharma, France) et extubés. Ils sont surveillés après le réveil et les jours suivants le réveil pour éviter toute complication liée à l'anesthésie.

A J8, les animaux sont endormis en suivant le même protocole anesthésique. La sonde LDF est repositionnée à l'aide des coordonnées des vis micrométriques et ajustée sur la zone de mesure à l'aide des photos de fond d'œil prises à J1. Un enregistrement de 5 minutes est ensuite réalisé. La stabilité de l'œil durant les mesures a été évaluée par analyse à posteriori des images du fond d'œil prises toutes les 30 secondes au cours des mesures.

#### 9.4.4 Evolution des paramètres LDF lors d'arrêt de la perfusion sanguine oculaire

Deux méthodes ont été utilisées pour provoquer un arrêt de la perfusion sanguine oculaire : une augmentation aiguë de la PIO à 150 mmHg et une mesure LDF immédiatement après arrêt cardiaque.

La chambre antérieure de l'œil de 6 rats a été canulée à l'aide d'une aiguille 27G<sup>1/2</sup> connectée à un réservoir rempli de balanced salt solution (BSS, Baush and Lomb, Rochester, NY, Etats-Unis) et à un transducteur de pression (Edwards Lifesciences, Guyancourt, France). La PIO est enregistrée en continu (Powerlab, ADInstruments, Oxford, Royaume-Uni) et modifiée en faisant varier la hauteur du réservoir de BSS. La mesure consiste en 2 min d'enregistrement des paramètres ( $Vel_{ART}$  ou  $Vel_{ONH}$ ) en condition normale (PIO à 15 mmHg, Baseline), puis durant 4 min d'augmentation de la PIO à 150 mmHg et enfin 5 min à nouveau en condition Baseline. La mesure de la perfusion sanguine est réalisée aléatoirement sur 2 artères rétiniennes différentes et 2

localisations de la TNO pour chaque rat, les mesures étant espacées de 20 min. Après le 4<sup>e</sup> enregistrement, une surdose de pentobarbital est injectée en i.v. à chaque animal.  $Vel_{ART}$  est enregistré pendant l'injection et l'arrêt cardiaque concomitant (5 min), alors que  $Vel_{ONH}$  est enregistrée pendant 5 min, immédiatement à la fin de l'enregistrement de  $Vel_{ART}$ . Les enregistrements de chaque rat sont réalisés dans la même localisation de la TNO et de l'artère rétinienne. La stabilité de l'œil durant les mesures a été évaluée par analyse à posteriori des images du fond d'œil prise toutes les 30 secondes au cours de la mesure.

#### **9.4.5 Evaluation de la perfusion sanguine oculaire en réponse à des stimuli pharmacologiques**

Dans le but d'étudier la régulation du flux sanguin rétinien et de la TNO chez le rat soumis à l'HI, des enregistrements préliminaires ont été menés chez le rat sain afin d'évaluer les réponses des paramètres de la perfusion oculaire obtenu avec le prototype LDF à des stimuli connus. Les deux stimuli qui ont été retenus mettent en jeu l'ET-1 et ses récepteurs et sont connus pour provoquer une diminution de la perfusion sanguine rétinienne et de la TNO: la réponse à la respiration d'oxygène pur et l'injection intra-artérielle d'ET-1.

##### **9.4.5.1 Hyperoxie**

La mesure en hyperoxie consiste en 1 min d'enregistrement du paramètre  $Vel_{ART}$  en condition de base (avant stimulation) puis 2 minutes durant lesquelles l'animal respire de l'oxygène pur et enfin 4 min de mesure en condition de base. La stabilité de l'œil durant les mesures a été évaluée par analyse à posteriori des images du fond d'œil prises toutes les 30 secondes au cours de la mesure.

##### **9.4.5.2 Injection intra-artérielle d'ET-1**

Après vérification de la profondeur de l'anesthésie, deux cathéters sont placés dans la carotide gauche comme décrit précédemment (paragraphe 3.3.2). Le cathéter placé en direction du cœur est relié à un capteur de pression et un système d'acquisition

(PowerLab, AD Instruments) permettant l'enregistrement en continu de la PA. Le deuxième cathéter, placé dans la même carotide mais en direction de la tête, est relié à un robinet 3 voies et permet l'injection de l'ET-1 en intra-carotidien.

#### Evaluation de la dose maximale d'ET-1 sans effet sur la PA systémique :

Sur un groupe de 3 rats, des doses croissantes d'ET-1 sont injectées et les variations de la PA systémique enregistrées. Les doses injectées sont 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 et 300 pmol.

#### Evaluation de la réponse de la perfusion sanguine oculaire après injection intra-carotidienne d'ET-1 :

La réponse à 100 et 200 pmol d'ET-1 injectée en intra-carotidien est enregistrée au niveau d'une artère rétinienne (n = 5 rats). La stabilité de l'œil durant les mesures a été évaluée par analyse à postériori des images du fond d'œil prises toutes les 30 secondes au cours de la mesure.

### **9.5 Evaluation de la perfusion sanguine oculaire en réponse à l'hyperoxie chez le rat soumis à l'HI**

L'évaluation de la perfusion rétinienne en réponse à l'hyperoxie est réalisée sur les rats avant (J0) et après (J15) exposition à 14 jours d'HI (n = 8) ou de normoxie (n = 8).

La mesure en hyperoxie consiste en 1 min d'enregistrement du paramètre  $Vel_{ART}$  en condition de base (avant stimulation) puis 4 minutes durant lesquelles l'animal respire de l'oxygène pur et enfin 5 min de mesure en condition de base. La stabilité de l'œil durant les mesures a été évaluée par analyse à postériori des images du fond d'œil prise toutes les 30 secondes au cours de la mesure. Durant ces mesures, les rats sont maintenus sous perfusion intra-veineuse de bromure de vécuronium à 2 ou 5 mg/Kg/h en fonction de la stabilité de l'œil. Si la stabilité de l'œil est jugée insuffisante pour permettre une mesure fiable, la dose de 5 mg est administrée.

## 9.6 Analyses statistiques

L'analyse des données a été réalisée à l'aide du logiciel R (ref) et l'analyse statistique avec le logiciel SPSS (SPSS; version 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, Etats-Unis). Les données sont exprimées sous la forme de moyenne  $\pm$  écart-type. Les paramètres de perfusion oculaire en condition de base, d'hypertonie intraoculaire et après la mort sont comparés avec le test non-paramétrique de Wilcoxon. La corrélation entre les paramètres de la perfusion sanguine oculaire (vélocité et volume) et la vitesse de la roue en Téflon et des microsphères est analysée par calcul du coefficient de corrélation de Pearson. La répétabilité des paramètres  $Vel_{ART}$  et  $Vel_{ONH}$  est analysée au court des mesures de 5 min (intra-session), entre les 3 mesures répétées à J1 (inter-session) et entre les 2 jours de mesure (inter-day). La répétabilité est estimée par calcul des coefficients de variation (CV) et des coefficients de corrélation intra-classe (ICC, single, two-way random absolute agreement). Les valeurs d'ICC sont interprétées comme suit : 0–0,49 indique une concordance faible, 0,5–0,69 indique une concordance modérée et  $>0,7$  indique une concordance bonne à forte.

Le seuil de significativité est fixé à 5% ( $p < 0,05$ ).

## 10 Résultats

## 10.1 Etude 2 : Développement d'un prototype compact de fluxmétrie laser Doppler pour la mesure de la perfusion rétinienne chez le rongeur.

RESEARCH ARTICLE

# Compact Laser Doppler Flowmeter (LDF) Fundus Camera for the Assessment of Retinal Blood Perfusion in Small Animals

Marielle Mentek<sup>1,2</sup>\*, Frederic Truffer<sup>3</sup>\*, Christophe Chiquet<sup>1,2,4</sup>, Diane Godin-Ribuot<sup>1,2</sup>, Serge Amoos<sup>3</sup>, Corinne Loeuille<sup>1,2</sup>, Mario Bernabei<sup>3</sup>, Martial Geiser<sup>3\*</sup>

1 HP2 laboratory, Grenoble Alpes University, 38000, Grenoble, France, 2 INSERM U1042 laboratory, 38000, Grenoble, France, 3 University of Applied Sciences and Arts of Western Switzerland, Institute of Systems Engineering, Sion, Switzerland, 4 Department of Ophthalmology, Grenoble University Hospital, Grenoble Alpes University, 38000, Grenoble, France

\* These authors contributed equally to this work.

\* [martial.geiser@hevs.ch](mailto:martial.geiser@hevs.ch)



CrossMark  
click for updates

### OPEN ACCESS

**Citation:** Mentek M, Truffer F, Chiquet C, Godin-Ribuot D, Amoos S, Loeuille C, et al. (2015) Compact Laser Doppler Flowmeter (LDF) Fundus Camera for the Assessment of Retinal Blood Perfusion in Small Animals. *PLoS ONE* 10(7): e0134378. doi:10.1371/journal.pone.0134378

**Editor:** Utpal Sen, University of Louisville, UNITED STATES

**Received:** March 20, 2015

**Accepted:** July 8, 2015

**Published:** July 30, 2015

**Copyright:** © 2015 Mentek et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** Funding provided by Retina France 2012 (CC) <http://www.retina.fr/retinaDrupal/content/projets-et-bourses-financés-en-2012>, Fondation de France, bourse Berthe Fouassier (MM) <http://www.fondationdefrance.org/La-Fondation-de-France/Fonds-et-fondations-sous-egide/Toutes-les-fondations/Berthe-Fouassier> and PHC Germaine de Stael 2012, projet n° 26419NE (CC, MHG), PHC Germaine de Stael 2013, projet n° 777772H (CC, MHG) <http://www.campusfrance.org/fr/stael>. The

## Abstract

### Purpose

Noninvasive techniques for ocular blood perfusion assessment are of crucial importance for exploring microvascular alterations related to systemic and ocular diseases. However, few techniques adapted to rodents are available and most are invasive or not specifically focused on the optic nerve head (ONH), choroid or retinal circulation. Here we present the results obtained with a new rodent-adapted compact fundus camera based on laser Doppler flowmetry (LDF).

### Methods

A confocal miniature flowmeter was fixed to a specially designed 3D rotating mechanical arm and adjusted on a rodent stereotaxic table in order to accurately point the laser beam at the retinal region of interest. The linearity of the LDF measurements was assessed using a rotating Teflon wheel and a flow of microspheres in a glass capillary. In vivo reproducibility was assessed in Wistar rats with repeated measurements (inter-session and inter-day) of retinal arteries and ONH blood velocity in six and ten rats, respectively. These parameters were also recorded during an acute intraocular pressure increase to 150 mmHg and after heart arrest ( $n = 5$  rats).

### Results

The perfusion measurements showed perfect linearity between LDF velocity and Teflon wheel or microsphere speed. Intraclass correlation coefficients for retinal arteries and ONH velocity (0.82 and 0.86, respectively) indicated strong inter-session repeatability and stability. Inter-day reproducibility was good (0.79 and 0.7, respectively). Upon ocular blood flow cessation, the retinal artery velocity signal substantially decreased, whereas the ONH



fundings had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

signal did not significantly vary, suggesting that it could mostly be attributed to tissue light scattering.

## Conclusion

We have demonstrated that, while not adapted for ONH blood perfusion assessment, this device allows pertinent, stable and repeatable measurements of retinal blood perfusion in rats.

## Introduction

Laser Doppler flowmetry (LDF) is a technique widely used to assess red blood cell (RBC) perfusion in tissues. In 1972, Riva et al. first described the Doppler effect for the evaluation of retinal perfusion in rabbits [1]. Since then, several LDF prototypes have been developed in animals to evaluate blood perfusion in various vascular beds of the eye, such as the retina, the optic nerve head (ONH) and the choroid [2]. These prototypes were developed for a range of different species, such as primates [3], rabbits [4], cats [5], birds [6] and minipigs [7].

The rat has been extensively studied in the fields of physiology, physiopathology and therapeutics. Researchers have access to different rodent models of systemic (diabetes, hypertension) and ocular (glaucoma, diabetic retinopathy, nonarteritic ischemic optic neuropathy, hereditary optic nerve and retinal) diseases. For rats, noninvasive techniques of ocular blood perfusion measurement have previously been developed, including LDF [8], laser speckle [9], optical coherence tomography (OCT) [10], optical microangiography (OMAG) [11], magnetic resonance imaging (MRI) [12], the scanning laser ophthalmoscope-particle tracking method [13] and scanning LDF [14]. Many of these techniques require specific and expensive equipment for animal studies (OCT, MRI, OMAG) and highly qualified operators. Other techniques of blood perfusion measurements are invasive, using a LDF probe either inserted into the vitreous cavity [15] or placed on the sclera after conjunctival dissection [16]. Finally, some techniques require the sacrifice of the animal such as those using ( $^{14}\text{C}$ )-iodoantipyrine [17], N-Isopropyl-p- [ $^{14}\text{C}$ ]-iodoamphetamine [ $^{14}\text{C}$ ]-IMP tracer [18] or radiolabeled microspheres [19].

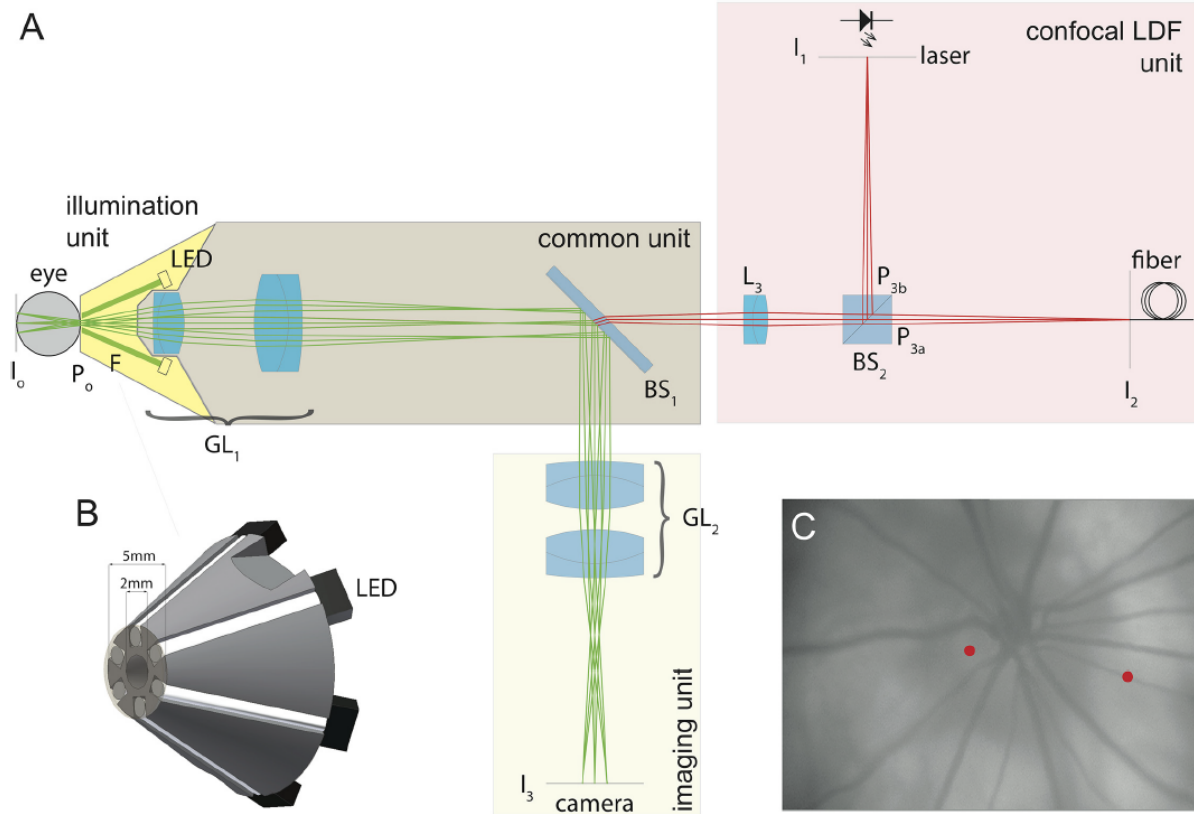
LDF [2] is based on the detection of the Doppler shift of light scattered by a moving particle. This technique provides relative and repeatable values of choroidal and ONH blood perfusion in humans in real time [20, 21]. Given the extensive use of rodents in physiology and therapeutics, the development of a similar LDF technique for the study of blood perfusion in the vascular beds of the rat eye (retina, ONH and choroid) is desirable.

For these reasons, we aimed to develop a compact, inexpensive and noninvasive LDF instrument for repeatable measurements of rodent ocular blood perfusion. This device has been particularly designed for repeated measurement of retinal and optic nerve head blood flow over time. Technical data and extensive measurements in rats are therefore reported herein.

## Material and Methods

### Optical system description

The optical system, designed for Campbell and Hughes's general rat eye model [22] consists of an external illumination source, a common unit, an imaging unit and a confocal LDF unit [23] (Fig 1).



**Fig 1. LDF optical unit scheme.** (A) Optical system with the different optical units.  $I_n$  are conjugated images and  $P_n$  are conjugated pupils. F: illumination fiber;  $GL_1$ : first relay with focusing;  $BS_1$ : cold mirror;  $L_3$ : relay lens;  $BS_2$ : beam splitter cube with pupil images on surfaces;  $I_1$  laser source and  $I_2$  detection fiber;  $GL_2$ : relay lens group to CCD camera at  $I_3$ . (B) 3D view of the front part of the instrument with the glass rods and LEDs to illuminate the fundus. Central hole of 2 mm acts as entrance pupil ( $P_0$ ). (C) Fundus image obtained with the imaging unit. Dots represent typical LDF recording locations on the ONH and retinal artery.

doi:10.1371/journal.pone.0134378.g001

The common unit images the fundus ( $I_0$ ) with  $GL_1$  onto an intermediate image ( $I_0'$ ), which is relayed by the confocal LDF and imaging units. The focus is adjusted with the front lens of  $GL_1$  along the optical axis. A cold mirror ( $BS_1$ ) divides the optical paths between the imaging and LDF units. In this later unit are two images ( $P_{3a}$ ,  $P_{3b}$ ) of the pupil of the rat ( $P_0$ ).

An annulus of six glass rod ends, with a protective 125  $\mu$ m thin glass plate to prevent dust and liquid entering the system, delivers up to 830  $\mu$ W of light into the eye (front illumination unit). On the other end of each glass rod, a color filter (central wavelength, 530 nm; Edmund Optics, Karlsruhe, Germany) and a white LED (LW P4SG-U2AA-5K8L-Z, Osram, Munich, Germany) are glued.

The imaging unit ( $GL_2$ ) focuses the light onto a CCD camera with 640×480 active pixels (20K13XUSB, Videology, The Netherlands). Visualization of the retina and projection of the laser onto the target are provided by the camera (Fig 1). The field of view, limited by the size of the CCD sensor to 28×20 degrees in air, corresponds to a 1.3 magnification.

The LDF unit is built on a confocal arrangement (Fig 1). The probing laser light  $I_1$  (780 nm, 5 mW, Thorlabs, Munich, Germany) goes through a 50/50 beam splitter ( $BS_2$ ) and enters the eye with an adjustable power of 300, 400 or 500  $\mu$ W, below the reported minimum light intensity known to cause phototoxic effects on rat photoreceptors [24]. The laser beam is focused onto the point of interest on the rat retina (estimated diameter, 10  $\mu$ m). Some light is backscattered by the red blood cells (RBCs) with a Doppler shift proportional to their speed. Light reflected by the tissue, mixed with that scattered from the RBCs, is collected by the optical system and directed towards an optical fiber  $I_2$  (200  $\mu$ m diameter; Thorlabs, Munich, Germany). The latter guides the light to an avalanche photodiode (C5460-01, Hamamatsu, Japan). The portion of the ocular fundus probed has a diameter of about 80  $\mu$ m, meaning that  $I_2$  collects light diffused around the illumination point.

### Data acquisition and software description

Due to the optical arrangement and blood velocity, the maximum Doppler shift to be acquired is set at 5 kHz. This signal is Fourier-analyzed 14 times per second. Direct current (DC) corresponds to the intensity of the collected light. The blood perfusion parameters (velocity,  $Vel$ ) and (volume,  $Vol$ ) were calculated as the first moment of the power spectrum and the  $DC^2$  normalized integral of the power spectrum, respectively. The weighted mean  $Vel$  (expressed in Hz) gives a frequency shift proportional to RBC velocity. The signal analysis was previously described [23]. DC is used to estimate the stability of the eye and the light scattering. In addition, the eye fundus is continuously observed using the imaging unit during measurements, and fundus images are captured every 30 s to permit qualitative evaluation of eyeball stability.

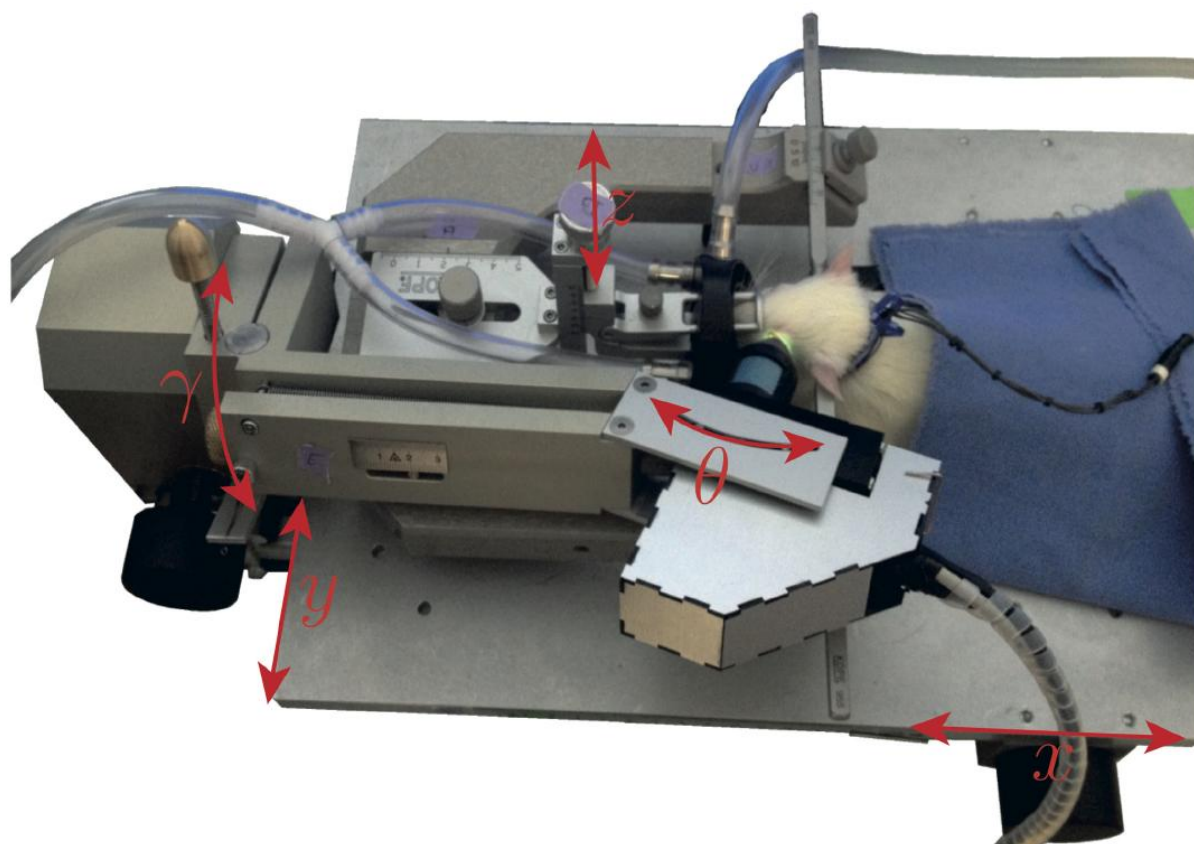
### Mechanical system

The rat is fixed on a modified stereotaxic instrument (Kopf instruments, Tujunga, CA, USA). The optical device is mounted on a dedicated positioning holder (Fig 2), which allows an adjustment in the (x, y, z) directions to bring the pupil of the optical device into the pupil of the eye, with 10- $\mu$ m precision, without exerting any pressure on the eye. Then a rotation ( $\theta$ ,  $\gamma$ ) around the center of the animal's pupil brings the probing beam to the desired retinal location.

### Animal preparation

**Ethics statement.** All experiments were conducted on adult male Wistar rats (8 weeks old; weight range, 300–330 g; Janvier Labs, France). The experiments were conducted in strict accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Council of Europe, European Treaties ETS 123, Strasbourg, 18 March 1986) and with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health (Publication No. 85–23, revised 1996). The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of Grenoble Alpes University (Comité d'éthique ComEth Grenoble, permit number: 38 10 42). The rats were housed under diurnal lighting conditions and given free access to food and water. All surgery was performed under general anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

**Anesthetic protocol.** The animals were anesthetized with buprenorphine (0.1 mg/kg, subcutaneously, Buprecare, Axience, France), xylazine (6 mg/kg, intramuscular injection, Rompun, Bayer, France) and diazepam (5 mg/kg, intraperitoneal injection, Valium, Roche, France). This protocol has been designed to ensure minimal cardiovascular depression and optimal eye stability. The anesthetic protocol has been modified from previously described one [25] and assessed under veterinary control. Unconsciousness and loss of deep sensibility were controlled during the experiment by frequent assessment of deep sensitivity (every 5 min) by pinching the



**Fig 2. Stereotaxic table view.** The LDF unit is held in three dimensions by a rotating arm. Accurate movements are enabled by five micrometric screws.  $x$  and  $y$  permit movements of the table in the horizontal plane.  $z$  permits vertical movements of the rat head.  $\Theta$  and  $\gamma$  permit modification of the angulation of the emitted light into the eye.

doi:10.1371/journal.pone.0134378.g002

foot with a forceps (pedal reflex), and by observation of a stable heart rate and eye globe position. Animals were intubated and mechanically ventilated (75 breaths/min, tidal volume of 1.5 ml) using a rodent respirator (model 683, Harvard Apparatus, MA, USA). Oxygen saturation (MouseOx Mouse Oxymeter, STARR Life Sciences Corporation, USA), heart rate and mean arterial blood pressure (Powerlab, ADInstruments, Oxford, UK) were monitored continuously. Body temperature was monitored and maintained at 37–38°C using a homoeothermic plate (Physitemp Instruments, NJ, USA).

The animals were placed in ventral recumbence on the stereotaxic table. The head was maintained by auricular bars to ensure stability and safety of the vertebral column (Fig 2).

The pupil was dilated with 1% tropicamide (Mydriaticum, Théa, Clermont-Ferrand, France) and the cornea was anesthetized by instillation of oxybuprocaine chlorohydrate (Théa, Clermont-Ferrand, France). Ophthalmic gel (Lacrigel, Europhtha, Monaco) was used to prevent the cornea from drying during the measurements and to provide better image quality by reducing aberrations.

The perfusion parameter velocity in retinal arteries ( $Vel_{ART}$ ) was measured at a distance of 0.5–1 papillary diameter from the border of the ONH. The same parameter within the ONH tissue ( $Vel_{ONH}$ ) was measured on the neuroretinal rim, between major retinal vessels (Fig 1B).

## Experiments

**Linearity of LDF measurements in simulation experiments.** The linearity of LDF measurements was first confirmed using a Doppler shift simulator, which consisted of a rotating Teflon wheel [20], on which the probing beam was focused. In another series of measurements, the probing light was focused on a simulated retinal vessel consisting of a glass capillary tube (200  $\mu\text{m}$  in diameter) in which latex microspheres (1  $\mu\text{m}$  in diameter, Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Germany), suspended in water, were moved in a laminar flow using a syringe pump. The speed of the wheel and the microspheres was changed stepwise. Perfusion parameters were averaged over 40-s LDF recordings. With these simulations,  $Vel$  should vary linearly with the speed of the wheel and of the flowing microspheres, whereas  $Vol$  should remain constant.

**Repeatability of LDF measurements in rats.** Intra- and inter-session  $Vel_{ART}$  and  $Vel_{ONH}$  signal repeatability was assessed on day 1 (D1) by three consecutive 5 min recordings separated by 10 min intervals ( $n = 6$  and 10 rats, respectively). Eye stability was evaluated afterwards by image analysis (Image J software, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) and stereotaxic micrometric coordinates were recorded for each measurement location. At the end of the experiment, rats were awakened by intramuscular injection of atipamezole (0.1 mg/kg, Antisedan, Orion Pharma, France). They underwent close monitoring in the next hours and were checked for any post-anesthetic complications during the following days. Housing conditions did not vary between D1 and D8.

One week later (D8), the animals underwent the same anesthetic protocol, and inter-day repeatability was assessed by a single 5 min recording of  $Vel_{ART}$  and  $Vel_{ONH}$  performed at the same locations as on D1. At the end of the experiment, the animals were sacrificed with an intravenous pentobarbital sodium (Ceva, France) overdose.

We also quantitatively evaluated the precision of the laser beam repositioning using the stereotaxic micrometric coordinates and a Malassez cell as a target. The laser beam was directed on day 1 at a point in the micrometric grid of the Malassez cell and the precise position of each micrometric screw was carefully recorded. The beam was then randomly redirected away from the Malassez cell. On day 2, the laser beam was repositioned using only the micrometric screw positions. Deviation of the target point between day 1 and day 2 was recorded for five different locations on the Malassez cell.

**Transient ocular blood flow changes.** In six rats, the anterior chamber was cannulated with a 27G<sup>1/2</sup> needle connected to a reservoir filled with balanced salt solution (Baush and Lomb, Rochester, NY, USA) and to a pressure transducer (Edwards Lifesciences, Guyancourt, France). Intraocular pressure (IOP) was continuously monitored (Powerlab, ADInstruments, Oxford, UK) and modified by increasing the height of the bottle in order to reach an IOP of 150 mmHg. LDF measurements were taken for 2 min at baseline IOP (physiological IOP, 15 mmHg), followed by 4 min at 150 mmHg and finally by 5 min at baseline. For each rat, four recordings (on two retinal arteries and two ONH locations) were performed with a resting period of 20 min between them. At the end, the animals were sacrificed and  $Vel_{ART}$  was recorded continuously upon heart arrest and  $Vel_{ONH}$  was recorded for 5 min after heart arrest. All recordings were performed in the same retinal or ONH locations throughout the IOP experiment.

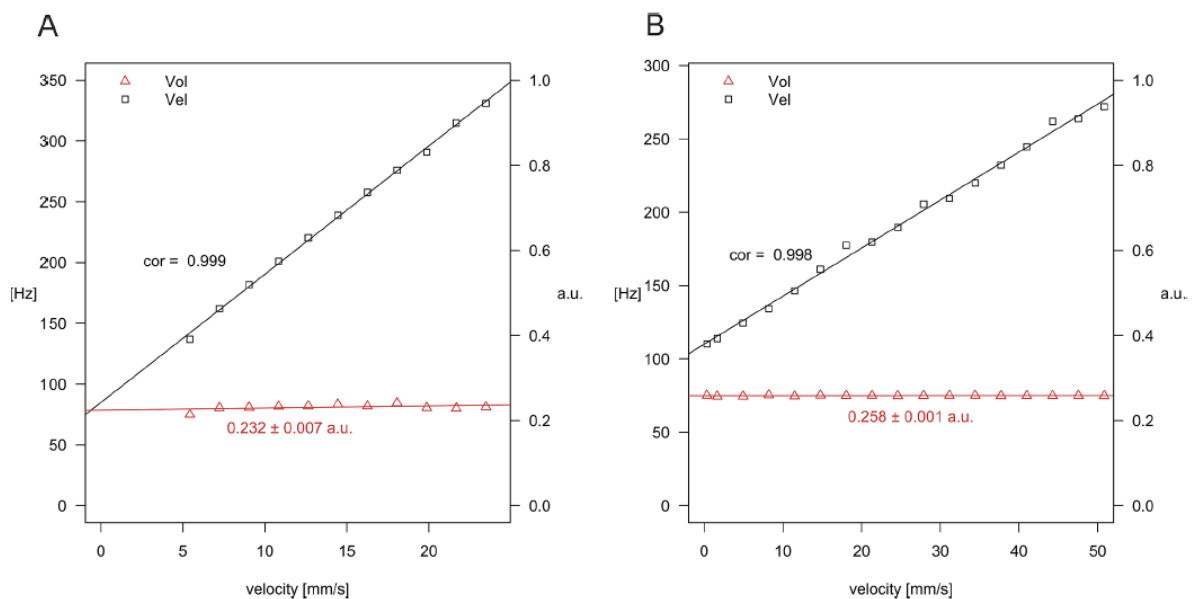
### Statistical analysis

Data processing was performed using R [26] and statistical analysis using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS; version 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).  $P < 0.05$  was considered statistically significant. All tests were two-tailed. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Statistical comparison during baseline, ocular hypertension and after heart arrest was performed using nonparametric Wilcoxon signed-rank tests. The correlation of the ocular blood perfusion parameters with the speed of the Teflon wheel and of the microspheres was assessed using Pearson tests. Repeatability of the measurements was assessed between each minute of the 5 min measurements (intra-session), between the three repeated 5 min measurements (inter-session) and between the first recording on D1 and D8 (inter-day). Intra- and inter-session, and inter-day repeatability of  $Vel_{ART}$  and  $Vel_{ONH}$  were estimated by calculating the variation coefficients (VC) and the Intraclass Correlation Coefficient (ICC) (single, two-way random absolute agreement). ICC values were interpreted as follows: 0–0.49 indicating poor agreement, 0.5–0.69 indicating fair agreement and  $>0.7$  indicating good to strong agreement.

### Results

#### Linearity of LDF measurements in simulation experiments

The results of the LDF measurements recorded using the Teflon wheel and latex microspheres are shown in Fig 3.  $Vel$  varied linearly with the velocity of the wheel (Pearson correlation factor, 0.999,  $p < 0.0001$ ).  $Vol$  remained constant over the range of induced velocity ( $0.232 \pm 0.007$  a.u., Fig 3A). Due to the minimum voltage required to operate the motor, velocities lower than 5 mm/s could not be tested. Similar results were obtained using flowing microspheres:  $Vel$  varied linearly with the velocity of the microspheres in the capillary (Pearson correlation factor, 0.998,



**Fig 3. Linearity assessment of LDF parameters.** Ocular blood perfusion parameters  $Vol$  (volume) and  $Vel$  (velocity) versus the velocity obtained from a rotating Teflon (A) wheel and a flow of microspheres in a glass capillary (B).

doi:10.1371/journal.pone.0134378.g003

$p < 0.0001$ ).  $Vol$  remained constant ( $0.258 \pm 0.001$  a.u., Fig 3B).  $DC$  (data not shown) remained constant in both setups over the entire velocity range (Teflon wheel  $0.359 \pm 0.001$  Volt and microspheres  $0.338 \pm 0.004$  Volt).

### Baseline velocity values in physiological conditions

Cardiovascular monitoring of each rat during anesthesia showed stable mean arterial blood pressure and heart rate, and physiological blood oxygen saturation ( $122 \pm 3$  mmHg,  $332 \pm 5$  beats/min and  $98.7 \pm 0.6\%$ , respectively). During baseline measurements in retinal arteries and ONH,  $Vel_{ART}$  and  $Vel_{ONH}$  were  $651 \pm 76$  Hz ( $n = 12$  rats) and  $369 \pm 138$  Hz ( $n = 16$  rats), respectively.

The mean spectra from retinal arteries were characterized by a power intensity distribution over a wide range of frequency shifts (30 to 3000–4000 Hz), whereas the mean spectra from ONH had a power intensity distribution over a lower range of frequency shifts (30–1000 Hz). The mean spectra from tissue proximal to the investigated retinal vessels (i.e., choroid) were similar to the ONH spectra.

### LDF signal repeatability

After analysis of ocular fundus images for all retinal and ONH measurements, we excluded one 5-min measurement for  $Vel_{ART}$  evaluation on D1 in two rats because of eyeball movements.

The repeatability of the measurements (variation coefficients and ICC) is reported in Table 1.  $Vel_{ART}$  and  $Vel_{ONH}$  repeatability is illustrated in Fig 4 with representative examples of repeated measurements on D1.

$Vel_{ART}$  and  $Vel_{ONH}$  were highly repeatable, with inter-session ICCs of 0.82 and 0.86, respectively, indicating strong agreement. However, intra-session ICCs were 0.4 and 0.6, respectively, reflecting the high short-term variation of the  $Vel$  signal (1 min).

The accuracy of the laser beam repositioning on the pupil, assessed using the Malassez cell, was considered satisfactory in most cases, with a median 50  $\mu$ m difference between the two consecutive positions on day 1 and day 2.

The five different positions on day 2 were respectively 20, 50, 75, 20 and 100  $\mu$ m away from those of day 1.

Concomitantly, the inter-day ICC of 0.79 for  $Vel_{ART}$  reflected the accuracy of laser beam repositioning, while inter-day ICC for  $Vel_{ONH}$  did not reach statistical significance.

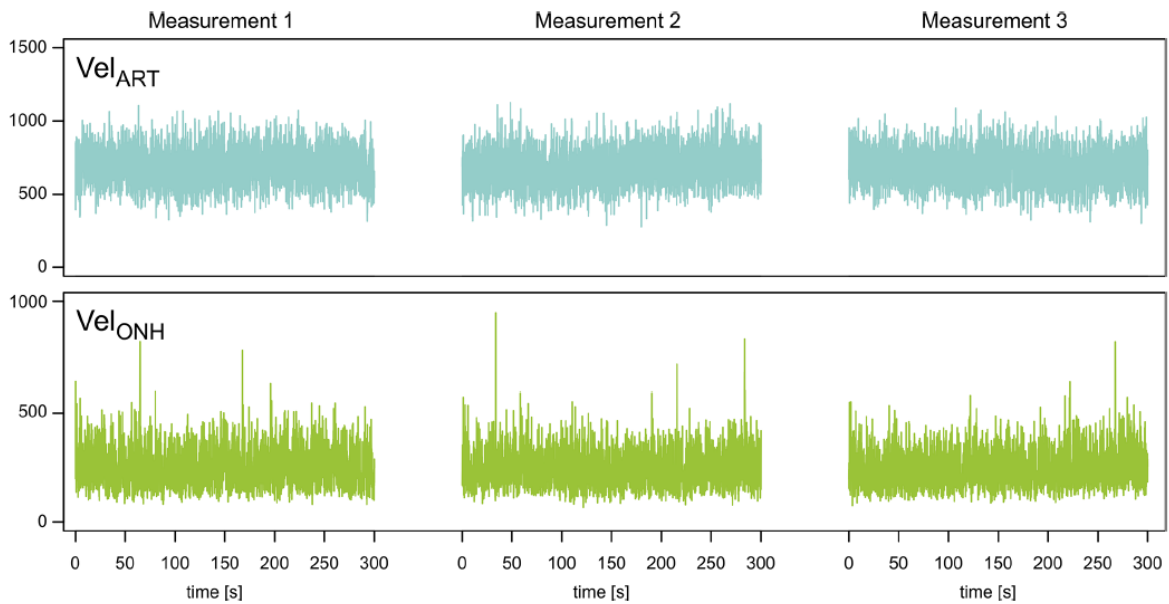
### Effects of IOP variations

An increase in the IOP value to 150 mmHg decreased  $Vel_{ART}$  by  $69 \pm 9\%$  ( $p = 0.04$ ) and  $Vel_{ONH}$  by  $4.5 \pm 19.5\%$  ( $p = 0.39$ ) compared to baseline values (Fig 5). Fig 6 illustrates the real-time changes in  $Vel_{ART}$  and  $Vel_{ONH}$  in the response to intraocular hypertension.

**Table 1. Intraclass correlation coefficient and variation coefficient for retinal artery and optic nerve head velocity.** For Intra-session evaluation, each 5-min measurement was divided into five 1-min periods. Mean velocities in each 5-min or 1-min session were considered.  $P$ -value and 95% confidence interval are given for each corresponding ICC value.

	Velocity, retinal arteries					Velocity, optic nerve head				
	VC (%)	ICC	95% confidence interval		p	VC (%)	ICC	95% confidence interval		p
			lower bound	upper bound				lower bound	upper bound	
Intra-session	3.6±3.4	0.4	0.12	0.91	<0.05	9.2±4.2	0.6	0.4	0.84	<0.05
Inter-session	7±5.1	0.82	0.29	0.98	<0.05	8.1±7	0.87	0.68	0.96	<0.05
Inter-day	7.8±5	0.79	-0.22	0.98	<0.05	7.6±9	0.7	-0.3	0.97	0.07

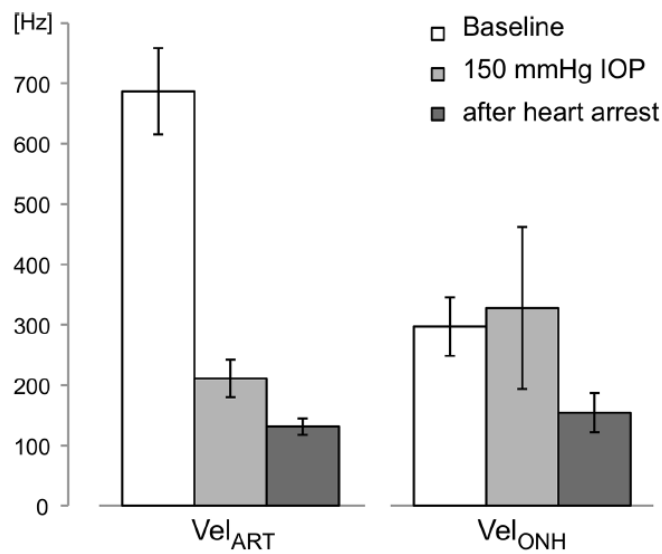
doi:10.1371/journal.pone.0134378.t001



**Fig 4. Repeated velocity measurements.** Example of  $Vel_{ART}$  and  $Vel_{ONH}$  recordings repeated every 5 min for one rat.

doi:10.1371/journal.pone.0134378.g004

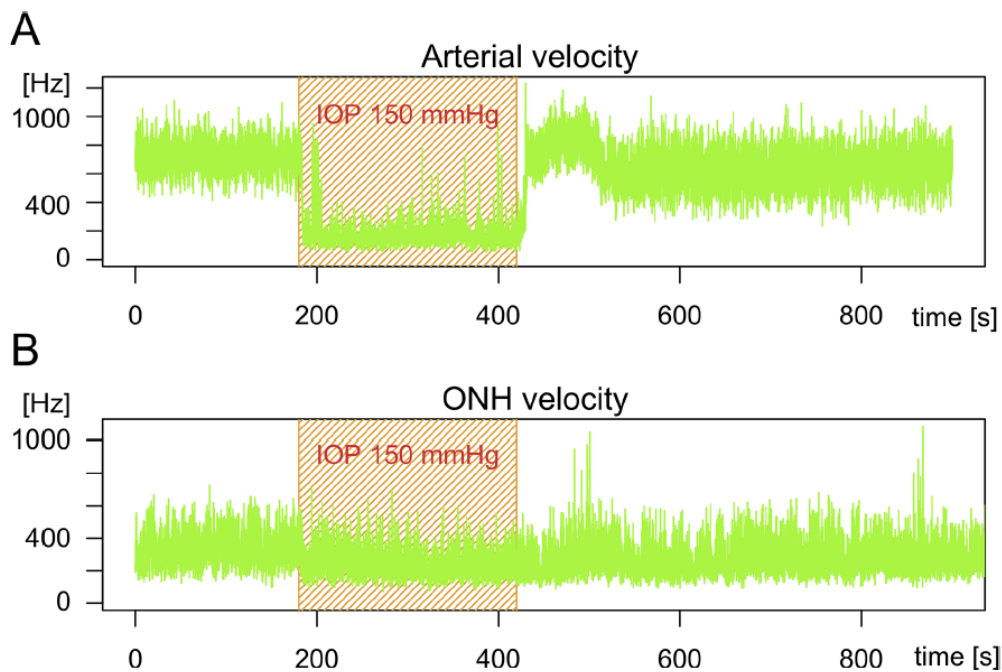
After heart arrest,  $Vel_{ART}$  and  $Vel_{ONH}$  were decreased by  $81 \pm 3\%$  ( $p = 0.04$ ) and  $41 \pm 15\%$  ( $p = 0.04$ ), respectively, compared to previous values. Fig 7 shows representative power spectra during baseline, intraocular hypertension and immediately following heart arrest.



**Fig 5.  $Vel_{ART}$  and  $Vel_{ONH}$  variations in response to 150 mmHg and after heart arrest (mean  $\pm$  SD).**

doi:10.1371/journal.pone.0134378.g005





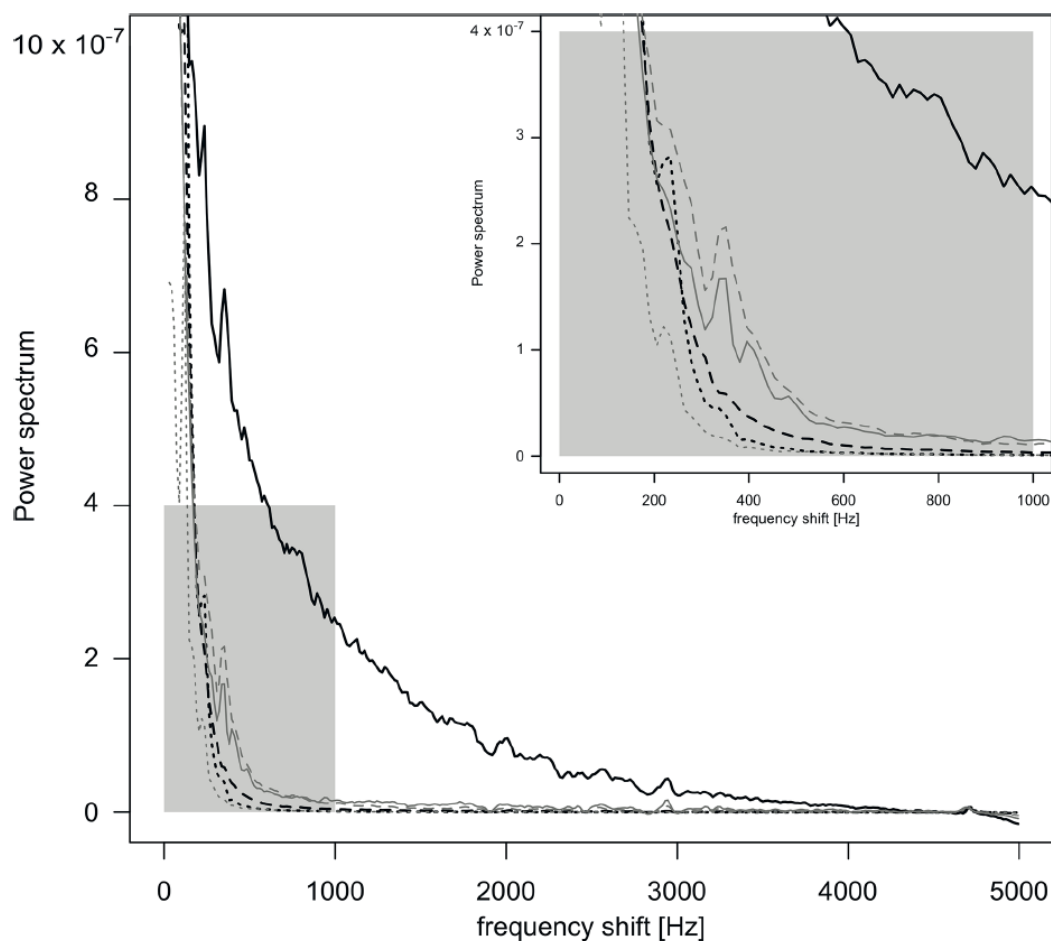
**Fig 6. Intraocular hypertension experiment results.** Typical recordings of retinal arteries (A) and optic nerve head (B) velocity during intraocular hypertension experiment. After 3 min of baseline recording (IOP, 15 mmHg), IOP was increased to 150 mmHg for 4 min and returned to 15 mmHg for the end of the measurement (recovery period).

doi:10.1371/journal.pone.0134378.g006

## Discussion

We have developed a new compact LDF device dedicated to the study of ocular blood perfusion in the rat. The perfusion measurements obtained using this new prototype show a perfect linearity between measurements of  $Vel$ , Teflon wheel speed and microsphere speed. This LDF device estimated the mean spectra of the Doppler shift for the ONH tissue and retinal arteries in baseline conditions. Inter-session and inter-day reproducibility of blood velocity measurements were better than intra-session repeatability. The analysis of spectra and blood perfusion parameters during the IOP increase and after heart arrest validate the pertinence of the velocity signal from retinal arteries and strongly suggest that the  $Vel_{ONH}$  signal is mostly attributed to tissue light scattering.

The first step of validation of this new LDF device was to test the linearity of LDF measurements with a Teflon wheel and microspheres in a glass capillary. Due to the scattering process, the number of backscattered photons is known to be independent of the speed of the wheel so that the power spectrum integral, normalized with  $DC^2 (Vol)$ , should be constant. As expected, in both experiments,  $Vol$  was constant and independent of speed.  $Vel$  measured with moving microspheres was linear over a much wider range (0.3–50 mm/s) than needed for the expected speed of RBC in the rat fundus (24 mm/s in retinal arteries [11]). The range of speed for the wheel is low because multiple scattering within Teflon induces a higher frequency shift than the software can accept. Therefore, the new LDF device shows the same linearity and similar spectra as described for the previous LDF systems used in humans [20].



**Fig 7. Power spectra analysis during the three experimental conditions.** Variation of power spectra at baseline, during the IOP experiment and after heart arrest, for velocity of retinal artery (black lines) and optic nerve head (gray lines). Each period of the experiment is represented by the corresponding mean power spectrum: baseline (solid line), increased IOP at 150 mmHg (dashed line) and after heart arrest (dotted line). Upper right corner of the figure represents zoomed power spectra between 0 and 1000 Hz (gray area).

doi:10.1371/journal.pone.0134378.g007

Three parameters may be used to ascertain the quality of LDF measurements: stability of *DC* [23], control of eye stability and spectrum characteristics. *DC*, which corresponds to the intensity of the collected light, is monitored during LDF measurements to validate a stable measurement volume. It is the first parameter to vary in response to eyeball movements because sampled tissue volume, and therefore scattered light, will change. In our experiments, we were able to observe real-time eyeball movements, confirmed by fundus images captured every 30 s. These observations suggest that some very low amplitude movements of the eye globe do not affect *DC* stability but can induce *Vel* variations. We used post-measurement analysis of ocular fundus images as a qualitative index of ocular stability, permitting us to validate *Vel* recordings. This method allows us to exclude *Vel* variations due to slow ocular motion.

Consequently, a quantitative method for fundus image analysis, and thus for eye motion evaluation, using image tracking, would be valuable in the near future.

Besides *DC* and fundus images, measurement validation incorporates the mean spectrum as a third quality criterion. The mean power spectrum for frequencies between 400 and 500 Hz should be higher than mean noise, which is calculated for frequencies above 4 kHz. Retinal arteries and ONH spectra showed different profiles, with lower frequency shift in ONH spectra. This is in accordance with the lower volume of RBCs in ONH tissue compared to retinal arteries.

Perfusion measurements are affected by the optical scattering properties of the tissue and by the heterogeneity of the distribution of capillaries. Measurements show that retinal blood vessels do not affect ONH perfusion recording when they are at a distance greater than 100  $\mu\text{m}$  from the measurement area in the ONH (data not shown). In the case of *Vel* measurement in the retinal vessel, which has a diameter of approximately 50  $\mu\text{m}$  [27, 28], most of the signal originates from RBCs in the vessels and the contribution of surrounding tissues was considered to be negligible.

Based on the ICC values discussed in the results section, reproducibility was considered good to strong for *Vel<sub>ART</sub>* and *Vel<sub>ONH</sub>*. Inter-session reproducibility was higher than intra-session reproducibility. Short-term variations (1 min) of the signal were probably associated with eyeball movements, the main parameter affecting *Vel<sub>ART</sub>* stability. We observed very stable eyeballs for some rats, whereas others showed eye motions in spite of the same anesthetic protocol. For inter-day reproducibility, which showed good to strong agreement for *Vel<sub>ART</sub>* and *Vel<sub>ONH</sub>*, the positioning of the LDF was critical and improved by the modified stereotaxic instrument and the LDF holder, which allows adjustment in the (*x*, *y*, *z*) directions to bring the pupil of the optical device into the pupil of the eye with a precision of 10  $\mu\text{m}$  (as shown using the Malassez cell). Owing to this setup, recording of blood perfusion in the area of interest is possible on different days, in order to follow blood perfusion over time.

An increase in IOP up to a value of 150 mmHg led to a major decrease in *Vel<sub>ART</sub>*. Complete cessation of retinal perfusion is visible with funduscopy (rapid disappearance of retinal vessels, whitening of the fundus) [29, 30] and previous experiments in rats have shown that an IOP as high as 130 mmHg strongly reduces blood perfusion [31, 32] in the choroid, retina and ONH. This IOP increase gave similar results in other species and using other measurement techniques (monkeys [33] and cats [34, 35]). Since mean arterial pressure during our experiments was less than 130 mmHg, ocular perfusion pressure at an IOP of 150 mmHg, estimated in the rat by the difference between mean arterial pressure and IOP, is expected to be close to zero. We can assume that the *Vel<sub>ART</sub>* decrease is directly correlated to the retinal vessel diameter reduction and obstruction, as previously imaged in OCT [32] and as observed in ocular fundus images during our experiments. A similar decrease in ocular perfusion was observed after heart arrest. Mean spectra analysis showed a significant drop in intensity at frequencies over 200 Hz. This means that the number of moving RBCs (proportional to the area under the curve) drops significantly. These observations led us to conclude that the LDF signal recorded in retinal arteries is highly sensitive to an acute increase in IOP and reflects the decrease in blood perfusion in both conditions.

Contrary to *Vel<sub>ART</sub>* changes during the IOP increase, *Vel<sub>ONH</sub>* showed a nonsignificant decrease in response to ocular blood flow arrest. If this response reflects the absence of change in ONH blood flow, a possible explanation is that the ONH tissue sampled by LDF was significantly deeper than ONH tissues affected by the IOP increase and still perfused under these conditions [36]. The prelaminar and laminar ONH region of rats, about 170  $\mu\text{m}$  thick, is likely to have been measured by LDF. Fredriksson et al. explored LDF measurement depth and volume in various tissues for a similar LDF probe setup. From these results, the depth of measurement

for our device is estimated between 100  $\mu\text{m}$  and 270  $\mu\text{m}$  [37]. Moreover, comparison of the power spectrum obtained during intraocular hypertension and after heart arrest shows similar signals. These observations support the theory that Doppler shift induced by tissue light scattering contributes more to the  $Vel_{ONH}$  signal than RBC movements. This hypothesis is reinforced by the paucity of capillaries in the anterior part of the ONH sampled by our LDF device. An abundant capillary network irrigates the retrobulbar part of the optic nerve, but few capillaries have been observed in the superficial ONH layers [38, 39]. One scanning electron micrograph of a microvascular cast [40] shows that three to six capillaries are visible in the LDF measurement area. Other ocular blood perfusion measurement techniques such as microsphere velocity measurements show that perfusion in the rat ONH ( $0.18 \pm 0.03 \mu\text{l}/\text{min}$ ) was lower than that measured in the retina ( $19 \pm 3.4 \mu\text{l}/\text{min}$ ) and the choroid ( $170 \pm 35 \mu\text{l}/\text{min}$ ) [41]. These data strongly suggest that noise produced by light scattering in ONH tissue is responsible for the majority of the LDF signal.

There are some limitations in the use of our LDF device. It does not provide absolute perfusion values and therefore it is not possible to compare baseline perfusion between animals. Adding a rotating pupil with two scattering directions of detection and image analysis to achieve accurate measurement of vessel diameter would improve the ability of the device to measure the absolute flow in rat retinal vessels. Moreover, the absence of a pertinent signal coming from the ONH strongly suggests that this device is not useful for the study of ONH perfusion in rats.

This device should be considered as a new tool to assess retinal perfusion along with the other devices recently reported: LDF to assess global ocular perfusion [8], an invasive method to acquire perfusion information [16] and the promising but less affordable OCT-OMAG technique [11].

## Conclusion

We have described a new, compact LDF device dedicated to studying ocular blood perfusion in the rat allowing repeatable measurements on retinal vessels. The perfusion measurements obtained using this new prototype showed perfect linearity between measurements of  $Vel$  and speed of the Teflon wheel and microspheres. The mechanical system allows rotation of the lens through the rat's pupil, providing easy targeting of retinal vessels. Regular recording of images and subsequent analysis can track the eye position and *a posteriori* selection of collected data. Estimation of the mean Doppler shift spectra for retinal arteries in baseline conditions, during IOP increase and after heart arrest validated the pertinence of the velocity signal from retinal arteries.

## Supporting Information

S1 File. NC3Rs ARRIVE Guidelines Checklist 2014.  
(DOCX)

## Acknowledgments

The authors thank Charles Riva for his advice and all the valuable discussions on laser Doppler flowmetry. Magali Albrieux and Marie Baldazza are acknowledged for their technical contributions.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MM FT CC DGR SA CL MB MG. Performed the experiments: MM FT CL MB. Analyzed the data: MM FT CC MG. Contributed reagents/materials/analysis tools: MM FT SA MB MG. Wrote the paper: MM FT CC DGR MG.

## References

1. Riva C, Ross B, Benedek GB (1972) Laser Doppler measurements of blood flow in capillary tubes and retinal arteries. *Invest Ophthalmol* 11: 936–944. PMID: [4634958](#)
2. Riva CE, Geiser M, Petrig BL (2010) Ocular blood flow assessment using continuous laser Doppler flowmetry. *Acta Ophthalmol* 88: 622–629. doi: [10.1111/j.1755-3768.2009.01621.x](#) PMID: [19860779](#)
3. Petrig BL, Riva CE, Hayreh SS (1999) Laser Doppler flowmetry and optic nerve head blood flow. *Am J Ophthalmol* 127: 413–425. PMID: [10218694](#)
4. Kiel JW, Shepherd AP (1992) Autoregulation of choroidal blood flow in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 2399–2410. PMID: [1634337](#)
5. Riva CE, Cranstoun SD, Mann RM, Barnes GE (1994) Local choroidal blood flow in the cat by laser Doppler flowmetry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 608–618. PMID: [8113011](#)
6. Fitzgerald ME, Vana BA, Reiner A (1990) Control of choroidal blood flow by the nucleus of Edinger-Westphal in pigeons: a laser Doppler study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 2483–2492. PMID: [2265988](#)
7. Riva CE, Poumaras CJ, Poitry-Yamate CL, Petrig BL (1990) Rhythmic changes in velocity, volume, and flow of blood in the optic nerve head tissue. *Microvasc Res* 40: 36–45. PMID: [2144606](#)
8. Hetu S, Pouliot M, Cordahi G, Couture R, Vaucher E (2013) Assessment of retinal and choroidal blood flow changes using laser Doppler flowmetry in rats. *Curr Eye Res* 38: 158–167. doi: [10.3109/02713683.2012.723296](#) PMID: [22992205](#)
9. Cheng H, Duong TQ (2007) Simplified laser-speckle-imaging analysis method and its application to retinal blood flow imaging. *Opt Lett* 32: 2188–2190. PMID: [17671579](#)
10. Choi W, Baumann B, Liu JJ, Clermont AC, Feener EP, Duker JS et al. (2012) Measurement of pulsatile total blood flow in the human and rat retina with ultrahigh speed spectral/Fourier domain OCT. *Biomed Opt Express* 3: 1047–1061. doi: [10.1364/BOE.3.001047](#) PMID: [22567595](#)
11. Zhi Z, Cepurna W, Johnson E, Shen T, Morrison J, Ruikang KW. (2011) Volumetric and quantitative imaging of retinal blood flow in rats with optical microangiography. *Biomed Opt Express* 2: 579–591. doi: [10.1364/BOE.2.000579](#) PMID: [21412463](#)
12. Li Y, Cheng H, Duong TQ (2008) Blood-flow magnetic resonance imaging of the retina. *Neuroimage* 39: 1744–1751. PMID: [18063388](#)
13. Lorentz K, Zayas-Santiago A, Tummala S, Kang Derwent JJ (2008) Scanning laser ophthalmoscope-particle tracking method to assess blood velocity during hypoxia and hyperoxia. *Adv Exp Med Biol* 614: 253–261. doi: [10.1007/978-0-387-74911-2\\_29](#) PMID: [18290336](#)
14. Tsujikawa A, Kiryu J, Nonaka A, Yamashiro K, Ogura Y, Honda Y. (2000) Reproducibility of scanning laser Doppler flowmetry in the rat retina and optic nervehead. *Jpn J Ophthalmol* 44: 257–262. PMID: [10913644](#)
15. Strohmaier C, Werkmeister RM, Bogner B, Runge C, Schroedl F, Brandtner H et al. A novel, microscope based, non-invasive laser Doppler flowmeter for choroidal blood flow assessment. *Exp Eye Res* 92: 545–551. doi: [10.1016/j.exer.2011.03.014](#) PMID: [21443871](#)
16. Reiner A, Li C, Del Mar N, Fitzgerald ME (2010) Choroidal blood flow compensation in rats for arterial blood pressure decreases is neuronal nitric oxide-dependent but compensation for arterial blood pressure increases is not. *Exp Eye Res* 90: 734–741. doi: [10.1016/j.exer.2010.03.006](#) PMID: [20302861](#)
17. O'Brien C, Kelly PA, Ritchie IM (1997) Effect of chronic inhibition of nitric oxide synthase on ocular blood flow and glucose metabolism in the rat. *Br J Ophthalmol* 81: 68–71. PMID: [9135412](#)
18. Pouliot M, Deschenes MC, Hetu S, Chemtob S, Lesk MR, Couture R et al. (2009) Quantitative and regional measurement of retinal blood flow in rats using N-isopropyl-p-[14C]-iodoamphetamine ([14C]-IMP). *Exp Eye Res* 89: 960–966. doi: [10.1016/j.exer.2009.08.005](#) PMID: [19698709](#)
19. Wang L, Fortune B, Cull G, McElwain KM, Cioffi GA (2007) Microspheres method for ocular blood flow measurement in rats: size and dose optimization. *Exp Eye Res* 84: 108–117. PMID: [17069799](#)
20. Geiser MH, Truffer F, Evequoz H, Khayi H, Mottet B, Chiquet C. (2013) Schlieren laser Doppler flowmeter for the human optical nerve head with the flicker stimuli. *J Biomed Opt* 18: 127001. doi: [10.1117/1.JBO.18.12.127001](#) PMID: [24296999](#)
21. Chiquet C, Lacharme T, Riva C, Almanjourni A, Aptel F, Khayi H et al. (2014) Continuous response of optic nerve head blood flow to increase of arterial blood pressure in humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55: 485–491. doi: [10.1167/iov.13-12975](#) PMID: [24355824](#)
22. Campbell MC, Hughes A (1981) An analytic, gradient index schematic lens and eye for the rat which predicts aberrations for finite pupils. *Vision Res* 21: 1129–1148. PMID: [7314492](#)
23. Geiser M, U. D, Riva CE (1999) Compact laser Doppler choroidal flowmeter. *Journal of Biomedical optics* 4: 459–464. PMID: [23014619](#)

24. Rapp LM, Tolman BL, Dhindsa HS (1990) Separate mechanisms for retinal damage by ultraviolet-A and mid-visible light. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 1186–1190. PMID: [2354921](#)
25. Mohammed A, Abdelnabi MA, Modlinski JA. Evaluation of anesthesia and reproductive performance upon diazepam and xylazine injection in rats. *Animal Science Papers and Reports* vol. 30 (2012) no. 3, 285–292 Institute of Genetics and Animal Breeding, Jastrzębiec, Poland.
26. R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL, <http://www.R-project.org/>.
27. Bhutto IA, Amemiya T (1995) Retinal vascular changes during aging in Wistar Kyoto rats. Application of corrosion cast and scanning electron microscopy. *Ophthalmic Res* 27: 249–261. PMID: [8552365](#)
28. Ninomiya H, Kuno H (2001) Microvasculature of the rat eye: scanning electron microscopy of vascular corrosion casts. *Vet Ophthalmol* 4: 55–59. PMID: [11397320](#)
29. Bui BV, Edmunds B, Cioffi GA, Fortune B (2005) The gradient of retinal functional changes during acute intraocular pressure elevation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 202–213. PMID: [15623775](#)
30. Heike M, Marmor MF (1991) Recovery of retinal pigment epithelial function after ischemia in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 73–77. PMID: [1987107](#)
31. Selles-Navarro I, Villegas-Perez MP, Salvador-Silva M, Ruiz-Gomez JM, Vidal-Sanz M (1996) Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure-induced ischemia and survival intervals. A quantitative in vivo study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 2002–2014. PMID: [8814140](#)
32. Zhi Z, Cepuma WO, Johnson EC, Morrison JC, Wang RK (2012) Impact of intraocular pressure on changes of blood flow in the retina, choroid, and optic nerve head in rats investigated by optical microangiography. *Biomed Opt Express* 3: 2220–2233. PMID: [23024915](#)
33. Geijer C, Bill A (1979) Effects of raised intraocular pressure on retinal, prelaminar, laminar, and retrolaminar optic nerve blood flow in monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 18: 1030–1042. PMID: [90027](#)
34. Shonat RD, Wilson DF, Riva CE, Cranstoun SD (1992) Effect of acute increases in intraocular pressure on intravascular optic nerve head oxygen tension in cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 3174–3180. PMID: [1399424](#)
35. Riva CE, Cranstoun SD, Petrig BL (1996) Effect of decreased ocular perfusion pressure on blood flow and the flicker-induced flow response in the cat optic nerve head. *Microvasc Res* 52: 258–269. PMID: [8954867](#)
36. Sossi N, Anderson DR (1983) Effect of elevated intraocular pressure on blood flow. Occurrence in cat optic nerve head studied with iodoantipyrine I 125. *Arch Ophthalmol* 101: 98–101. PMID: [6849662](#)
37. Fredriksson I, Larsson M, Stromberg T (2009) Measurement depth and volume in laser Doppler flowmetry. *Microvasc Res* 78: 4–13. doi: [10.1016/j.mvr.2009.02.008](https://doi.org/10.1016/j.mvr.2009.02.008) PMID: [19285089](#)
38. Morrison JC, Johnson EC, Cepuma WO, Funk RH (1999) Microvasculature of the rat optic nerve head. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 1702–1709. PMID: [10393039](#)
39. Sugiyama K, Gu ZB, Kawase C, Yamamoto T, Kitazawa Y (1999) Optic nerve and peripapillary choroidal microvasculature of the rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 3084–3090. PMID: [10586928](#)
40. Pannarale L, Onori P, Ripani M, Gaudio E (1996) Precapillary patterns and perivascular cells in the retinal microvasculature. A scanning electron microscope study. *J Anat* 188 (Pt 3): 693–703. PMID: [8763486](#)
41. Wang L, Fortune B, Cull G, McElwain KM, Cioffi GA (2007) Microspheres method for ocular blood flow measurement in rats: size and dose optimization. *Exp Eye Res* 84: 108–117. PMID: [17069799](#)

## 10.2 Evolution du signal en fonction de l'angle de focalisation

Lorsqu'un animal est évalué sur deux jours différents, le repositionnement de la sonde LDF sur la même zone de mesure grâce aux coordonnées micrométriques de la première mesure n'est pas toujours correct, du fait de la position variable de la tête de l'animal ou de la bascule de l'œil, difficilement maîtrisables. Dans ces conditions, à partir des coordonnées micrométriques de la première mesure, il peut être nécessaire de faire varier l'angle d'incidence du laser afin d'obtenir la focalisation optimale nécessaire à la mesure. Or, le signal LDF est sensible aux variations de l'angle d'incidence du laser incident par rapport au tissu. De plus la forte convergence de l'œil de rat pourrait accentuer le phénomène si l'entrée du faisceau incident s'éloignait du point central de la cornée. Les variations d'angles utilisées pour cette expérience constituent des positions extrêmes par rapport aux ajustements qui peuvent être nécessaires lors du repositionnement de la sonde pour une mesure répétée chez le rat.

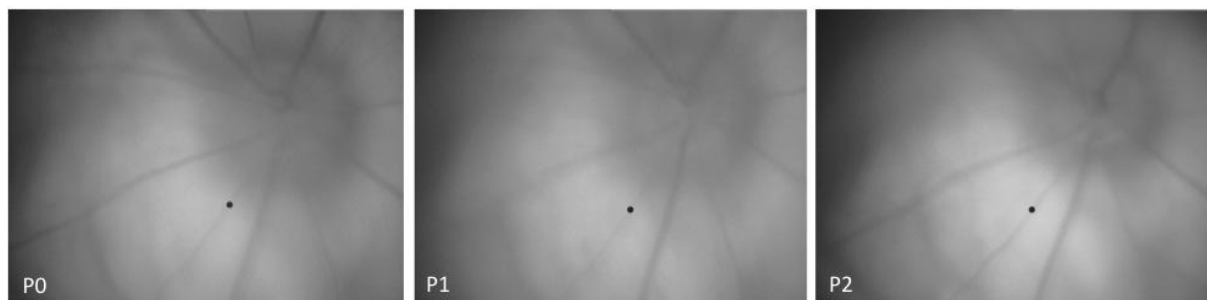
Le tableau 9 représente les valeurs moyennes de  $Vel_{ART}$  et du  $DC$  pour les 3 positions de mesure, ainsi que la variation (delta, valeur absolue) entre  $Vel_{ART}$  et  $DC$  à la position 0 (P0) et  $Vel_{ART}$  et  $DC$  à la position 1 (P1) ou 2 (P2).

Rat	$Vel_{ART}$ P0 (Hz)	SD	2SD	P1 Variation $\theta$ (cm)	P2 Variation $\gamma$ (°)	Delta $Vel_{ART}$ P1	Delta $Vel_{ART}$ P2	$DC$ (V)	SD	2SD	Delta $DC$ P1	Delta $DC$ P2
C1	343,31	149,8	299,6	-0,6	8	247,95	166,92	0,275	0,009	0,018	0,068	0,007
D1	620,48	138,8	277,6	-0,6	-9	165,54	117,6	0,357	0,046	0,092	0,015	0,194
G1	535,48	101,6	203,2	-0,7	7	79,29	118,55	0,16	0,003	0,006	0,01	0,22
H1	657,66	101,7	203,4	-0,8	-7	99,47	92,6	0,348	0,019	0,038	0,118	0,109
I1	560,17	114,8	229,6	-0,72	5	147,18	73,14	0,227	0,007	0,014	0,056	0,04
E1	644,8	139	278	-0,7	ND	19,7	ND	0,221	0,009	0,018	0,081	ND
J1	795,2	142,8	285,6	-0,6	5	137,4	123,3	0,22	0,008	0,016	0,02	0,01

**Tableau 9 : Mesure de la vélocité artérielle rétinienne ( $Vel_{ART}$  en Herz) lors de variation de l'angle d'incidence du laser (moyenne).** La variation des angles  $\theta$  et  $\gamma$  correspondant aux positions P1 et P2 est exprimée en cm et degré respectivement. Les valeurs Delta  $Vel_{ART}$  P1 et P2 représentent la différence (valeur absolue) entre  $Vel_{ART}$  mesurée à P0 et  $Vel_{ART}$  mesurée à P1 et P2. Delta  $Vel_{ART}$  P1 et P2 sont comparée à l'écart-type (SD) et le double de l'écart-type (2SD) de  $Vel_{ART}$  P0. Les valeurs de  $DC$ , exprimées en Volts, suivent la même analyse.

La variation des angles  $\theta$  et  $\gamma$  a été choisie de façon arbitraire afin d'avoir un déplacement maximal de la sonde tout en conservant celle-ci focalisée sur la même zone de mesure. La variation de l'angle  $\theta$  a été réalisée toujours dans le même sens (rotation latéro-médiale) du fait de la position de l'animal et de la sonde, le mouvement dans l'autre sens (medio-latéral) ne permettant pas de conserver la zone de mesure focalisée.

Un exemple d'images du fond d'œil et de la localisation de la mesure dans les 3 positions est représenté dans la figure 18.



**Figure 21 : Image du fond d'œil précisant la localisation de la mesure artérielle rétinienne (ART) pour les 3 positions de sonde testées.** P0 : position initiale ; P1 : après variation de l'angle  $\theta$ , P2 après variation de l'angle  $\gamma$ . Le point noir représente la zone de focalisation de la sonde.

La valeur  $Vel_{ART}$  reflète la vitesse des globules rouges dans l'artère rétinienne. Cette valeur n'étant pas absolue, il n'est pas possible de la comparer à une valeur de référence. Il en est de même pour les variations que le signal peut subir. La variabilité intrinsèque du signal  $Vel_{ART}$  lors de la mesure est reflétée par l'écart-type (SD) de  $Vel_{ART}$  au cours d'une mesure. Ce SD était compris entre 101,6 et 149,8 Hz dans cette expérience. Nous avons choisi de comparer les variations du paramètre  $Vel_{ART}$  entre les 3 positions avec les valeurs SD et 2SD, car elles représentent soit un intervalle de valeurs pour lesquelles la variation est « normale » (SD), soit un intervalle directement dépendant de la variabilité intrinsèque du signal initial (2SD). Delta  $Vel_{ART}$  était inférieur à SD pour 50% des mesures (P1 et P2 confondus) et compris entre SD et 2SD le reste du temps. De plus



les valeurs delta  $Vel_{ART}$  P1 et delta  $Vel_{ART}$  P2 étaient significativement inférieures à 2SD (Test de Friedman,  $p < 0,05$ ).

Ces résultats sont en faveur d'un impact faible de la variation de l'angle d'entrée du faisceau incident dans l'œil du rat sur la valeur de base de  $Vel_{ART}$ . Ainsi, lors d'un repositionnement de la sonde LDF pour des mesures sur un même rat (même artère rétinienne) à des jours différents, les variations de cet angle d'entrée ne devrait pas engendrer de variabilité significative du signal.

Le  $DC$  a subi des variations lors des modifications d'angles. Le signal  $DC$  basal étant très stable (), le delta  $DC$  supérieur à 2 SD pour 85% des mesures reflète des variations de faible amplitude. La variabilité du  $DC$  est directement liée à la variation de quantité de lumière diffusée par les hématies et réfléchi par le tissu vers le capteur. Il y a donc de faibles variations de la quantité de lumière émise entre les différentes positions de la sonde. L'utilisation d'une valeur de  $DC$  stable entre deux mesures sur une même localisation pourrait donc être utilisée pour valider la relocalisation de la sonde LDF.

### 10.3 Caractérisation et évolution des spectres du signal $Vel_{ART}$

#### 10.3.1 Evolution des spectres lors des variations d'angles d'incidence du laser

La figure 19 représente les spectres de puissance moyens des mesures de  $Vel_{ART}$  lors des variations d'angles d'incidence du laser.

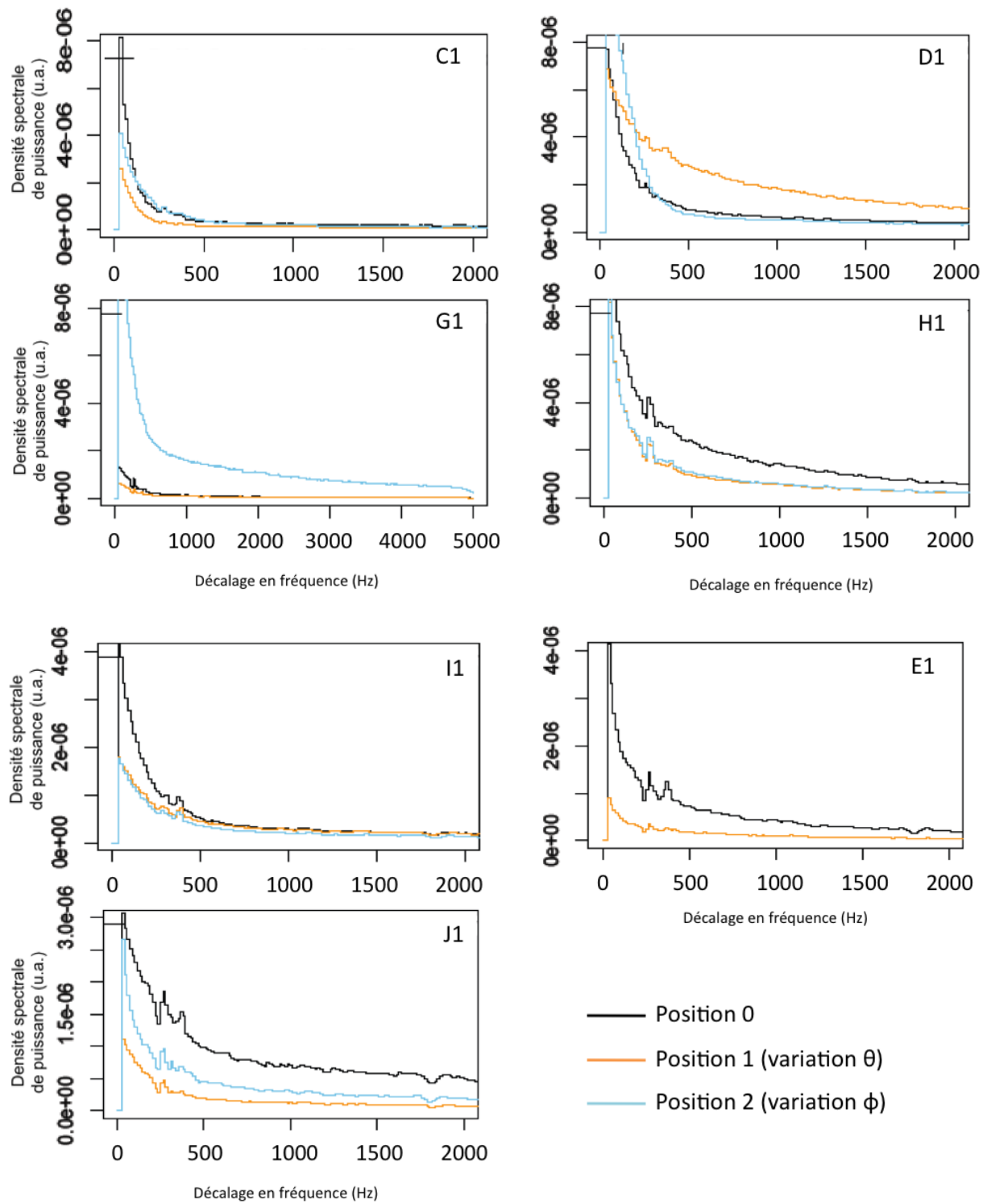
##### Position P0 :

On peut observer une grande variation du profil du spectre de puissance moyen à P0, position qui représente la meilleure condition de mesure de  $Vel_{ART}$ . Le spectre de puissance moyen présente un « décroché » ou variation de la densité spectrale de puissance (DSP) au niveau des fréquences de 300 Hz environ, visible chez tous les autres rats sauf C1 et D1. Cela signifie qu'une quantité égale de photons présente un décalage en fréquence autour de 300Hz. Le spectre de puissance moyen du rat G1 présente une DSP faible par rapport aux spectres des autres rats, sans que la valeur de  $Vel_{ART}$  ne soit

modifiée par rapport aux valeurs de  $Vel_{ART}$  des autres rats (535 Hz contre 635 Hz en moyenne).

Positions P1 et P2 :

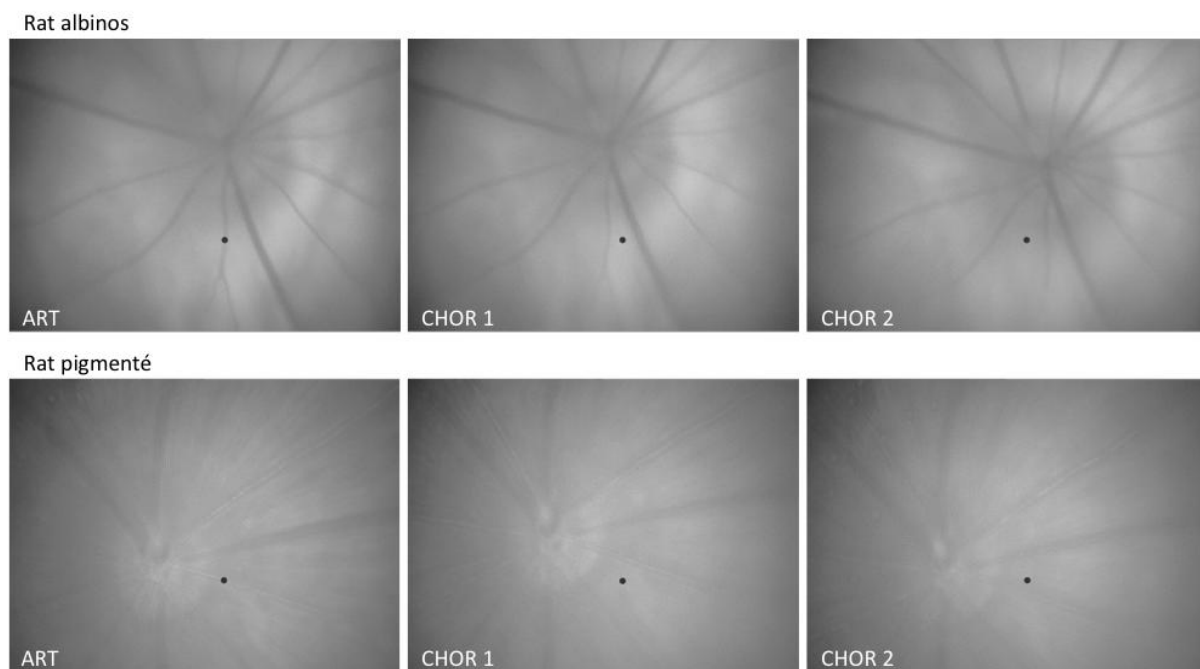
Après variation de l'angle  $\theta$  ou  $\gamma$ , le spectre de puissance moyen varie notablement et de façon non reproductible entre les rats. La variation la plus fréquemment observée est une diminution de la DSP, ce qui signe une diminution du nombre de photons ayant subi les décalages en fréquence captés.



**Figure 22 : Evolution des spectres de puissance moyens des mesures de *VelART* en fonction de la variation de l'angle d'incidence du laser, pour chaque animal. Les positions P1 et P2 correspondent à la variation des angles  $\theta$  et  $\gamma$  respectivement.**

### 10.3.2 Comparaison des spectres $Vel_{ART}$ avec les spectres du signal choroidien

Le signal de vélocité à l'état basal a été enregistré au niveau d'une artère rétinienne et de la choroïde adjacente (2 localisations), comme indiqué sur les images de fond d'œil (figure 20). Ces mesures ont été réalisées sur des rats albinos et des rats pigmentés. Le tableau 10 résume les valeurs moyennes de  $Vel_{ART}$ ,  $Vel_{CHOR}$ , du DC et de la présence de la variation de la DSP sur les spectres de puissance moyens.



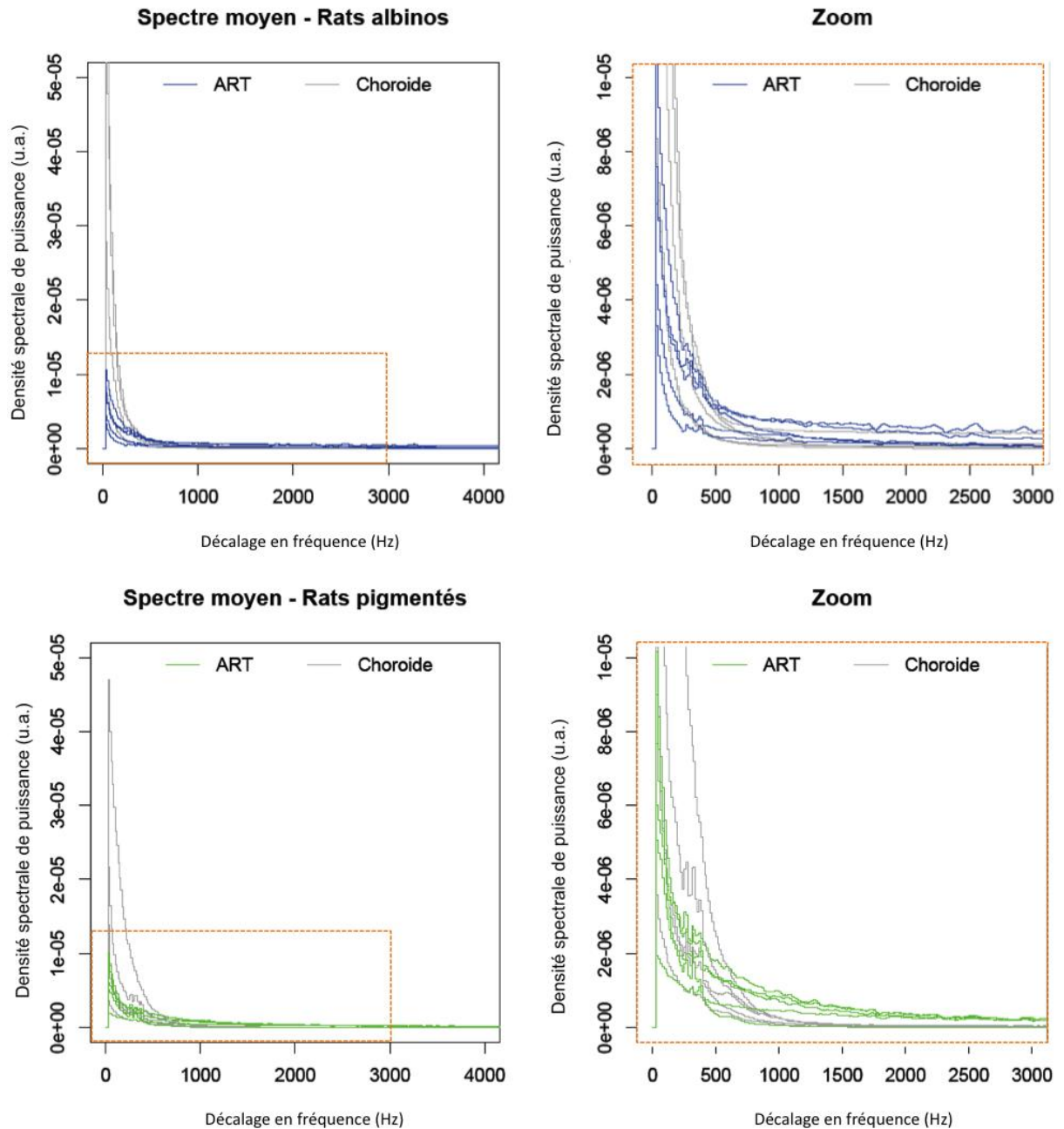
**Figure 23 : Image du fond d'œil précisant la localisation de la mesure artérielle rétinienne (ART) et des mesures choroidiennes (CHOR 1 et 2) chez un rat albinos (G1) et un rat pigmenté (E1).**

Rat	Pigmentation	$Vel_{ART}$ (Hz)	$Vel_{CHOR 1}$ (Hz)	$Vel_{CHOR 2}$ (Hz)	DC ART	DC CHOR 1	DC CHOR 2	Variation DSP spectre ART	Variation DSP spectre CHOR 1	Variation DSP spectre CHOR 2
C1	albinos	694,2	254	279,5	0,25	0,3	0,33	1	0	0
D1	albinos	467,3	246,1	254,3	0,286	0,394	0,373	1	0	0
G1	albinos	611,95	228,5	259,2	0,237	0,23	0,148	1	0	1
H1	albinos	646,48	235,7	437,15	0,255	0,345	0,305	1	0	0
I1	albinos	574,17	164,7	256,1	0,359	0,535	0,299	1	0	0
E1	pigmenté	588,1	273,4	209,3	0,387	0,457	0,427	1	1	1
F1	pigmenté	626,06	203,63	290,05	0,198	0,268	0,225	1	0	0
J1	pigmenté	745,36	290,89	329,51	0,206	0,224	0,218	1	1	1
K1	pigmenté	625,45	299,9	425,39	0,293	0,358	0,323	1	1	1
L1	pigmenté	213,6	183,5	ND	0,236	0,2	ND	1	1	ND

**Tableau 10 : Mesure de la vélocité artérielle rétinienne ( $Vel_{ART}$ , en Herz) et chorôidienne ( $Vel_{CHOR}$ ).** Les valeurs moyennes de  $DC$  sont exprimées en Volts et données pour chaque mesure. La présence de la variation de la DSP dans le spectre de chaque mesure est analysé et noté en fonction de sa présence (1) ou de son absence (0).

La valeur basale de la vélocité sanguine au niveau de la choroïde est en moyenne de  $262 \pm 69$  Hz chez les rats albinos et de  $278 \pm 74$  Hz chez les rats pigmentés, les deux groupes ne présentant pas de différence significative. La valeur basale de  $Vel_{ART}$  est semblable entre les deux groupes, avec une moyenne de  $579 \pm 148$  Hz. La valeur de  $DC$  est également identique entre l'artère et la choroïde, et entre les deux groupes de rats, ce qui signifie que la même quantité de photons est transmis vers la sonde LDF. Ceci est en accord avec le spectre d'absorption de la mélanine, qui absorbe majoritairement la lumière de longueur d'onde (bleu) et non les longueurs d'onde utilisée par le système (700 nm).

Les spectres de puissance moyens correspondant à ses mesures sont représentés sur la figure 21.



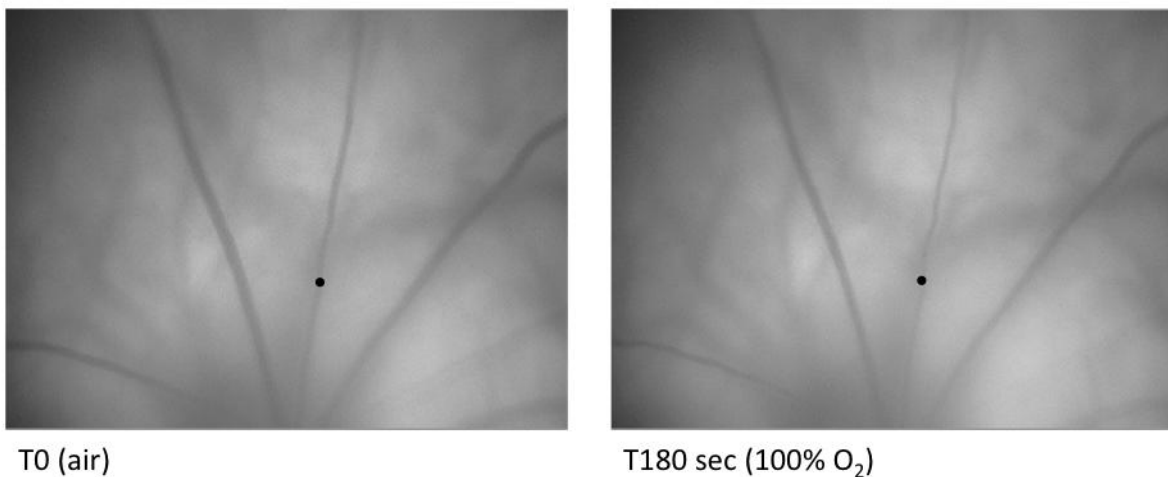
**Figure 24 : Représentation graphique du spectre de puissance moyen pour les mesures de  $Vel_{ART}$  et une mesure de  $Vel_{CHOR}$  chez les rats albinos (n = 5) et chez les rats pigmentés (n = 5).**

Les spectres de puissance de la choroïde présentent un profil semblable aux spectres de la tête du nerf optique, avec une grande partie du signal compris dans les faibles fréquences (0 - 300 Hz) pour des DSP allant jusqu'à  $5 \cdot 10^{-5}$  u.a.. La variation de la DSP est

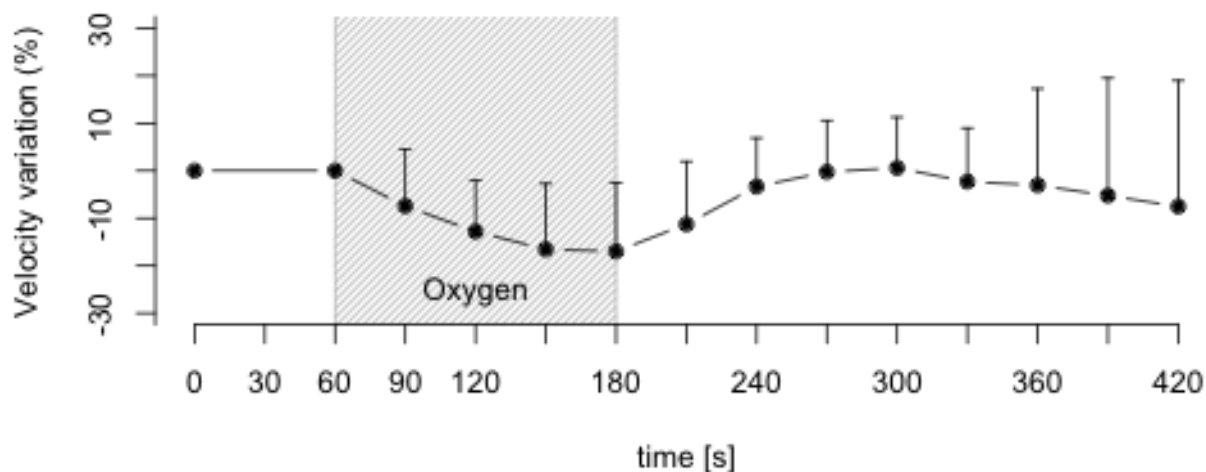
retrouvée de façon très reproductible sur les spectres des artères chez les deux groupes. Chez les rats pigmentés ont observé cette variation de DSP dans 7 spectres sur 9 alors qu'un seul spectre de choroïde présente cette variation chez les rats albinos. L'analyse des images du fond d'œil à posteriori révèle que la mesure correspondant à ces spectres (choroïde) est localisée sur un vaisseau choroïdien de gros calibre, difficilement identifiable à cause de la pigmentation du fond d'œil chez ces rats.

#### 10.4 Evolution de la perfusion rétinienne lors d'hyperoxie

La diminution de  $Vel_{ART}$  était rapidement observée en début d'hyperoxie, et s'accompagnait d'une vasoconstriction artérielle visible au fond d'œil (figure 22).



**Figure 25 : Image du fond d'œil enregistrée pendant la mesure de la vitesse artérielle rétinienne, au début de la mesure (T0, en air ambiant) et en fin d'hyperoxie (T180 sec, 100% O<sub>2</sub>).**



**Figure 26 : Variation moyenne (+ SD) de la vélocité artérielle rétinienne lors d'inhalation d'oxygène pur (n = 8 rats) par rapport à la valeur de base (première minute de mesure).**

Après 2 minutes d'oxygène pur,  $Vel_{ART}$  diminuait significativement de  $17,0 \pm 13,7 \%$  (n = 8 rats,  $p=0.012$ ) (Figure 23).

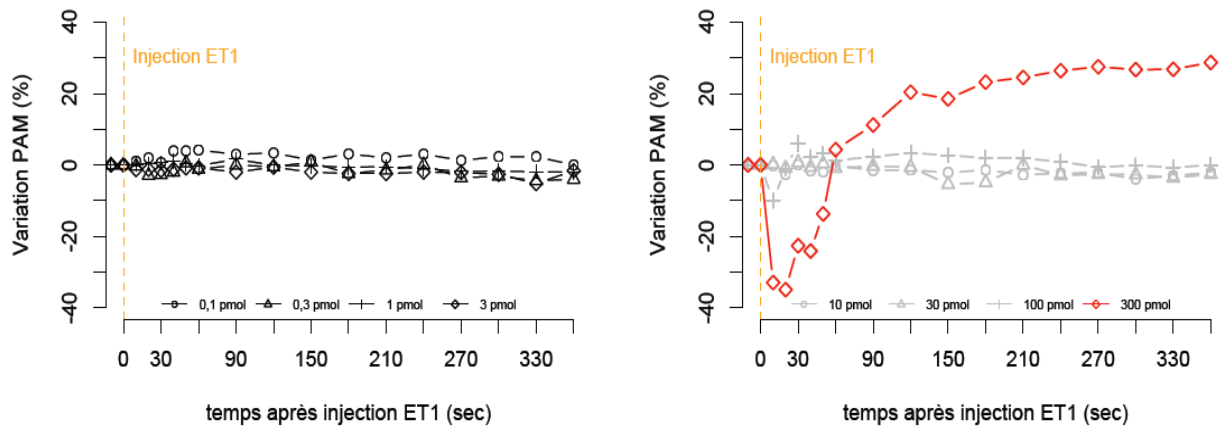
## 10.5 Evolution de la perfusion rétinienne lors d'injection intra-carotidienne d'ET-1

### Evaluation de la dose maximale d'ET-1 sans effet sur la PA systémique

La PA moyenne (PAM) des rats (n = 3) a été enregistrée après injection intra-carotidienne de doses croissantes d'ET-1. Aucune variation de la PAM pour des doses d'ET-1 entre 0,1 et 30 pmol n'a été observée. Après injection de 100pmol, une légère diminution de la PAM suivie d'une augmentation fugace mais de faible amplitude a été enregistrée. Après injection de 300 pm d'ET-1, la PAM chutait brutalement de 38% à 20 secondes puis augmentait progressivement pour dépasser la PAM basale à 1 min et augmenter jusqu'à un maximum de + 30% en moyenne à 5-6 min (figure 24).

Nous avons donc évalué dans un premier temps par fluxmétrie laser Doppler la réponse artérielle rétinienne à des doses d'ET-1 inférieures à 300 pmol.

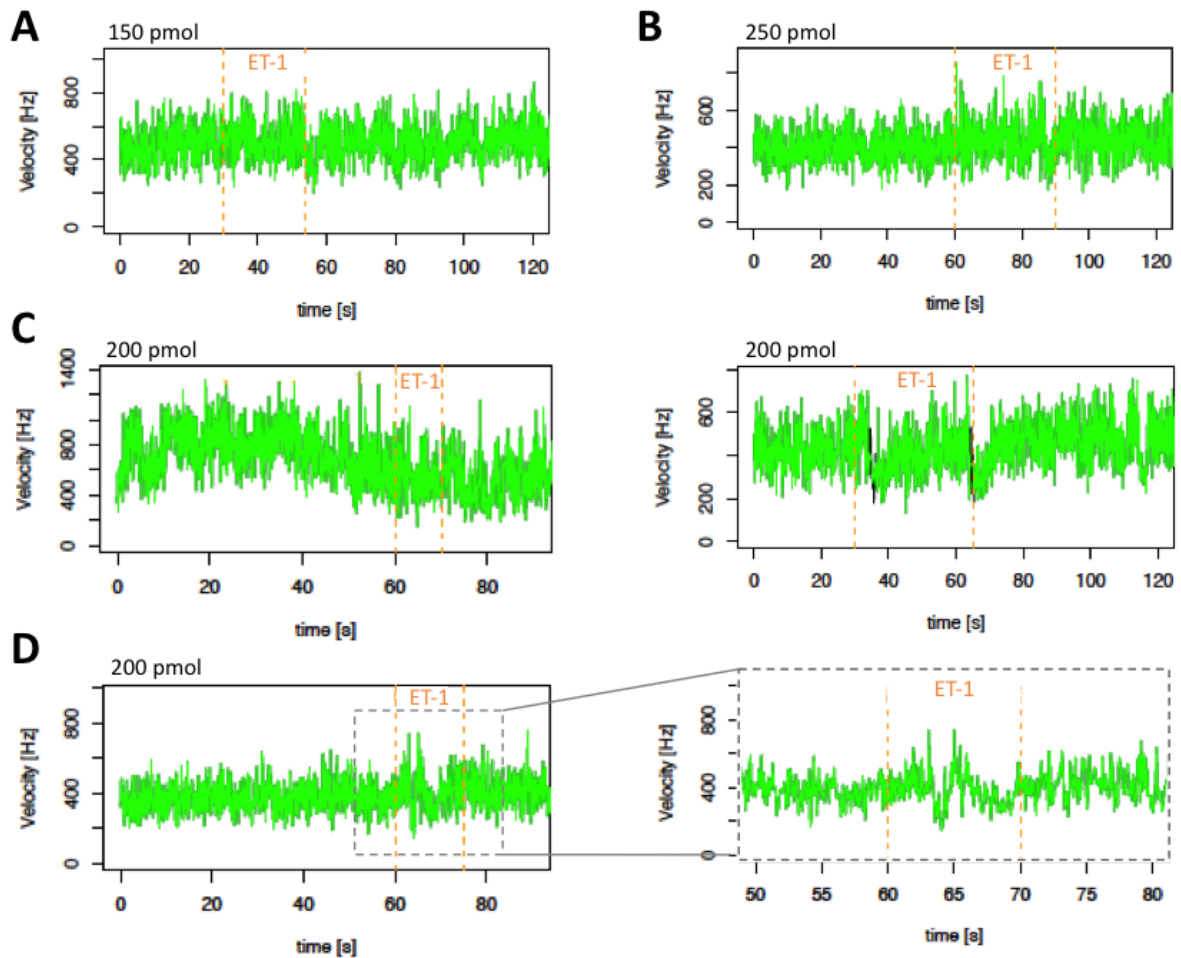




**Figure 27 : Variation de la pression artérielle moyenne (PAM) après injection intra carotidienne de doses croissantes d'endothéline 1 (0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 et 300 pmol). La variation de la PAM est exprimée en pourcentage de la PAM basale (avant injection).**

Evaluation de la réponse de la perfusion rétinienne après injection intra-carotidienne d'ET-1 :

Les variations de  $Vel_{ART}$  ont été enregistrées après injection de 150, 200 et 250 pmol d'ET-1. La figure 25 montre des exemples de variation de vélocité en réponse aux différentes doses d'ET-1. Lors de l'injection d'ET-1 aux doses testées, l'observation du fond d'œil en direct révélait une vasoconstriction globale de tous les vaisseaux du fond d'œil (rétiniens et choroïdiens), avec disparition des vaisseaux rétiniens pendant 5 secondes en moyenne. Cette vasoconstriction était suivie d'un remplissage rapide des vaisseaux rétiniens puis choroïdiens. Cependant, la mesure de  $Vel_{ART}$  ne reflétait pas la vasoconstriction marquée visible au fond d'œil, et ne montrait pas de variation significative pendant l'injection d'ET-1.



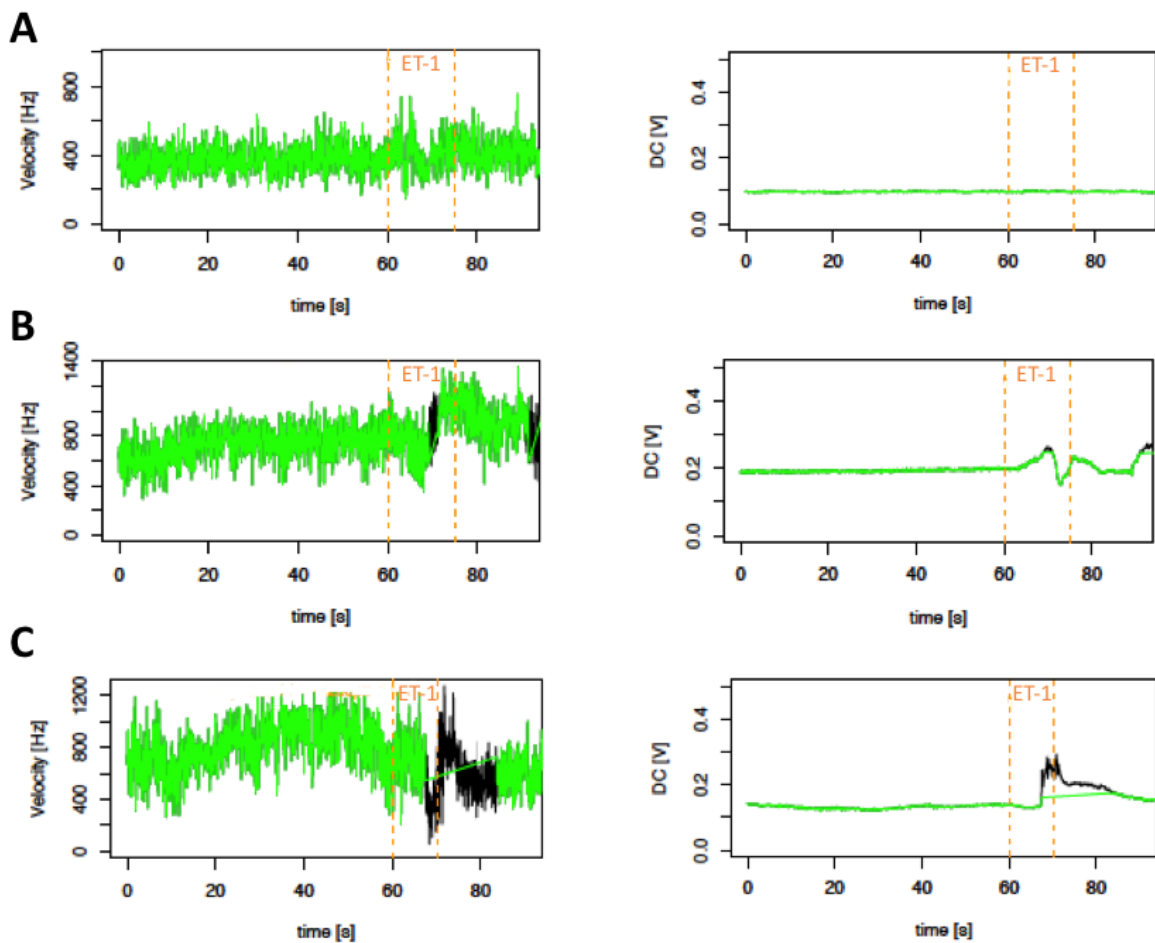
**Figure 28: Enregistrements de  $Vel_{ART}$  pendant l'injection intra carotidienne d'endothéline 1 à la dose de 150 (A), 200 (C et D) et 250 pmol (B).** Les lignes pointillées orange matérialisent le début et la fin de l'injection d'ET-1. La figure D représente une mesure de  $Vel_{ART}$  avec deux échelles différentes.

Plusieurs cas de figure se sont présentés :

- 1) un oeil stable pendant l'injection d'ET-1, associé à un DC stable et une mesure interprétable (figure 26 - A). Nous n'avons pas observé de variation significative et reproductible de  $Vel_{ART}$  entre les rats. L'analyse du tracé en détail a mis parfois en évidence des diminutions de vitesse qui reste néanmoins faibles (figure 25 - D)
- 2) un oeil stable pendant l'injection d'ET-1, associé à une alternance de vasoconstriction et vasorelaxation des vaisseaux rétiens en fin d'injection d'ET-1. Une variation du DC

associée à une variation non synchrone de  $Vel_{ART}$ , difficilement interprétable et non reproductible d'un rat à l'autre, était observée (figure 26 - B).

3) un œil qui bascule lors de l'injection d'ET-1, avec perte de la zone de mesure (figure 26 - C). Cette situation est fréquente (60% injections) et ne permettait pas d'obtenir de mesure interprétable.



**Figure 29 : Exemple de tracés de  $Vel_{ART}$  et du  $DC$  correspondant représentant les 3 cas de figure rencontrés. A) Mesure stable avec œil stable B) œil stable associé à une alternance de vasoconstriction et vasorelaxation des vaisseaux rétiniens et C) bascule de l'œil pendant l'injection d'ET-1.**

## 10.6 Evaluation de la perfusion sanguine oculaire en réponse à l'hyperoxie chez le rat soumis à l'HI

L'expérience a pris fin précocement avant J15 car les résultats de variation de la perfusion artérielle rétinienne en réponse à l'hyperoxie enregistrés à J0 n'étaient pas en accord avec les données préliminaires obtenues chez le rat sain. De plus, une forte mortalité des rats a été observée à l'induction de l'anesthésie et au réveil (5 rats sur 12), sans cause identifiée. Le protocole anesthésique, dont l'utilisation de la curarisation, avait été validé les mois précédents sans aucun décès d'animal. Ces conditions nous ont poussé à stopper l'expérience afin d'analyser l'origine de ces résultats.

Le tableau 11 résume la variation maximale de  $Vel_{ART}$  par rapport à sa valeur basale (avant 100% O<sub>2</sub>), en réponse à 4 min d'hyperoxie. Après 4 min d'hyperoxie,  $Vel_{ART}$  diminue de  $7 \pm 10,9$  %, contre une diminution de  $17,0 \pm 13,7$  % après 2 min d'O<sub>2</sub>, observée lors des expériences préliminaires.

Rat	Exposition 14 jours	Delta $Vel_{ART}$ (%)
LDF1	NX	-2,5
LDF2	NX	
LDF3	NX	-5,4
LDF4	NX	
LDF5	NX	17,1
LDF6	NX	-23
LDF9	HI	-2,1
LDF10	HI	-2,3
LDF11	HI	-11,7
LDF12	HI	-10,9
LDF13	HI	-13,8
LDF14	HI	-15,6

**Tableau 11 : Variation moyenne de la vitesse artérielle rétinienne à J0 (en %) lors d'inhalation d'oxygène pur (n = 8 rats) par rapport à la valeur de base**

**(première minute de mesure).** Les cases grises représentent les rats décédés en début ou fin d'expérience.

Les conditions d'expérience entre les mesures préliminaires et cette expérience diffèrent en deux points : la durée de l'hyperoxie, plus longue dans cette expérience (+ 2 min), et la curarisation des animaux pendant les mesures. La durée du stimulus d'hyperoxie a été allongée afin de savoir si la vasoconstriction et la diminution de la vitesse sanguine en réponse à l'O<sub>2</sub> pur étaient augmentées ou si la réponse maximale était atteinte après 2 min d'O<sub>2</sub> pur. Cet allongement du stimulus ne peut néanmoins pas expliquer une plus faible variation de la vitesse artérielle rétinienne. Ainsi seul la curarisation pourrait être associée à l'altération de la réponse rétinienne à l'hyperoxie. Dans cette optique, nous avons comparé les variations de  $Vel_{ART}$  entre les rats curarisés ou et les rats non curarisés, ayant subi cette expérience (tableau 12).

Rat	Dose bromure de vecuronium	Stabilité oeil	Stabilité signal LDF	Delta $Vel_{ART}$ (%)
LDF1	5 mg/kg/h	Très stable	Stable	- 2,5
LDF3	5 mg/kg/h	ND	Stable	-5,4
LDF9	5 mg/kg/h	Très stable	Instable	+ 2,7
LDF10	5 mg/kg/h	Très stable	Stable	- 2,3
LDF5	2 mg/kg/h	Très stable	Instable ++	Non interprétable
LDF6	2 mg/kg/h	Très stable	Stable	- 23
LDF11	2 mg/kg/h	Stable	Instable	- 9,1
LDF12	2 mg/kg/h	Très stable	Instable	- 10,9
LDF13	Pas de curare	Très stable	Stable	- 13,8
LDF14	Pas de curare	Stable	Instable	Non interprétable

**Tableau 12 : Comparaison des résultats obtenus lors de l'hyperoxie à J0 entre les rats sans curarisation et les rats avec 2 ou 5 mg/kg/h de curare.**

Ces observations amènent plusieurs commentaires :

1) Les plus faibles variations de  $Vel_{ART}$  sont observées chez les rats ayant reçu 5 mg/kg/h de bromure de vecuronium. Malgré le faible nombre d'animaux dans les deux

autres groupes, les réponses disponibles chez les rats non curarisés et ayant reçu la dose 2 mg/kg/h semblent plus en accord avec la variation de  $Vel_{ART}$  observée chez le rat sain.

2) La curarisation à la dose 5 mg/kg/h est associée à une meilleure stabilité de l'œil comparé à la dose 2 mg/kg/h.

3) Dans 6 cas sur 9, il y a une adéquation entre la stabilité de l'œil et la stabilité du signal LDF.

## **11 Discussion et perspectives**

Nous avons développé un prototype de fluxmètre laser Doppler adapté au petit animal (rat) dans le but d'étudier de façon non invasive la régulation vasculaire oculaire (rétine et tête du nerf optique) chez le rat sain et en conditions pathologiques.

**La première étape de ce travail consistait à valider le fonctionnement et la pertinence du signal donné par le prototype** ainsi que d'évaluer la reproductibilité des mesures dans le temps, critère indispensable pour pouvoir envisager de mesurer la perfusion sanguine oculaire chez un animal atteint de maladie rétinienne évolutive/chronique ou de maladie systémique à répercussion oculaire, notamment le rat soumis à l'HI (hypoxie intermittente)

Ce travail a fait l'objet d'une publication (Mentek et al. 2015) permettant de valider :

- la linéarité du signal in-vitro
- la pertinence du signal provenant des artères rétiniennes ( $Vel_{ART}$ ). Le signal provenant de la tête du nerf optique n'est pas modifié de façon significative lorsque la perfusion sanguine oculaire est arrêtée, ce qui supporte l'hypothèse que les mouvements d'hématies dans ce tissu ne contribuent pas de façon significative au signal de perfusion enregistré par le prototype LDF.
- la bonne répétabilité à cours terme (mesures dans la même journée) et à long terme (mesures répétées sur deux jours), associé à une possibilité de repositionnement précis de la sonde (de l'ordre de 100  $\mu\text{m}$ ) grâce au système de bras articulé et aux vis micrométriques.

**La deuxième étape de ce travail a consisté à :**

- 1) poursuivre la caractérisation du signal LDF, en particulier la compréhension des facteurs pouvant influencer la variabilité du signal,**
- 2) et d'évaluer la régulation de la perfusion sanguine rétinienne en réponse à l'inhalation d' $\text{O}_2$  pur et l'injection intra carotidienne d'ET-1.**



## A – VARIABILITE DU SIGNAL LIEE A L'APPAREILLAGE LDF

Quel que soit l'organe étudié, la réalisation de mesures répétées sur une localisation donnée par la technique LDF nécessite de relocaliser sur la même région anatomique en respectant les angles d'incidence du laser.

Contrairement aux autres organes étudiés par LDF, comme la peau ou certains organes internes, l'étude de l'œil par un LDF couplé à une caméra donne l'opportunité d'avoir une localisation précise du point de mesure par vidéo, grâce aux repères anatomiques du fond d'œil. L'utilisation de coordonnées micrométriques nous a semblé une manière pertinente de contourner ces limitations.

De plus nous avons montré que des variations importantes de l'angle d'incidence du laser par rapport à un point de mesure donné entraînait une modification du signal  $Vel_{ART}$  de l'ordre de la variation basale du signal. Nous avons ainsi formulé l'hypothèse que des faibles variations de l'angle d'incidence entre plusieurs jours de mesure sur une localisation du fond d'œil identique, ne modifient pas significativement le signal de base de  $Vel_{ART}$  et pourrait contribuer à la bonne répétabilité de la mesure de  $Vel_{ART}$  observée entre 2 jours.

Cependant, lors des variations d'angles, les spectres de puissance artériels ont présentés des variations notables dans leur profil et dans la DSP, mais de façon non reproductible entre les rats. Une diminution de la DSP du spectre est la plus fréquemment observée. Comme le  $DC$  présentait des variations, cette diminution peut être liée à un plus faible nombre de photons ayant subi les décalages en fréquence. Ce phénomène peut être dû à une plus faible quantité de photons diffusés et captés par la sonde LDF. Deux hypothèses peuvent être avancées : Soit moins de photons sont renvoyés vers la sonde, soit la sonde n'est plus dans un axe optimal permettant la détection des photons diffusés.

## B – CARACTERISATION DU SPECTRE DE PUISSANCE DES VAISSEAUX RETINIENS

Nous avons cherché à caractériser un profil de spectre de puissance type pour les artères, dans le but de l'utiliser comme outil de validation des mesures. Dans cette optique nous avons :

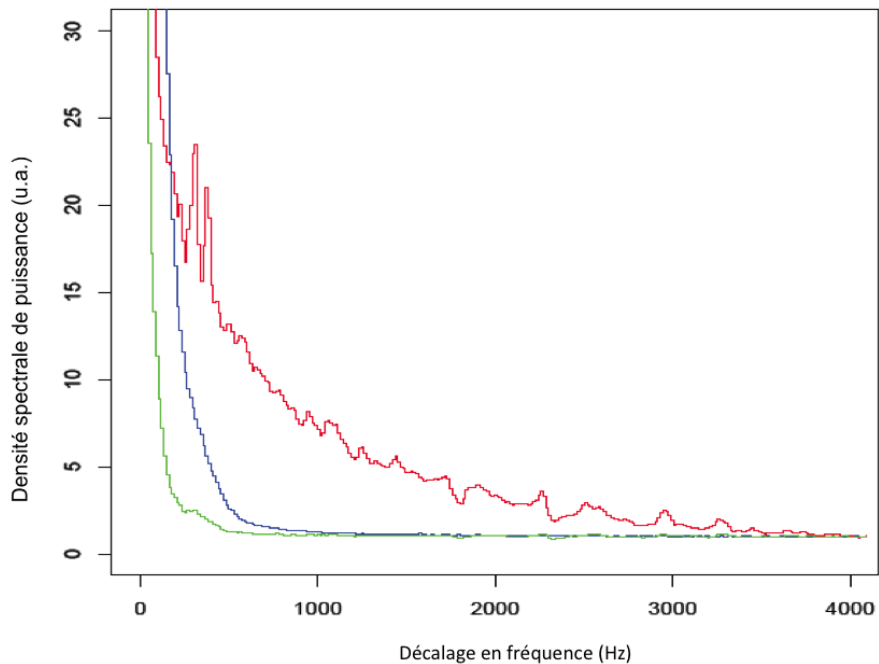
- 1) comparé les spectres de puissance moyens des mesures rétiniennes artérielles aux spectres de puissance moyens des mesures choroïdiennes,
- 2) et comparé les spectres de puissance moyens des mesures rétiniennes artérielles lors de variation de l'angle d'incidence du laser.

Le spectre de puissance observé lors de mesure de  $Vel_{ART}$  est caractérisé par une variation de la DSP associée aux fréquences avoisinant les 300 Hz, qui la différencie du profil exponentiel du reste du spectre. Nous ne l'avons pas observé sur les spectres de la tête du nerf optique ni de la choroïde, mais il est présent quand la sonde est pointée sur un gros vaisseau choroïdien.

Il est normal d'observer, dans un spectre d'artère, un plateau à une certaine fréquence, qui indique qu'un certain nombre de photons ont subi le même décalage de fréquence. Cela signifie que ces globules rouges ont la même vitesse au sein de l'artère étudiée. Cependant, nous n'observons pas de réel plateau, mais une variation brutale du signal à une fréquence précise. Le fait que cette variation se retrouve de façon identique aux mêmes fréquences chez tous les rats et que son profil est très conservé nous fait penser qu'elle représente un artefact lié à l'artère. L'hypothèse la plus probable serait un artefact de l'analyse du signal par la transformée de Fourier, du aux pulsations du sang artériel. Ces pulsations pourraient modifier les décalages en fréquence de la lumière diffusée par la paroi du vaisseau et/ou par les hématies.

Nous avons également remarqué que la DSP caractérisant le spectre des artères rétiniennes était variable, allant de  $3 \cdot 10^{-6}$  à  $10^{-5}$  u.a. La vitesse est calculée comme le premier moment du spectre et dépend des intensités pondérées par les fréquences. Ainsi la variation des profils des spectres bruts ne reflète pas les variations de la vitesse artérielle. Une possibilité pour comparer les spectres d'un même animal serait de normaliser les spectres par la valeur de l'intensité à 4000 HZ, fréquence à partir de

laquelle nous n'observons généralement plus de signal. Cela permet de comparer les spectres avec une même DSP pour les faibles fréquences (figure 27).



**Figure 30 : Comparaison des spectres d'une artère rétinienne (rouge), de la choroïde (bleu) et de la tête du nerf optique (vert) d'un même rat après normalisation par l'intensité à 4000 Hz.**

La différence de profil entre les spectres de puissance d'artère et ceux de la choroïde sont très probablement lié à une plus grande quantité d'hématies en mouvement dans les artères rétiniennes, du fait du calibre important du vaisseau par rapport aux vaisseaux choroïdiens évalués. En accord avec cette hypothèse, lorsque la mesure choroïdienne est ciblée sur un gros vaisseau choroïdien et non sur la choriocapillaire, nous avons observé chez les rats pigmentés des spectres de puissance choroïdiens semblables au profil des spectres de puissance artériel rétinien. Le réseau de la choriocapillaire est caractérisé par des mouvements d'hématies dans toutes les directions, ce qui implique que les décalages en fréquence de certains photons peuvent s'annuler. Ce phénomène peut contribuer à la différence de signal observée.

Ces observations sur les profils des spectres sont préliminaires, ce travail de caractérisation des spectres doit être poursuivi afin de mieux caractériser le signal et d'améliorer la compréhension de sa variabilité.

## C – REPONSE DES VAISSEAUX RETINIENS A L'HYPEROXIE

Nous avons montré que l'inhalation d'O<sub>2</sub> pur pendant 2 min (hyperoxie) provoquait une réduction significative de  $Vel_{ART}$  ( $17,0 \pm 13,7$  %) associée à une vasoconstriction artérielle rétinienne. Les données concernant la variation de la perfusion sanguine rétinienne lors d'hyperoxie chez le rat sont variables en fonction de l'étude et de la technique utilisée (tableau 13). La diminution de la perfusion rétinienne sanguine varie dans la littérature entre -8 et -51 %.

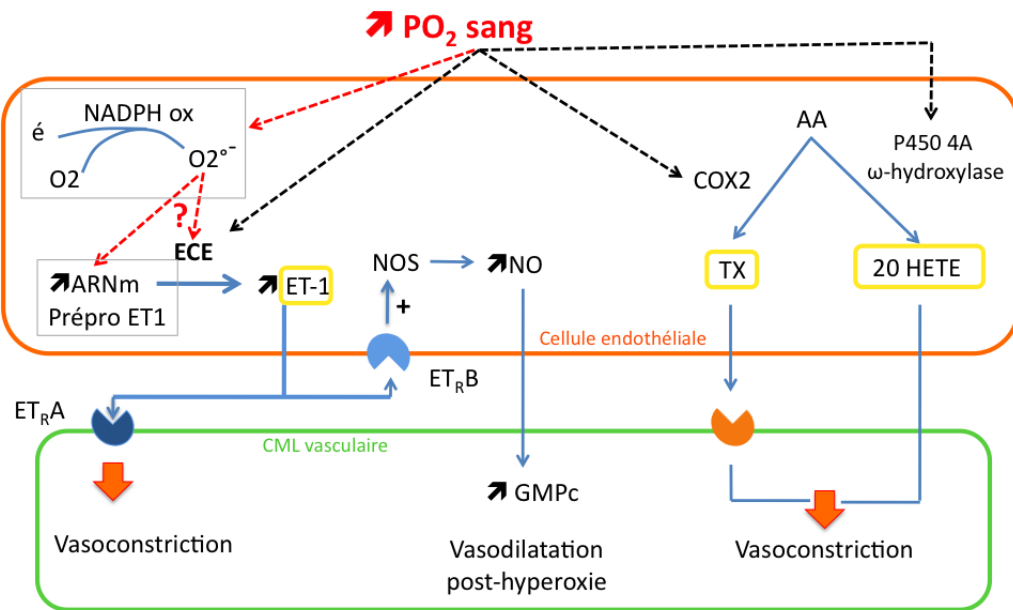
Auteur	Lit vasculaire	Technique	Gaz	Durée hyperoxie	Gaz sanguins	Curare	Variation vitesse
Hetu e al. 2013	Rétine +/- choroïde	LDF	100% O <sub>2</sub>	3 min	oui	Non	Tissue perfusion: - 8 ± 4%
Li et al. 2009	Rétine totale	IRM	100% O <sub>2</sub>	6 min	Non/Et CO <sub>2</sub>	Bromure de Pancuronium	- 12 à -26 %
Nair et al. 2011	Rétine	IRM	100% O <sub>2</sub>	6 min	Non/EtCO <sub>2</sub>	Bromure de Pancuronium	-51 ± 17%
Takagi et al. 1996	Rétine	Angiographie fluo video	100% O <sub>2</sub>	5, 10 ou 15 min	ND	Non	Diminution maximale 10 et 15 min d'O <sub>2</sub>
Li et al. 2008	Rétine	IRM	100% O <sub>2</sub>	6 min	Non/EtCO <sub>2</sub>	Bromure de Pancuronium	-25 ± 6%
Cheng et al. 2007	Rétine	Laser Speckle	100% O <sub>2</sub>	3 min	Non/EtCO <sub>2</sub>	Bromure de Pancuronium	Diminution
Tsujikawa et al. 2000	Rétine +/- choroïde	Scanning LDF	100% O <sub>2</sub>	5 min	Non	Non	-20.3%

**Tableau 13 : Résultats des études publiées rapportant la réponse de la perfusion sanguine rétinienne en réponse à l'hyperoxie chez le rat.**

L'augmentation de PaO<sub>2</sub> liée à l'inhalation d'O<sub>2</sub> pur provoque une vasoconstriction importante des artères rétiniennes associée à une diminution du flux sanguin rétinien chez l'animal (Riva et al. 1986 ; Eperon et al. 1975 ; Zhu et al. 1998) et l'homme sain (Riva et al. 1983 ; Fallon et al. 1985 ; Jean-Louis et al. 2005 ; Luksch et al. 2002 ; Langhans et al. 1997 ; Kiss et al. 2002). Cette réponse rétinienne semble plus marquée que celle observée au niveau de la circulation cérébrale (Kety et al. 1948). Les mécanismes impliqués sont résumés sur la figure 28 et font principalement intervenir l'endothéline 1 et les produits du métabolisme de l'acide arachidonique.

Chez l'homme, l'antagoniste sélectif des ET<sub>RA</sub> BQ-123 abolit la réponse rétinienne à l'hyperoxie, suggérant que l'interaction entre ET-1 et son récepteur A joue un rôle crucial dans le mécanisme de vasoconstriction induit par l'hyperoxie (Dallinger et al. 2000).

Chez le rat, le blocage sélectif des ET<sub>RA</sub> et de l'enzyme de conversion de l'ET-1 abolit également la réponse à l'hyperoxie (Takagi et al. 1996). La voie de l'acide arachidonique a été également impliquée dans cette réponse : le thromboxane A<sub>2</sub> et 20-HETE sont impliqués dans la réduction de la perfusion rétinienne chez le porc nouveau-né lors soumis à l'hyperoxie (Zhu et al. 1998). Par ailleurs, la libération de NO est impliquée dans le retour de la perfusion rétinienne à son état basal (post-hyperoxie) chez le chat, mais n'intervient pas dans les mécanismes mis en jeu pendant l'hyperoxie (Izumi et al. 2008). Ainsi la stimulation hyperoxique, en faisant intervenir deux molécules impliquées dans la physiopathologie du SAOS et modifiées par l'HI (ET-1 et NO) semble être un moyen pertinent pour évaluer l'effet de l'HI sur la régulation vasculaire rétinienne *in vivo*.



**Figure 31: Représentation schématique des voies impliquées dans la vasoconstriction rétinienne en réponse à l'hyperoxie.** La voie de l'enzyme de conversion de l'endothéline 1 (ECE) est activée, et l'ET-1 libérée stimule la vasoconstriction en se fixant sur son récepteur A (ET<sub>R</sub>A) à la surface des cellules musculaires lisses vasculaires (CML vasculaire). L'activation de l'ECE serait liée à l'augmentation de la synthèse d'ion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) par la NADPH oxydase (NADPH ox) en réponse à l'hyperoxie. Le mécanisme d'action n'est cependant pas connu (pointillés rouges). La voie de la cyclo-oxygénase 2 (COX2) conduit à la synthèse de thromboxane A2 (TX) et la voie du cytochrome P450 (P450 4A ω-hydroxylase) conduit à la synthèse de l'acide 20-hydroxyeicosatetraénoïque (20 HETE). Le monoxyde d'azote (NO), contribue au retour du tonus vasculaire rétinien à son état basal après l'arrêt de l'hyperoxie, via l'activation des récepteurs B à l'ET-1 (ET<sub>R</sub>B) situé à la surface des cellules endothéliales.

AA, acide arachidonique ; GMPc, guanosine monophosphate cyclique ; NOS, nitric oxide synthase.

Malgré des données préliminaires encourageantes chez le rat sain, la réponse à l'hyperoxie n'a pas pu être menée de façon satisfaisante chez le rat soumis à l'HI. La variation moyenne de  $Vel_{ART}$  enregistrée à J0 est inférieure à celle observée chez le rat sain, et certains animaux présentaient une variation de  $Vel_{ART}$  presque nulle. Le seul paramètre pouvant expliquer cette différence de réponse est l'utilisation de curare (bromure de vécuronium). L'utilisation de curare se révèle indispensable lors de l'injection intra-carotidienne d'ET-1, afin de bloquer la bascule de l'œil. Ce mouvement de l'œil est probablement dû à la vasoconstriction massive au sein du sinus veineux rétrobulbaire et de la microcirculation des muscles extra orbitaires en réponse à l'ET-1.

La curarisation a été utilisée lors d'évaluation de l'effet de l'O<sub>2</sub> sur la régulation du flux sanguin rétinien chez le rat (Chenget al. 2007 ; Li et al. 2008, 2009 ; Nair et al. 2011). Le protocole anesthésique associant xylazine + kétamine et curarisation (bromure de pancuronium) est rapporté comme très efficace pour obtenir la stabilité oculaire chez le rat (Nair et al. 2011). Ainsi la curarisation nous a semblé une solution adéquate pour s'affranchir de mouvements résiduels de l'œil, observés chez certains rats avec notre protocole anesthésique initial (xylazine + diazépam +/- kétamine).

Le bromure de vécuronium est un curare non dépolarisant agissant au niveau des récepteurs pré et post-synaptiques, par compétition réversible avec l'acétylcholine (cholino-compétitif). C'est une molécule récente possédant peu d'effets cardiovasculaires indésirables (Lavery et al. 1986 ; Alvarez et al. 1992 ; Gursoy et al. 2011). Contrairement au bromure de pancuronium, le bromure de vécuronium n'entraîne pas de vasorelaxation in vitro de l'aorte de rat (Gursoy et al. 2009) ni des artères coronaires et rénales de chien (Sai et al. 1998) et n'est pas associé à une augmentation de la fréquence cardiaque (Gursoy et al. 2011). En condition d'hypoxie, le bromure de vécuronium diminue la réponse nerveuse des corps carotidiens (Igarashi et al. 2002) et altère la réponse ventilatoire chez l'homme (Eriksson et al. 1992 ; Eriksson et al. 1993). Ainsi, ce curare pourrait être associé à une diminution de la réponse réflexe lors de variation de PO<sub>2</sub>. Les variations de perfusion rétinienne mesurées sur animal curarisé lors de variation de PO<sub>2</sub> seraient moins influencées par la régulation du flux sanguin systémique (activation réflexe via les corps carotidien), et reflèterait uniquement le mécanisme de régulation locale. Les propriétés intrinsèques du curare

utilisé ne semblent pas expliquer la diminution de réactivité vasculaire rétinienne observée.

L'effet observé pourrait par contre venir d'une potentialisation entre le curare et l'un/les agents anesthésiques utilisés. Le diazépam est capable de potentialiser la dépression de l'activité du muscle strié induite par le vécuronium (Driessen et al. 1985, 1987). Le diazépam, également connu pour diminuer la résistance vasculaire (French et al. 1989), est capable d'inhiber la contraction de l'artère coronaire chez le chien en réponse à une augmentation de potassium, de calcium ou en réponse à la norépinephrine (Ishii et al. 1983). Ainsi, une interaction entre ces deux molécules pourrait être responsable de la diminution de la vasoconstriction rétinienne lors d'hyperoxie. Il est donc important de vérifier cette hypothèse et de modifier le protocole anesthésique à associer avec la curarisation en fonction des résultats.

Plusieurs perspectives sont en cours de développement pour palier aux limites et échecs rencontrés :

#### Stabilité du signal LDF/stabilité de l'œil :

Avec ou sans curarisation, nous avons observé régulièrement une adéquation entre la stabilité de l'œil (évaluée par les images du fond d'œil) et la stabilité du signal LDF. Cela peut s'expliquer par une technique d'évaluation de la stabilité du fond d'œil qui est actuellement qualitative et dépendante de l'opérateur, et ne permet pas de quantifier l'importance de mouvements très fin. La zone de mesure au niveau du fond d'œil étant très réduite (diamètre estimé à 10  $\mu\text{m}$ ), des micromouvements pourraient entraîner des variations du signal en fonction du tissu échantillonné sans être perçu par l'opérateur. Ainsi si la zone de mesure est homogène en terme de perfusion vasculaire, ces micromouvements ne perturberont pas le signal enregistré par le LDF.

Nous testerons un logiciel actuellement développé au sein de l'équipe de Pierre Roduit de la Haute Ecole Spécialisée de Suisse occidentale (HES//SO, Haute école d'ingénierie, Sion, Valais), qui permet de quantifier a posteriori les déplacements de l'œil du rat pendant la mesure, par analyse des images du fond d'œil en se basant sur une analyse des pixels des images.



### - Réactivité vasculaire rétinienne en réponse à l'ET-1

La voie d'injection intra carotidienne de l'ET-1 a été sélectionnée initialement pour limiter les effets vasculaires systémiques de l'endothéline et obtenir une réponse rapide sur la vascularisation de l'œil. La réponse s'est révélée très fugace et n'était pas accompagnée d'une variation significative et reproductible du signal  $Vel_{ART}$ .

De plus la bascule de l'œil rendait toute mesure difficilement exploitable dans ces conditions. D'autres voies d'administration de ET-1 sont actuellement envisagées:

- la voie intra-vitréenne (IVT) permettrait de délivrer l'ET-1 directement au contact de la rétine. L'effet serait prolongé et avec un plus grande latence que la voie artérielle actuelle. Cette technique est associée à plusieurs limitations. Notamment la réalisation d'injections IVT chez le rongeur nécessite un travail sous microscope opératoire et une contention/mobilisation de l'œil. L'adaptation de la technique avec un système grossissant portable (lunette loupe) pourrait permettre de réaliser l'IVT sur le rat installé sur la table stéréotaxique sans nécessité de déplacement de l'animal, principale source de variation de l'angle d'entrée du laser dans l'œil.
- La voie rétrobulbaire (Chauhan et al. 2004) ou sous-conjonctivale chez le rat pourraient également être des voies intéressantes et moins lourdes à mettre en place comparé aux IVT. Notamment l'injection sous-conjonctivale de  $4.10^{-5}$  M d'ET-1 est associée à une diminution de la perfusion rétinienne à partir de 5 min après injection et jusqu'à 35 min après injection. En particulier la perfusion capillaire rétinienne est altérée jusqu'à plus de 60 min après injection alors que les vaisseaux de plus gros calibre ont retrouvé une perfusion normale (Masuzawa et al. 2006).

- Mesure du diamètre des vaisseaux réiniens :

La définition des images du fond d'œil prise avec la caméra CCD actuelle ne permet pas une mesure suffisamment précise du diamètre des artères réiniennes. Ainsi, il n'est pas possible de comparer les variations du signal LDF aux variations du diamètre artériel réinien lors d'inhalation d'O<sub>2</sub> pur. Cette comparaison constituerait une étape supplémentaire pour confirmer la validité d'une mesure et de corréler la variation du signal LDF avec celle du diamètre vasculaire.

- Evolution du prototype de fluxmètre laser Doppler :

Les données et limitations actuelles de l'appareil nous encouragent à faire évoluer notre prototype vers un vélocimètre laser Doppler bidirectionnel avec caméra de haute résolution (mesure absolue de la vitesse sanguine réinienne), en collaboration avec l'équipe du Pr Schmetterer (avec notamment René Werkmeister, Centre de physique médicale et de génie biomédical, Hôpital Universitaire de Vienne, Autriche).

**Conclusion**

De nombreuses hypothèses ont été soulevées et proposées pour tenter d'expliquer le lien entre le SAOS et les atteintes vasculaires rétiniennes et du nerf optique. Les données cliniques actuellement disponibles apportent peu de renseignements sur la physiopathologie de ces atteintes vasculaires. Chez le patient atteint de SAOS, la perfusion choroïdienne a été récemment étudiée à l'aide de la fluxmétrie laser Doppler (Khayati et al. 2011 ; Tonini et al. 2010) et cette étude a montré qu'en absence de comorbidités, la régulation vasculaire semblait conservée. Cela suggérait que l'HI isolée n'entraînait pas de modifications vasculaires importantes au niveau de la choroïde. A ce jour, les études expérimentales chez le rongeur soumis à l'HI, modèle animal mimant la composante hypoxique intermittente du SAOS, n'ont pas exploré l'impact de l'HI sur la vascularisation oculaire.

Nous avons montré au cours de ce travail de thèse que l'HI altérait de façon significative la régulation de l'AO du rat *in vitro*. Cette altération se caractérise par une augmentation de la vasoconstriction à ET-1 par le biais de son récepteur A, une diminution de la relaxation à l'Ach liée à une diminution de la biodisponibilité du NO, et associée à une altération de la balance vasoconstrictrice/vasodilatatrice des produits du CYP450. Ces altérations étaient associées à une augmentation des ions superoxyde au sein de l'AO, suggérant un rôle du stress oxydant. Ces résultats soulignent l'intérêt potentiel du système de l'endothéline et du stress oxydant comme cibles thérapeutiques. L'effet bénéfique du blocage de ces voies sur le plan thérapeutique mérite ainsi d'être exploré.

Nous avons également développé et validé un prototype de fluxmètre laser Doppler confocal permettant l'évaluation de la perfusion sanguine artérielle rétinienne chez le rat. Malgré les difficultés et limites liées à l'utilisation du rongeur, en partie liées aux contraintes anesthésiques (stabilité de l'œil, interaction avec les mécanismes de régulation vasculaire) ou liées à l'animal (anatomie des réseaux vasculaires de la tête du nerf optique), les travaux de validation de ce prototype nous encouragent à poursuivre le développement et le perfectionnement de cet outil. Au delà de l'étude de la régulation de la perfusion sanguine rétinienne chez le rat soumis à l'HI, ce prototype a sa place dans l'étude de nombreuses affections associées à des dysfonctions vasculaires oculaires ou systémiques, ou dans le développement de molécules ciblées sur la vascularisation oculaire. Ainsi des améliorations techniques du prototype (détection bidirectionnelle,

adjonction d'une caméra de haute résolution) sont prévues dans un avenir proche dans le cadre d'une collaboration européenne (France, Suisse, Autriche) dans le but de réaliser des mesures absolues du flux sanguin rétinien.

## **Bibliographie**

- Ainslie, P.N. & Poulin, M.J., 2004. Ventilatory, cerebrovascular, and cardiovascular interactions in acute hypoxia: regulation by carbon dioxide. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 97(1), pp.149–159.
- Alasil, T. et al., 2014. Correlation of retinal nerve fiber layer thickness and visual fields in glaucoma: a broken stick model. *American journal of ophthalmology*, 157(5), pp.953–959.
- Allahdadi, K.J., Cherng, T.W., et al., 2008. Endothelin type A receptor antagonist normalizes blood pressure in rats exposed to eucapnic intermittent hypoxia. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 295(1), pp.H434–40.
- Allahdadi, K.J., Duling, L.C., et al., 2008. Eucapnic intermittent hypoxia augments endothelin-1 vasoconstriction in rats: role of PKCdelta. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 294(2), pp.H920–7.
- Allahdadi, K.J., Walker, B.R. & Kanagy, N.L., 2005. Augmented endothelin vasoconstriction in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension*, 45(4), pp.705–709.
- Allahdadi, K.J., Walker, B.R. & Kanagy, N.L., 2007. ROK contribution to endothelin-mediated contraction in aorta and mesenteric arteries following intermittent hypoxia/hypercapnia in rats. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 293(5), pp.H2911–8.
- Alm, A. & Bill, A., 1973. Ocular and optic nerve blood flow at normal and increased intraocular pressures in monkeys (*Macaca irus*): a study with radioactively labelled microspheres including flow determinations in brain and some other tissues. *Experimental eye research*, 15(1), pp.15–29.
- Alm, A., Törnquist, P. & Stjernschantz, J., 1977. Radioactively labelled microspheres in regional ocular blood flow determinations. *Bibliotheca anatomica*, (16 Pt 2), pp.24–29.
- Alonso, D. & Radomski, M.W., 2003. The nitric oxide-endothelin-1 connection. *Heart failure reviews*, 8(1), pp.107–115.
- Altaf, Q. et al., 2013. Obstructive Sleep Apnea is associated with sight threatening retinopathy and predicts the development of proliferative retinopathy in patients with type 2 diabetes: a longitudinal analysis. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, 30(s1), pp.E1–E10.
- Alvarez, L. et al., 1992. Electrophysiological effects of atracurium and vecuronium on normal and denervated hearts. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia*, 6(3), pp.304–307.
- Aptel, F. et al., 2014. Association between glaucoma and sleep apnea in a large French multicenter prospective cohort. *Sleep medicine*, 15(5), pp.576–581.
- Aptel, F. et al., 2015a. Association of Nonarteritic Ischemic Optic Neuropathy With

- Obstructive Sleep Apnea Syndrome: Consequences for Obstructive Sleep Apnea Screening and Treatment. *JAMA ophthalmology*, 133(7), pp.797–804.
- Aptel, F. et al., 2015b. Relationship between nocturnal intraocular pressure variations and sleep macrostructure. *Investigative ophthalmology & visual science*, 56(11), pp.6899-905.
- Arcaro, G. et al., 2002. Insulin causes endothelial dysfunction in humans: sites and mechanisms. *Circulation*, 105(5), pp.576–582.
- Arda, H. et al., 2013. Obstructive sleep apnoea prevalence in non-arteritic anterior ischaemic optic neuropathy. *The British journal of ophthalmology*, 97(2), pp.206–209.
- Arnaud, C. et al., 2011. Inflammation contributes to the atherogenic role of intermittent hypoxia in apolipoprotein-E knock out mice. *Atherosclerosis*, 219(2), pp.425–431.
- Arzt, M. et al., 2006. Sleepiness and sleep in patients with both systolic heart failure and obstructive sleep apnea. *Archives of internal medicine*, 166(16), pp.1716–1722.
- Asrani, S. et al., 2000. Large diurnal fluctuations in intraocular pressure are an independent risk factor in patients with glaucoma. *Journal of glaucoma*, 9(2), pp.134–142.
- Atkins, E.J. et al., 2010. Treatment of nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy. *Survey of ophthalmology*, 55(1), pp.47–63.
- Baguet, J.-P. et al., 2005. The severity of oxygen desaturation is predictive of carotid wall thickening and plaque occurrence. *Chest*, 128(5), pp.3407–3412.
- Bajpai, A.K. et al., 2007. 15(S)-HETE production in human retinal microvascular endothelial cells by hypoxia: Novel role for MEK1 in 15(S)-HETE induced angiogenesis. *Investigative ophthalmology & visual science*, 48(11), pp.4930–4938.
- Banerjee, D. et al., 2013. The potential association between obstructive sleep apnea and diabetic retinopathy in severe obesity-the role of hypoxemia. R. Pasquali, ed. *PLoS one*, 8(11), p.e79521.
- Barceló, A. et al., 2000. Abnormal lipid peroxidation in patients with sleep apnoea. *The European respiratory journal*, 16(4), pp.644–647.
- Barceló, A. et al., 2006. Antioxidant status in patients with sleep apnoea and impact of continuous positive airway pressure treatment. *The European respiratory journal*, 27(4), pp.756–760.
- Bateman, G.A., 2009. Cerebral blood flow and hydrocephalus. *Journal of neurosurgery. Pediatrics*, 3(3), pp.244–author reply 245.
- Belaidi, E. et al., 2009. Major role for hypoxia inducible factor-1 and the endothelin system in promoting myocardial infarction and hypertension in an animal model of obstructive sleep apnea. *Journal of the American College of Cardiology*, 53(15),



pp.1309–1317.

- Bendel, R.E. et al., 2008. Prevalence of glaucoma in patients with obstructive sleep apnoea--a cross-sectional case-series. *Eye (London, England)*, 22(9), pp.1105–1109.
- Bengtsson, B. & Heijl, A., 2005. A long-term prospective study of risk factors for glaucomatous visual field loss in patients with ocular hypertension. *Journal of glaucoma*, 14(2), pp.135–138.
- Bergeron, C., Kimoff, J. & Hamid, Q., 2005. Obstructive sleep apnea syndrome and inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 116(6), pp.1393–1396.
- Bergua, A., 1995. [Nitroergic reactivity in endothelial cells of human uveal blood vessels]. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, 206(2), pp.115–121.
- Bilgin, G., 2014. Normal-tension glaucoma and obstructive sleep apnea syndrome: a prospective study. *BMC ophthalmology*, 14(1), p.27.
- Bilgin, G., Koban, Y. & Arnold, A.C., 2013. Nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy and obstructive sleep apnea. *Journal of neuro-ophthalmology : the official journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society*, 33(3), pp.232–234.
- Bitto, A. et al., 2010. Evidence for markers of hypoxia and apoptosis in explanted human carotid atherosclerotic plaques. *Journal of vascular surgery*, 52(4), pp.1015–1021.
- Blumen Ohana, E. et al., 2010. Primary open angle glaucoma and snoring: prevalence of OSAS. *European annals of otorhinolaryngology, head and neck diseases*, 127(5), pp.159–164.
- Boland, L.L. et al., 2004. Sleep-disordered breathing is not associated with the presence of retinal microvascular abnormalities: the Sleep Heart Health Study. *Sleep*, 27(3), pp.467–473.
- Bonner, R. & Nossal, R., 1981. Model for laser Doppler measurements of blood flow in tissue. *Applied optics*, 20(12), pp.2097–2107.
- Borel, A.-L. et al., 2010. High prevalence of obstructive sleep apnoea syndrome in a Type 1 diabetic adult population: a pilot study. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, 27(11), pp.1328–1329.
- Bouzas, E.A., Donati, G. & Pournaras, C.J., 1997. Distribution and regulation of the optic nerve head tissue PO<sub>2</sub>. *Survey of ophthalmology*, 42 Suppl 1, pp.S27–34.
- Braga, V.A., Soriano, R.N. & Machado, B.H., 2006. Sympathoexcitatory response to peripheral chemoreflex activation is enhanced in juvenile rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *Experimental physiology*, 91(6), pp.1025–1031.
- Brazis, P.W. & Lee, A.G., 1998. Elevated intracranial pressure and pseudotumor cerebri. *Current opinion in ophthalmology*, 9(6), pp.27–32.
- Brinchmann-Hansen, O. & Myhre, K., 1990. Vascular response of retinal arteries and

- veins to acute hypoxia of 8,000, 10,000, 12,500, and 15,000 feet of simulated altitude. *Aviation, space, and environmental medicine*, 61(2), pp.112–116.
- Brodie, F.L. et al., 2015. Obstructive sleep apnea and central serous chorioretinopathy. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 35(2), pp.238–243.
- Brzecka, A., 2007. Role of hypercapnia in brain oxygenation in sleep-disordered breathing. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 67(2), pp.197–206.
- Bucci, F.A. & Krohel, G.B., 1988. Optic nerve swelling secondary to the obstructive sleep apnea syndrome. *American journal of ophthalmology*, 105(4), pp.428–430.
- Buerk, D.G. & Riva, C.E., 1998. Vasomotion and spontaneous low-frequency oscillations in blood flow and nitric oxide in cat optic nerve head. *Microvascular research*, 55(1), pp.103–112.
- Buguet, A., Py, P. & Romanet, J.P., 1994. 24-hour (nyctohemeral) and sleep-related variations of intraocular pressure in healthy white individuals. *American journal of ophthalmology*, 117(3), pp.342–347.
- Buono, L.M. et al., 2002. Nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy. *Current opinion in ophthalmology*, 13(6), pp.357–361.
- Campbell, M.C. & Hughes, A., 1981. An analytic, gradient index schematic lens and eye for the rat which predicts aberrations for finite pupils. *Vision research*, 21(7), pp.1129–1148.
- Campbell, U.B. et al., 2015. Acute nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy and exposure to phosphodiesterase type 5 inhibitors. *The journal of sexual medicine*, 12(1), pp.139–151.
- Campbell, W.B. et al., 1996. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circulation research*, 78(3), pp.415–423.
- Campbell, W.B. et al., 2003. 11,12,15-Trihydroxyeicosatrienoic acid mediates ACh-induced relaxations in rabbit aorta. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 285(6), pp.H2648–56.
- Campbell, W.B. & Falck, J.R., 2007. Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Hypertension*, 49(3), pp.590–596.
- Campbell, W.B. & Fleming, I., 2010. Epoxyeicosatrienoic acids and endothelium-dependent responses. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 459(6), pp.881–895.
- Campbell, W.B. & Gauthier, K.M., 2013. Inducible endothelium-derived hyperpolarizing factor: role of the 15-lipoxygenase-EDHF pathway. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 61(3), pp.176–187.
- Carlson, J.T. et al., 1993. Augmented resting sympathetic activity in awake patients with obstructive sleep apnea. *Chest*, 103(6), pp.1763–1768.

- Carlson, J.T., Rångemark, C. & Hedner, J.A., 1996. Attenuated endothelium-dependent vascular relaxation in patients with sleep apnoea. *Journal of hypertension*, 14(5), pp.577–584.
- Carvajal, J.A. et al., 2000. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *Journal of cellular physiology*, 184(3), pp.409–420.
- Casas, P. et al., 2013. Retinal and optic nerve evaluation by optical coherence tomography in adults with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome (OSAHS). *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 251(6), pp.1625–1634.
- Cecconi, C. et al., 2000. New insights on myocardial pyridine nucleotides and thiol redox state in ischemia and reperfusion damage. *Cardiovascular research*, 47(3), pp.586–594.
- Chakravarthy, U. et al., 1995. Nitric oxide synthase activity and expression in retinal capillary endothelial cells and pericytes. *Current eye research*, 14(4), pp.285–294.
- Chauhan, B.C. et al., 2004. Model of endothelin-1-induced chronic optic neuropathy in rat. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(1), pp.144–152.
- Chauhan, S.D. et al., 2003. Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(3), pp.1426–1431.
- Chen, T. et al., 2013. The association between diabetes mellitus and nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy: a systematic review and meta-analysis. G. Malaga, ed. *PLoS one*, 8(9), p.e76653.
- Cheng, H. & Duong, T.Q., 2007. Simplified laser-speckle-imaging analysis method and its application to retinal blood flow imaging. *Optics letters*, 32(15), pp.2188–2190.
- Chew, S.K.H., Xie, J. & Wang, J.J., 2012. Retinal arteriolar diameter and the prevalence and incidence of hypertension: a systematic review and meta-analysis of their association. *Current hypertension reports*, 14(2), pp.144–151.
- Chou, K.-T. et al., 2012. Sleep apnea and risk of retinal vein occlusion: a nationwide population-based study of Taiwanese. *American journal of ophthalmology*, 154(1), pp.200–205.e1.
- Chrissobolis, S. et al., 2000. Role of inwardly rectifying K(+) channels in K(+)-induced cerebral vasodilatation in vivo. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 279(6), pp.H2704–12.
- Christou, K., et al., 2003a. Reactive oxygen metabolites (ROMs) as an index of oxidative stress in obstructive sleep apnea patients. *Sleep & breathing = Schlaf & Atmung*, 7(3), pp.105–110.
- Christou, K., et al., 2003b. Antioxidant capacity in obstructive sleep apnea patients. *Sleep medicine*, 4(3), pp.225–228.

- Cioffi, G.A. et al., 1995. An in vivo model of chronic optic nerve ischemia: the dose-dependent effects of endothelin-1 on the optic nerve microvasculature. *Current eye research*, 14(12), pp.1147–1153.
- Cohen, R.A. & Vanhoutte, P.M., 1995. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation*, 92(11), pp.3337–3349.
- Congdon, N. et al., 2004. Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 122(4), pp.477–485.
- Coulet, F. et al., 2003. Identification of hypoxia-response element in the human endothelial nitric-oxide synthase gene promoter. *The Journal of biological chemistry*, 278(47), pp.46230–46240.
- Crossland, R.F. et al., 2013. A new rodent model for obstructive sleep apnea: effects on ATP-mediated dilations in cerebral arteries. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 305(4), pp.R334–42.
- Daou, G.B. & Srivastava, A.K., 2004. Reactive oxygen species mediate Endothelin-1-induced activation of ERK1/2, PKB, and Pyk2 signaling, as well as protein synthesis, in vascular smooth muscle cells. *Free radical biology & medicine*, 37(2), pp.208–215.
- da Rosa, D.P. et al., 2015. Antioxidants inhibit the inflammatory and apoptotic processes in an intermittent hypoxia model of sleep apnea. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 64(1), pp.21–29.
- Dallinger, S. et al., 2000. Endothelin-1 contributes to hyperoxia-induced vasoconstriction in the human retina. *Investigative ophthalmology & visual science*, 41(3), pp.864–869.
- Daruich, A. et al., 2015. Central serous chorioretinopathy: Recent findings and new pathophysiology hypothesis. *Progress in retinal and eye research*, 48, pp.82–118.
- Davies, C.W. et al., 2000. Case-control study of 24 hour ambulatory blood pressure in patients with obstructive sleep apnoea and normal matched control subjects. *Thorax*, 55(9), pp.736–740.
- Davies, M.J., 1996. The contribution of thrombosis to the clinical expression of coronary atherosclerosis. *Thrombosis research*, 82(1), pp.1–32.
- Dawson, V.L. et al., 1991. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(14), pp.6368–6371.
- de Jong, E.K. et al., 2015. Chronic central serous chorioretinopathy is associated with genetic variants implicated in age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, 122(3), pp.562–570.
- Delaey, C. & Van De Voorde, J., 2000. Regulatory mechanisms in the retinal and choroidal circulation. *Ophthalmic research*, 32(6), pp.249–256.
- Dematteis, M. et al., 2009. Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing:

- contribution of animal models to understanding the human disease. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 50(3), pp.262–281.
- Deramo, V.A. et al., 2003. Ischemic optic neuropathy as the first manifestation of elevated cholesterol levels in young patients. *Ophthalmology*, 110(5), pp.1041–6–discussion 1046.
- Desai, D. et al., 2004. Hypoxia augments TNF-alpha-mediated endothelin-1 release and cell proliferation in human optic nerve head astrocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 318(3), pp.642–648.
- Ding, H.-L. et al., 2005. Inducible nitric oxide synthase contributes to intermittent hypoxia against ischemia/reperfusion injury. *Acta pharmacologica Sinica*, 26(3), pp.315–322.
- Dopp, J.M. et al., 2011. Xanthine oxidase inhibition attenuates endothelial dysfunction caused by chronic intermittent hypoxia in rats. *Respiration; international review of thoracic diseases*, 82(5), pp.458–467.
- D'Orléans-Juste, P. et al., 2002. Function of the endothelin(B) receptor in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Pharmacology & therapeutics*, 95(3), pp.221–238.
- Drager, L.F. et al., 2005. Early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 172(5), pp.613–618.
- Drager, L.F. et al., 2007. Effects of continuous positive airway pressure on early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 176(7), pp.706–712.
- Driessen, J.J. et al., 1987. Effects of two benzodiazepines and a benzodiazepine antagonist on neuromuscular blockade in the anaesthetized cat. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie*, 286(1), pp.58–70.
- Driessen, J.J. et al., 1985. Interaction of some benzodiazepines and their solvents with vecuronium in the in vivo rat sciatic nerve-tibialis anterior muscle preparation. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie*, 273(2), pp.277–288.
- Dumskyj, M.J. et al., 1996. Autoregulation in the human retinal circulation: assessment using isometric exercise, laser Doppler velocimetry, and computer-assisted image analysis. *Microvascular research*, 51(3), pp.378–392.
- Duranteau, J. et al., 1998. Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. *The Journal of biological chemistry*, 273(19), pp.11619–11624.
- Durgan, D.J. et al., 2015. Increased cerebrovascular sensitivity to endothelin-1 in a rat model of obstructive sleep apnea: a role for endothelin receptor B. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 35(3), pp.402–411.

- Dyugovskaya, L. et al., 2008. Delayed neutrophil apoptosis in patients with sleep apnea. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 177(5), pp.544–554.
- Dyugovskaya, L., Lavie, P. & Lavie, L., 2002. Increased adhesion molecules expression and production of reactive oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 165(7), pp.934–939.
- Dyugovskaya, L., Lavie, P. & Lavie, L., 2005. Lymphocyte activation as a possible measure of atherosclerotic risk in patients with sleep apnea. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1051(1), pp.340–350.
- Eckhart, A.D. et al., 1997. Characterization of the alpha1B-adrenergic receptor gene promoter region and hypoxia regulatory elements in vascular smooth muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(17), pp.9487–9492.
- Edwards, G. et al., 1998. K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature*, 396(6708), pp.269–272.
- Eltzschig, H.K. & Carmeliet, P., 2011. Hypoxia and inflammation. *The New England journal of medicine*, 364(7), pp.656–665.
- Eom, Y. et al., 2012. Systemic factors associated with central serous chorioretinopathy in Koreans. *Korean journal of ophthalmology : KJO*, 26(4), pp.260–264.
- Eperon, G., Johnson, M. & David, N.J., 1975. The effect of arterial PO<sub>2</sub> on relative retinal blood flow in monkeys. *Investigative ophthalmology*, 14(5), pp.342–352.
- Erdem, C.Z. et al., 2003. Doppler measurement of blood flow velocities in extraocular orbital vessels in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Journal of clinical ultrasound : JCU*, 31(5), pp.250–257.
- Eriksson, L.I. et al., 1992. Attenuated ventilatory response to hypoxaemia at vecuronium-induced partial neuromuscular block. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*, 36(7), pp.710–715.
- Eriksson, L.I., Sato, M. & Severinghaus, J.W., 1993. Effect of a vecuronium-induced partial neuromuscular block on hypoxic ventilatory response. *Anesthesiology*, 78(4), pp.693–699.
- Ernest, J.T., 1977. Optic disk oxygen tension. *Experimental eye research*, 24(3), pp.271–278.
- Fallon, T.J., Maxwell, D. & Kohner, E.M., 1985. Retinal vascular autoregulation in conditions of hyperoxia and hypoxia using the blue field entoptic phenomenon. *Ophthalmology*, 92(5), pp.701–705.
- Faraci, F.M. & Didion, S.P., 2004. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24(8), pp.1367–1373.
- Fike, C.D. et al., 1998. Chronic hypoxia decreases nitric oxide production and endothelial

- nitric oxide synthase in newborn pig lungs. *The American journal of physiology*, 274(4 Pt 1), pp.L517–26.
- Fleming, I. et al., 2001. The coronary endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) stimulates multiple signalling pathways and proliferation in vascular cells. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 442(4), pp.511–518.
- Fletcher, E.C., 2001. Invited review: Physiological consequences of intermittent hypoxia: systemic blood pressure. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 90(4), pp.1600–1605.
- Foster, G.D. et al., 2009. Obstructive sleep apnea among obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes care*, 32(6), pp.1017–1019.
- Fraser, C.L. et al., 2013. A prospective photographic study of the ocular fundus in obstructive sleep apnea. *Journal of neuro-ophthalmology : the official journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society*, 33(3), pp.241–246.
- French, J.F., Rapoport, R.M. & Matlib, M.A., 1989. Possible mechanism of benzodiazepine-induced relaxation of vascular smooth muscle. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 14(3), pp.405–411.
- Friedman, J.K. et al., 2014. Intermittent hypoxia-induced increases in reactive oxygen species activate NFATc3 increasing endothelin-1 vasoconstrictor reactivity. *Vascular pharmacology*, 60(1), pp.17–24.
- Furchgott, R.F. & Zawadzki, J.V., 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789), pp.373–376.
- Furukawa, S. et al., 2013. Nocturnal intermittent hypoxia as an associated risk factor for microalbuminuria in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 169(2), pp.239–246.
- Gaisl, T., Bratton D.J. & Kohler M., 2015. The Impact of Obstructive Sleep Apnoea on the Aorta. *The European respiratory journal* 46(2),pp. 532–544. Web.
- Garland, C.J., Hiley, C.R. & Dora, K.A., 2011. EDHF: spreading the influence of the endothelium. *British journal of pharmacology*, 164(3), pp.839–852.
- Garpestad, E. et al., 1994. Decrease in ventricular stroke volume at apnea termination is independent of oxygen desaturation. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 77(4), pp.1602–1608.
- Gatzka, C.D. & Schmieder, R.E., 1995. Improved classification of dippers by individualized analysis of ambulatory blood pressure profiles. *American journal of hypertension*, 8(7), pp.666–671.
- Gebremedhin, D. et al., 1992. Mechanism of action of cerebral epoxyeicosatrienoic acids on cerebral arterial smooth muscle. *The American journal of physiology*, 263(2 Pt 2), pp.H519–25.

- Gebremedhin, D. et al., 1998. Cat cerebral arterial smooth muscle cells express cytochrome P450 4A2 enzyme and produce the vasoconstrictor 20-HETE which enhances L-type Ca<sup>2+</sup> current. *The Journal of physiology*, 507 ( Pt 3)(Pt 3), pp.771–781.
- Geiser, M.H., Diermann, U. & Riva, C.E., 1999. Compact laser Doppler choroidal flowmeter. *Journal of biomedical optics*, 4(4), pp.459–464.
- Geyer, O. et al., 2003. The prevalence of glaucoma in patients with sleep apnea syndrome: same as in the general population. *American journal of ophthalmology*, 136(6), pp.1093–1096.
- Gilmartin, G.S. et al., 2010. Chronic intermittent hypoxia in humans during 28 nights results in blood pressure elevation and increased muscle sympathetic nerve activity. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 299(3), pp.H925–31.
- Girkin, C.A. et al., 2006. Is there an association between pre-existing sleep apnoea and the development of glaucoma? *The British journal of ophthalmology*, 90(6), pp.679–681.
- Gjørup, P.H. et al., 2007. Abnormally increased endothelin-1 in plasma during the night in obstructive sleep apnea: relation to blood pressure and severity of disease. *American journal of hypertension*, 20(1), pp.44–52.
- Glacet-Bernard, A. et al., 2010. Obstructive sleep apnea among patients with retinal vein occlusion. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 128(12), pp.1533–1538.
- Gloire, G., Legrand-Poels, S. & Piette, J., 2006. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochemical pharmacology*, 72(11), pp.1493–1505.
- Gordon, M.O. et al., 2002. The Ocular Hypertension Treatment Study: baseline factors that predict the onset of primary open-angle glaucoma. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 120(6), pp.714–20– discussion 829–30.
- Görlach, C., Benyó, Z. & Wahl, M., 1998. Endothelin-1-induced contraction in cerebral vessels mediated by phospholipase C/protein kinase C cascade. *Kidney international. Supplement*, 67, pp.S224–5.
- Gottlieb, D.J. et al., 2010. Prospective study of obstructive sleep apnea and incident coronary heart disease and heart failure: the sleep heart health study. *Circulation*, 122(4), pp.352–360.
- Govetto, A. et al., 2014. Bilateral and simultaneous central retinal vein occlusion in a patient with obstructive sleep apnea syndrome. *Case reports in ophthalmology*, 5(2), pp.150–156.
- Greenberg, H. et al., 2006. Chronic intermittent hypoxia activates nuclear factor-kappaB in cardiovascular tissues in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*, 343(2), pp.591–596.



- Grimpen, F. et al., 2000. Endothelin-1 plasma levels are not elevated in patients with obstructive sleep apnoea. *The European respiratory journal*, 15(2), pp.320–325.
- Gruber, A. et al., 2006. Obstructive sleep apnoea is independently associated with the metabolic syndrome but not insulin resistance state. *Cardiovascular diabetology*, 5(1), p.22.
- Gursoy, S. et al., 2011. Investigation of the cardiac effects of pancuronium, rocuronium, vecuronium, and mivacurium on the isolated rat atrium. *Current therapeutic research, clinical and experimental*, 72(5), pp.195–203.
- Gursoy, S. et al., 2009. Investigation of the relaxant effects of pancuronium, rocuronium, vecuronium and mivacurium on rat thoracic aorta. *European journal of anaesthesiology*, 26(2), pp.155–159.
- Gutiérrez-Díaz, E. et al., 2012. Evaluation of the visual function in obstructive sleep apnea syndrome patients and normal-tension glaucoma by means of the multifocal visual evoked potentials. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 250(11), pp.1681–1688.
- Haefliger, I.O., Flammer, J. & Lüscher, T.F., 1992. Nitric oxide and endothelin-1 are important regulators of human ophthalmic artery. *Investigative ophthalmology & visual science*, 33(7), pp.2340–2343.
- Haefliger, I.O., Zschauer, A. & Anderson, D.R., 1994. Relaxation of retinal pericyte contractile tone through the nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. *Investigative ophthalmology & visual science*, 35(3), pp.991–997.
- Hamer, J. et al., 1977. Influence of systemic and cerebral vascular factors on the cerebrospinal fluid pulse waves. *Journal of neurosurgery*, 46(1), pp.36–45.
- Hansson, G.K., 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *The New England journal of medicine*, 352(16), pp.1685–1695.
- Harder, D.R. et al., 1997. Cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid as intracellular signaling molecules in vascular tissue. *Journal of vascular research*, 34(3), pp.237–243.
- Harino, S. et al., 1995. Rebreathing into a bag increases human retinal macular blood velocity. *The British journal of ophthalmology*, 79(4), pp.380–383.
- Harris, A. et al., 1998. Regulation of retinal and optic nerve blood flow. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 116(11), pp.1491–1495.
- Harris, A. et al., 1996. Retinal blood flow during dynamic exercise. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 234(7), pp.440–444.
- Hayreh, S.S., 1977. Optic disc edema in raised intracranial pressure. V. Pathogenesis. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 95(9), pp.1553–1565.

- Hayreh, S.S., 1999. Role of nocturnal arterial hypotension in the development of ocular manifestations of systemic arterial hypertension. *Current opinion in ophthalmology*, 10(6), pp.474–482.
- Hayreh, S.S. & Zimmerman, M.B., 2008. Nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy: natural history of visual outcome. *Ophthalmology*, 115(2), pp.298–305.e2.
- Hayreh, S.S. et al., 1997. Nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy: role of nocturnal arterial hypotension. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 115(7), pp.942–945.
- Hayreh, S.S. et al., 1994. Systemic diseases associated with nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy. *American journal of ophthalmology*, 118(6), pp.766–780.
- Hayreh, S.S., Jonas, J.B. & Zimmerman, M.B., 2007. Nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy and tobacco smoking. *Ophthalmology*, 114(4), pp.804–809.
- Hayreh, S.S., Podhajsky, P.A. & Zimmerman, B., 2001. Ipsilateral recurrence of nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy. *American journal of ophthalmology*, 132(5), pp.734–742.
- Hein, T.W. et al., 2009. Functional and molecular characterization of the endothelin system in retinal arterioles. *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(7), pp.3329–3336.
- Hétu, S. et al., 2013. Assessment of retinal and choroidal blood flow changes using laser Doppler flowmetry in rats. *Current eye research*, 38(1), pp.158–167.
- Hirota, K. & Semenza, G.L., 2006. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Critical reviews in oncology/hematology*, 59(1), pp.15–26.
- Hoffmann, A., Gloe, T. & Pohl, U., 2001. Hypoxia-induced upregulation of eNOS gene expression is redox-sensitive: a comparison between hypoxia and inhibitors of cell metabolism. *Journal of cellular physiology*, 188(1), pp.33–44.
- Hollenberg, S.M. et al., 1994. Eicosanoid production by human aortic endothelial cells in response to endothelin. *The American journal of physiology*, 267(6 Pt 2), pp.H2290–6.
- Hudgel, D.W., Hendricks, C. & Dadley, A., 1988. Alteration in obstructive apnea pattern induced by changes in oxygen- and carbon-dioxide-inspired concentrations. *The American review of respiratory disease*, 138(1), pp.16–19.
- Huseyinoglu, N. et al., 2014. Optic disc and retinal nerve fiber layer parameters as indicators of neurodegenerative brain changes in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep & breathing = Schlaf & Atmung*, 18(1), pp.95–102.
- Iester, M. et al., 2007. Retinal blood flow autoregulation after dynamic exercise in healthy young subjects. *Ophthalmologica. Journal internationale d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift für Augenheilkunde*, 221(3), pp.180–185.

- Igarashi, A. et al., 2002. Vecuronium directly inhibits hypoxic neurotransmission of the rat carotid body. *Anesthesia and analgesia*, 94(1), pp.117–22– table of contents.
- Ignarro, L.J. et al., 1988. Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 244(1), pp.181–189.
- Ihling, C. et al., 2001. Coexpression of endothelin-converting enzyme-1 and endothelin-1 in different stages of human atherosclerosis. *Circulation*, 104(8), pp.864–869.
- Imadojemu, V.A. et al., 2002. Obstructive apnea during sleep is associated with peripheral vasoconstriction. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 165(1), pp.61–66.
- Imadojemu, V.A. et al., 2007. Sympathetic chemoreflex responses in obstructive sleep apnea and effects of continuous positive airway pressure therapy. *Chest*, 131(5), pp.1406–1413.
- Ip, M.S. et al., 2000. Circulating nitric oxide is suppressed in obstructive sleep apnea and is reversed by nasal continuous positive airway pressure. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 162(6), pp.2166–2171.
- Ip, M.S.M. et al., 2004. Endothelial function in obstructive sleep apnea and response to treatment. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 169(3), pp.348–353.
- Ip, M.S.M. et al., 2002. Obstructive sleep apnea is independently associated with insulin resistance. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 165(5), pp.670–676.
- Ishii, K., Kano, T. & Ando, J., 1983. Pharmacological effects of flurazepam and diazepam on isolated canine arteries. *Japanese journal of pharmacology*, 33(1), pp.65–71.
- Ito, I. et al., 2007. Characteristics of myogenic tone in the rat ophthalmic artery. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 292(1), pp.H360–8.
- Ivy, D. et al., 2001. Endothelin B receptor deficiency potentiates ET-1 and hypoxic pulmonary vasoconstriction. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 280(5), pp.L1040–8.
- Izumi, N. et al., 2008. Role of nitric oxide in regulation of retinal blood flow in response to hyperoxia in cats. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(10), pp.4595–4603.
- Jablonski, M.M. et al., 2007. Age-related decline in VIP-positive parasympathetic nerve fibers in the human submacular choroid. *Investigative ophthalmology & visual science*, 48(2), pp.479–485.
- Jacobson, D.M., Vierkant, R.A. & Belongia, E.A., 1997. Nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy. A case-control study of potential risk factors. *Archives of ophthalmology*

(Chicago, Ill. : 1960), 115(11), pp.1403–1407.

- Jarajapu, Y.P.R., Grant, M.B. & Knot, H.J., 2004. Myogenic tone and reactivity of the rat ophthalmic artery. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(1), pp.253–259.
- Jean-Louis, S., Lovasik, J.V. & Kergoat, H., 2005. Systemic hyperoxia and retinal vasomotor responses. *Investigative ophthalmology & visual science*, 46(5), pp.1714–1720.
- Jelic, S. et al., 2008. Inflammation, oxidative stress, and repair capacity of the vascular endothelium in obstructive sleep apnea. *Circulation*, 117(17), pp.2270–2278.
- Jennum, P. & Børgeesen, S.E., 1989. Intracranial pressure and obstructive sleep apnea. *Chest*, 95(2), pp.279–283.
- Jeppesen, P. et al., 2007. Response of retinal arteriole diameter to increased blood pressure during acute hyperglycaemia. *Acta ophthalmologica Scandinavica*, 85(3), pp.280–286.
- Jeremy, J.Y. et al., 1999. Nitric oxide and the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular research*, 43(3), pp.580–594.
- Jin, X. et al., 2011. New molecular mechanisms for cardiovascular disease: contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the regulation of vasoconstriction in peripheral resistance arteries. *Journal of pharmacological sciences*, 116(4), pp.332–336.
- Johnson, E.C. & Morrison, J.C., 2009. Friend or foe? Resolving the impact of glial responses in glaucoma. *Journal of glaucoma*, 18(5), pp.341–353.
- Johnson, L.N. et al., 1998. The role of weight loss and acetazolamide in the treatment of idiopathic intracranial hypertension (pseudotumor cerebri). *Ophthalmology*, 105(12), pp.2313–2317.
- Jung, F. et al., 2000. Hypoxic regulation of inducible nitric oxide synthase via hypoxia inducible factor-1 in cardiac myocytes. *Circulation research*, 86(3), pp.319–325.
- Kadyan, A. et al., 2010. Ocular findings in sleep apnoea patients using continuous positive airway pressure. *Eye (London, England)*, 24(5), pp.843–850.
- Kanagy, N.L., Walker, B.R. & Nelin, L.D., 2001. Role of endothelin in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension*, 37(2 Pt 2), pp.511–515.
- Kanai, H. et al., 2012. [Prevalence of sleep-disordered breathing in patients with retinal vein occlusion]. *Nippon Ganka Gakkai zasshi*, 116(2), pp.81–85.
- Karakucuk, S. et al., 2008. Ocular blood flow in patients with obstructive sleep apnea syndrome (OSAS). *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 246(1), pp.129–134.
- Kargi, S.H. et al., 2005. Retinal nerve fibre layer measurements are reduced in patients

- with obstructive sleep apnoea syndrome. *Eye (London, England)*, 19(5), pp.575–579.
- Kato, M. et al., 2000. Impairment of endothelium-dependent vasodilation of resistance vessels in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation*, 102(21), pp.2607–2610.
- Kawasaki, A., Purvin, V.A. & Burgett, R.A., 1999. Hyperhomocysteinaemia in young patients with non-arteritic anterior ischaemic optic neuropathy. *The British journal of ophthalmology*, 83(11), pp.1287–1290.
- Känel, von, R. & Dimsdale, J.E., 2003. Hemostatic alterations in patients with obstructive sleep apnea and the implications for cardiovascular disease. *Chest*, 124(5), pp.1956–1967.
- Kent, B.D. et al., 2014. Sleep apnoea severity independently predicts glycaemic health in nondiabetic subjects: the ESADA study. *The European respiratory journal*, 44(1), pp.130–139.
- Kety, S.S. & Schmidt, C.F., 1948. THE EFFECTS OF ALTERED ARTERIAL TENSIONS OF CARBON DIOXIDE AND OXYGEN ON CEREBRAL BLOOD FLOW AND CEREBRAL OXYGEN CONSUMPTION OF NORMAL YOUNG MEN. *The Journal of clinical investigation*, 27(4), pp.484–492.
- Khan, Z. et al., 2013. 10-Year Framingham risk in patients with retinal vein occlusion: a systematic review and meta-analysis. *Canadian journal of ophthalmology. Journal canadien d'ophtalmologie*, 48(1), pp.40–45.e1.
- Khayy, H. et al., 2011. Choroidal blood flow regulation after posture change or isometric exercise in men with obstructive sleep apnea syndrome. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(13), pp.9489–9496.
- Kiekens, S. et al., 2008. Continuous positive airway pressure therapy is associated with an increase in intraocular pressure in obstructive sleep apnea. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(3), pp.934–940.
- Kiel, J.W., 1999. Modulation of choroidal autoregulation in the rabbit. *Experimental eye research*, 69(4), pp.413–429.
- Killer, H.E., Jaggi, G.P. & Miller, N.R., 2009. Papilledema revisited: is its pathophysiology really understood? *Clinical & experimental ophthalmology*, 37(5), pp.444–447.
- Kim, J.-A. et al., 2006. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation*, 113(15), pp.1888–1904.
- Kimura, H., 2014. Production and physiological effects of hydrogen sulfide. *Antioxidants & redox signaling*, 20(5), pp.783–793.
- Kiss, B. et al., 2002. Retinal blood flow during hyperoxia in humans revisited: concerted results using different measurement techniques. *Microvascular research*, 64(1), pp.75–85.

- Kita, H. et al., 1998. The nocturnal secretion of cardiac natriuretic peptides during obstructive sleep apnoea and its response to therapy with nasal continuous positive airway pressure. *Journal of sleep research*, 7(3), pp.199–207.
- Kloos, P., Laube, I. & Thoelen, A., 2008. Obstructive sleep apnea in patients with central serous chorioretinopathy. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 246(9), pp.1225–1228.
- Kohan, D.E. et al., 2011. Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. *Physiological reviews*, 91(1), pp.1–77.
- Kono, M. et al., 2007. Obstructive sleep apnea syndrome is associated with some components of metabolic syndrome. *Chest*, 131(5), pp.1387–1392.
- Korn, J.H. et al., 2004. Digital ulcers in systemic sclerosis: prevention by treatment with bosentan, an oral endothelin receptor antagonist. *Arthritis and rheumatism*, 50(12), pp.3985–3993.
- Kosseifi, S. et al., 2010. The association between obstructive sleep apnea syndrome and microvascular complications in well-controlled diabetic patients. *Military medicine*, 175(11), pp.913–916.
- Krause, B.J. et al., 2015. Arginase-endothelial nitric oxide synthase imbalance contributes to endothelial dysfunction during chronic intermittent hypoxia. *Journal of hypertension*, 33(3), pp.515–24– discussion 524.
- Kremmer, S. et al., 2003. Obstructive sleep apnea syndrome, normal tension glaucoma, and nCPAP therapy--a short note. *Sleep*, 26(2), pp.161–162.
- Krishnamoorthy, R.R. et al., 2008. Role of the ETB receptor in retinal ganglion cell death in glaucoma. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 86(6), pp.380–393.
- Laaban, J.-P. et al., 2009. Prevalence and predictive factors of sleep apnoea syndrome in type 2 diabetic patients. *Diabetes & metabolism*, 35(5), pp.372–377.
- Lacharme, T. et al., 2014. Twenty-four-hour rhythm of ocular perfusion pressure in non-arteritic anterior ischaemic optic neuropathy. *Acta ophthalmologica*, 92(5), pp.e346–52.
- Lam, B.L. et al., 2007. Risk of non-arteritic anterior ischaemic optic neuropathy (NAION) after cataract extraction in the fellow eye of patients with prior unilateral NAION. *The British journal of ophthalmology*, 91(5), pp.585–587.
- Lam, J.C.M. et al., 2006. Obstructive sleep apnea and the metabolic syndrome in community-based Chinese adults in Hong Kong. *Respiratory medicine*, 100(6), pp.980–987.
- Landau, K. et al., 1996. 24-hour blood pressure monitoring in patients with anterior ischemic optic neuropathy. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 114(5), pp.570–575.
- Langhans, M., Michelson, G. & Groh, M.J., 1997. Effect of breathing 100% oxygen on

- retinal and optic nerve head capillary blood flow in smokers and non-smokers. *The British journal of ophthalmology*, 81(5), pp.365–369.
- Lattimore, J.L. et al., 2006. Treatment of obstructive sleep apnoea leads to improved microvascular endothelial function in the systemic circulation. *Thorax*, 61(6), pp.491–495.
- Lau, K.C. et al., 1994. NADPH-diaphorase neurons in the retina of the hamster. *The Journal of comparative neurology*, 350(4), pp.550–558.
- Lavery, G.G. et al., 1986. The effect of atracurium, vecuronium and pancuronium on heart rate and arterial pressure in normal individuals. *European journal of anaesthesiology*, 3(6), pp.459–467.
- Lavie, L., Vishnevsky, A. & Lavie, P., 2004. Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. *Sleep*, 27(1), pp.123–128.
- Le Cras, T.D. et al., 1996. Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung. *The American journal of physiology*, 270(1 Pt 1), pp.L164–70.
- Leahy, M.J. et al., 1999. Principles and practice of the laser-Doppler perfusion technique. *Technology and health care : official journal of the European Society for Engineering and Medicine*, 7(2-3), pp.143–162.
- Lee, M.S. et al., 2011. Incidence of nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy: increased risk among diabetic patients. *Ophthalmology*, 118(5), pp.959–963.
- Lee, V.W. & Mok, K.H., 1999. Retinal nerve fiber layer measurement by nerve fiber analyzer in normal subjects and patients with glaucoma. *Ophthalmology*, 106(5), pp.1006–1008.
- Lefebvre, B. et al., 2006. Functional assessment of vascular reactivity after chronic intermittent hypoxia in the rat. *Respiratory physiology & neurobiology*, 150(2-3), pp.278–286.
- Leong, W.B. et al., 2015. Effect of obstructive sleep apnoea on diabetic retinopathy and maculopathy: a systematic review and meta-analysis. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, pp.n/a–n/a.
- Leroux les Jardins, G. et al., 2009. [Retinal vein occlusion and obstructive sleep apnea syndrome]. *Journal français d'ophtalmologie*, 32(6), pp.420–424.
- Leske, M.C. et al., 2003. Factors for glaucoma progression and the effect of treatment: the early manifest glaucoma trial. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 121(1), pp.48–56.
- Leveque, T.K. et al., 2007. Central serous chorioretinopathy and risk for obstructive sleep apnea. *Sleep & breathing = Schlaf & Atmung*, 11(4), pp.253–257.
- Lévy, P. et al., 2009. Obstructive sleep apnea and atherosclerosis. *Progress in*

- cardiovascular diseases*, 51(5), pp.400–410.
- Li, Jian et al., 2007a. Non-arteritic anterior ischaemic optic neuropathy and presumed sleep apnoea syndrome screened by the Sleep Apnea scale of the Sleep Disorders Questionnaire (SA-SDQ). *The British journal of ophthalmology*, 91(11), pp.1524–1527.
- Li, Jianguo et al., 2006. Altered metabolic responses to intermittent hypoxia in mice with partial deficiency of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Physiological genomics*, 25(3), pp.450–457.
- Li, Jianguo et al., 2007b. Hyperlipidemia and lipid peroxidation are dependent on the severity of chronic intermittent hypoxia. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 102(2), pp.557–563.
- Li, Jianguo et al., 2005. Intermittent hypoxia induces hyperlipidemia in lean mice. *Circulation research*, 97(7), pp.698–706.
- Li, Richard C et al., 2004. Nitric oxide synthase and intermittent hypoxia-induced spatial learning deficits in the rat. *Neurobiology of disease*, 17(1), pp.44–53.
- Li, Yingxia et al., 2009. Blood flow magnetic resonance imaging of retinal degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(4), pp.1824–1830.
- Li, Yingxia, Cheng, H. & Duong, T.Q., 2008. Blood-flow magnetic resonance imaging of the retina. *NeuroImage*, 39(4), pp.1744–1751.
- Liao, J.K. et al., 1995. Regulation of bovine endothelial constitutive nitric oxide synthase by oxygen. *The Journal of clinical investigation*, 96(6), pp.2661–2666.
- Libby, P., 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420(6917), pp.868–874.
- Liew, G. et al., 2007. Measurement of retinal vascular caliber: issues and alternatives to using the arteriole to venule ratio. *Investigative ophthalmology & visual science*, 48(1), pp.52–57.
- Lin, C.-C. et al., 2013. Obstructive sleep apnea and increased risk of glaucoma: a population-based matched-cohort study. *Ophthalmology*, 120(8), pp.1559–1564.
- Lin, P.-W., Friedman, M., Lin, H.-C., Chang, H.-W., Wilson, M., et al., 2011a. Normal tension glaucoma in patients with obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome. *Journal of glaucoma*, 20(9), pp.553–558.
- Lin, P.-W., Friedman, M., Lin, H.-C., Chang, H.-W., Pulver, T.M., et al., 2011b. Decreased retinal nerve fiber layer thickness in patients with obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 249(4), pp.585–593.
- Linsenmeier, R.A. & Braun, R.D., 1992. Oxygen distribution and consumption in the cat retina during normoxia and hypoxemia. *The Journal of general physiology*, 99(2),



pp.177–197.

- Linsenmeier, R.A., Mines, A.H. & Steinberg, R.H., 1983. Effects of hypoxia and hypercapnia on the light peak and electroretinogram of the cat. *Investigative ophthalmology & visual science*, 24(1), pp.37–46.
- Liu, Y., Tipoe, G.L. & Fung, M.L., 2014. Melatonin attenuates intermittent hypoxia-induced lipid peroxidation and local inflammation in rat adrenal medulla. *International journal of molecular sciences*, 15(10), pp.18437–18452.
- Lovett, J.K. & Rothwell, P.M., 2003. Site of carotid plaque ulceration in relation to direction of blood flow: an angiographic and pathological study. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)*, 16(4), pp.369–375.
- Luksch, A. et al., 2002. Effect of inhalation of different mixtures of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> on retinal blood flow. *The British journal of ophthalmology*, 86(10), pp.1143–1147.
- Luksch, A. et al., 2000. Effects of systemic NO synthase inhibition on choroidal and optic nerve head blood flow in healthy subjects. *Investigative ophthalmology & visual science*, 41(10), pp.3080–3084.
- Luksch, A. et al., 2006. ETA-receptor blockade, but not ACE inhibition, blunts retinal vessel response during isometric exercise. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 290(4), pp.H1693–8.
- Luksch, A. et al., 2003. Role of NO in choroidal blood flow regulation during isometric exercise in healthy humans. *Investigative ophthalmology & visual science*, 44(2), pp.734–739.
- Lundmark, P.O., Trope, G.E. & Flanagan, J.G., 2003. The effect of simulated obstructive apnoea on intraocular pressure and pulsatile ocular blood flow in healthy young adults. *The British journal of ophthalmology*, 87(11), pp.1363–1369.
- Lusina, S.-J.C. et al., 2006. Long-term intermittent hypoxia increases sympathetic activity and chemosensitivity during acute hypoxia in humans. *The Journal of physiology*, 575(Pt 3), pp.961–970.
- Lusis, A.J., 2000. Atherosclerosis. *Nature*, 407(6801), pp.233–241.
- Mäepea, O., 1992. Pressures in the anterior ciliary arteries, choroidal veins and choriocapillaris. *Experimental eye research*, 54(5), pp.731–736.
- Magder, S.A., Lichtenstein, S. & Adelman, A.G., 1983. Effect of negative pleural pressure on left ventricular hemodynamics. *The American journal of cardiology*, 52(5), pp.588–593.
- Manalo, D.J. et al., 2005. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*, 105(2), pp.659–669.
- Manicam, C. et al., 2014. Mechanisms of endothelium-dependent vasodilation in the ophthalmic artery of mice. In *American Research in Vision and Ophthalmology*.

- Manin, G. et al., 2015. Obstructive sleep apnoea in people with Type 1 diabetes: prevalence and association with micro- and macrovascular complications. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, 32(1), pp.90–96.
- Marcus, D.M. et al., 2001. Sleep disorders: a risk factor for normal-tension glaucoma? *Journal of glaucoma*, 10(3), pp.177–183.
- Marin, J.M. et al., 2005. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet (London, England)*, 365(9464), pp.1046–1053.
- Marrone, O. et al., 1993. Catecholamines and blood pressure in obstructive sleep apnea syndrome. *Chest*, 103(3), pp.722–727.
- Martens, F.M.A.C. et al., 2006. TNF-alpha induces endothelial dysfunction in diabetic adults, an effect reversible by the PPAR-gamma agonist pioglitazone. *European heart journal*, 27(13), pp.1605–1609.
- Masaki, T., Vane, J.R. & Vanhoutte, P.M., 1994. International Union of Pharmacology nomenclature of endothelin receptors. *Pharmacological reviews*, 46(2), pp.137–142.
- Mason, R.H. et al., 2012a. High prevalence of sleep disordered breathing in patients with diabetic macular edema. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 32(9), pp.1791–1798.
- Mason, R.H. et al., 2012b. Visual improvement following continuous positive airway pressure therapy in diabetic subjects with clinically significant macular oedema and obstructive sleep apnoea: proof of principle study. *Respiration; international review of thoracic diseases*, 84(4), pp.275–282.
- Masuzawa, K. et al., 2006. A model of retinal ischemia-reperfusion injury in rats by subconjunctival injection of endothelin-1. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 231(6), pp.1085–1089.
- Matoba, T. et al., 2000. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *The Journal of clinical investigation*, 106(12), pp.1521–1530.
- Matoba, T. et al., 2002. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. *Biochemical and biophysical research communications*, 290(3), pp.909–913.
- McCarron, J.G. & Halpern, W., 1990. Potassium dilates rat cerebral arteries by two independent mechanisms. *The American journal of physiology*, 259(3 Pt 2), pp.H902–8.
- McNeish, A.J., Dora, K.A. & Garland, C.J., 2005. Possible role for K<sup>+</sup> in endothelium-derived hyperpolarizing factor-linked dilatation in rat middle cerebral artery. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 36(7), pp.1526–1532.
- Mehra, R. et al., 2006. Soluble interleukin 6 receptor: A novel marker of moderate to severe sleep-related breathing disorder. *Archives of internal medicine*, 166(16), pp.1725–1731.

- Mehta, S. et al., Sleep disordered breathing in patients of type 2 diabetes mellitus with and without retinopathy.
- Mentek, M. et al., 2015. Compact Laser Doppler Flowmeter (LDF) Fundus Camera for the Assessment of Retinal Blood Perfusion in Small Animals. U. Sen, ed. *PloS one*, 10(7), p.e0134378.
- Merritt, S.P. et al., Sleep disordered breathing, a causative factor in the development of severe diabetic retinopathy? In British Thoracic Society Winter Meeting.
- Meslier, N. et al., 2003. Impaired glucose-insulin metabolism in males with obstructive sleep apnoea syndrome. *The European respiratory journal*, 22(1), pp.156–160.
- Miki, A. et al., 2014. Common variants in the complement factor H gene confer genetic susceptibility to central serous chorioretinopathy. *Ophthalmology*, 121(5), pp.1067–1072.
- Minoguchi, K. et al., 2004. Elevated production of tumor necrosis factor-alpha by monocytes in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Chest*, 126(5), pp.1473–1479.
- Minoguchi, K. et al., 2005. Increased carotid intima-media thickness and serum inflammatory markers in obstructive sleep apnea. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 172(5), pp.625–630.
- Moghimi, S. et al., 2013. Retinal nerve fiber thickness is reduced in sleep apnea syndrome. *Sleep medicine*, 14(1), pp.53–57.
- Mohammed, A. & Abdelnabi, J.A., 2012. Evaluation of anesthesia and reproductive performance upon diazepam and xylazine injection in rats. *Animal Science Papers ....*
- Mojon, D.S. et al., 2002. Association between sleep apnea syndrome and nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 120(5), pp.601–605.
- Mojon, D.S. et al., 2002. Normal-tension glaucoma is associated with sleep apnea syndrome. *Ophthalmologica. Journal internationale d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift für Augenheilkunde*, 216(3), pp.180–184.
- Mojon, D.S. et al., 2000. Primary open-angle glaucoma is associated with sleep apnea syndrome. *Ophthalmologica. Journal internationale d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift für Augenheilkunde*, 214(2), pp.115–118.
- Mojon, D.S. et al., 1999. High prevalence of glaucoma in patients with sleep apnea syndrome. *Ophthalmology*, 106(5), pp.1009–1012.
- Mojon, D.S. et al., 1998. Optic neuropathy associated with sleep apnea syndrome. *Ophthalmology*, 105(5), pp.874–877.
- Monneret, D. et al., 2010. Association of urinary 15-F2t-isoprostane level with oxygen desaturation and carotid intima-media thickness in nonobese sleep apnea patients.

- Free radical biology & medicine*, 48(4), pp.619–625.
- Morrison, J.C. et al., 1999. Microvasculature of the rat optic nerve head. *Investigative ophthalmology & visual science*, 40(8), pp.1702–1709.
- Movaffaghy, A. et al., 1998. Blood flow in the human optic nerve head during isometric exercise. *Experimental eye research*, 67(5), pp.561–568.
- Muniesa, M. et al., 2014. Floppy eyelid syndrome as an indicator of the presence of glaucoma in patients with obstructive sleep apnea. *Journal of glaucoma*, 23(1), pp.e81–5.
- Muniyappa, R. et al., 2007. Cardiovascular actions of insulin. *Endocrine reviews*, 28(5), pp.463–491.
- Murphy, J.A., Archibald, M.L. & Chauhan, B.C., 2010. The role of endothelin-1 and its receptors in optic nerve head astrocyte proliferation. *The British journal of ophthalmology*, 94(9), pp.1233–1238.
- Møller, D.S. et al., 2003. Abnormal vasoactive hormones and 24-hour blood pressure in obstructive sleep apnea. *American journal of hypertension*, 16(4), pp.274–280.
- Nagao, T., Illiano, S. & Vanhoutte, P.M., 1992. Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to NG-nitro-L-arginine in rats. *The American journal of physiology*, 263(4 Pt 2), pp.H1090–4.
- Nair, G. et al., 2011. MRI reveals differential regulation of retinal and choroidal blood volumes in rat retina. *NeuroImage*, 54(2), pp.1063–1069.
- Nair, G. et al., 2011. Effects of common anesthetics on eye movement and electroretinogram. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*, 122(3), pp.163–176.
- Narkiewicz, K. et al., 1998. Contribution of tonic chemoreflex activation to sympathetic activity and blood pressure in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation*, 97(10), pp.943–945.
- Nathoo, N.A., Etminan, M. & Mikelberg, F.S., 2015. Association between phosphodiesterase-5 inhibitors and nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy. *Journal of neuro-ophthalmology : the official journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society*, 35(1), pp.12–15.
- Nácher, M. et al., 2007. Recurrent obstructive apneas trigger early systemic inflammation in a rat model of sleep apnea. *Respiratory physiology & neurobiology*, 155(1), pp.93–96.
- Nelli, S. et al., 2003. Evaluation of potassium ion as the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in the bovine coronary artery. *British journal of pharmacology*, 139(5), pp.982–988.
- Newman, A.B. et al., 2001. Relation of sleep-disordered breathing to cardiovascular disease risk factors: the Sleep Heart Health Study. *American journal of epidemiology*,

154(1), pp.50–59.

- Nguyen, L.T., Taravella, M.J. & Pelak, V.S., 2006. Determining whether delayed nonarteritic ischemic optic neuropathy associated with cataract extraction is a true entity. *Journal of cataract and refractive surgery*, 32(12), pp.2105–2109.
- Nieto, F.J. et al., 2000. Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. Sleep Heart Health Study. *JAMA*, 283(14), pp.1829–1836.
- Nieto, F.J. et al., 2004. Sleep apnea and markers of vascular endothelial function in a large community sample of older adults. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 169(3), pp.354–360.
- Ninomiya, H. & Kuno, H., 2001. Microvasculature of the rat eye: scanning electron microscopy of vascular corrosion casts. *Veterinary ophthalmology*, 4(1), pp.55–59.
- Nishimura, A. et al., 2015. Relationship between sleep disordered breathing and diabetic retinopathy: Analysis of 136 patients with diabetes. *Diabetes research and clinical practice*, 109(2), pp.306–311.
- Noël, C. et al., 2001. Twenty-four-hour time course of intraocular pressure in healthy and glaucomatous Africans: relation to sleep patterns. *Ophthalmology*, 108(1), pp.139–144.
- Nowak, M.S. et al., 2011. Pulsatile ocular blood flow in subjects with sleep apnoea syndrome. *Archives of medical science : AMS*, 7(2), pp.332–336.
- O'Brien, M., 2012. The reciprocal relationship between inflammation and coagulation. *Topics in companion animal medicine*, 27(2), pp.46–52.
- O'Connor, G.T. et al., 2009. Prospective study of sleep-disordered breathing and hypertension: the Sleep Heart Health Study. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 179(12), pp.1159–1164.
- O'Mahoney, P.R.A., Wong, D.T. & Ray, J.G., 2008. Retinal vein occlusion and traditional risk factors for atherosclerosis. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 126(5), pp.692–699.
- Oberg, P.A., 1990. Laser-Doppler flowmetry. *Critical reviews in biomedical engineering*, 18(2), pp.125–163.
- Ohga, E. et al., 2003. Effects of obstructive sleep apnea on circulating ICAM-1, IL-8, and MCP-1. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 94(1), pp.179–184.
- Ohga, E. et al., 1999. Increased levels of circulating ICAM-1, VCAM-1, and L-selectin in obstructive sleep apnea syndrome. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 87(1), pp.10–14.
- Olson, K.R., 2015. Hydrogen sulfide as an oxygen sensor. *Antioxidants & redox signaling*, 22(5), pp.377–397.

- Onen, S.H. et al., 2000. High prevalence of sleep-disordered breathing in patients with primary open-angle glaucoma. *Acta ophthalmologica Scandinavica*, 78(6), pp.638–641.
- Orgül, S. et al., 1996. An endothelin-1-induced model of chronic optic nerve ischemia in rhesus monkeys. *Journal of glaucoma*, 5(2), pp.135–138.
- Palmer, R.M., Ferrige, A.G. & Moncada, S., 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327(6122), pp.524–526.
- Palmer, R.M. et al., 1988. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochemical and biophysical research communications*, 153(3), pp.1251–1256.
- Palombi, K. et al., 2006. Non-arteritic anterior ischaemic optic neuropathy is nearly systematically associated with obstructive sleep apnoea. *The British journal of ophthalmology*, 90(7), pp.879–882.
- Parish, J.M. & Shepard, J.W., 1990. Cardiovascular effects of sleep disorders. *Chest*, 97(5), pp.1220–1226.
- Peng, Y.-J. et al., 2006. Heterozygous HIF-1alpha deficiency impairs carotid body-mediated systemic responses and reactive oxygen species generation in mice exposed to intermittent hypoxia. *The Journal of physiology*, 577(Pt 2), pp.705–716.
- Peppard, P.E. et al., 2013. Increased prevalence of sleep-disordered breathing in adults. *American journal of epidemiology*, 177(9), pp.1006–1014.
- Peppard, P.E. et al., 2000. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *The New England journal of medicine*, 342(19), pp.1378–1384.
- Peter, L. et al., 2007. Prevalence of papilloedema in patients with sleep apnoea syndrome: a prospective study. *Journal of sleep research*, 16(3), pp.313–318.
- Peters, J., Kindred, M.K. & Robotham, J.L., 1988. Transient analysis of cardiopulmonary interactions. II. Systolic events. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 64(4), pp.1518–1526.
- Pépin, J.-L. et al., 2010. Frequent loss of nyctohemeral rhythm of intraocular pressure restored by nCPAP treatment in patients with severe apnea. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 128(10), pp.1257–1263.
- Philippi, N.R. et al., 2010. Time course of intermittent hypoxia-induced impairments in resistance artery structure and function. *Respiratory physiology & neurobiology*, 170(2), pp.157–163.
- Phillips, B.G. et al., 1999. Effects of obstructive sleep apnea on endothelin-1 and blood pressure. *Journal of hypertension*, 17(1), pp.61–66.
- Phillips, S.A. et al., 2004. Chronic intermittent hypoxia impairs endothelium-dependent

- dilation in rat cerebral and skeletal muscle resistance arteries. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 286(1), pp.H388–93.
- Pianka, P. et al., 2000. Hyperhomocystinemia in patients with nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy, central retinal artery occlusion, and central retinal vein occlusion. *Ophthalmology*, 107(8), pp.1588–1592.
- Pillunat, L.E. et al., 1997. Autoregulation of human optic nerve head circulation in response to increased intraocular pressure. *Experimental eye research*, 64(5), pp.737–744.
- Pinet, F., 2004. [What is the role of endothelin system?]. *Médecine sciences : M/S*, 20(3), pp.339–345.
- Polak, K. et al., 2001. Effect of endothelin and BQ123 on ocular blood flow parameters in healthy subjects. *Investigative ophthalmology & visual science*, 42(12), pp.2949–2956.
- Polak, K. et al., 2003. Regulation of human retinal blood flow by endothelin-1. *Experimental eye research*, 76(5), pp.633–640.
- Pomeranz, H.D. & Bhavsar, A.R., 2005. Nonarteritic ischemic optic neuropathy developing soon after use of sildenafil (viagra): a report of seven new cases. *Journal of neuro-ophthalmology : the official journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society*, 25(1), pp.9–13.
- Poulain, L. et al., 2014. Visceral white fat remodelling contributes to intermittent hypoxia-induced atherogenesis. *The European respiratory journal*, 43(2), pp.513–522.
- Poulain, L. et al., 2015. Toll-like receptor-4 mediated inflammation is involved in the cardiometabolic alterations induced by intermittent hypoxia. *Mediators of inflammation*, 2015(10), pp.620258–9.
- Pournaras, C.J. et al., 1992. [Regulation of papillary pO<sub>2</sub>]. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, 200(5), pp.517–518.
- Prabhakar, N.R. & Kumar, G.K., 2010. Mechanisms of sympathetic activation and blood pressure elevation by intermittent hypoxia. *Respiratory physiology & neurobiology*, 174(1-2), pp.156–161.
- Prasanna, G. et al., 2002. Human optic nerve head astrocytes as a target for endothelin-1. *Investigative ophthalmology & visual science*, 43(8), pp.2704–2713.
- Prasanna, G. et al., 1998. Regulation of endothelin-1 in human non-pigmented ciliary epithelial cells by tumor necrosis factor-alpha. *Experimental eye research*, 66(1), pp.9–18.
- Punjabi, N.M. et al., 2004. Sleep-disordered breathing, glucose intolerance, and insulin resistance: the Sleep Heart Health Study. *American journal of epidemiology*, 160(6), pp.521–530.

- Purvin, V.A., Kawasaki, A. & Yee, R.D., 2000. Papilledema and obstructive sleep apnea syndrome. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 118(12), pp.1626–1630.
- Quigley, H.A., 1996. Number of people with glaucoma worldwide. *The British journal of ophthalmology*, 80(5), pp.389–393.
- Quigley, H.A. et al., 1992. An evaluation of optic disc and nerve fiber layer examinations in monitoring progression of early glaucoma damage. *Ophthalmology*, 99(1), pp.19–28.
- Quigley, H.A., Dunkelberger, G.R. & Green, W.R., 1989. Retinal ganglion cell atrophy correlated with automated perimetry in human eyes with glaucoma. *American journal of ophthalmology*, 107(5), pp.453–464.
- Quinn, A.G. et al., 2008. Obstructive sleep apnea syndrome with bilateral papilledema and vision loss in a 3-year-old child. *Journal of AAPOS : the official publication of the American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus / American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus*, 12(2), pp.197–199.
- Ramond, A. et al., 2013. Oxidative stress mediates cardiac infarction aggravation induced by intermittent hypoxia. *Fundamental & clinical pharmacology*, 27(3), pp.252–261.
- Rapp, L.M., Tolman, B.L. & Dhindsa, H.S., 1990. Separate mechanisms for retinal damage by ultraviolet-A and mid-visible light. *Investigative ophthalmology & visual science*, 31(6), pp.1186–1190.
- Rehak, M. & Wiedemann, P., 2010. Retinal vein thrombosis: pathogenesis and management. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 8(9), pp.1886–1894.
- Reichmuth, K.J. et al., 2005. Association of sleep apnea and type II diabetes: a population-based study. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 172(12), pp.1590–1595.
- Resch, H. et al., 2009. Effect of dual endothelin receptor blockade on ocular blood flow in patients with glaucoma and healthy subjects. *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(1), pp.358–363.
- Resnikoff, S. et al., 2004. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bulletin of the World Health Organization*, 82(11), pp.844–851.
- Ripodas, A. et al., 2001. Localisation of endothelin-1 mRNA expression and immunoreactivity in the retina and optic nerve from human and porcine eye. Evidence for endothelin-1 expression in astrocytes. *Brain research*, 912(2), pp.137–143.
- Riva, C., Ross, B. & Benedek, G.B., 1972. Laser Doppler measurements of blood flow in capillary tubes and retinal arteries. *Investigative ophthalmology*, 11(11), pp.936–944.
- Riva, C.E., 1998. Noninvasive measurement of oxygen tension in the optic nerve head. *Current opinion in ophthalmology*, 9(2), pp.56–60.



- Riva, C.E. et al., 1997. Autoregulation of human optic nerve head blood flow in response to acute changes in ocular perfusion pressure. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 235(10), pp.618–626.
- Riva, C.E., Grunwald, J.E. & Petrig, B.L., 1986. Autoregulation of human retinal blood flow. An investigation with laser Doppler velocimetry. *Investigative ophthalmology & visual science*, 27(12), pp.1706–1712.
- Riva, C.E., Grunwald, J.E. & Sinclair, S.H., 1983. Laser Doppler Velocimetry study of the effect of pure oxygen breathing on retinal blood flow. *Investigative ophthalmology & visual science*, 24(1), pp.47–51.
- Roche, F. et al., 2009. Obstructive sleep apnoea/hypopnea influences high-density lipoprotein cholesterol in the elderly. *Sleep medicine*, 10(8), pp.882–886.
- Rogers, S. et al., 2010. The prevalence of retinal vein occlusion: pooled data from population studies from the United States, Europe, Asia, and Australia. *Ophthalmology*, 117(2), pp.313–9.e1.
- Ronksley, P.E. et al., 2009. Obstructive sleep apnoea is associated with diabetes in sleepy subjects. *Thorax*, 64(10), pp.834–839.
- Rubin, L.J. et al., 2002. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine*, 346(12), pp.896–903.
- Rudrappa, S., Warren, G. & Idris, I., 2012. Obstructive sleep apnoea is associated with the development and progression of diabetic retinopathy, independent of conventional risk factors and novel biomarkers for diabetic retinopathy. *The British journal of ophthalmology*, 96(12), pp.1535–1535.
- Ryan, S., Taylor, C.T. & McNicholas, W.T., 2006. Predictors of elevated nuclear factor-kappaB-dependent genes in obstructive sleep apnea syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 174(7), pp.824–830.
- Ryan, S., Taylor, C.T. & McNicholas, W.T., 2005. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation*, 112(17), pp.2660–2667.
- Sagiv, O. et al., 2014. Retinal nerve fibre layer thickness measurements by optical coherence tomography in patients with sleep apnoea syndrome. *Clinical & experimental ophthalmology*, 42(2), pp.132–138.
- Sai, Y. et al., 1998. Comparison of the effects of pancuronium and vecuronium in canine coronary and renal arteries. *Anesthesiology*, 88(1), pp.165–171.
- Sakagami, K. et al., 2001. Nitric oxide/cGMP-induced inhibition of calcium and chloride currents in retinal pericytes. *Microvascular research*, 62(2), pp.196–203.
- Sandoval, Y.-H.G. et al., 2014. Endothelin-1 signaling in vascular physiology and pathophysiology. *Current vascular pharmacology*, 12(2), pp.202–214.

- Sandow, S.L. & Hill, C.E., 2000. Incidence of myoendothelial gap junctions in the proximal and distal mesenteric arteries of the rat is suggestive of a role in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses. *Circulation research*, 86(3), pp.341–346.
- Sandow, S.L. et al., 2002. Involvement of myoendothelial gap junctions in the actions of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circulation research*, 90(10), pp.1108–1113.
- Sang, D.N. & D'Amore, P.A., 2008. Is blockade of vascular endothelial growth factor beneficial for all types of diabetic retinopathy? *Diabetologia*, 51(9), pp.1570–1573.
- Sasanabe, R. et al., 2006. Metabolic syndrome in Japanese patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*, 29(5), pp.315–322.
- Savransky, V. et al., 2007. Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 175(12), pp.1290–1297.
- Schiffrin, E.L., 2005. Vascular endothelin in hypertension. *Vascular pharmacology*, 43(1), pp.19–29.
- Shimokawa, H., 2010. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 459(6), pp.915–922.
- Shirotani, M. et al., 1991. U-61,431F, a stable prostacyclin analogue, inhibits the proliferation of bovine vascular smooth muscle cells with little antiproliferative effect on endothelial cells. *Prostaglandins*, 41(2), pp.97–110.
- Schmetterer, L. et al., 1997. Effects of endothelin-1 (ET-1) on ocular hemodynamics. *Current eye research*, 16(7), pp.687–692.
- Schmittgen, T.D. & Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols*, 3(6), pp.1101–1108.
- Schober, A.-K., Neurath, M.F. & Harsch, I.A., 2011. Prevalence of sleep apnoea in diabetic patients. *The clinical respiratory journal*, 5(3), pp.165–172.
- Schofield, C.J. & Ratcliffe, P.J., 2004. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(5), pp.343–354.
- Schubert, C. et al., 2014. Cadherin 5 is regulated by corticosteroids and associated with central serous chorioretinopathy. *Human mutation*, 35(7), pp.859–867.
- Schulz, R., Mahmoudi, S., et al., 2000a. Enhanced release of superoxide from polymorphonuclear neutrophils in obstructive sleep apnea. Impact of continuous positive airway pressure therapy. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 162(2 Pt 1), pp.566–570.
- Schulz, R., Schmidt, D., et al., 2000b. Decreased plasma levels of nitric oxide derivatives in obstructive sleep apnoea: response to CPAP therapy. *Thorax*, 55(12), pp.1046–1051.

- Sebastian, R.T., Johns, S. & Gibson, R.A., 2006. Treating obstructive sleep apnoea syndrome: does it improve visual field changes? *Eye (London, England)*, 20(1), pp.118–120.
- Sergi, M. et al., 2007. Prevalence of normal tension glaucoma in obstructive sleep apnea syndrome patients. *Journal of glaucoma*, 16(1), pp.42–46.
- Shankar, A. et al., 2013. Sleep-disordered breathing and retinal microvascular diameter. *Atherosclerosis*, 226(1), pp.124–128.
- Sharrett, A.R. et al., 1999. Retinal arteriolar diameters and elevated blood pressure: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *American journal of epidemiology*, 150(3), pp.263–270.
- Shiba, T. et al., 2014. Relationship between severity of obstructive sleep apnea syndrome and retinal nerve fiber layer thickness. *American journal of ophthalmology*, 157(6), pp.1202–1208.
- Shiba, T., Sato, Y. & Takahashi, M., 2009. Relationship between diabetic retinopathy and sleep-disordered breathing. *American journal of ophthalmology*, 147(6), pp.1017–1021.
- Shiba, T. et al., 2010. Nocturnal intermittent serious hypoxia and reoxygenation in proliferative diabetic retinopathy cases. *American journal of ophthalmology*, 149(6), pp.959–963.
- Shiells, R. & Falk, G., 1992. Retinal on-bipolar cells contain a nitric oxide-sensitive guanylate cyclase. *Neuroreport*, 3(10), pp.845–848.
- Smith, M.L. et al., 1996. Role of hypoxemia in sleep apnea-induced sympathoexcitation. *Journal of the autonomic nervous system*, 56(3), pp.184–190.
- Snow, J.B. et al., 2008. Differential effects of chronic hypoxia and intermittent hypocapnic and eucapnic hypoxia on pulmonary vasoreactivity. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 104(1), pp.110–118.
- Snow, J.B. et al., 2011. Role for PKC $\beta$  in enhanced endothelin-1-induced pulmonary vasoconstrictor reactivity following intermittent hypoxia. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 301(5), pp.L745–54.
- Solh, El, A.A. et al., 2007. Endothelial cell apoptosis in obstructive sleep apnea: a link to endothelial dysfunction. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 175(11), pp.1186–1191.
- Somers, V.K. et al., 1995. Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep apnea. *The Journal of clinical investigation*, 96(4), pp.1897–1904.
- Spieker, L.E. et al., 2001. Endothelin receptor antagonists in congestive heart failure: a new therapeutic principle for the future? *Journal of the American College of Cardiology*, 37(6), pp.1493–1505.

- Stary, H.C. et al., 1995. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 92(5), pp.1355–1374.
- Stefánsson, E. et al., 1999. Optic nerve oxygen tension in pigs and the effect of carbonic anhydrase inhibitors. *Investigative ophthalmology & visual science*, 40(11), pp.2756–2761.
- Stein, J.D. et al., 2011. The association between glaucomatous and other causes of optic neuropathy and sleep apnea. *American journal of ophthalmology*, 152(6), pp.989–998.e3.
- Steinberg, H.O. & Baron, A.D., 2002. Vascular function, insulin resistance and fatty acids. *Diabetologia*, 45(5), pp.623–634.
- Stitt, A.W. et al., 1996. Endothelin-like immunoreactivity and receptor binding in the choroid and retina. *Current eye research*, 15(1), pp.111–117.
- Stokely, M.E., Brady, S.T. & Yorio, T., 2002. Effects of endothelin-1 on components of anterograde axonal transport in optic nerve. *Investigative ophthalmology & visual science*, 43(10), pp.3223–3230.
- Strenn, K. et al., 1997. Reproducibility and sensitivity of scanning laser Doppler flowmetry during graded changes in PO<sub>2</sub>. *The British journal of ophthalmology*, 81(5), pp.360–364.
- Sugita, Y. et al., 1985. Marked episodic elevation of cerebrospinal fluid pressure during nocturnal sleep in patients with sleep apnea hypersomnia syndrome. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 60(3), pp.214–219.
- Sugiyama, K. et al., 1999. Optic nerve and peripapillary choroidal microvasculature of the rat eye. *Investigative ophthalmology & visual science*, 40(13), pp.3084–3090.
- Sugiyama, T. et al., 2000. Effect of nitric oxide synthase inhibitor on optic nerve head circulation in conscious rabbits. *Investigative ophthalmology & visual science*, 41(5), pp.1149–1152.
- Sullivan, C.E. et al., 1981. Reversal of obstructive sleep apnoea by continuous positive airway pressure applied through the nares. *Lancet (London, England)*, 1(8225), pp.862–865.
- Sun, C.W. et al., 1998. Nitric oxide-20-hydroxyeicosatetraenoic acid interaction in the regulation of K<sup>+</sup> channel activity and vascular tone in renal arterioles. *Circulation research*, 83(11), pp.1069–1079.
- Suzuki, M. et al., 2005. Digital recording and analysis of esophageal pressure for patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Sleep & breathing = Schlaf & Atmung*, 9(2), pp.64–72.
- Tahawi, Z. et al., 2001. Altered vascular reactivity in arterioles of chronic intermittent

- hypoxic rats. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 90(5), pp.2007–13– discussion 2000.
- Takagi, C. et al., 1996. Endothelin-1 action via endothelin receptors is a primary mechanism modulating retinal circulatory response to hyperoxia. *Investigative ophthalmology & visual science*, 37(10), pp.2099–2109.
- Takemoto, M. et al., 2002. Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 106(1), pp.57–62.
- Tamisier, R. et al., 2011. 14 nights of intermittent hypoxia elevate daytime blood pressure and sympathetic activity in healthy humans. *The European respiratory journal*, 37(1), pp.119–128.
- Tamura, A. et al., 2008. Relationship between the severity of obstructive sleep apnea and impaired glucose metabolism in patients with obstructive sleep apnea. *Respiratory medicine*, 102(10), pp.1412–1416.
- Tang, G., Wu, L. & Wang, R., 2010. Interaction of hydrogen sulfide with ion channels. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 37(7), pp.753–763.
- Tang, X. et al., 2003. Interleukin-13 upregulates vasodilatory 15-lipoxygenase eicosanoids in rabbit aorta. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 23(10), pp.1768–1774.
- Tang, X. et al., 2008. Age-related decrease in 15-lipoxygenase contributes to reduced vasorelaxation in rabbit aorta. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 294(2), pp.H679–87.
- Taniguchi, T. et al., 2006. Endothelin-1 impairs retrograde axonal transport and leads to axonal injury in rat optic nerve. *Current neurovascular research*, 3(2), pp.81–88.
- Tassone, F. et al., 2003. Obstructive sleep apnoea syndrome impairs insulin sensitivity independently of anthropometric variables. *Clinical endocrinology*, 59(3), pp.374–379.
- Tatsumi, K. et al., 2005. Sleep oxygen desaturation and circulating leptin in obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Chest*, 127(3), pp.716–721.
- Taylor, C.T. & Cummins, E.P., 2009. The role of NF-kappaB in hypoxia-induced gene expression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1177(1), pp.178–184.
- Tewari, H.K. et al., 2006. Sympathetic-parasympathetic activity and reactivity in central serous chorioretinopathy: a case-control study. *Investigative ophthalmology & visual science*, 47(8), pp.3474–3478.
- Tezel, G. & Wax, M.B., 2004. Hypoxia-inducible factor 1alpha in the glaucomatous retina and optic nerve head. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 122(9), pp.1348–1356.
- Tezel, G. et al., 2001. TNF-alpha and TNF-alpha receptor-1 in the retina of normal and glaucomatous eyes. *Investigative ophthalmology & visual science*, 42(8), pp.1787–

1794.

- Tezel, G., Luo, C. & Yang, X., 2007. Accelerated aging in glaucoma: immunohistochemical assessment of advanced glycation end products in the human retina and optic nerve head. *Investigative ophthalmology & visual science*, 48(3), pp.1201–1211.
- The Ischemic Optic Neuropathy Decompression Trial Research Group, 1996. Characteristics of patients with nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy eligible for the Ischemic Optic Neuropathy Decompression Trial. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 114(11), pp.1366–1374.
- The Ischemic Optic Neuropathy Decompression Trial Research Group,, 1995. Optic nerve decompression surgery for nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy (NAION) is not effective and may be harmful. The Ischemic Optic Neuropathy Decompression Trial Research Group. *JAMA*, 273(8), pp.625–632.
- Thompson, L.P. et al., 2000. Chronic hypoxia increases the NO contribution of acetylcholine vasodilation of the fetal guinea pig heart. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 279(5), pp.R1813–20.
- Tittl, M.K. et al., 1999. Systemic findings associated with central serous chorioretinopathy. *American journal of ophthalmology*, 128(1), pp.63–68.
- Tonini, M. et al., 2010. Choroidal blood-flow responses to hyperoxia and hypercapnia in men with obstructive sleep apnea. *Sleep*, 33(6), pp.811–818.
- Toporsian, M. et al., 2000. Downregulation of endothelial nitric oxide synthase in rat aorta after prolonged hypoxia in vivo. *Circulation research*, 86(6), pp.671–675.
- Trobe, J.D., 2011. Papilledema: the vexing issues. *Journal of neuro-ophthalmology : the official journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society*, 31(2), pp.175–186.
- Troncoso Brindeiro, C.M. et al., 2007. Reactive oxygen species contribute to sleep apnea-induced hypertension in rats. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 293(5), pp.H2971–6.
- Tsang, C.S.L. et al., 2006. Moderate to severe obstructive sleep apnoea patients is associated with a higher incidence of visual field defect. *Eye (London, England)*, 20(1), pp.38–42.
- Tsujikawa, A. et al., 2000. Reproducibility of scanning laser Doppler flowmetry in the rat retina and optic nervehead. *Japanese journal of ophthalmology*, 44(3), pp.257–262.
- Turati, M. et al., 2009. Bilateral central retina vein occlusion associated with obesity-hypoventilation syndrome (pickwickian syndrome). *Retinal cases & brief reports*, 3(2), pp.140–143.
- Turmel, J. et al., 2009. Relationship between atherosclerosis and the sleep apnea syndrome: an intravascular ultrasound study. *International journal of cardiology*,

132(2), pp.203–209.

- Unver, Y.B. et al., 2009. A Putative Relation between Obstructive Sleep Apnea and Diabetic Macular Edema Associated with Optic Nerve Fiber Layer Infarcts. *The Open Sleep Journal*, 2(1), pp.11–19.
- van Uden, P., Kenneth, N.S. & Rocha, S., 2008. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. *The Biochemical journal*, 412(3), pp.477–484.
- Wallace, A.M. et al., 2001. Plasma leptin and the risk of cardiovascular disease in the west of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS). *Circulation*, 104(25), pp.3052–3056.
- Wang, X. et al., 2009. Increase in endothelin B receptor expression in optic nerve astrocytes in endothelin-1 induced chronic experimental optic neuropathy. *Experimental eye research*, 88(3), pp.378–385.
- Wang, Y. et al., 1992. Endothelin rapidly stimulates mitogen-activated protein kinase activity in rat mesangial cells. *The Biochemical journal*, 287 ( Pt 2)(Pt 2), pp.589–594.
- Weatherwax, Kevin J et al. “Obstructive Sleep Apnea in Epilepsy Patients: the Sleep Apnea Scale of the Sleep Disorders Questionnaire (SA-SDQ) Is a Useful Screening Instrument for Obstructive Sleep Apnea in a Disease-Specific Population.” *Sleep medicine* 4.6 (2003): 517–521. Print.
- Weaver, T.E., 2013. Don't start celebrating--CPAP adherence remains a problem. *Journal of clinical sleep medicine : JCSM : official publication of the American Academy of Sleep Medicine*, 9(6), pp.551–552.
- Webster, B.R. et al., 2013. Phosphoinositide-dependent kinase-1 and protein kinase Cδ contribute to endothelin-1 constriction and elevated blood pressure in intermittent hypoxia. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 344(1), pp.68–76.
- Weenink, A.C., Borsje, R.A. & Oosterhuis, J.A., 2001. Familial chronic central serous chorioretinopathy. *Ophthalmologica. Journal internationale d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift für Augenheilkunde*, 215(3), pp.183–187.
- Weger, M. et al., 2001. Hyperhomocyst(e)inaemia, but not MTHFR C677T mutation, as a risk factor for non-arteritic ischaemic optic neuropathy. *The British journal of ophthalmology*, 85(7), pp.803–806.
- Weigert, G. et al., 2005. Effects of moderate changes in intraocular pressure on ocular hemodynamics in patients with primary open-angle glaucoma and healthy controls. *Ophthalmology*, 112(8), pp.1337–1342.
- Weinreb, R.N. & Khaw, P.T., 2004. Primary open-angle glaucoma. *Lancet (London, England)*, 363(9422), pp.1711–1720.
- West, S.D. et al., 2010. The prevalence of retinopathy in men with Type 2 diabetes and

- obstructive sleep apnoea. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, 27(4), pp.423–430.
- West, S.D., Nicoll, D.J. & Stradling, J.R., 2006. Prevalence of obstructive sleep apnoea in men with type 2 diabetes. *Thorax*, 61(11), pp.945–950.
- Wollensak, G., Schaefer, H.E. & Ihling, C., 1998. An immunohistochemical study of endothelin-1 in the human eye. *Current eye research*, 17(5), pp.541–545.
- Wong, T.Y. et al., 2003. Retinal vessel diameters and their associations with age and blood pressure. *Investigative ophthalmology & visual science*, 44(11), pp.4644–4650.
- Wu, X. et al., 1998. Acceleration of myosin light chain dephosphorylation and relaxation of smooth muscle by telokin. Synergism with cyclic nucleotide-activated kinase. *The Journal of biological chemistry*, 273(18), pp.11362–11369.
- Xu, B. et al., 2004. Role of protein kinase C isoforms in the regulation of interleukin-13-induced 15-lipoxygenase gene expression in human monocytes. *The Journal of biological chemistry*, 279(16), pp.15954–15960.
- Yamashita, K. et al., 2001. Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia. Contributions of hypoxia-inducible factor-1, activator protein-1, GATA-2, AND p300/CBP. *The Journal of biological chemistry*, 276(16), pp.12645–12653.
- Yang, J. et al., 2005. Mathematical modeling of the nitric oxide/cGMP pathway in the vascular smooth muscle cell. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 289(2), pp.H886–97.
- Yau, J.W.Y. et al., 2012. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes care*, 35(3), pp.556–564.
- Young, T. et al., 2009. Burden of sleep apnea: rationale, design, and major findings of the Wisconsin Sleep Cohort study. *WMJ : official publication of the State Medical Society of Wisconsin*, 108(5), pp.246–249.
- Young, T., Peppard, P.E. & Gottlieb, D.J., 2002. Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 165(9), pp.1217–1239.
- Yuan, G. et al., 2005. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase-dependent activation of hypoxia inducible factor 1 transcriptional activity in cells subjected to intermittent hypoxia. *The Journal of biological chemistry*, 280(6), pp.4321–4328.
- Yuan, G. et al., 2008. Induction of HIF-1 $\alpha$  expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca<sup>2+</sup> signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR. *Journal of cellular physiology*, 217(3), pp.674–685.
- Yuan, L. & Neufeld, A.H., 2000. Tumor necrosis factor- $\alpha$ : a potentially neurodestructive cytokine produced by glia in the human glaucomatous optic nerve head. *Glia*, 32(1), pp.42–50.
- Yuan, X., Guo, X., et al., 2015a. Chronic intermittent hypoxia-induced neuronal apoptosis



in the hippocampus is attenuated by telmisartan through suppression of iNOS/NO and inhibition of lipid peroxidation and inflammatory responses. *Brain research*, 1596, pp.48–57.

Yuan, X., Zhu, D., et al., 2015b. Telmisartan attenuates myocardial apoptosis induced by chronic intermittent hypoxia in rats: modulation of nitric oxide metabolism and inflammatory mediators. *Sleep & breathing = Schlaf & Atmung*, 19(2), pp.703–709.

Zamarrón-Sanz, C. et al., 2006. Plasma levels of vascular endothelial markers in obstructive sleep apnea. *Archives of medical research*, 37(4), pp.552–555.

Zheng, Y., He, M. & Congdon, N., 2012. The worldwide epidemic of diabetic retinopathy. *Indian journal of ophthalmology*, 60(5), pp.428–431.

Zhou, J.Q. et al., 2013. The 10-year incidence and risk factors of retinal vein occlusion: the Beijing eye study. *Ophthalmology*, 120(4), pp.803–808.

Zhu, D. et al., 2003. Chronic hypoxia activates lung 15-lipoxygenase, which catalyzes production of 15-HETE and enhances constriction in neonatal rabbit pulmonary arteries. *Circulation research*, 92(9), pp.992–1000.

Zhu, Y., Park, T.S. & Gidday, J.M., 1998. Mechanisms of hyperoxia-induced reductions in retinal blood flow in newborn pig. *Experimental eye research*, 67(3), pp.357–369.

Zou, M.-H., 2007. Peroxynitrite and protein tyrosine nitration of prostacyclin synthase. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 82(1-4), pp.119–127.

## RESUME

### **Impact de l'hypoxie intermittente chronique sur la rétine et le nerf optique du rat : aspects inflammatoire et vasculaire**

Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) est associé à la survenue de neuropathies optiques, en particulier la neuropathie optique ischémique antérieure aiguë non artéritique (NOIAA-NA). Parmi les mécanismes d'apparition de cette neuropathie et potentiellement associés au SAOS, la dysrégulation et l'inflammation vasculaires pourraient jouer un rôle. Il n'existe aucune donnée dans la littérature sur l'effet de l'hypoxie intermittente (HI) chronique sur la fonction vasculaire de l'œil.

Le but de ce travail était de développer des techniques d'évaluation de la fonction vasculaire oculaire chez le rat et de les appliquer à l'étude des conséquences vasculaires oculaires de l'HI. Ainsi, deux approches complémentaires ont été développées : 1) un prototype de fluxmètre laser Doppler (LDF) adapté au rongeur pour l'évaluation in vivo de la perfusion sanguine rétinienne et de la tête du nerf optique (TNO) et 2) le modèle d'étude de l'artère ophtalmique (AO) du rat par myographie vasculaire, in vitro.

La mise au point du LDF chez le rat sain a permis de valider la pertinence du signal provenant des artères rétiniennes. A l'inverse, nos données invalident l'intérêt de la mesure au niveau de la TNO. En réponse à l'inhalation d'oxygène pur, nous observons une diminution de  $17,0 \pm 13,7$  % de la vitesse artérielle rétinienne ( $Vel_{ART}$ ). Nous n'observons pas de variation significative de  $Vel_{ART}$  lors d'injection intracarotidienne d'endothéline 1 (ET-1) malgré une forte vasoconstriction des vaisseaux rétiniens. Les perspectives consistent à associer une caméra de haute résolution à un système bidirectionnel de LDF. L'étude de la réactivité de l'AO par myographie chez le rat soumis à 14 jours d'HI a mis en évidence une augmentation de la contraction à l'ET-1, associée à une surexpression des récepteurs à l'ET-1 de type A au sein de l'AO. La relaxation NO-dépendante était diminuée chez le rat HI, et associée à un effet prédominant des produits vasoconstricteurs du cytochrome P450. Ces réponses étaient associées à une augmentation de la présence d'anions superoxyde dans la paroi de l'AO. Des études complémentaires sont nécessaires pour explorer les mécanismes à l'origine de ces altérations vasculaires, en particulier le rôle du stress oxydant.

**Mots clés :** Hypoxie intermittente, Fluxmétrie laser Doppler, Rétine, Nerf optique, Artère ophtalmique, Endothéline 1, Stress oxydant, Myographie

---

### **Impact of chronic intermittent hypoxia on rat retina and optic nerve: inflammatory and vascular aspects.**

Obstructive sleep apnea (OSA) has recently been associated with the occurrence of optic neuropathies, especially acute non-arteritic anterior ischemic optic neuropathy (NAION). Among the mechanisms of NAION onset potentially associated with OSA, vascular dysregulation and inflammation may play a role. There is still no data on the effect of chronic intermittent hypoxia (IH) on vascular function of the eye. The purpose of this work was to develop techniques for assessing rat ocular vascular function and apply them to the study of the ocular vascular consequences of IH. Thus, two complementary models have been developed: 1) a laser Doppler flowmeter (LDF) prototype adapted for rodents, to evaluate in vivo retinal and optic nerve head (ONH) blood perfusion and 2) in vitro model of rat ophthalmic artery (OA) study by myography. Preliminary work on healthy rat enabled us to validate the relevance of retinal arteries LDF signal, but not that of the ONH. Retinal blood velocity ( $Vel_{ART}$ ) dropped by  $17.0 \pm 13.7\%$  in response to pure oxygen inhalation. We did not observe any significant change in  $Vel_{ART}$  signal after intracarotidian endothelin 1 (ET -1) injection, despite strong vasoconstriction of retinal vessels. OA reactivity study by myography in rats exposed to a 14-day IH showed increased contraction to ET-1, associated with endothelin receptor A overexpression within the AO. NO-dependent relaxation is reduced in IH rats, and associated with a shift towards vasoconstrictive effects of cytochrome P450 products. These responses were associated with an increase in superoxide anions in the OA wall. Further studies are needed to explore the underlying mechanisms of these vascular changes, particularly the role of oxidative stress. Understanding of the LDF signal is partial and should be further explored to permit application to the study of IH rat.

**Key words:** Intermittent hypoxia, Laser Doppler flowmetry, Retina, Optic nerve, Ophthalmic artery, Endothelin 1, Oxidative stress, Myography