



Rôle protecteur de l'estradiol contre les conséquences systémiques et cellulaires dans un modèle d'apnées obstructives du sommeil : implication des récepteurs nucléaires ER α et ER β

Sofien Laouafa

► To cite this version:

Sofien Laouafa. Rôle protecteur de l'estradiol contre les conséquences systémiques et cellulaires dans un modèle d'apnées obstructives du sommeil : implication des récepteurs nucléaires ER α et ER β . Physiologie [q-bio.TO]. Université de Lyon; Université Laval (Québec, Canada), 2018. Français. NNT : 2018LYSE1077 . tel-01875717

HAL Id: tel-01875717

<https://theses.hal.science/tel-01875717>

Submitted on 17 Sep 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.



UNIVERSITÉ
LAVAL

N°d'ordre NNT : 2018LYSE1077

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
L'Université Claude Bernard Lyon 1 et de l'Université Laval
(Canada)

Ecole Doctorale N° 205
Interdisciplinaire Sciences-Santé (EDISS)

Spécialité de doctorat : Physiologie et Neurosciences

Soutenue publiquement/à huis clos le **14/05/2018**, par :

Laouafa Sofien

**Rôle protecteur de l'estradiol contre les
conséquences systémiques et cellulaires dans un
modèle d'apnées obstructives du sommeil:
Implication des récepteurs nucléaires ER α et ER β**

Devant le jury composé de :

M. PARENT André, Professeur, Université Laval
M. PRAUD Jean-Paul, PU-PH, Université Sherbrooke
M. BELIN DE CHANTEMEL Éric, Professeur, Université Augusta
Mme. SIGAUDO-ROUSSEL Dominique, DR, Université Lyon 1
M.ROUSSEL Damien, MCF, Université Lyon 1
M.JOSEPH Vincent, Professeur, Université Laval
Mme. BAIRAM Aida, PU-PH, Université Laval
M.SERIES Frédéric, PU-PH, Université Laval

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Directeur de thèse
Directeur de thèse
Co-Directrice de thèse
Invité

Résumé

L'apnée du sommeil (AS) induit des variations constantes d'oxygénation artérielle (hypoxie intermittente – HI) qui affectent environ 5 à 7 % de la population. Il se produit une augmentation du stress oxydatif (production d'espèces réactives de l'oxygène - ROS), augmentant les risques cardiovasculaires, neurologiques et métaboliques. Les études épidémiologiques démontrent que la prévalence d'AS est inférieure chez les femmes que chez les hommes, mais après la ménopause la prévalence augmente pour atteindre le même niveau que chez les hommes. L'œstradiol (E₂) est un puissant agent antioxydant, mais son rôle éventuel dans le traitement ou la prévention de l'AS n'est pas exploité. Toutefois, l'œstradiol (associé ou non à la progestérone) permet de réduire l'AS chez les femmes ménopausées. Les ROS peuvent être produites par les mitochondries, la NADPH oxydase et/ou la Xanthine oxydase. La mitochondrie est le plus important producteur de ROS (90% de l'oxygène consommé) et son dysfonctionnement est très préjudiciable. L'œstradiol est une cible de la mitochondrie à travers ses récepteurs nucléaires alpha et bêta (ER α et ER β) qui sont capables de moduler le fonctionnement de la mitochondrie et diminuer la production de ROS.

Nous avons testé l'hypothèse dans un modèle animal ovariectomisé exposé à une HI, que l'estradiol et ses agonistes spécifiques ER α et ER β sont capables de limiter le stress oxydatif cérébral, la dysfonction mitochondriale et l'apparition des désordres systémiques.

Nos résultats ont permis de montrer que l'estradiol est capable d'éviter l'augmentation de la pression artérielle et la survenue de désordres respiratoires causés par l'HI. De plus, l'HI augmente le stress oxydatif cérébral en augmentant l'activité d'enzymes pro-oxydantes et en diminuant l'activité d'enzymes antioxydantes. L'estradiol permet de prévenir l'augmentation du stress oxydatif. On retrouve également une dysfonction de la chaîne respiratoire mitochondriale dans le cortex en HI qui est préservée de manière différente par le traitement avec les modulateurs sélectifs des récepteurs ER α et ER β (SERMs). Nous avons montré que ER β joue un rôle dans le contrôle cardio-respiratoire et la fonction mitochondriale dans le cerveau.

Nos résultats apportent une meilleure compréhension du rôle de l'estradiol comme agent protecteur contre l'apnée du sommeil et ses conséquences associées. L'utilisation d'agonistes spécifiques nous renseigne sur le rôle que tient chaque récepteur dans la protection induite par l'estradiol contre la dysfonction mitochondriale. L'utilisation du remplacement hormonal avec de l'estradiol ou des SERMs peut constituer une thérapie efficace contre l'apnée du sommeil et ses conséquences.

Summary

Sleep apnea (SA) induces constant changes of arterial oxygenation (Intermittent hypoxia - IH) that affect about 5 to 7% of the general population. IH increases oxidative stress (production of reactive oxygen species – ROS) and lead to cardiovascular, neurological and metabolic risks. Epidemiological studies show that the prevalence of SA is lower in women than in men, but after menopause the prevalence increases to the same level that in men. Estradiol (E₂) is a potent antioxidant, but its potential role in the treatment or prevention of SA is not exploited. However, estradiol (with or without progesterone) can reduce SA in postmenopausal women. ROS can be produced by mitochondria, NADPH oxidase and/or Xanthine oxidase. Mitochondria is the most important producer of ROS (90% of oxygen consumed) and its dysfunction is very detrimental. Estradiol is a target of mitochondria through its mitochondria alpha and beta (ER α et ER β) that are able to modulate mitochondrial function and decrease ROS production.

We tested the hypothesis in ovariectomized animal model exposed to IH, that estradiol and its specific receptor ER α and ER β agonists are able to limit cerebral oxidative stress, mitochondrial dysfunction and the appearance of systemic disorders.

Our results have shown that estradiol is able to avoid the increase of blood pressure and the occurrence of respiratory disorders caused by IH. Furthermore, IH increases cerebral oxidative stress by increasing activity of pro-oxidant enzymes and decreasing activity of antioxidant enzymes. Estradiol prevents against the increase of oxidative stress. There is also a mitochondrial respiratory chain dysfunction in the cortex by IH, that is preserved differently by treatment with selective ER α and ER β receptor modulators (SERMs). We have shown that ER β plays an important role in cardiorespiratory control and mitochondrial function in the brain.

Our results provide a better understanding of the role of estradiol as a protective agent against sleep apnea and its associated consequences. The use of specific agonists informs us on the role of each receptors in estradiol-induced protection against mitochondrial dysfunction. The use of hormone replacement with estradiol or SERMs may be an effective therapy against sleep apnea and its consequences.

Table des matières

RESUME	III
SUMMARY	IV
LISTE DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XIV
REMERCIEMENT.....	XVI
AVANT-PROPOS.....	XVIII
PARTIE I	1
INTRODUCTION GENERALE	1
I) CONNAISSANCES GENERALES SUR L'APNEE DU SOMMEIL CHEZ L'HOMME ADULTE..	1
1) AU FIL DU TEMPS.....	1
2) DEFINITION.....	3
3) SEVERITE, SIGNES CLINIQUES ET DIAGNOSTIC.....	4
3.1) L'indice d'apnées-hypopnées.....	5
3.2) La somnolence diurne.....	5
3.3) Syndrome d'apnées du sommeil	6
3.4) Hypoxémie et micro-éveils	6
3.5) Quels types d'enregistrements réaliser pour diagnostiquer les patients apnéiques ?	7
3.5) Quels traitements ?	8
4) COMORBIDITES ASSOCIEES A L'APNEE DU SOMMEIL CHEZ L'HOMME.....	9
4.1) Apnées du sommeil et problèmes cardiovasculaires.....	9
4.1.1) Apnée du sommeil et hypertension.....	10
4.1.2) PPC et hypertension.....	10
4.2) Apnée du sommeil et troubles cognitifs	10
4.2.1) Apnée du sommeil et somnolence diurne.....	10
4.2.2) PPC et somnolence diurne	11
4.3) Apnée du sommeil et dysfonction métabolique	12
4.3.1) Apnée du sommeil et résistance à l'insuline.....	12
4.3.2) PPC et Diabète.....	12
5) ÉPIDEMIOLOGIE	13
5.1) Facteurs de risques.....	13
5.2) Population générale	14
5.3) Ménopause et apnée du sommeil.....	16
5.4) Conclusion.....	17

II) MODELES D'APNEES DU SOMMEIL CHEZ L'ANIMAL : MECANISMES PHYSIOLOGIQUES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES.....	18
1) MIMER L'APNEE DU SOMMEIL CHEZ L'ANIMAL : LES DIFFERENTS MODELES	18
1.1) Hypoxie Intermittente Chronique	18
1.2) Le ballon trachéal	20
2) CONSEQUENCES SYSTEMIQUES.....	21
2.1) Hypertension.....	21
2.2) Les mécanismes systémiques responsables de l'hypertension	23
2.2.1) Système nerveux sympathique et contrôle cardiovasculaire.....	23
2.2.2) Le chémoréflexe artériel périphérique.....	24
2.2.3) Activation du corps carotidien et de l'activité sympathique par l'HI.....	26
2.2.4) Chez l'homme : mêmes mécanismes ?.....	28
2.3) Altérations neurocognitives	29
2.3.1) La Somnolence diurne.....	29
2.3.2) L'apprentissage spatial.....	30
2.4) Conclusion.....	30
3) LE STRESS OXYDATIF : ACTEUR CELLULAIRE MAJEUR DANS L'HI.....	30
3.1) Les espèces réactives de l'oxygène et le stress oxydatif.....	30
3.1.1) Définition	30
3.1.2) Les principaux producteurs de ROS.....	34
3.1.3) Les défenses antioxydantes.....	42
3.1.2) Effet des ROS sur les biomolécules de la cellule	45
3.2) Le cerveau : un organe sensible au stress oxydatif.	48
3.3) Le stress oxydatif dans les modèles d'HI.....	49
3.3.1) Le stress oxydatif dans l'induction de l'hypertension artérielle systémique.....	49
3.3.2) Le stress oxydatif dans les troubles neurocognitifs.....	51
3.3.3) Le stress oxydatif chez l'homme atteint de SAOS	52
3.4) Conclusion.....	53
III) TRAITEMENTS HORMONAUX DE LA MENOPAUSE : IMPLICATION DE L'ESTRADIOL	54
1) LA MENOPAUSE	54
1.1) Définition	54
1.2) Symptômes liés à la ménopause	55
1.3) Ménopause et stress oxydatif	56
1.4) Hormonothérapie (HRT)	56
1.4.1) Effet sur les conséquences systémiques	56
1.4.1) Effet sur le stress oxydatif	58
1.5) Autre traitement : les modulateurs sélectifs des récepteurs estrogéniques (SERMs).....	58
1.6) conclusion	59
2) L'ESTRADIOL	60
2.2) Les récepteurs de l'estradiol	60

2.2.1) Effets génomiques	60
2.2.2) Effets non-génomiques	61
2.2) Estradiol et son rôle antioxydant	63
2.3) Estradiol et fonction de la chaîne respiratoire mitochondriale dans le cerveau	63
PARTIE II	67
HYPOTHESE GENERALE ET OBJECTIFS.....	67
PARTIE III	71
CHAPITRE I.....	71
ESTRADIOL PROTECTS AGAINST CARDIO-RESPIRATORY DYSFUNCTIONS AND OXIDATIVE STRESS IN	
INTERMITTENT HYPOXIA.	71
1) RESUME EN FRANÇAIS.....	73
2) ABSTRACT	74
3) INTRODUCTION	75
4) MATERIAL AND METHODS.....	77
4.1) Ethical approval.....	77
4.2) Experimental group	77
4.3) Surgical procedures	77
4.4) Chronic intermittent hypoxia exposure.....	78
4.5) Body weight and food intake	78
4.6) Systemic measurements.....	78
4.7) Data analysis	79
4.8) Oxidative stress enzyme activities.....	80
4.9) Makers of oxidative stress	82
4.10) Statistical analysis.....	82
5) RESULTS.....	82
5.1) Estradiol protects against metabolic alterations induced by CIH.....	84
5.2) Estradiol prevents the increase of arterial pressure and heart rate induced by CIH.....	85
5.3) Estradiol reduces the frequency of sighs and apneas and promotes stability of the breathing pattern during exposure to chronic intermittent hypoxia.	85
5.4) Estradiol prevents the increase in chemoreflex function during exposure to chronic intermittent hypoxia	87
5.5) Estradiol protects against pro-oxidant status during exposure to chronic intermittent hypoxia.....	88
6) DISCUSSION	91
CHAPITRE II.....	96
ESTRADIOL RECEPTOR AGONISTS α AND β PREVENT BRAIN MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN	
INTERMITTENT HYPOXIA.	96
1) RESUME EN FRANÇAIS.....	97

2)	ABSTRACT	99
3)	INTRODUCTION	100
4)	MATERIAL AND METHODS.....	101
4.1)	Animals	101
4.2)	Surgical procedures	101
4.3)	Chronic intermittent hypoxia exposure.....	102
4.4)	Experimental group	102
4.5)	Oxygen consumption and H ₂ O ₂ production on permeabilized brain cortex	102
4.6)	In vitro enzymatic activity.....	103
4.6.1)	Measurement of Complex I activity	103
4.6.2)	Measurement of cytochrome c oxidase (COX) activity.....	104
4.6.3)	Measurement of Pyruvate Dehydrogenase (PDH) activity	104
4.6.4)	Measurement of Citrate Synthase (CS) activity	104
4.7)	Statistical analysis.....	105
5)	RESULTS.....	106
5.1)	PPT and DPN treatments rescued decreased O ₂ consumption decreased by CIH.....	106
5.2)	PPT and DPN treatments rescued RCR decreased by CIH	107
5.3)	PPT and DPN treatments rescued H ₂ O ₂ production increased by CIH.....	107
5.4)	PPT and DPN treatments rescued PDH activity decreased by CIH	108
6)	DISCUSSION	110
	CHAPITRE III.....	111
	ROLE OF ESTRADIOL RECEPTOR BETA (ERB) ON ARTERIAL PRESSURE, RESPIRATORY CHEMOREFLEX AND MITOCHONDRIAL FUNCTION IN YOUNG AND AGED FEMALE MICE.....	111
1)	RESUME EN FRANÇAIS.....	112
2)	ABSTRACT	113
3)	INTRODUCTION	114
4)	MATERIAL AND METHODS.....	115
4.1)	Measurements of arterial pressure.....	115
4.2)	Respiratory and metabolic recordings.....	115
4.3)	Analysis of respiratory and metabolic rate variables.....	116
4.4)	Mitochondrial respiration recordings on permeabilized brain samples	116
4.5)	In vitro activity of the mitochondrial complex I	117
4.6)	Statistics.....	118
5)	RESULTS.....	118
5.1)	Arterial pressure in young and old WT and ERβKO female mice.....	118
5.2)	Body weight, respiratory and metabolic variables at rest in young and old WT and ERβKO female mice.....	119
5.3)	Hypoxic and hypercapnic ventilatory responses in young and old WT and ERβKO female mice.....	121

5.4) Mitochondrial respiration and in vitro activity of electron transport chain complexes in young and old WT and ER β KO female mice	123
6) DISCUSSION	124
6.1) Role of ER β on the cardiovascular system in old vs young female mice.....	125
6.2) Role of ER β on the respiratory control system in old vs young female mice.	125
6.3) Role of ER β on mitochondrial respiration in old female mice.....	127
6.4) Conclusion.....	127
PARTIE IV	128
DISCUSSION/CONCLUSION GENERALE	128
1) Résumé des principaux résultats obtenus	128
2) L'estradiol traitement du SAOS ou de ses conséquences systémiques ?	128
2.1) Estradiol et apnées du sommeil.....	128
2.2) Estradiol et activité sympathique	130
3) La progestérone : stimulant respiratoire ou antioxydant ?	131
4) HIF-1 et HIF-2 : modulateurs des ROS induits par l'hypoxie intermittente.....	134
5) Hypoxie intermittente, dysfonction mitochondriale et adaptation métabolique : rôle des récepteurs ER α et ER β	137
6) Conclusion générale et perspectives cliniques	140
PARTIE V	142
BIBLIOGRAPHIE.....	142
PARTIE VI	164
ANNEXE	164
Collaboration avec le laboratoire du Dr Jorge Soliz.....	164
Liste Publications :	165
Liste des conférences nationales et internationales :	166

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Prévalence de l'apnée du sommeil et du syndrome d'apnées du sommeil chez la femme et chez l'homme selon les études réalisées entre 1992 et 2015.....	15
Tableau I.2 : Différents protocoles d'hypoxie intermittente induisant des changements de la pression artérielle chez le rat.	22
Tableau I.3 : Les 3 principales catégories de défenses antioxydantes.....	43
Tableau II.4 : Respiratory and metabolic variables recorded at rest in young (5-6 months) and old (17-18 months) wild-type (WT) and ER β KO female mice.	120

Liste des figures

Introduction

Figure I.1 : Couverture du livre « Les papier posthumes du Pickwick Club » de Charles Dickens	2
Figure I.2 : Enregistrement typique d'apnées successives à l'aide d'un polygraphe SanBorn	3
Figure I.3 : Les différents types d'apnées rencontrés chez l'homme	4
Figure I.4 : Exemples typiques d'enregistrements de polygraphie ventilatoire montrant des apnées obstructives et centrales.	8
Figure I.5 : Traitement de l'apnée obstructive du sommeil	9
Figure I.6 : Exemple d'une chambre d'hypoxie intermittente	19
Figure I.7 : Protocoles d'hypoxie intermittentes induisant des effets délétères.....	20
Figure I.8 : Méthode du ballon trachéal pour mimer les apnées du sommeil	21
Figure I.9 : Innervation du cœur et de la glande surrénale par le système nerveux autonome	24
Figure I.10 : Représentation schématique d'un corps carotidien	25
Figure I.11 : Mécanismes de l'installation de l'hypertension artérielle systémique induite par l'apnée du sommeil	29
Figure I.12 : Formation du radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$).....	31
Figure I.13 : La réduction de l'oxygène.....	32
Figure I.14 : Représentation schématique (A) et par microscopie électronique (B) d'une mitochondrie	35
Figure I.15 : Représentation schématique et fonctionnement de la chaine respiratoire mitochondriale.....	36
Figure I.16 : Les mécanismes de fuite de protons	38
Figure I.17 : Production du superoxyde à travers les complexes I et III.....	39
Figure I.18 : Représentation schématique du complexe I de la chaine respiratoire	40
Figure I.19 : Production du superoxyde par le cycle du coenzyme Q.....	41
Figure I.20 : Fonctionnement de la NADPH Oxydase (NOX)	42
Figure I.21 : Principales défenses antioxydantes enzymatiques	44
Figure I.22 : Cycles réactionnels de régénération des antioxydants	45
Figure I.23 : Mécanisme de la peroxydation lipidique.....	46
Figure I.24 : Les différentes catégories d'attaques radicalaires	48
Figure I.25 : Représentation schématique de la voie de synthèse de l'estradiol	55
Figure I.26 : Structure chimique des principaux modulateurs sélectifs des récepteurs de l'estradiol (SERMs)...	59
Figure I.27 : Représentation schématique des récepteurs nucléaires $ER\alpha$ et $ER\beta$	60
Figure I.28 : Structure chimique du 17β -estradiol (E_2) et des modulateurs sélectifs des récepteurs de l'estradiol.	61
Figure I.29 : Localisation des différents récepteurs de l'estradiol dans une cellule cérébrale.....	62
Figure I.30 : Effet de l'estradiol (E_2) sur la chaine respiratoire mitochondriale	66

Chapitre I

Figure II.1 : Evolution of body weight (A), weekly weight gain (B), and weekly energy uptake (C) over the course of the experiments	83
Figure II.2 : Respiratory and metabolic parameters recorded at rest.....	84
Figure II.3 : Mean (A), diastolic (B), systolic (C), arterial pressure (in mmHg), and heart rate (D in bpm).....	85
Figure II.4 : Sigh frequency at rest.....	86
Figure II.5 : Apnea frequency and duration at rest.....	86
Figure II.6 : Stability of the breathing pattern at rest.....	87
Figure II.7 : Hypoxic and hypercapnic ventilatory responses.....	88
Figure II.8 : Activity of NADPH oxidase (NOX: A) and xanthine oxidase (XO: B).....	89
Figure II.9 : Activity of glutathione peroxidase (GPX: A) and superoxide dismutase (SOD) in cytosolic (B) or mitochondrial fractions (C)	90
Figure II.10 : Ratio of NADPH to SOD _{Cu-Zn} activities (A), malondialdehyde (MDA: B in mmol/mg protein) and advanced oxidation protein products (AOPP: C in mmol/mg protein) levels	91

Chapitre II

Figure III.1 : Oxygen consumption with a high resolution fluoroimeter Oroboros.....	106
Figure III. 2 : Respiratory control ratio (RCR)	107
Figure III.3 : H ₂ O ₂ production with a high resolution fluoroimeter Oroboros.....	108
Figure III. 4 : Activity of mitochondrial enzymes	109

Chapitre III

Figure IV.1 : Systolic, mean, and diastolic arterial pressure in young and old wild-type (WT) and ER β KO female mice.....	119
Figure IV.2 : Typical respiratory recordings from an old WT and an old ER β KO mice showing the occurrence of a sigh followed by apneas in the WT but not in the ER β KO mice	121
Figure IV.3 : Ventilatory responses to hypoxia (upper panels) and hypercapnia (lower panels) in young (5-6 months) wild-type (WT) and ER β KO female mice.	122
Figure IV.4 : Ventilatory responses to hypoxia (upper panels) and hypercapnia (lower panels) in old (17-18 months) wild-type (WT) and ER β KO female mice.	123
Figure IV. 5 : Mitochondrial function in samples of permeabilized brain cortex in old (17-18 months) WT and ER β KO female mice.	124

Discussion/conclusion

Figure V.1 : Cercle vicieux induit par l'exposition en hypoxie intermittente	130
Figure V.2 : Paramètres cardio-respiratoires chez des ratées traitées avec de la progestérone.....	132
Figure V.3 : Peroxydation lipidique chez des ratées traitées avec de la progestérone	133

Figure V.4 : Activité de la superoxyde dismutase (SOD) chez des rattees traitées avec de la progestérone	133
Figure V.5 : Mode d'action de HIF-1	135
Figure V. 6 : La production à travers la glycolyse et les oxydations phosphorylantes	137
Figure V.7 : Régulation de la pyruvate déshydrogénase.....	138

Liste des abréviations

ROS: Reactive oxygen species
CIH: chronic Intermittent Hypoxia
HI : Hypoxie intermittente
E2 : 17 β -estradiol
NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
SOD: Superoxyde dismutase
OVX : ovariectomie
RA : room air
Veh: vehicle
ERs : Récepteurs nucléaires de l'estradiol
ER α and ER β : estradiol receptor α and β
fR: respiratory frequency
V_T: tidal volume
V_E: minute ventilation
VO₂: Oxygen consumption rate
VCO₂: CO₂ production rate
RER: Respiratory exchange ratio
NTB: Nitroblue tetrazolium
XO: Xanthine oxydase
NOX: NADPH oxydase
MDA: Malondialdehyde
TBARS
AOPP: Advanced oxidation protein products
SD: standard deviation
GPX: glutathion peroxidase
HIF: Hypoxia Inducible Factor
EMG/EEG: electromyogram/electroencephalogram
MnTMPyP: Manganese tetrakis(1-methyl-4-pyridyl) porphyrin pentachloride
CRM : Chaîne respiratoire mitochondriale
MAPK: Mitogen-activated protein kinases
CREB: C-AMP response Element-Binding protein
NF- κ B: Nuclear factor-kappa B
NTS : Noyau du tractus solitaire

RVLM: Rostral ventrolateral medulla
 ATP: Adénosine triphosphate
 Nrf2: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
 sLTF : Sensory long term facilitation
 HIF-1: Hypoxia-inductible factor 1
 HIF-2: Hypoxia-inductible factor 2
 LDL: Low density lipoprotein
 HDL: High density lipoprotein
 PPC : Pression positive continue
 OXPHOS : Oxydation phosphorylante
 BZA : Bazédoxifène
 PPT : 4,4',4''-(4-Propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol
 DPN : diarylpropionitrile
 IAH : Index d'apnées/hypopnées
 CRM : Chaîne respiratoire mitochondriale
 SAOS : Syndrome d'apnées obstructives du sommeil
 SERMs : Selective estrogen receptor modulators
 TBARS : Thiobarbituric acid reactive substances
 MPTP : 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
 AF-1 : Activation Function 1
 GPER : G-protein coupled estrogen receptor 1
 PI3: Phosphatidylinositol-4,5 bisphosphate 3-Kinase
 HRT : Traitement hormonale de remplacement

Remerciements

Voilà le temps des remerciements, enfin, la partie indispensable d'une thèse de doctorat. Je voudrais commencer par remercier les membres du jury (les Drs Jean-Paul Praud, Eric Belin de Chantemèle, Frédéric Series et Dominique Sigaud-Roussel) d'avoir eu le mérite et la gentillesse d'évaluer cette thèse, et qui ont fait le déplacement sur Québec pour écouter ma défense.

La première personne qui mérite d'être citée dans ces remerciements est le Dr Vincent Joseph, tu es la personne qui m'a fait venir au Canada pour mon stage de master 2, et surtout celle qui m'a fait rester en me donnant un sujet à mon image. Tu m'as permis de réaliser cette thèse en cotutelle tout en me laissant beaucoup de liberté et je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi au cours de ces 4 dernières années. Merci pour tous les congrès que tu m'as fait partager avec toi. Merci également pour les nombreuses discussions qu'on a pu avoir, au Canada ou à l'étranger durant les congrès. Tu m'as clairement fait évoluer et si je suis ce que je suis maintenant c'est aussi grâce à toi. Merci pour tout.

Un merci au Dr Damien Roussel, pour m'avoir donné la passion de la mitochondrie, de m'avoir accueilli durant mon stage de master 1 et d'avoir accepté de diriger ma thèse en France. Merci pour tes précieux conseils sur le fonctionnement mitochondrial, tu es vraiment un expert de la mitochondrie, sans aucun doute. Je n'ai cessé de te citer quand je dois parler mitochondrie, car je ne connais pas plus grand expert que toi.

Merci au Dre Aida Bairam d'avoir codirigé ma thèse, merci pour tes précieux conseils, ta gentillesse et tes connaissances impressionnantes sur n'importe quel sujet. Tu m'as énormément appris durant ces années de thèse et je te remercie du fond du cœur pour tout ce que tu as fait pour moi.

Je ne peux continuer ces remerciements sans citer le Dr Jorge Soliz, qui a beaucoup été présent durant mes années de thèse, nous avons énormément travaillé ensemble et je suis fier d'avoir pu contribuer au développement de ton laboratoire dans l'encadrement de tes stagiaires. L'EPO n'a plus de secret pour moi, j'espère qu'on pourra travailler encore longtemps ensemble, j'ai beaucoup appris à tes côtés. Merci également pour les nombreuses discussions dans ton bureau, où ta porte était toujours ouverte pour moi-même quand tu étais beaucoup occupé. Merci pour tout.

Un merci à François Marcouiller, de m'avoir énormément aidé durant toutes ces années de thèse, tu as toujours été présent quand j'en avais besoin, tu dois connaître mon sujet mieux que personne. Merci pour tout.

Je tiens à remercier toutes les personnes que j'ai pu fréquenter durant ma thèse et avec qui j'ai pu collaborer, dont le Dr Richard Kinkead de l'université Laval et le Dr David Gozal de l'université de Chicago. Merci aux étudiants que j'ai côtoyés, J-P, Alexandra, Christian, Eli, Karen, Ryma, un remerciement particulier merci à Jean-Philippe Rousseau pour toutes nos discussions et surtout c'est toi qui m'as fait découvrir le soccer à Québec et c'est grâce à toi que j'ai pu connaître tout ce monde dans le monde du soccer québécois. Forcément je remercie toutes les personnes avec qui j'ai pu jouer au Soccer, je ne pourrai les citer tous, mais si j'ai pu m'épanouir autant à Québec c'est grâce à vous tous.

Bien évidemment je suis aussi obligé de conclure cette partie par remercier mes parents, vous avez été mon soutien pendant toutes ces années depuis que j'ai quitté la maison à 17 ans. Si j'en suis là, c'est principalement grâce à vous, vous m'avez toujours soutenue même quand j'ai traversé l'atlantique pour continuer mes études, j'ai toujours suivi vos conseils, car j'ai toujours su que c'était pour mon bien, c'est pour cela que je vous dédie cette thèse qui est aussi la vôtre.

Avant-propos

Le chapitre I a été publié dans le journal « SLEEP » le 1^{er} août 2017.

Ce chapitre se décompose en deux grandes parties. La partie systémique réalisée à Québec (Canada) et la partie stress oxydatif réalisée à Lyon (France). Il a été partiellement présenté à différents congrès internationaux.

J'ai participé à toutes les étapes de cet article, de la conception, la réalisation, l'interprétation et l'écriture.

Le chapitre III a été accepté le 18 décembre 2017 et sera publié prochainement dans le journal « Advance in Experimental Medicine and biology »

J'ai participé aux étapes de conception, la réalisation et l'interprétation de cet article. Je remercie François Marcouiller pour avoir grandement participé à certaines expériences.

Ce travail sera partiellement présenté à **Experimental Biology** qui se tiendra à San Diego du 20 au 25 avril 2018 et fera partie d'un papier de conférence publié dans « The FASEB » intitulé : Role of estradiol receptor Beta (ER β) on brain mitochondrial dysfunction and cardio-respiratory control in aged female mice.

Partie I

Introduction générale

I) Connaissances générales sur l'apnée du sommeil chez l'homme adulte

1) Au fil du temps

La première description du syndrome d'apnées du sommeil a été attribuée à Burwell et ses collègues en 1956 décrivant l'état d'un patient obèse, somnolent et polycythémique ([Burwell et al., 1994](#)). On parlait de syndrome de Pickwick en référence à la ressemblance avec le personnage de Charles Dickens « fat Joe » dans le roman de 1836 « Les papiers posthumes du Pickwick Club » **figure I.1** ([Lavie, 2008, 1984](#)). Alors que cette étude est régulièrement citée dans la littérature en lien avec l'apnée du sommeil, les auteurs n'ont pas fait de rapprochement entre la somnolence excessive de ce patient et un désordre du sommeil. Cette hypersomnolence était attribuée à des pressions partielles en O₂ et en CO₂ artérielles anormales ([Burwell et al., 1994](#)).

Au début des années 60, des enregistrements physiologiques de sujets atteints du syndrome de Pickwick ont été réalisés par Drachman et Gumnit. Ils ont montré des arrêts de la respiration pendant le sommeil, associés à des fluctuations du rythme cardiaque. Cependant, ils n'ont pas reconnu que la raison de ces arrêts respiratoires était liée à l'obstruction des voies aériennes supérieures ([Drachman and Gumnit, 1962](#)).

Il faut attendre l'étude de Gastaut et al en 1965, pour reconnaître que les apnées répétées au cours du sommeil de patients atteints du syndrome de Pickwick proviennent de l'obstruction des voies aériennes supérieures. Ils concluent donc que cette somnolence diurne est la conséquence d'un désordre respiratoire qui survient au cours du sommeil ([Gastaut et al., 1965](#)). Cependant, les autres signes cliniques chez ces patients comme la polycythémie ou l'insuffisance ventriculaire droite ont été attribuées à un syndrome cardiorespiratoire de l'obésité sans lien direct avec la survenue d'apnées du sommeil ([Gastaut et al., 1965](#)).

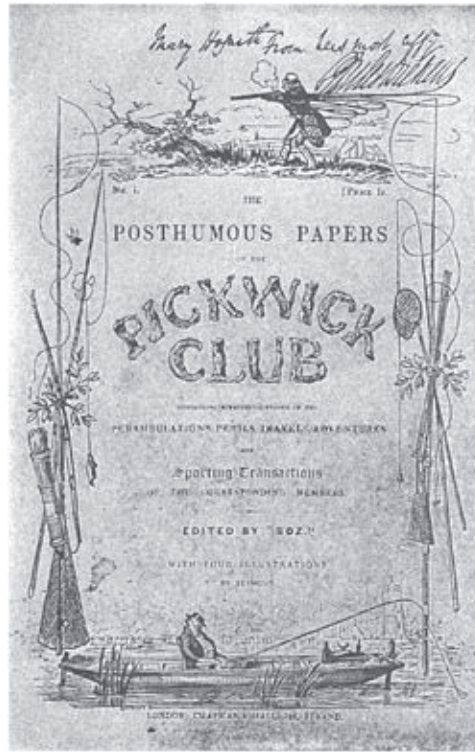


Figure I.1 : Couverture du livre « Les papier posthumes du Pickwick Club » de Charles Dickens

Aux États-Unis, peu de choses ont été réalisés sur les désordres respiratoires du sommeil jusqu'au milieu des années 70. En 1972, Christian Guilleminault un médecin français intègre la clinique du sommeil de l'université de Standford et publie en 1976 une étude majeure utilisant pour la première fois le terme de « syndrome d'apnée du sommeil » en se basant sur des tracées polysomnographiques, **figure I.2** (Guilleminault et al., 1976). Dans cette étude, il démontre le lien entre hypersomnolence, insomnie et obstruction des voies aériennes supérieures durant le sommeil chez des sujets non-obèses. Le syndrome d'apnée du sommeil est défini par Guilleminault comme étant la survenue d'au moins 30 apnées d'une durée minimale de 10 secondes au cours d'une nuit entière. Cette définition prévaut encore maintenant en tenant seulement compte des variations de la durée du sommeil entre chaque personne. C'est également la première étude qui montre la corrélation étroite entre le syndrome d'apnée du sommeil et l'apparition d'une hypertension artérielle (Guilleminault et al., 1976). Quelques années plus tard, une équipe anglaise publie une lettre dans le journal « *Lancet* » intitulée « Où sont les patients anglais atteints d'apnée du sommeil ? » en signifiant qu'il existe peu de cas d'apnées obstructives du sommeil dans leur population. Sur les 120 sujets étudiés seulement 3 (2,41%) étaient atteints d'apnées obstructives (Shapiro et al., 1981). Pour faire face au manque de considération sur l'apnée du sommeil des médecins anglais, en 1988, une cohorte sur les désordres du sommeil, dont l'apnée du sommeil voit le jour à l'université du Wisconsin aux États-Unis (*The Wisconsin sleep cohort*). Se basant sur cette

cohorte issue de la population générale (hommes et femmes employés de l'état du Wisconsin âgés entre 30 et 60 ans), Young et al., publie une étude épidémiologique rigoureuse rapportant que dans la population générale, 4% des hommes et 2 % des femmes sont atteints du syndrome d'apnée du sommeil (Young et al., 1993).

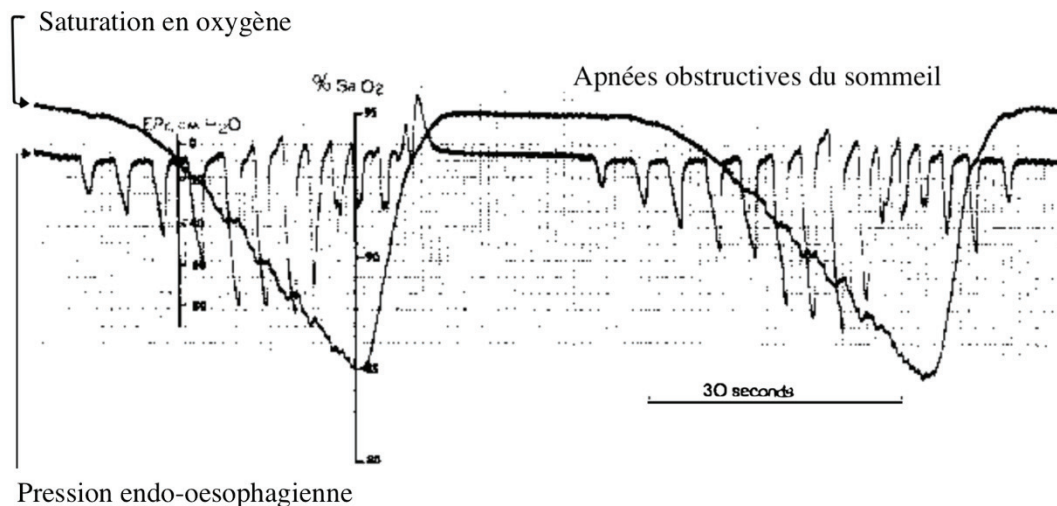


Figure I.2 : Enregistrement typique d'apnées successives à l'aide d'un polygraphe SanBorn

Sujet de 42 ans se plaignant de somnolence diurne. La pression endo-oesophagienne démontre une relation intriquée entre les apnées centrales et les apnées obstructives (apnées mixtes). La saturation en oxygène diminue durant chaque apnée. D'après Guilleminaut et al., 1976.

2) Définition

« L'American Academy of Sleep Medicine » a mis en place en 1999 une définition standard concernant les désordres respiratoires du sommeil, afin de faciliter les différentes études traitant ce sujet. On distingue 3 types d'apnées/hypopnées du sommeil qui conduisent toutes à une hypoxémie (diminution du taux d'oxygène dans le sang) (Rakel, 2009) figure I.3.

Le syndrome d'apnées/hypopnées obstructives du sommeil (SAHOS) : Introduit par Guilleminault dans les années 70, l'SAHOS est caractérisée par une obstruction totale (apnée) ou partielle (hypopnée) des voies aériennes supérieures aboutissant à une réduction ou un arrêt complet du flux respiratoire, supérieur à 10 secondes (absence de 2 cycles respiratoires), et ce malgré la continuité des efforts inspiratoires. Ce type d'apnées est observé surtout chez les hommes, souvent associé à des ronflements et une obésité. Par la suite, pour des soucis de simplification, on parlera principalement du syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS).

Le syndrome d'apnées/hypopnées centrales du sommeil (SAHCS) : Elle se caractérise par des épisodes d'apnées/hypopnées supérieures à 10 secondes (absence de 2 cycles

respiratoires) sans obstruction des voies aériennes supérieures, c'est à dire en absence d'effort inspiratoire. Le dysfonctionnement se situe au niveau des centres qui contrôlent la respiration, ce qui rend la compréhension des mécanismes beaucoup plus complexe. Contrairement à l'apnée obstructive, l'apnée centrale est plus souvent associée à une insuffisance cardiaque et/ou à des problèmes neurologiques.

Le syndrome d'apnées/hypopnées mixtes du sommeil (SAHMS) : C'est une combinaison à la fois d'apnées obstructives et d'apnées centrales. L'arrêt respiratoire débute comme une apnée centrale et se termine par une apnée obstructive. Même si l'on parle couramment d'apnée obstructive dans la majorité des cas, il semblerait qu'il s'agit principalement d'apnées mixtes qui se produisent.

Ces trois types d'apnées font parties d'une large famille de désordres respiratoires du sommeil. On peut citer par exemple la respiration de Cheynes-Stokes (alternance de phases d'apnées et d'hyperpnées), premier désordre respiratoire à être décrit par Cheynes en 1818 et Stokes en 1854 (Pack, 2006). On sait maintenant que le syndrome d'obésité/hypoventilation alvéolaire (augmentation de la pression partielle en dioxyde de carbone dans le sang) correspond à l'ancien terme « syndrome de Pickwick » décrit par Burwell en 1956.

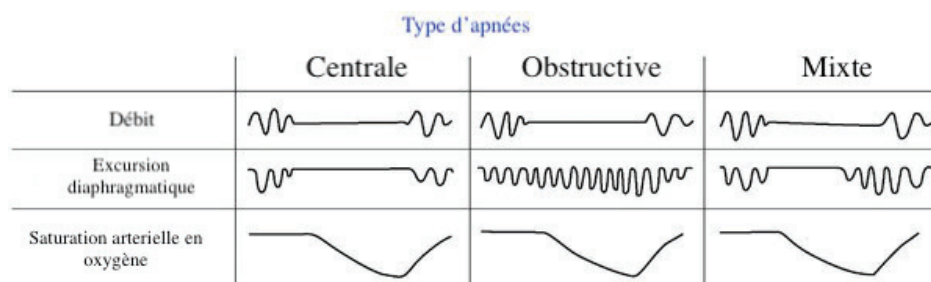


Figure I.3 : Les différents types d'apnées rencontrés chez l'homme

Les apnées centrales, obstructives et mixtes conduisent toutes les 3 à une désaturation en oxygène dans le sang. *D'après Revue médicale Suisse.*

3) Sévérité, signes cliniques et diagnostic

La sévérité des apnées du sommeil prend en compte deux composantes (Escourrou et al., 2010) :

- L'indice (ou index) d'apnées-hypopnées (IAH)
- L'importance de la somnolence diurne après exclusion d'une autre cause de somnolence.

Dans la majorité des études, le terme « syndrome d'apnées du sommeil » réfère souvent aux

apnées, à proprement parler, associées à la somnolence diurne ([Rakel, 2009](#)).

3.1) L'indice d'apnées-hypopnées

L'IAH du sommeil se calcule à l'aide de la formule suivante : *(nombre d'apnées + nombre d'hypopnées) / temps de sommeil (heure)*

On distingue 3 stades de sévérité selon l'IAH :

- Léger : entre 5 et 15 évènements par heure ;
- Modéré : entre 15 et 30 évènements par heure ;
- Sévère : entre 30 et plus d'évènements par heure.

3.2) La somnolence diurne.

Concernant la somnolence diurne il existe également 3 stades de sévérité :

- Légère : Somnolence indésirable ou épisodes de sommeil involontaire ayant peu de répercussion sur la vie sociale ou professionnelle et apparaissant pendant des activités nécessitant peu d'attention (lecture, télévision)
- Modérée : Somnolence indésirable ou épisode de sommeil involontaire ayant une répercussion modérée sur la vie sociale ou professionnelle et apparaissant durant des évènements nécessitant plus d'attention (concert, réunion).
- Sévère : Somnolence indésirable ou épisode de sommeil involontaire perturbant de façon importante la vie sociale ou professionnelle et apparaissant lors d'activités de la vie quotidienne (manger, conduire, marcher, parler).

Une des méthodes d'évaluation de la somnolence est l'échelle d'Epworth. Créée par Johns en 1991, il s'agit d'un questionnaire bien défini permettant de classer le degré de somnolence. L'échelle varie entre 1 et 24 ; plus le score est élevé, plus le sujet est somnolent. Les sujets ayant des valeurs > 10 sont souvent considérés comme somnolents ([Johns, 2000, 1991](#)). Il existe d'autres tests permettant d'évaluer la somnolence diurne qui sont plus complexes, sensibles et coûteux comme le test de latence à l'endormissement (TILE), le test de maintien d'éveil (TME) et le test d'attention simple ([Dauvilliers et al., 2010](#)). Par exemple, le TILE est utile lorsque le score d'Epworth est faible avec un IAH > 30 apnées/heure ou quand le score d'Epworth est élevé avec un IAH <30 apnées/heure ([Miyamoto et al., 2002](#)).

3.3) Syndrome d'apnées du sommeil

Selon l'*American Academy of Sleep Medicine*, le syndrome d'apnées du sommeil est défini par un IAH > 5 apnées par heure de sommeil et associé à :

-une somnolence diurne excessive non expliquée par d'autres facteurs
-ou s'il n'y a pas de somnolence diurne, il faut au moins deux des critères suivants qui ne sont pas expliqués par d'autres facteurs comme décrits par le rapport de « *L'American Academy of Sleep Medicine* » :

- Sommeil non réparateur.
- Sensation d'étouffement et de suffocation pendant le sommeil.
- Fatigue diurne.
- Éveils récurrents pendant le sommeil.
- Altération de la concentration.

Selon les études, les critères peuvent légèrement varier. Pour certains, l'IAH doit être supérieur à 10 événements par heure de sommeil et associé à une comorbidité telle que l'hypertension (Bixler et al., 2001). Mais pour la majorité des études un IAH > 5 apnées par heure de sommeil associé à une somnolence diurne est suffisant pour porter le diagnostic de syndrome d'apnées du sommeil (Pack, 2006).

3.4) Hypoxémie et micro-éveils

L'apnée du sommeil conduit à des cycles récurrents d'hypoxémie intermittente (cycles de désaturation-réoxygénation). Les sujets atteints d'apnées du sommeil présentent généralement une hypoxémie intermittente à haute fréquence (cycles de désaturation qui durent pendant 15 à 60 secondes avant une phase de réoxygénation). Ces changements cycliques d'hypoxémie sont similaires à ce qui est observé dans l'ischémie-reperfusion et contribue à l'augmentation du stress oxydatif (Dewan et al., 2015)

De plus, l'architecture du sommeil est altérée, conduisant à une fragmentation du sommeil (microéveil) qui se produit à la fin des épisodes d'apnées-hypopnées. Dans l'apnée obstructive, ces éveils semblent primordiaux permettant l'activation des muscles des voies aériennes supérieures et la reprise de la respiration (Kimoff, 1996). Les mécanismes contributifs à ces micro-éveils peuvent inclure l'hypoxémie, l'hypercapnie et des stimulus issus des mécanorécepteurs localisés dans la paroi thoracique (Kimoff, 1996). L'activation des chémorécepteurs périphériques peut également conduire à ces microéveils par des projections directes dans les centres de l'éveil du système nerveux central ou indirectement par une influence sur la commande respiratoire ou sur les efforts ventilatoires (Bowes, 1984). Ces courts

épisodes d'éveil provoquent un sommeil de très mauvaise qualité et participe à l'apparition d'une somnolence diurne excessive, au contraire de l'hypoxémie qui ne joue pas de rôle dans la somnolence diurne. En effet, chez des sujets apnéiques traités par ventilation en pression positive continue pour corriger les apnées, la fragmentation du sommeil et l'hypoxémie, il se produit une amélioration de la somnolence diurne évaluée par le test de latence à l'endormissement. Si l'on corrige seulement les apnées et la fragmentation du sommeil tout en induisant une hypoxémie contrôlée, on n'évite pas l'amélioration de la somnolence diurne (Colt et al., 1991).

3.5) Quels types d'enregistrements réaliser pour diagnostiquer les patients apnéiques ?

Tout enregistrement doit être précédé d'une évaluation clinique réalisée par un médecin formé à la pathologie du sommeil.

Pour évaluer les anomalies respiratoires, on utilise régulièrement la polygraphie ventilatoire ou la polysomnographie. La première est moins coûteuse et plus simple que la seconde, mais pas toujours suffisante ; elle doit parfois être complétée par la polysomnographie. Les enregistrements sont réalisés le plus souvent en laboratoire et permettent de mesurer plusieurs paramètres physiologiques. Pour la polygraphie on enregistre souvent le flux aérien à l'aide d'un masque ou d'une lunette nasale, les efforts inspiratoires à l'aide d'une ceinture abdominale et thoracique, la saturation en oxygène dans le sang (SaO₂) à l'aide d'un oxymètre de pouls placé au bout du doigt et les ronflements à l'aide d'un capteur de son placé à la base du cou. Deux exemples de tracés polygraphiques d'apnées obstructives et centrales sont présentés **figure I.4**. La polygraphie ne permet pas de mesurer l'index d'apnées / hypopnées par heure de sommeil, mais permet d'avoir seulement l'index d'anomalies respiratoires par temps d'enregistrement (Escourrou et al., 2010). Ce qui explique pourquoi la polysomnographie est l'examen de référence dans le diagnostic de l'apnée du sommeil. Outre ce qui est cité précédemment, on recueille d'autres signaux permettant d'évaluer les différents stades de sommeil (léger, profond et paradoxal) ainsi que la veille intra sommeil et les microéveils. On mesure alors les ondes cérébrales (EEG), l'activité oculaire (EOG) et musculaire de la houppe du menton (EMG) (Escourrou et al., 2010).

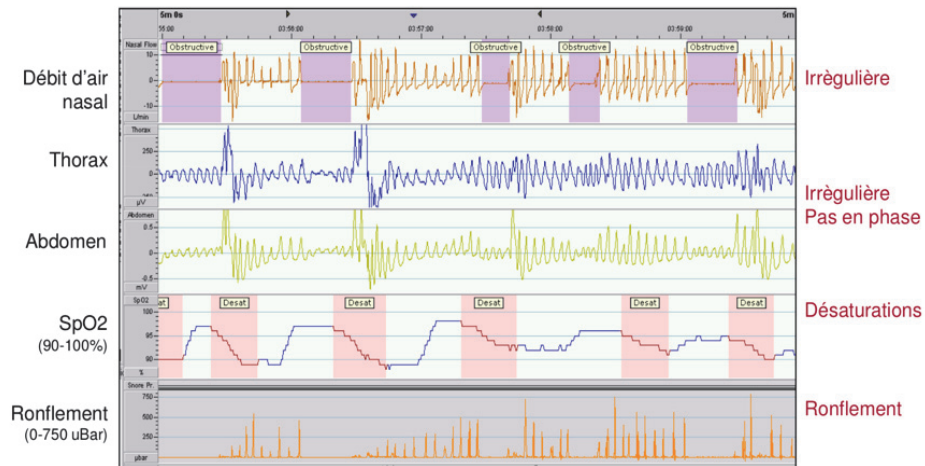
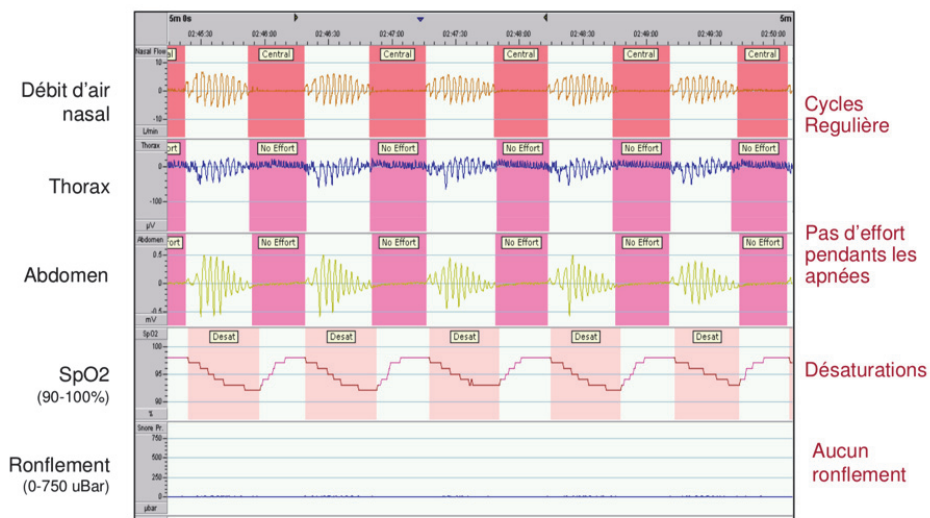
A**B**

Figure I.4 : Exemples typiques d'enregistrements de polygraphie ventilatoire montrant des apnées obstructives et centrales.

Les apnées obstructives (**A**) et centrales (**B**) entraînent dans les deux cas une diminution de la saturation en oxygène dans le sang. Les efforts respiratoires sont présents pendant les apnées obstructives alors qu'ils sont absents pendant les apnées centrales. Le ronflement est observé seulement pendant les apnées obstructives. *D'après B.Etcheverry.fr*

3.5) Quels traitements ?

Actuellement, le traitement le plus efficace contre l'apnée obstructive du sommeil est la ventilation en pression positive continue (PPC), bien que la perte de poids chez les patients obèses a également montré son efficacité (Young et al., 2002a). Ce traitement mis au point par Sullivan en 1981 permet d'éviter le collapsus pharyngé (Sullivan et al., 1981). Le principe est simple, de l'air est envoyé en continu dans les voies aériennes supérieures à l'aide d'un masque nasal ou facial, **figure I.5**. L'appareil délivre des débits d'air pouvant aller de 20 à 60 L/min à une faible pression de l'ordre de 3 à 20 cm d'H₂O. Le masque est appliqué de façon étanche sur

le visage à l'aide d'un système de harnais réglable (Casse, 2014). Le principal problème de la PPC est qu'elle occasionne des effets indésirables et gênants pour le patient comme des inconforts, des irritations, des douleurs liées aux lanières du harnais et des gênes sonores (surtout pour l'entourage). Le port du masque toute la nuit n'est pas toujours bien toléré par les patients et certains refusent catégoriquement de le porter. De même, le bruit que peut engendrer la machine peut causer des troubles aux patients et à l'entourage de celui-ci (Casse, 2014). La recherche d'autres thérapies est donc primordiale pour le futur.

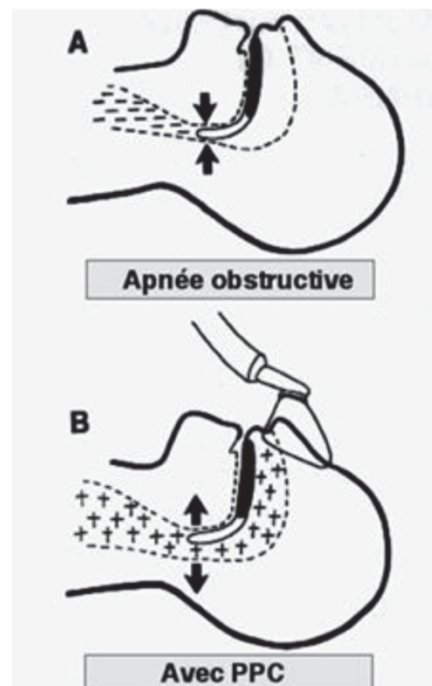


Figure 1.5 : Traitement de l'apnée obstructive du sommeil

Le traitement par ventilation en pression positive continue (PPC) permet d'éviter le collapsus pharyngé. D'après le site des pneumologues libéraux de la Côte d'Azur, APLCA

4) Comorbidités associées à l'apnée du sommeil chez l'homme

L'apnée du sommeil est considérée comme un problème de santé publique majeur. Plusieurs comorbidités sont associées à l'apnée du sommeil incluant des problèmes cardiovasculaires neurologiques et métaboliques. L'hypoxémie induite par les variations constantes d'oxygénation artérielle (hypoxie intermittente – HI) est la principale cause de ces manifestations systémiques associées.

4.1) Apnées du sommeil et problèmes cardiovasculaires

Il existe de nombreuses preuves montrant l'association étroite entre l'apnée du sommeil et l'augmentation de la prévalence des problèmes cardiovasculaires (hypertension, maladies

coronariennes, arrêt cardiaque, arythmie et accident vasculaire cérébral) (Rakel, 2009). Un exemple concret est l'augmentation de la protéine C-réactive et de l'homocystéine (deux marqueurs de risque cardiovasculaire) chez les sujets atteints d'apnées obstructives (Can et al., 2006). Bien que plusieurs troubles cardiovasculaires soient liés à l'apnée du sommeil, seule l'hypertension sera décrite ici, étant la seule morbidité cardiovasculaire étudiée pendant mon travail de doctorat.

4.1.1) Apnée du sommeil et hypertension

L'hypertension artérielle est l'une des conséquences néfastes les plus communes de l'apnée du sommeil. Les données cliniques de nombreuses études longitudinales et épidémiologiques concordent dans ce sens (Bixler et al., 2000; Nieto et al., 2000). Environ 50% des sujets atteints d'apnées du sommeil souffrent d'hypertension (Haas et al., 2005). En 2000, Nieto et ses collègues rapportent que la sévérité de l'index apnéique est associée avec une hypertension systémique chez les deux sexes, après ajustement des facteurs confondants tels que l'indice de masse corporelle, l'âge, l'alcoolisme et le tabagisme (Nieto et al., 2000). L'étude prospective sur la « *Wisconsin sleep cohort* » conforte le lien entre l'hypertension et l'apnée du sommeil. Le risque de développer une hypertension artérielle est multiplié par 3 pour les personnes ayant un IAH > 15 apnées par heure (Peppard et al., 2000b).

De plus, des sujets sains soumis à un protocole d'hypoxie intermittente sévère (afin de mimer l'hypoxémie observée dans l'apnée du sommeil) pendant 14 jours consécutifs montrent une élévation de la pression artérielle après seulement un jour d'exposition qui se prolonge pendant les 13 jours suivants (Tamisier et al., 2011).

4.1.2) PPC et hypertension

Les personnes apnéiques utilisant la ventilation en PPC ont une réduction de la pression artérielle de 2,5 mmHg après un mois de traitement, le bénéfice étant plus important chez ceux souffrant d'apnée sévère (IAH >15 apnées/ heure) (Pepperell et al., 2002).

4.2) Apnée du sommeil et troubles cognitifs

Les altérations cognitives liées à l'apnée du sommeil sont nombreuses chez l'adulte (Gozal, 1998). La somnolence diurne est le désordre cognitif le plus communément associé au syndrome d'apnées du sommeil.

4.2.1) Apnée du sommeil et somnolence diurne

Les facteurs déterminants la somnolence diurne dans l'apnée du sommeil ne sont pas encore

bien compris. Il est rapporté qu'entre 5 et 12 % de la population générale adulte souffre de somnolence diurne. Les causes sont multifactorielles, mais environ 50 % des personnes souffrant d'apnées modérées à sévères sont atteints de somnolence diurne (Kapur et al., 2005). Parmi les autres causes responsables de la somnolence diurne, il y a certaines maladies comme la narcolepsie, l'hypersomnie idiopathique et la myoclonie nocturne. D'autres causes non pathologiques peuvent induire de la somnolence diurne comme un traitement médicamenteux ou des horaires de travail alternés (jour-nuit) comme chez les professionnels de santé (Martikainen et al., 1992).

La relation entre IAH et somnolence diurne n'est pas claire parmi la communauté scientifique, alors que certains groupes montrent clairement qu'un fort IAH (>30 apnées/heure) est associé à un score d'Epworth élevé (Gottlieb et al., 1999) d'autres études rapportent que la sévérité de l'IAH ne corrèle pas du tout avec la sévérité de la somnolence diurne (Heinzer et al., 2015; Slater and Steier, 2012).

La somnolence diurne est la raison principale qui conduit les médecins à orienter les patients vers les cliniques du sommeil. C'est une manifestation extrêmement dérangeante dans la vie socioprofessionnelle du patient et un facteur de risque dans la vie de tous les jours. On peut citer deux exemples où la somnolence diurne pose un réel problème au quotidien.

La performance au travail en est clairement impactée. Le risque d'être atteint de somnolence diurne au travail est augmenté de 40 fois pour les sujets atteints d'apnées obstructives. Chez ces sujets, les difficultés de concentration et d'apprentissage de nouvelles tâches augmentent respectivement de 8% et de 9% après ajustement de l'âge et de l'indice de masse corporelle par rapport à des sujets sains (Ulfberg et al., 1996). L'apnée obstructive augmente également le risque d'accident automobile d'un facteur 2 à 3 (Dauvilliers et al., 2010). Pour Young et al, le risque de subir un accident de voiture est augmenté de 6 fois pour les personnes présentant un syndrome d'apnées du sommeil (Young et al., 1997a).

4.2.2) PPC et somnolence diurne

Généralement, la somnolence diurne répond bien au traitement ventilatoire par pression positive continue avec des bénéfices obtenus après quelques jours seulement, même si une somnolence résiduelle peut persister (Pépin et al., 2009). Jenkison et ses collègues ont étudié 107 sujets atteints d'apnées obstructives avec un score d'Epworth >10. Parmi ces personnes, 53 ont reçu le traitement en ventilation par pression positive continue (thérapeutique) et 54 ont reçu le même traitement, mais à faible pression (sous-thérapeutique, 1 cm H₂O). Pour le premier groupe, le score d'Epworth est passé d'une moyenne de 15 à 7, alors que pour le second groupe

il a été peu modifié en passant de 15 à 13 (Jenkinson et al., 1999). Une autre étude sur 174 patients symptomatiques atteints d'apnées modérées à sévères (IAH >30 apnées/h) rapporte que la somnolence diurne disparaît chez seulement 50% des sujets après 3 mois de traitement (Antic et al., 2011), suggérant que la réponse au traitement est variable d'un individu à l'autre.

4.3) Apnée du sommeil et dysfonction métabolique

4.3.1) Apnée du sommeil et résistance à l'insuline

Le syndrome métabolique inclut une hyperinsulinémie, une obésité centrale, une dyslipidémie, une intolérance au glucose et une hypertension (Reaven, 1988). Ces facteurs liés au syndrome métabolique sont aussi connus comme « le syndrome de résistance à l'insuline » (Ip et al., 2002). La résistance à l'insuline est définie comme un défaut de réponse des cellules à l'insuline dû à l'insensibilisation des récepteurs membranaires conduisant à une augmentation du glucose plasmatique et à l'installation d'un diabète de type 2. Il est clairement démontré que la résistance à l'insuline prédispose au développement de certaines maladies cardiovasculaires (Haffner and Miettinen, 1997). Sachant que l'apnée du sommeil est associée à des problèmes cardiovasculaires, est-ce le cas également pour la résistance à l'insuline ? L'étude *Sleep Heart Health* rapporte que sur 2665 sujets suivis pendant 5 ans, un lien existe entre la sévérité de l'apnée du sommeil déterminée par l'IAH et le risque de développer une intolérance au glucose et potentiellement un diabète de type 2 indépendamment du sexe, de l'âge, de l'indice de masse corporelle et du tour de taille (Punjabi et al., 2004). Cependant, certains cliniciens ne sont pas convaincus que l'apnée du sommeil isolément conduise au développement d'un diabète de type 2 et pensent que l'association à l'obésité est nécessaire (Reichmuth et al., 2005). L'explication la plus plausible est que l'obésité est un facteur de risque pour le développement des apnées obstructives du sommeil et pour les dysfonctions métaboliques. L'apnée obstructive du sommeil exacerberait les risques métaboliques attribués à l'obésité (Dewan et al., 2015).

4.3.2) PPC et Diabète

Les études de l'effet de la ventilation en PPC sur le contrôle glycémique chez des sujets apnéiques ont donné des résultats mitigés. L'étude non randomisée de Harsch et ses collègues montre une amélioration de la sensibilité à l'insuline seulement deux jours après le traitement et reste stable après 3 mois de traitement, surtout chez des sujets moyennement obèses (<30 kg/m²) (Harsch et al., 2004). L'étude randomisée sur 42 patients diabétiques, nouvellement diagnostiqués apnéiques (IAH >10 apnées/heure) et somnolents (score Epworth ≥9) rapporte que les 22 sujets traités par PPC pendant 3 mois n'ont pas d'amélioration de la résistance à

l'insuline par rapport aux sujets non traités (West et al., 2007). Cependant, une autre étude randomisée sur 61 sujets chinois atteints d'apnées du sommeil modérées à sévères, rapporte que les 31 sujets traités par PPC ont une amélioration de la sensibilité à l'insuline par rapport aux 30 sujets non traités. Ces bénéfices sont surtout observés sur les 20 personnes ayant un indice de masse corporelle $> 25 \text{ kg/m}^2$ (Lam et al., 2010).

5) Épidémiologie

5.1) Facteurs de risques

Avant la description de quelques études épidémiologiques majeures, les principaux facteurs de risques de l'apnée du sommeil sont importants à connaître. Concernant l'apnée obstructive du sommeil, la prédispositions majeure est l'obésité (indice de masse corporelle $\geq 30 \text{ kg/m}^2$) une large circonférence du cou ($> 42 \text{ cm}$) et un rapport taille-hanche élevée (Rakel, 2009; Young et al., 2004). Plusieurs études épidémiologiques chez l'homme rapportent que la survenue d'apnées du sommeil est toujours augmentée chez les personnes avec un indice de masse corporelle élevé. Dans la « *Sleep heart health study* » pour un indice d'apnées / hypopnées situé entre 5 et 15 apnées/heure 41 % sont des sujets obèses (Young et al., 2002b). Une augmentation de 10 % du poids corporel augmente de 6 fois le risque de développer des apnées obstructives du sommeil modérées à sévères (Peppard et al., 2000a). De même, la perte de poids de façon chirurgicale ou naturelle chez une population obèse diminue la sévérité des apnées obstructives. Cette dernière constitue donc une bonne thérapie contre cette maladie (Young et al., 2002a). Également, les structures craniofaciale et des voies supérieures aériennes ont un rôle important dans la survenue de l'apnée obstructive (Young et al., 2004).

Les hommes sont deux à trois fois plus touchés que les femmes, mais la prévalence est faible chez les femmes non ménopausées et augmente après la ménopause (Table 1). Elles sont donc relativement protégées dans le développement des apnées obstructives et centrales même en présence des autres facteurs de risque (voir partie 5.3 pour plus de détails). La différence entre les hommes et les femmes a même tendance à s'estomper à la ménopause (Young et al., 2003). Une prévalence plus élevée est observée chez les femmes atteintes du syndrome des ovaires polykystiques (Pack, 2006). L'âge reste un facteur important (Bixler et al., 1998) tout comme les antécédents familiaux où le risque augmente d'un facteur situé entre 1.5 et 2 si un membre de la famille souffre déjà d'apnées du sommeil (Rakel, 2009). Un gène spécial, l'APOE epsilon

4 est associé avec une augmentation du risque d'être atteint d'apnées obstructives du sommeil chez les jeunes sujets (< 65 ans) (Gottlieb et al., 2004).

5.2) Population générale

Au cours de ces 30 dernières années, plusieurs études épidémiologiques ont été publiées. Cependant, la maladie reste toujours sous diagnostiquée. En effet, bien que la population ait accès facilement aux cliniques de sommeil, on estime que 80 % des personnes d'âge moyen (93% pour les femmes et 82% pour les hommes) ne sont pas diagnostiquées pour le syndrome d'apnée du sommeil alors qu'ils devraient l'être (Young et al., 1997b).

Nous allons décrire 3 études importantes qui ont eu lieu au cours des 3 dernières décennies.

En 1979, Block et ses collaborateurs publiaient la première étude épidémiologique en utilisant les enregistrements polysomnographiques nous montrant que les hommes affichaient une baisse de la saturations en O₂ artérielles plus importante que les femmes et positivement corrélée avec l'obésité et l'âge (Block et al., 1979). Toutefois, l'échantillonnage de cette étude était faible, seulement 30 hommes et 19 femmes ont été inclus, ne reflétant pas forcément la population générale.

L'IAH et la somnolence diurne sont les principales composantes utilisées pour réaliser les études épidémiologiques comme celle de la cohorte du Wisconsin en 1992. Cette étude nous permet de comprendre que le ronflement chez les hommes et les femmes est positivement corrélé avec un IAH élevé (> 15 apnées/heure). Les hommes ont entre 2 à 4 fois plus de chance d'être atteint par des désordres respiratoires du sommeil. En effet, 24 % des hommes et 9% des femmes subissent au mois 5 apnées ou plus par heure. Lorsque cela est associé à une somnolence diurne excessive (sommeil non récupérateur et somnolence incontrôlée qui interfèrent avec la vie quotidienne), alors 4 % des hommes et 2% des femmes sont atteints du syndrome d'apnées du sommeil (Young et al., 1993). Cependant, les sujets inclus dans cette cohorte sont des employés ayant un travail stable et souvent en meilleure santé que ceux n'ayant pas d'emploi, suggérant une sous-estimation des résultats obtenus.

Plus récemment, une étude réalisée en Suisse sur une cohorte issue de la population générale de la ville de Lausanne (HypnoLaus) rapporte des résultats différents. L'étude polysomnographique a été réalisée sur 2121 personnes (1024 hommes et 1097 femmes). Le désordre respiratoire majeur est l'hypopnée (75 %), suivie de l'apnée obstructive (24 %), de l'apnée centrale (4 %) et de l'apnée mixte (2 %). Les principaux facteurs de risque sont le sexe, l'âge, l'indice de masse corporelle et la présence de ronflement. Après ajustement de l'âge, du

sexe, de la consommation d'alcool et du tabagisme, la sévérité de l'IAH (> 20 apnées/heure) augmente le risque de développer un diabète de type 2 (+ 4.9 %) et de l'hypertension (+2.8 %) (Heinzer et al., 2015). Le **tableau I.1** permet de résumer différentes études épidémiologiques réalisées au cours de ces 25 dernières années.

Citation de l'étude	Prévalence AHI ≥ 5/h (%)	Prévalence AHI ≥ 15-20/h (%)	SAS (%)
<i>Young et al., 1992</i> (n=602)			
Homme	24.0	9.1	4.0
Femme	9.0	4.0	2.0
<i>Bixler et al., 1998</i> (n=741)			
Homme	17.0	5.6	3.3
Femme	NE	NE	NE
<i>Bixler et al., 2001</i> (n=1000)			
Toute femmes	NP	2.2	1.2
Préménopausées	NP	0.6	0.6
Postménopausées	NP	3.9	1.9
Avec HRT	NP	1.1	0.5
Sans HRT	NP	5.5	2.7
<i>Young et al., 2002</i> (n=589)			
Preménopausées	10.8	3.6	NP
Postménopausées	29.1	11	NP
<i>Heinzer et al., 2015</i> (n=2121)			
Homme (1024)			
< 60 ans	40	22	6.5
≥ 60 ans	25	33	2.5
Femme (1091)			
< 60 ans	32	10	44
≥ 60 ans	43	20	2.4

Tableau I.1 : Prévalence de l'apnée du sommeil et du syndrome d'apnées du sommeil chez la femme et chez l'homme selon les études réalisées entre 1992 et 2015.

Abréviation : AHI = Indice apnées / hypopnées. HRT = Hormonothérapie. NE= Non étudié. NP= Non présenté. SAS = Syndrome d'apnée du sommeil. NP= Non présenté.

5.3) Ménopause et apnée du sommeil

La majorité des études épidémiologique conclut aux mêmes résultats : les hommes sont plus enclins à développer de l'apnée du sommeil que les femmes (Bixler et al., 2001; Block et al., 1979; Saaresranta et al., 2015; Young et al., 1993).

La ménopause, une période associée à une cessation des cycles ovariens conduisant à une diminution des hormones stéroïdiennes circulantes (voir partie III pour plus de détails). Il se produit une augmentation de la survenue d'apnées du sommeil (Krystal et al., 1998). Deux études épidémiologiques au début des années 2000 vont dans ce sens. Celle de la *Wisconsin sleep cohort* rapporte que 29 % des femmes ménopausées ont un IAH >5 apnées/heure alors que seulement 10 % des femmes non ménopausées exhibent le même index. Un IAH >15 apnées/heure est retrouvé chez 11 % des femmes ménopausées contre 3,6 % des femmes non ménopausées (Young et al., 2003). La seconde étude examinant la cohorte des comtés de « *Dauphin and Lebanon* » en Pennsylvanie s'est concentrée sur le syndrome d'apnées du sommeil, définit ici par un IAH >10 apnées/heure associé à un symptôme journalier comme de l'hypertension ou de la somnolence diurne. Chez ces femmes, il a été détecté seulement des apnées obstructives du sommeil (pas d'apnées centrales du sommeil) et sont plus élevées chez les femmes postménopausées (1,9 %) par rapport à celles non ménopausées (0,6 %) (Bixler et al., 2001). Les observations de ces études suggèrent deux hypothèses (Krystal et al., 1998) :

- Les hormones stéroïdiennes féminines sont protectrices contre la survenue des apnées du sommeil.
- La ménopause conduit à une distribution de la graisse qui prédispose les femmes à développer des apnées du sommeil.

Netzer et ses collègues rapportent en 2003 que le taux plasmatique des hormones sexuelles féminines (progestérone et estradiol) est plus faible chez les femmes ayant un fort index apnéique, concluant que la réduction des hormones sexuelles chez la femme était associée à une augmentation de la probabilité de survenue d'apnées obstructives du sommeil (Netzer et al., 2003). Cette observation est confirmée plus récemment par la mesure des quantités d'estradiol dans le sang de femmes ménopausées souffrant d'apnées obstructives. Les niveaux sont plus faibles que les femmes ménopausées ne souffrant pas d'apnées obstructives du sommeil (Galvan et al., 2017). Le questionnaire de Berlin est un simple instrument épidémiologique permettant d'évaluer le risque de développer de l'apnée obstructive en se basant sur le ronflement, la somnolence diurne, l'obésité et l'hypertension (Netzer et al., 1999). L'utilisation de ce questionnaire sur 1254 femmes localisées sur tout le continent américain

rapporte que le risque de développer de l'apnée obstructive est de 38 % pour les femmes âgées entre 50-64 ans contre 19 % pour celles âgées entre 18-29 ans ([Kapsimalis and Kryger, 2009](#)). Le remplacement hormonal conduit à des effets bénéfiques contre les apnées du sommeil. Un traitement combiné d'estradiol et d'acétate de medroxyprogésterone pendant sept jours réduit de 71 % les désordres respiratoires du sommeil sans modification dans l'apparition des microéveils ([Pickett et al., 1989](#)). En 2002, sur la « *Wisconsin sleep cohort* », il a été rapporté que le remplacement hormonal à base d'estradiol et de progestérone permet de diminuer de 30 % l'indice d'apnée du sommeil ([Shahar et al., 2003](#)). Ces résultats sont assez similaires à ceux de la cohorte de « *Dauphin and Lebanon* » en Pennsylvanie ([Bixler et al., 2001](#)). Malgré de nombreuses preuves suggérant un effet protecteur des hormones sexuelles féminines, l'étude de Cistulli et ses collègues ne trouve aucune amélioration sur les apnées obstructives du sommeil que ce soit avec un traitement de 3 jours à base d'estradiol seul ou combiné avec de la progestérone ([Cistulli et al., 1994](#)).

5.4) Conclusion

L'apnée du sommeil est un problème de santé publique, caractérisé par l'apparition de comorbidités cardiovasculaires, neurologiques et métaboliques. Les personnes atteintes d'apnées du sommeil sont affectées au quotidien dans leurs vies. De plus, cette maladie est sous diagnostiquée malgré les nombreuses cliniques de sommeil existantes. La ménopause constitue un facteur de risque important pour la femme dans le développement de l'apnée du sommeil. Les mécanismes à l'origine de cette augmentation sont peu clairs et le remplacement hormonal ne nous indique pas, par quels mécanismes, les effets protecteurs de l'estradiol agissent.

II) Modèles d'apnées du sommeil chez l'animal : mécanismes physiologiques cellulaires et moléculaires

Plusieurs sociétés scientifiques recommandent l'utilisation de modèles animaux afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans l'apnée du sommeil et ses conséquences associées. Le modèle de Fletcher est le plus couramment utilisé sur les cellules ou sur animal entier lorsque l'on veut comprendre les mécanismes associés à l'apnée du sommeil ([Fletcher et al., 1992c](#)).

1) Mimer l'apnée du sommeil chez l'animal : les différents modèles

1.1) Hypoxie Intermittente Chronique

Comme son nom l'indique, l'hypoxie intermittente (HI) consiste à soumettre l'animal à des cycles répétés d'hypoxie entrecoupés par des périodes de normoxie, on parle d'hypoxie-réoxygénation. Cela conduit à une baisse de la saturation en oxygène artérielle (SaO_2) qui varie entre 60 et 80 % selon le modèle d'HI utilisé (**figure I.6**), mimant ce qui se produit chez les sujets souffrant d'apnées du sommeil ([Dewan et al., 2015](#)). Ces cycles d'HI peuvent être très différents d'un protocole à l'autre. En effet selon le protocole choisi des effets néfastes ou bénéfiques peuvent se produire. Nous n'allons pas discuter ici des effets bénéfiques de l'HI mais il faut savoir que si le nombre de cycles par jour d'hypoxie-réoxygénation est faible (moins de 15 cycles) et si la sévérité de l'hypoxie est faible ($> 15\%$ d'oxygène dans l'air inspiré), des effets souvent bénéfiques seront observés sur les paramètres cardiovasculaires, respiratoires, neurologiques et métaboliques ([Navarrete-Opazo and Mitchell, 2014](#)). Cependant, l'apnée du sommeil conduit systématiquement à des effets néfastes, c'est pour cela que le protocole d'HI doit être choisi en conséquence. Un protocole d'HI dépend de plusieurs variables qui peuvent s'ajuster selon la sévérité que l'on recherche. Ces variables sont au nombre de cinq selon ([Navarrete-Opazo and Mitchell, 2014](#)) :

- 1) La sévérité de l'hypoxie ($\%\text{O}_2$ dans l'air inspiré)
- 2) La durée de la phase hypoxique.

- 3) Le nombre de cycles d'hypoxie-réoxygénation par jour.
- 4) La durée totale de l'exposition à l'HI (de quelques jours à plusieurs mois).
- 5) Le patron du protocole d'HI (c'est-à-dire pendant des jours consécutifs où des jours alternés)

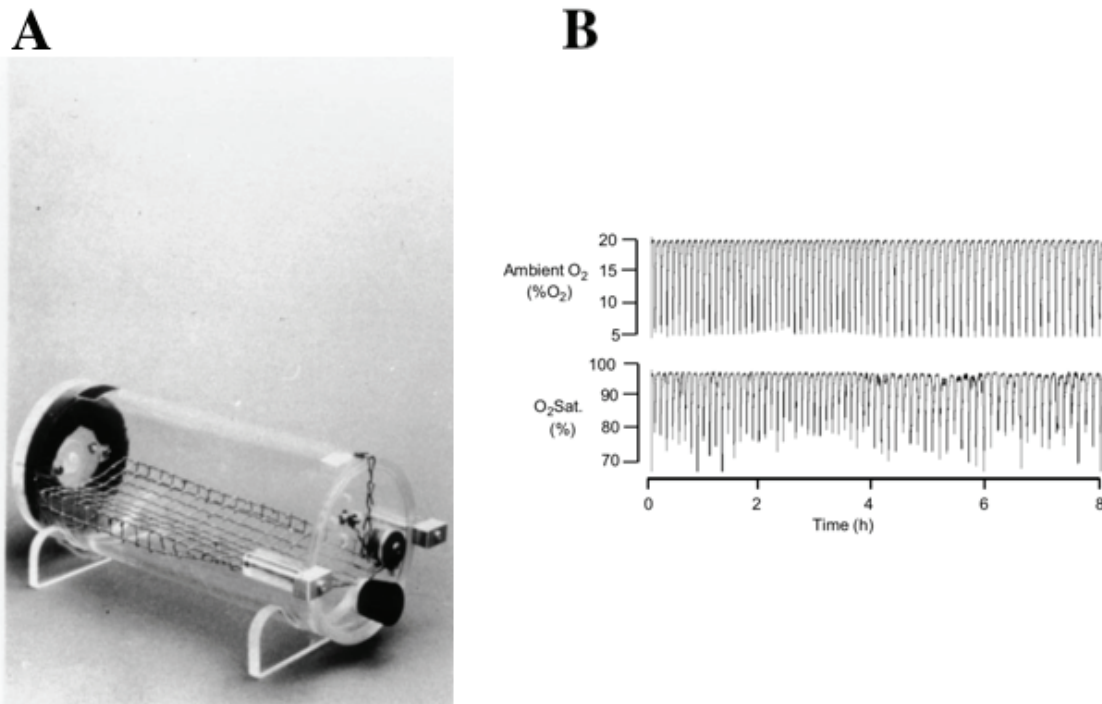


Figure I.6 : Exemple d'une chambre d'hypoxie intermittente

Chambre d'hypoxie intermittente de Fletcher (A) permettant de contrôler le niveau d'O₂ inspiré et d'induire une désaturation artérielle en oxygène (B). D'après Fletcher et al., 1991 et Peng et al., 2013.

Pour Lim et ses collègues, il faudrait rajouter une dernière variable importante pour mimer au mieux l'apnée du sommeil et plus précisément l'apnée obstructive du sommeil. C'est pouvoir contrôler la vitesse de réoxygénation. Habituellement elle a lieu en 90 secondes, mais pour être au plus proche des personnes souffrants d'apnées obstructives du sommeil, il faudrait qu'elle soit de 15 secondes (Lim et al., 2015).

La sévérité de l'hypoxie associée à un nombre de cycles par jour élevé conduit majoritairement à des effets pathologiques. Au cours de ces 30 dernières années des dizaines de protocoles d'HI différents conduisant à des effets néfastes ont été utilisés (figure I.7). Comme pour l'homme, les animaux exposés en HI exhibent les mêmes manifestations systémiques (neurocognitives, cardiovasculaires et métaboliques).

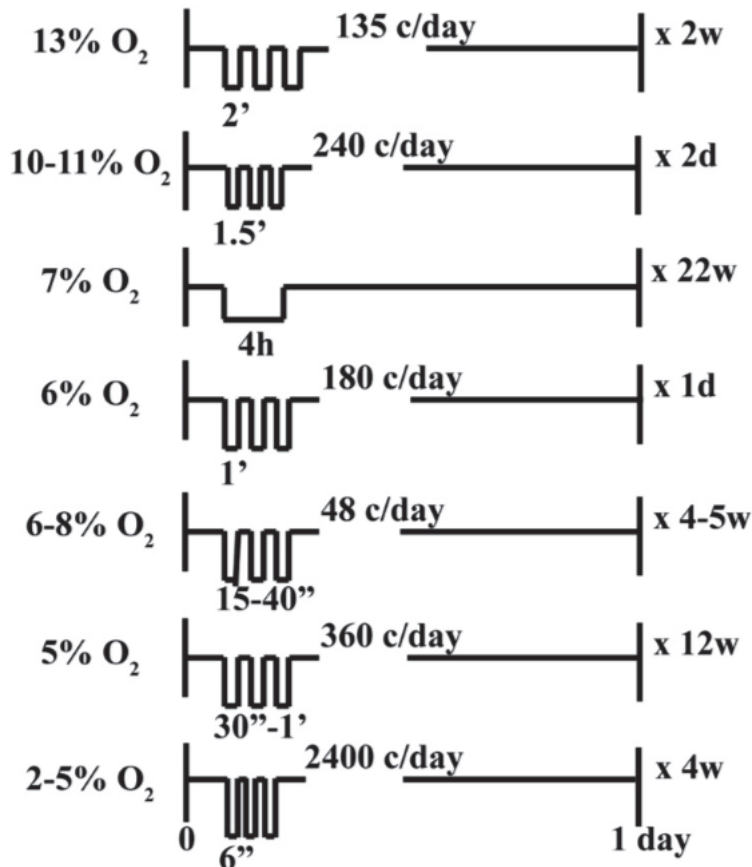


Figure I.7 : Protocoles d'hypoxie intermittentes induisant des effets délétères

On retrouve pour chaque protocole la sévérité de l'hypoxie durant chaque épisode (**à gauche**), la durée totale d'exposition en jours (d) ou en semaine (w) (**à droite**), la durée de chaque cycle (en bas) et le nombre de cycles par jour (**en haut**). *D'après Navarrete-Opazo and Mitchell, 2014*

1.2) Le ballon trachéal

Bien que l'on va surtout s'intéresser au modèle d'HI de Fletcher ([Fletcher et al., 1992c](#)), que j'ai utilisé lors de mes travaux de thèse, il est pertinent de rappeler qu'il existe un autre modèle développé en 2011 par Schoorlemmer et ses collègues afin de mimer les apnées obstructives du sommeil observées chez l'homme ([Schoorlemmer et al., 2011](#)). Un ballon gonflable inséré dans un tube rigide en téflon est implanté dans la trachée des rats permettant l'induction d'apnées sans causer de douleur à l'animal (**figure I.8**). La durée et la fréquence des apnées sont facilement contrôlables.

Les avantages de ce modèle pour les auteurs par rapport au modèle d'HI de Fletcher sont que :

- Le ballon induit des efforts respiratoires caractéristiques de l'apnée obstructive du sommeil.

- ¶ Le ballon induit une hypercapnie causée par les apnées qui est non retrouvée en HI, (même si de nos jours on est capable d'avoir des modèles d'hypoxie/hypercapnie intermittente (Douglas et al., 2010)).
- ¶ L'apnée obstructive chez l'homme induit des microéveils qu'on ne retrouve pas dans le modèle d'HI.

Ce modèle est très peu utilisé par rapport à l'HI, il est très invasif et demande une chirurgie lourde. Cependant, il est plus proche de l'apnée obstructive du sommeil observée chez l'homme en provoquant également les mêmes conséquences systémiques comme une élévation de la pression artérielle (Ferreira et al., 2015; Schoorlemmer et al., 2011).

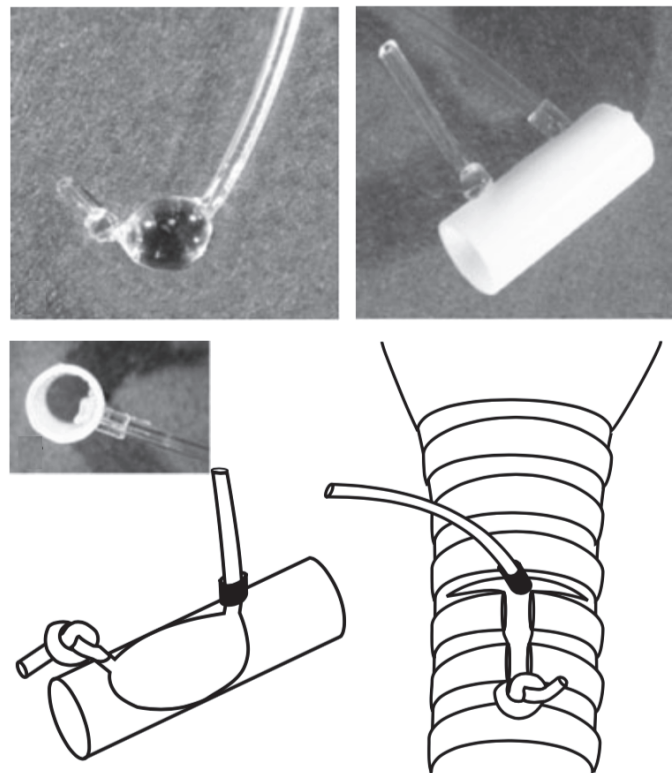


Figure I.8 : Méthode du ballon trachéal pour mimer les apnées du sommeil

Un tube de teflon est implanté dans la trachée contenant un ballon qui peut être gonflé, permettant de mimer des apnées obstructives. *D'après Schoorlemmer et al., 2011*

2) Conséquences systémiques

2.1) Hypertension

Il est maintenant bien établi que chez l'homme l'apnée du sommeil conduit à une élévation de la pression artérielle. Les preuves actuelles montrent que l'hypoxémie répétée est la cause majeure de l'hypertension (Dewan et al., 2015).

Dans le modèle développé par Fletcher, l'animal est placé dans une chambre cylindrique en plexiglas où des cycles répétés d'hypoxie-réoxygénations sont réalisés (20-5 % d'O₂-7 heures) pendant 35 jours consécutifs. La saturation artérielle en oxygène atteint 70 % (entre 60 et 80 %). La pression artérielle est mesurée de façon non invasive (brassard à la queue) et invasive (cathéter dans l'artère fémorale). Quelle que soit la méthode utilisée, la pression artérielle augmente dans les deux cas, +22 mmHg pour la méthode non invasive et + 13.7 mmHg pour la méthode invasive (Fletcher et al., 1992c). Cette première étude suggère que l'hypoxémie artérielle est le moteur clé de l'élévation de la pression artérielle. La même chose a été prouvée un peu plus tard chez un modèle canin, où l'apnée obstructive est mimée par une valve obstruant par intermittence les voies aériennes supérieures pendant une période de 1 à 3 mois, causant une augmentation de la pression artérielle (Brooks et al., 1997). Toutefois, lorsque seulement la fragmentation du sommeil est mimée par induction de microéveils, on n'observe pas d'élévation de la pression artérielle (Brooks et al., 1997). C'est donc bien l'hypoxémie artérielle et non la fragmentation du sommeil qui est responsable de l'apparition de l'hypertension qui persiste pendant plusieurs semaines après l'arrêt du protocole d'HI (Fletcher, 2001; Prabhakar, 2001; Prabhakar et al., 2005). Le modèle d'HI de Fletcher est donc un excellent modèle mimant les conséquences liées à l'apnée du sommeil, car il provoque bien une hypertension artérielle. Il est à ce jour très bien accepté par la communauté scientifique. Les différents modèles d'HI induisant une hypertension chez le rat sont présentés **Table I.2**

Citation de l'étude	Modèle HI	Méthodes	Δ mmHg
<i>Fletcher et al., 1992</i>	21-3-5 % O ₂ , 7h/jour, 35 jours	Brassard queue	+22
<i>Hui et al., 2003</i>	21-10 % O ₂ , 30 jours	Télémétrie	+10
<i>Joyeux-Faure et al., 2005</i>	21 -3-5 % O ₂ , 7h/jour, 35 jours	Cathéter artère fémorale	+11.3
<i>Kumar et al., 2006</i>	21 -3-5 % O ₂ , 7h/jour, 35 jours	Cathéter aorte abdominale	+11

Tableau I.2 : Différents protocoles d'hypoxie intermittente induisant des changements de la pression artérielle chez le rat.

Depuis, de nombreuses études ont utilisé l'HI pour comprendre les mécanismes responsables de l'hypertension artérielle chez les personnes apnéiques, voir revue de ([Prabhakar et al., 2015](#)). Il demeure néanmoins nécessaire de se questionner par quels mécanismes l'HI induit cette élévation de pression artérielle.

2.2) Les mécanismes systémiques responsables de l'hypertension

À ce jour, les mécanismes par lesquels l'HI provoquent l'élévation de la pression artérielle semblent plutôt bien connus. Un acteur joue un rôle déterminant, c'est l'activation du système nerveux sympathique en réponse à l'augmentation de la sensibilité du chémoréflexe artériel périphérique.

2.2.1) Système nerveux sympathique et contrôle cardiovasculaire.

Le système nerveux sympathique et parasympathique font partie du système nerveux autonome qui commande les fonctions automatiques et involontaires des organes et des glandes de l'organisme. Nous n'allons pas rentrer dans les détails du système nerveux autonome, mais il est nécessaire de comprendre le rôle que joue le système nerveux sympathique dans le contrôle cardiovasculaire.

L'activité sympathique est médiée par deux neurotransmetteurs de la famille des catécholamines, l'adrénaline et la noradrénaline. La synthèse des catécholamines a lieu dans les terminaisons synaptiques par une série de réactions enzymatiques. Les neurotransmetteurs sont stockés dans des vésicules puis libérés dans la fente synaptique en réponse à un potentiel d'action pour agir sur des récepteurs adrénergiques ([Serratrice et al., 2012](#)) situés sur les parois des vaisseaux sanguins, sur les cellules cardiaques, ou autres tissus cibles.

Les effets du système nerveux sympathique s'exercent à travers différentes voies (**figure I.9**) :

- Un effet direct sur les sphincters artériolaires précapillaires par la libération de noradrénaline pour produire un effet vasoconstricteur.
- Un effet sur la médullosurrénale conduisant à la libération d'adrénaline (90 %) et de noradrénaline (10 %) dans la circulation générale pour agir sur le myocarde et les vaisseaux sanguins.
- La libération de noradrénaline au niveau du cœur permet d'augmenter la fréquence cardiaque et de la force de contraction myocardique ([Kobayashi et al., 2013](#)).
- Les autres tissus cibles incluent le foie, les muscles, le système digestif, ou le tissu adipeux, mais ils ne seront pas abordés dans le cadre de cette thèse.

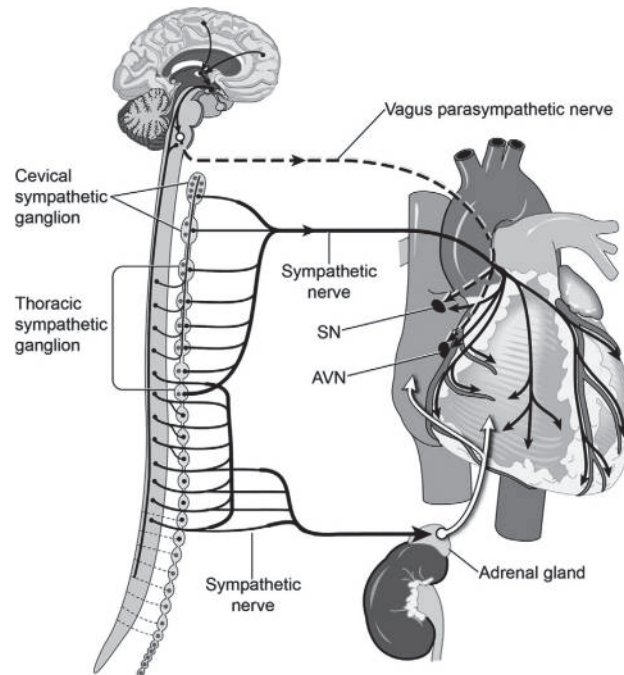


Figure I.9 : Innervation du cœur et de la glande surrénale par le système nerveux autonome
 SN, Nœud sinusal; AVN, Nœud atrioventriculaire. D'après Kobayashi et al., 2011

2.2.2) Le chémoréflexe artériel périphérique

Un des modulateurs importants qui permet l'activation du système nerveux sympathique en réponse à l'hypoxie est le chémoréflexe artériel périphérique.

Afin d'assurer des échanges gazeux adaptés aux besoins métaboliques, il existe des senseurs capables de détecter les pressions d'O₂ et de CO₂ dans le sang artériel. Le corps carotidien est le principal chémorécepteur périphérique sensible aux variations du contenu du sang artériel en O₂ (PaO₂). Les chémorécepteurs centraux sont surtout sensibles au CO₂ et sont essentiellement localisés au niveau ventral du bulbe rachidien, dans le noyau rétrotrapézoïde (RTN), et dans d'autres groupes neuronaux (noyaux du raphé médian) (Nattie and Li, 2012).

Le corps carotidien est un organe bilatéral, situé de chaque côté au niveau de la bifurcation de l'artère carotide commune, entre les artères carotide interne et externe (**figure I.10 A**). Il est considéré comme polymodal, car sensible à plusieurs stimulus. Outre l'hypoxie, il est sensible à l'hypercapnie, à l'acidose, à la température, ou aux fluctuations physiologiques de l'osmolarité (Peers et al., 2010). Les corps carotidiens sont constitués de deux types cellulaires. Les cellules de type 1 ou cellules glomiques (cellules nerveuses) sont entourées de cellules de type 2 qui représentent un réservoir de cellules souches capables de se transformer en cellules de type 1 (**figure I.10B**) (Prabhakar and Peers, 2014). Il est clairement établi que les cellules de type 1 sont le site de détection de la variation du contenu artériel en O₂ ; elles contiennent plusieurs neurotransmetteurs (acétylcholine, dopamine, noradrénaline, ATP) stockés dans des

vésicules et sont en contact synaptiques avec des fibres sensorielles afférentes du nerf du sinus carotidien (Prabhakar, 2000)

L'hypoxie induit une dépolarisation de la membrane des cellules chémosensibles de type de 1 et provoque l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants (Ca^{2+} VD). Le calcium extracellulaire entre alors dans la cellule en suivant son gradient électrochimique, ce qui déclenche la sécrétion des vésicules de neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Les neurotransmetteurs vont stimuler les fibres nerveuses afférentes du nerf du sinus carotidien (nerf de Herring) qui se projette au niveau des neurones du noyau du tractus solitaire (NTS) situés dans le tronc cérébral (Finley and Katz, 1992). Ces neurones répondent en stimulant à leur tour les centres respiratoires du tronc cérébral, qui à travers le nerf phrénique ou les nerfs intercostaux contrôlent les muscles respiratoires. Ceci entraîne une augmentation de la ventilation, que l'on dénomme « réponse ventilatoire à l'hypoxie » (RVH) ayant pour but de limiter une chute trop importante de la PaO_2 . (Prabhakar, 2000). Par la suite, pour des soucis de simplification on parlera de chémoréflexe pour désigner le chémoréflexe artériel périphérique.

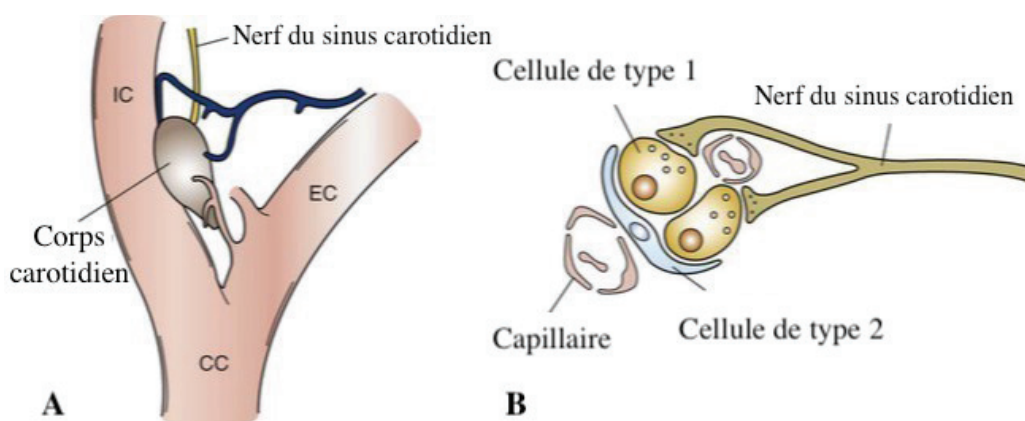


Figure I.10 : Représentation schématique d'un corps carotidien

Le corps carotidien est localisé à la bifurcation de l'artère carotide commune (CC) entre les artères carotides interne (IC) et externe (EC) (A) Il est constitué de cellules de type 1 chémosensibles et de cellule de type 2. Les cellules de type 1 libèrent des neurotransmetteurs dans la fente synaptique au contact du nerf du sinus carotidien. D'après Kobayashi et al., 2011

Outre la régulation de la ventilation, le chémoréflexe artériel permet de réguler les fonctions cardiovasculaires autonomiques. En effet, le NTS relaye aussi les informations des chémorécepteurs périphériques vers des sites sympathoexcitateurs tels que les neurones de la région C1 du bulbe rostral ventrolatéral (RVLM) ou le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (Sunderram and Androulakis, 2012). Il en résulte une augmentation de la décharge sympathique qui module la circulation sanguine et les échanges gazeux au niveau tissulaire.

2.2.3) Activation du corps carotidien et de l'activité sympathique par l'HI.

L'élévation de la pression artérielle systémique obtenue après les protocoles d'HI est associée à une augmentation de l'activité sympathique induite par une modification de la fonction du corps carotidien (Fletcher, 2001; Neubauer, 2001; Prabhakar, 2001). Voici dans l'ensemble les étapes qui se produisent entre l'exposition de l'animal à un protocole d'HI jusqu'à l'élévation de la pression artérielle systémique. Les mécanismes cellulaires et moléculaires seront décrits dans un prochain chapitre.

a- Réponse des chémorécepteurs périphériques :

L'exposition à l'HI chez plusieurs espèces incluant le rat, le chat et la souris augmente l'activité des afférences chémosensibles du nerf du sinus carotidien en réponse à une hypoxie aiguë (Del Rio et al., 2010; Fletcher, 2001; Peng et al., 2014, 2006, Peng and Prabhakar, 2004, 2003; Prabhakar, 2001; Prabhakar et al., 2015; Rey et al., 2004) mais pas à une hypercapnie aiguë (Peng and Prabhakar, 2004; Prabhakar et al., 2007a). De plus, l'HI induit une forme de plasticité fonctionnelle dénommée « facilitation sensorielle à long terme » (sLTF –sensory long term facilitation). Elle permet de maintenir en normoxie une activité chémosensorielle élevée même après l'arrêt de l'exposition à l'HI (Peng et al., 2003). Cet effet est réversible lorsque l'animal est réexposé quelques jours en normoxie, et se produit sans changement de la morphologie du corps carotidien (Peng et al., 2003; Prabhakar et al., 2007a). L'augmentation de la réponse à l'hypoxie et la sLTF est un phénomène propre à l'HI car l'exposition à une hypoxie maintenue constante de plusieurs heures n'induit pas la sLTF (Peng et al., 2003; Peng and Prabhakar, 2004). Il apparaît donc que l'HI est responsable de la mise en place de la sLTF.

L'implication du corps carotidien dans la régulation de la pression artérielle systémique a été suggérée par des études employant la chémodénervation par section du nerf du sinus carotidien. Elle permet d'éviter l'augmentation de la pression artérielle systémique chez des rats soumis à un protocole d'HI (Fletcher et al., 1992a; Lesske et al., 1997). De même, l'ablation des corps carotidiens par le froid prévient l'apparition d'une hypertension artérielle systémique chez le rat (Peng et al., 2014). Enfin, l'ablation des corps carotidiens chez des rats exposés pendant 21 jours à une HI (5 % O₂, 8h/jour, 30 jours), prévient l'augmentation de la pression artérielle systémique lorsque l'HI se maintient pendant 7 jours supplémentaires (Del Rio et al., 2016). L'élévation de pression artérielle systémique obtenue par l'HI est donc un phénomène complètement réversible. Le corps carotidien apparaît comme un organe essentiel dans la mise en place de l'hypertension artérielle induit par l'HI.

b- Implication du NTS:

Les informations venant de la sensibilisation par l'HI du corps carotidien à travers le nerf de Herring jusqu'au système nerveux central sont primordiales dans les changements sympathiques subséquents. Le site primaire d'intégration des fibres nerveuses afférentes des chémorécepteurs artériels périphériques est la partie commissurale du NTS (Finley and Katz, 1992; Zhang and Mifflin, 1993). La protéine *c-fos* est régulièrement utilisée comme un index de l'activation neuronale. Des rats exposés pendant 30 jours à une HI (21-7 % O₂, 8h/jour) montrent une augmentation du marquage *c-fos* dans la partie commissurale du NTS ainsi que les zones responsables de la sympathoexcitation situées dans le bulbe rachidien telles que les aires C1 adrénergiques et A1 noradrénergiques de la RVLM et les aires de la formation réticulée et du noyau raphé (Greenberg et al., 1999). Une étude plus récente réalisée sur des rats implantés avec des ballons trachéaux rapporte une augmentation du marquage *c-fos* dans les parties du bulbe rachidien impliquées dans le contrôle cardio-respiratoire comme la partie caudale du NTS, la RVLM et le pont (Ferreira et al., 2015). La ligature bilatérale de l'artère du corps carotidien (CBA) conduit à l'inactivation des corps carotidiens. Il en résulte une moins grande activation des neurones de la partie commissurale du NTS par rapport à des rats intacts, suggérant un rôle primordial des corps carotidiens dans l'activation de ces zones (NTS, RVLM) en HI (Ferreira et al., 2015).

c- Activation sympathique:

Ces zones (NTS, RVLM) fournissent des excitations synaptiques aux neurones pré ganglionnaires sympathiques de la moelle épinière (Sunderram and Androulakis, 2012). Les rats exposés en HI montrent une élévation de l'activité sympathique (Prabhakar et al., 2015). La dénervation sympathique de l'artère rénale chez des rats soumis à une HI prévient l'élévation de la pression artérielle systémique (Bao et al., 1997). La même observation a été montrée en réponse à l'administration d'un agent pharmacologique (6-hydroxydopamine) qui bloque l'activité sympathique (Fletcher et al., 1992b; Lesske et al., 1997).

d- Libération catécholaminergique

La résultante de l'augmentation de l'activité sympathique est l'élévation de la quantité des catécholamines circulantes (adrénaline et noradrénaline) libérées par les terminaisons nerveuses sympathiques et par la médullosurrénale. L'exposition à une HI chez des rats pendant 35 jours (21-3 % O₂, 8h/jour) augmente la pression artérielle systémique et la quantité moyenne d'adrénaline et de noradrénaline circulante (Bao et al., 1997). L'ablation de la médullosurrénale permet de réduire la quantité des catécholamines circulantes et prévient l'élévation de la pression artérielle systémique (Bao et al., 1997; Lesske et al., 1997).

e- Résumé :

Pour résumer, l'HI chez l'animal conduit à une sensibilisation de la fonction des cellules chémoréceptrices du corps carotidien. Les régions (NTS, RVLM) impliquées dans le contrôle cardio-respiratoire répondent en augmentant l'activité sympathique. Il se produit une augmentation de la libération des catécholamines dans la circulation générale à travers la libération d'adrénaline par la glande médullosurrénale et directement au contact des vaisseaux par les fibres efférentes noradrénergiques. L'ensemble conduit à l'augmentation de la vasoconstriction des vaisseaux et à l'élévation de la pression artérielle systémique.

De plus, il est important de savoir que la sensibilisation des corps carotidiens ne conduit pas seulement à une élévation de la pression artérielle systémique. L'activation du NTS par l'HI augmente la réponse ventilatoire à l'hypoxie contribuant à rendre le système de contrôle respiratoire moins stable (Prabhakar, 2001) et à favoriser la survenue des apnées du sommeil (Edge et al., 2012). On parle par conséquent de troubles cardio-respiratoires induits par l'HI.

2.2.4) Chez l'homme : mêmes mécanismes ?

Dans la partie I, il a été rapporté que l'apnée du sommeil induit une hypertension artérielle systémique chez l'homme (voir partie 4.1.1) tel qu'observée chez l'animal exposé en HI. Il est à noter que chez des sujets atteints d'apnées obstructives du sommeil on observe que :

- a) La réponse ventilatoire à l'hypoxie évaluée est plus élevée que chez des sujets sains, sans affecter la réponse ventilatoire à l'hypercapnie (Narkiewicz et al., 1999). L'ablation des corps carotidiens prévient le développement de l'hypertension. (Somers and Abboud, 1993).
- b) L'activité sympathique est plus élevée durant l'éveil et ne diminue pas lors du sommeil. L'hypertension artérielle systémique est réversible avec un traitement par pression positive continue (Somers et al., 1995).
- c) Le niveau des catécholamines plasmatiques et urinaires (adrénaline et noradrénaline) est plus élevé. Ce niveau est positivement corrélé avec l'index d'apnées/hypopnées (>30 évènements/heure) (Vardhan and Shanmuganandan, 2012).
- d) La quantité de certaines hormones vasoactives comme l'angiotensine II et la rénine augmentent. L'angiotensine II plasmatique étant même positivement corrélée avec la pression artérielle systémique. L'application d'une pression positive continue sur les voies aériennes (masque nasal) réduit la pression artérielle et diminue l'activité du système rénine-angiotensine.

Il existe donc une similarité des mécanismes avec le modèle d'HI qui nous conforte une fois de plus sur l'importance de l'utilisation de ce modèle pour comprendre les mécanismes associés aux conséquences de l'apnée du sommeil. Une figure bilan est présentée **figure I.11**.

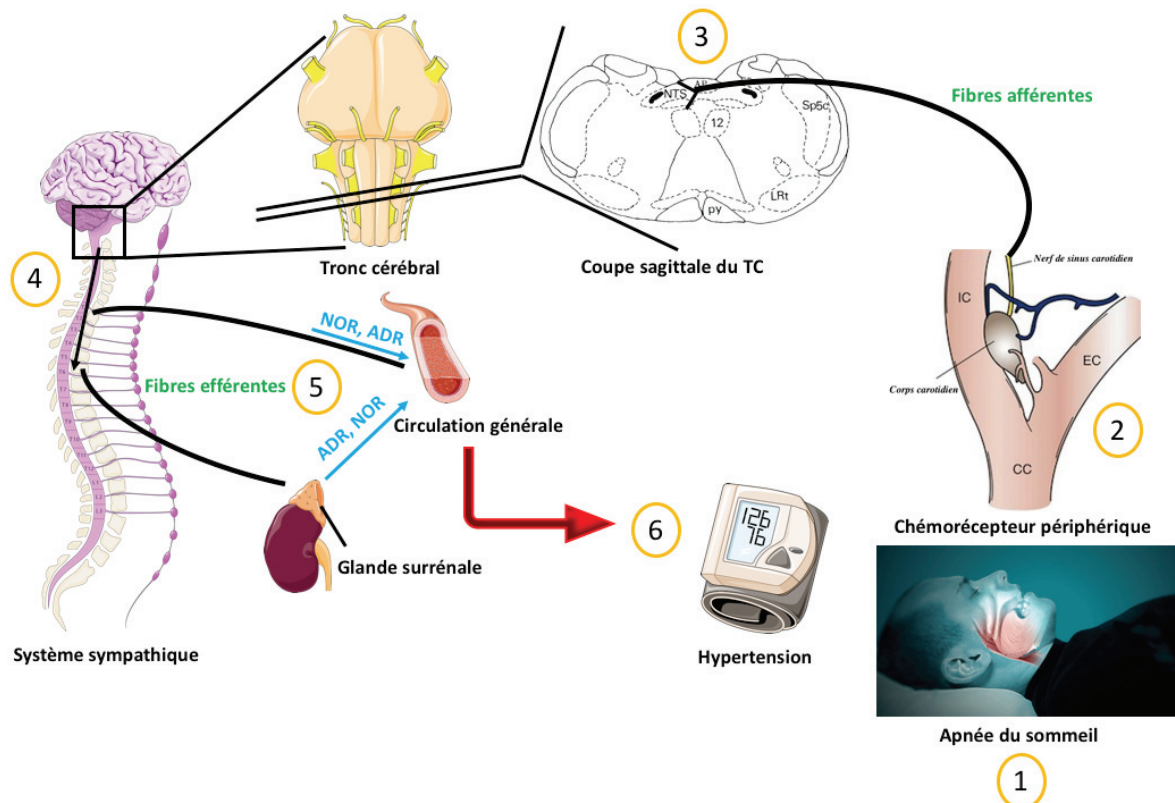


Figure I.11 : Mécanismes de l'installation de l'hypertension artérielle systémique induite par l'apnée du sommeil

L'apnée du sommeil (1) sensibilise les chémorécepteurs périphériques, principalement les corps carotidiens (2). Le nerf du sinus carotidien innerve le NTS dans le tronc cérébral (3). Le NTS répond en activant des zones sympatoexcitatrices localisées dans la RVLM conduisant à une augmentation de l'activité sympathique (4). La libération des catécholamines par les fibres afférentes et la médullosurrénale (5) conduit à l'élévation de la pression artérielle systémique (6).

2.3) Altérations neurocognitives

2.3.1) La Somnolence diurne

L'évaluation de la somnolence chez l'animal est possible avec l'implantation d'électrodes EEG et l'utilisation d'un test de latence à l'endormissement équivalent à celui utilisé chez l'homme (TILE) (Veasey et al., 2004b). Chez la souris, on mesure la propension à s'endormir à travers 4 opportunités de sieste. Deux études utilisant le même protocole d'HI de 8 semaines (21-10 % O₂ -10 heures/jour) rapportent une augmentation de la somnolence par rapport aux souris contrôles laissées en normoxie (Veasey et al., 2004a; Zhan et al., 2005).

2.3.2) L'apprentissage spatial.

L'exposition à l'HI (21-10 % O₂ 14 jours-8h/jours) conduit les rats à un déficit d'apprentissage spatial et de mémorisation d'une nouvelle tâche évalués par le test de Morris (*Morris water maze*), qui est partiellement réversible après la remise des animaux 14 jours en normoxie (Gozal et al., 2001). Ce déficit cognitif est en partie dû à une augmentation de l'apoptose (mort cellulaire programmée) dans des structures impliquées dans l'apprentissage et la mémorisation. Parmi ces structures, on retrouve le cortex fronto-pariétal et la région CA1 de l'hippocampe, mais pas la région CA3. Dans la région CA1, on retrouve également une diminution des récepteurs glutaminergiques NMDA, suggérant un processus excitotoxique du glutamate dans cette région (Gozal et al., 2001).

2.4) Conclusion

Les changements cycliques d'hypoxie-réoxygénation, similaire à ce qui est observé durant l'ischémie-réperfusion est la cause principale des manifestations systémiques cardiovasculaires et neurocognitives chez l'animal. Au niveau cellulaire, ils contribuent à une augmentation du stress oxydatif à travers la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS-*reactive oxygen species*), une abréviation qui sera utilisée pour la suite de l'écriture.

3) Le stress oxydatif : acteur cellulaire majeur dans l'HI

3.1) Les espèces réactives de l'oxygène et le stress oxydatif

3.1.1) Définition

Dans des conditions physiologiques normales, il existe une homéostasie entre la production des ROS et leur élimination par des systèmes de défense antioxydante. Un maintien de la balance redox (oxydation-réduction) est impératif pour réguler différentes fonctions cellulaires (Dröge, 2002). Lorsqu'il se produit un déséquilibre entre les systèmes pro-oxydants et les mécanismes de défense, on parle de « stress oxydant » (Halliwell B, 2001; Turrens, 2003). Un stress oxydant peut résulter :

- D'un niveau de production de ROS anormalement élevé et/ou :
- D'une insuffisance des défenses antioxydantes et/ou :
- D'une libération d'ions métalliques (fer et cuivre).

Un radical libre est une espèce chimique (atome, molécule ou ion) possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche de valence. La présence d'un électron célibataire rend les radicaux chimiquement instables, permettant leurs interactions avec les macromolécules constitutives de la cellule. Par exemple, l'oxygène est capable de capter un électron pour être réduit en radical superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (**figure I.12**). Les principales espèces réactives de l'oxygène couramment évoquées sont l'anion (ou radical) superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($\text{OH}^{\bullet}$).



Les ROS sont les espèces décrivant à la fois les radicaux libres de l'oxygène ($O_2^{\bullet-}$ et $OH^{\bullet}$) ainsi que leurs dérivés réactifs non radicalaires (H_2O_2 , O_3). Une description détaillée des différentes ROS existantes se trouve dans la revue de (Evans and Halliwell, 1999), qui rapporte

que toutes les espèces radicalaires sont des ROS mais toutes les ROS ne sont pas des radicaux de l'oxygène (Evans and Halliwell, 1999; Halliwell, 2006a; Halliwell and Gutteridge, 2015). La réactivité des ROS est très variable. Elle dépend de sa demi-vie et de son lieu de production ; plus l'électron est instable, plus la demi-vie du radical est courte, sa diffusion intracellulaire est lente et risque de réagir avec les biomolécules voisines. Par exemple, le peroxyde d'hydrogène a un temps de demi-vie de l'ordre d'une minute, et bien qu'il soit peu réactif, il est capable de diffuser loin dans la cellule pour atteindre l'ADN nucléaire. Au contraire, le radical hydroxyle ($\text{OH}^\bullet$) est lui réactif, mais sa courte demi-vie de l'ordre de 10^{-9} s le rend incapable de traverser la cellule (**figure I.13**).

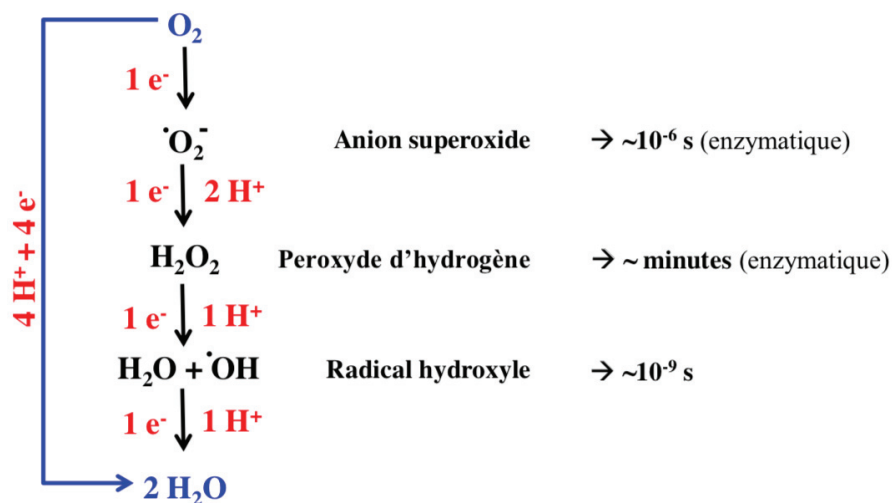


Figure I.13 : La réduction de l'oxygène

L'oxygène est réduit en eau en captant 4 électrons. Il y a la formation de 3 espèces réactives de l'oxygène en fonction des électrons captés. La réactivité de chaque ROS dépend de son temps de demi-vie. *D'Après cours Roussel, 2013.*

a- L'anion superoxyde ou radical superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$):

L'anion superoxyde peut être produit par des réactions d'auto-oxydation, par la chaîne respiratoire de la mitochondrie et par certaines enzymes telles que la xanthine oxydase et la NADPH oxydase. Contrairement à son « Super » nom, il ne peut pas attaquer directement les lipides, les protéines et les acides nucléiques de l'ADN. Toutefois, à des niveaux élevés, il peut mobiliser des quantités de fer issues de la ferritine selon l'équation suivante (Halliwell B, 2001; Paul, 2000) :



Il peut également attaquer des sites actifs de certaines enzymes contenant des groupements fer-souffre, comme l'aconitase, une enzyme du cycle de Krebs sensible à l'anion superoxyde. Il se

produit une inactivation de l'enzyme et la libération du fer (Cantu et al., 2009; Liochev, 1996). Le fer est important pour le corps humain, surtout au début de la vie pour le développement du cerveau. Cependant il est également dangereux. Il est capable d'osciller entre l'état ferreux (Fe^{2+}) et l'état ferrique (Fe^{3+}). Le Fe^{2+} peut réagir avec le peroxyde d'hydrogène pour produire le radical hydroxyle ($\text{OH}^\bullet$) (Halliwell and Gutteridge, 1984, 2015). En 1970, Beauchamp et Fridovich ont proposé que la toxicité *in vivo* de $\text{O}_2^{\bullet-}$ et de H_2O_2 résulte de leurs implications dans la formation du radical hydroxyle à travers les ions métalliques tels que le fer et le cuivre (Beauchamp and Fridovich, 1970).

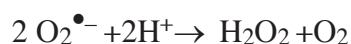
L'anion superoxyde est capable de réagir avec le radical libre $\text{NO}^\bullet$ peu réactif, pour former le peroxytnitrite :



La génération du peroxytnitrite conduit à l'oxydation et à la nitration des lipides, des acides nucléiques de l'ADN et des acides aminés des protéines (Halliwell, 1994; Halliwell B, 2001).

b- Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2):

Le peroxyde d'hydrogène est surtout issu de la dismutation de l'anion superoxyde selon la réaction suivante :



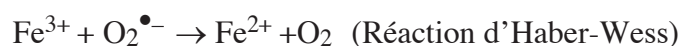
Il peut être produit également par plusieurs enzymes telles que la glycollate oxydase et la xanthine oxydase (Halliwell B, 2001). Il est faiblement réactif et ne peut pas oxyder les lipides, les protéines et l'ADN. Heureusement, il est très peu réactif, car le peroxyde d'hydrogène est retrouvé dans l'air et dans plusieurs breuvages chauds comme le café (Long and Halliwell, 2000).

c- Le radical hydroxyle ($\text{OH}^\bullet$)

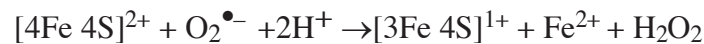
$\text{OH}^\bullet$ est probablement le radical libre le plus réactif trouvé *in vivo*. Il est principalement produit par la réaction de Fenton, du nom du chimiste qui a découvert cette réaction (Fenton, 1894):



Cette réaction peut être constamment perpétrée par tout agent capable de recycler le Fe^{3+} en Fe^{2+} comme l' $\text{O}_2^{\bullet-}$:



La réaction de Fenton peut avoir lieu après l'attaque et l'inactivation de l'aconitase par l'anion superoxyde qui induit la libération de Fe^{2+} des centres fer-soufre de l'enzyme (Cantu et al., 2009) :



Le radical hydroxyle extrêmement réactif peut attaquer toutes les biomolécules de la cellule proches de son site de génération. Si cette conversion a lieu proche de l'ADN, alors les 4 bases de l'ADN peuvent être modifiées (Evans and Halliwell, 1999).

3.1.2) Les principaux producteurs de ROS

Les ROS peuvent être générées par différents compartiments subcellulaires comme la mitochondrie, les membranes cellulaires, les lysosomes, les peroxysomes et le réticulum endoplasmique (Wang et al., 2010). Bien que la production des ROS implique plusieurs systèmes enzymatiques tels que la xanthine oxydase, la phospholipase A2, la lipoxigénase et la cyclooxygénase, il ne sera décrit que les deux principaux producteurs des ROS, la chaîne respiratoire mitochondriale et la NADPH oxydase.

a- La synthèse d'énergie cellulaire (ATP) par la mitochondrie : les oxydations phosphorylantes

La mitochondrie est un organe cellulaire constitué de deux membranes qui délimitent deux régions spatiales, l'espace intermembranaire et la matrice (figure I.14). Elles mesurent entre 0,5 et 1 μm de diamètre et peuvent atteindre plus de 10 μm de long (Fongy, 2013).

La membrane interne s'invagine pour former des crêtes mitochondriales permettant d'augmenter la surface membranaire. L'ADN mitochondrial est localisé dans la matrice, qui chez l'humain code 37 gènes, dont 13 protéines impliquées dans la production d'énergie (Wilson et al., 1985). On retrouve également de nombreuses voies métaboliques telles que le cycle de Krebs et l'hélice de Lynen (impliquée dans la β -oxydation des acides gras).

La synthèse d'énergie cellulaire sous la forme d'ATP par la mitochondrie est un phénomène localisé sur la membrane interne de cet organe. Ce processus biochimique est désigné par le terme d'« oxydation phosphorylante ». Il se déroule en deux temps. Dans un premier temps, la chaîne respiratoire mitochondriale ou chaîne de transport d'électrons a pour principal rôle de produire un gradient électrochimique de protons. Ensuite ce gradient électrochimique de protons est consommé par l'ATP synthétase pour phosphoryler l'ADP et produire l'ATP qui est finalement exportée dans le cytosol pour fournir les activités cellulaires en énergie.

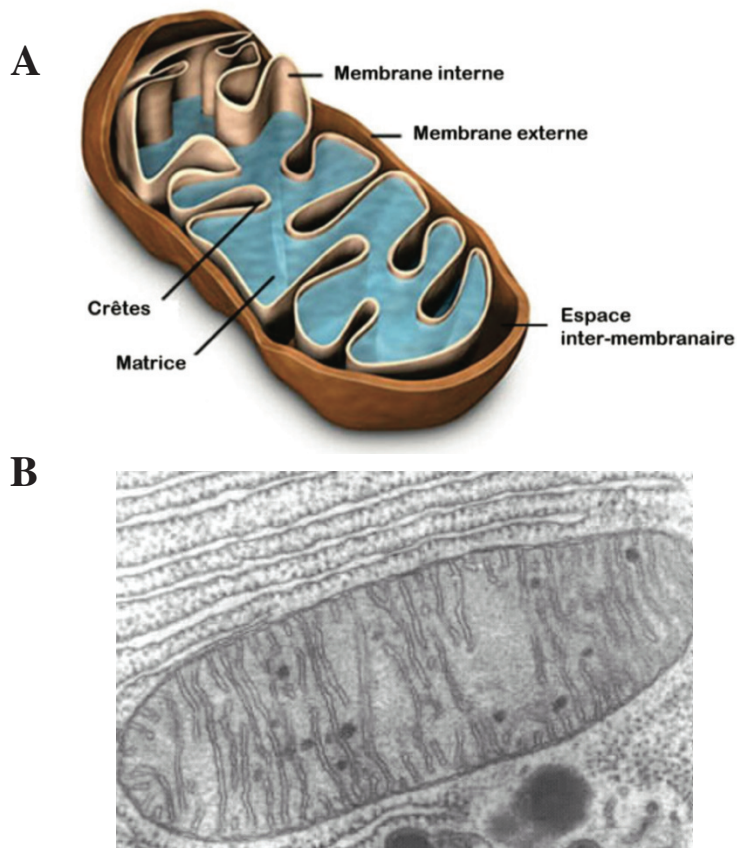


Figure I.14 : Représentation schématique (A) et par microscopie électronique (B) d'une mitochondrie

D'après Fongy, 2013.

La chaîne respiratoire se compose de quatre complexes protéiques enchâssés dans la membrane interne : le complexe I (ou NADH-ubiquinone oxydoréductase), le complexe II (ou succinate déshydrogénase), le complexe III (ou ubiquinol cytochrome-c réductase) et le complexe IV (ou cytochrome-c oxydase). La fonction de la chaîne respiratoire est d'oxyder des équivalents réduits (NADH-Nicotinamide adénine dinucléotide et FADH₂-Flavine adénine dinucléotide) provenant de différentes voies métaboliques (glycolyse, β -oxydation et cycle de Krebs). Le NADH donne ses électrons au complexe I, les électrons circulent du complexe I vers le complexe IV en passant par le complexe III. Le FADH₂ fournit ses électrons au complexe II ou équivalent, les électrons circulent du complexe II vers le complexe IV en passant par le complexe III ([Berg et al., 2002](#)). Le transfert des électrons a lieu jusqu'à un accepteur final : l'O₂ qui en acceptant les électrons est réduit en eau au niveau du complexe IV (cytochrome c oxydase ou COX) selon l'équation :



L'oxydation de ces équivalents réduits est couplée au transfert de protons ce qui permet aux complexes I, III et IV de transférer des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire et ainsi de générer un gradient électrochimique de protons (Δp). La membrane interne est

relativement imperméable aux protons, ils retournent dans la matrice via l'ATP synthétase (complexe V) permettant la production d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (P_i) (Mitchell, 1977). Ce phénomène de couplage entre l'oxydation des substrats et la production d'ATP est connu sous le terme d'oxydation phosphorylante. L'ATP est ensuite exportée dans le cytosol par l'ATP/ADP translocase ou transporteur des nucléotides adényliques (ANT) pour jouer son rôle énergétique (figure I.15).

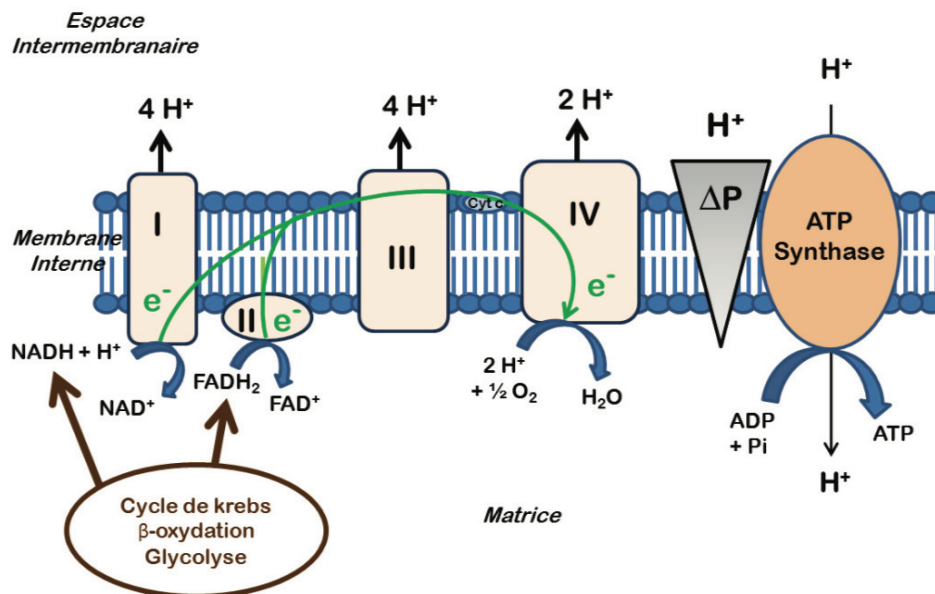


Figure I.15 : Représentation schématique et fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale

Les équivalents réduits ($NADH$ et $FADH_2$) issus du cycle de Krebs de la glycolyse et de la β -oxydation fournissent leurs électrons respectivement aux complexes I et II. Ces électrons réduisent l'oxygène en eau à travers différentes réactions d'oxydo-réduction le long de la chaîne respiratoire. Le gradient de proton formé est consommé par l'ATP synthase pour produire de l'ATP. *D'après Fongy, 2013.*

L'oxydation des substrats et la production d'ATP par la mitochondrie sont des processus finement régulés selon les besoins de la cellule. L'efficacité énergétique est définie par le rendement énergétique ATP/O.

L'efficacité serait maximale si la membrane interne était imperméable aux protons, ce qui n'est pas le cas, car les protons sont capables de retourner dans la matrice à travers la membrane interne de la mitochondrie indépendamment de l'ATP synthétase. On parle ainsi de fuite de protons (Jastroch et al., 2010). Le rendement énergétique (ATP/O) dépend en grande partie de l'intensité de ces fuites de protons à travers la membrane interne mitochondriale qui de fait découple les processus d'oxydation des processus de phosphorylation de la mitochondrie. Ces

fuites de protons peuvent représenter jusqu'à 20 à 30 % du métabolisme de repos des hépatocytes et jusqu'à 50 % de celui du muscle squelettique chez le rat (Brand et al., 1999).

Plusieurs facteurs peuvent moduler la perméabilité membranaire aux protons, entraînant un découplage partiel des oxydations phosphorylantes (**figure I.16**) :

- La composition membranaire. La quantité d'acides gras polyinsaturés dans la membrane interne mitochondriale est corrélée à une augmentation de la fuite des protons, alors qu'une augmentation des acides gras mono-insaturés est corrélée à une diminution de la fuite des protons (Brand et al., 2003). L'exposition au froid (Châinier et al., 2000) ou le statut thyroïdien (Brand et al., 1992) peut modifier la composition membranaire et jouer ainsi sur la fuite des protons.
- La fuite des protons peut également être induite par des protéines enchâssées dans la membrane interne mitochondriale. On parle alors de fuite de protons inductibles (Jastroch et al., 2010). On peut classer dans cette catégorie l'ANT et les protéines de la famille des UCPs (uncoupling protein). L'ANT qui a pour rôle principal les échanges entre l'ATP et l'ADP à travers la membrane interne mitochondriale peut représenter jusqu'à deux tiers de la fuite de protons basale (Brand et al., 2005). Dans la famille des UCPs, on retrouve trois protéines homologues : UCP1, UCP2 et UCP3. La plus connue est UCP1, elle est principalement retrouvée dans le tissu adipeux brun où elle peut représenter jusqu'à 8 % des protéines mitochondriales totales. Elle permet de dissiper le gradient de protons et ainsi de transformer l'énergie dépensée par la chaîne respiratoire en chaleur. La grande quantité d'UCP1 permet aux petits rongeurs, aux hibernants et aux nourrissons de défendre leur température corporelle contre le froid (Cannon and Nedergaard, 2004). UCP1 est activée par les acides gras libres et inhibée par les purines nucléoside di-et triphosphates (Jastroch et al., 2010), son rôle physiologique est thermogène. UCP2 a été identifiée dans quelques types cellulaires incluant les macrophages, les thymocytes et les cellules β du pancréas. Le gène UCP3 est limité aux muscles et au tissu adipeux brun des euthériens (Jastroch et al., 2010). Un rôle antioxydant a été attribué à UCP2 et UCP3, mais également à UCP1, depuis qu'il a été découvert que l'anion superoxyde et des dérivés de la peroxydation lipidique tels que le 4-hydroxynonanal (4-HNE) sont capables d'activer toutes les UCPs. Il en résulte une augmentation de la fuite de protons, une diminution du potentiel de membrane et une baisse de la production des ROS (Brand et al., 2004; Echtay et al., 2002).

Les expériences de respirométrie sur mitochondries isolées ou sur cellules entières permettent de mesurer la consommation d'oxygène à l'état phosphorylant (état 3) en présence d'ADP et à

l'état non-phosphorylant (état 4) par l'ajout d'oligomycine, un puissant inhibiteur de l'ATP synthétase. L'état 4 est contrôlé principalement par la fuite de protons alors que l'état 3 est lui contrôlé par la synthèse de l'ATP et l'oxydation des substrats (Martin D. Brand and Nicholls, 2011). Plus l'état 4 se rapproche de l'état 3, plus la mitochondrie est découplée. Un bon indicateur du couplage de la mitochondrie est le calcul du rapport du contrôle respiratoire (RCR) qui est défini de la manière suivante :

$$\text{RCR} = \text{respiration à l'état 3} / \text{respiration à l'état 4}$$

Selon Brand et Nicholls, un RCR élevé est un signe du bon fonctionnement mitochondrial. La mitochondrie a une grande capacité à oxyder les substrats et à renouveler l'ATP avec une faible fuite de protons (bon couplage de la mitochondrie). Un RCR faible indique une dysfonction de la chaîne respiratoire mitochondriale (Martin D. Brand and Nicholls, 2011). Toutefois, il n'y a pas de valeur absolue pour diagnostiquer une dysfonction mitochondriale, car la valeur est dépendante des substrats utilisés et du tissu. Un changement dans presque tous les aspects des oxydations phosphorylantes conduit à un changement du RCR (Martin D. Brand and Nicholls, 2011).

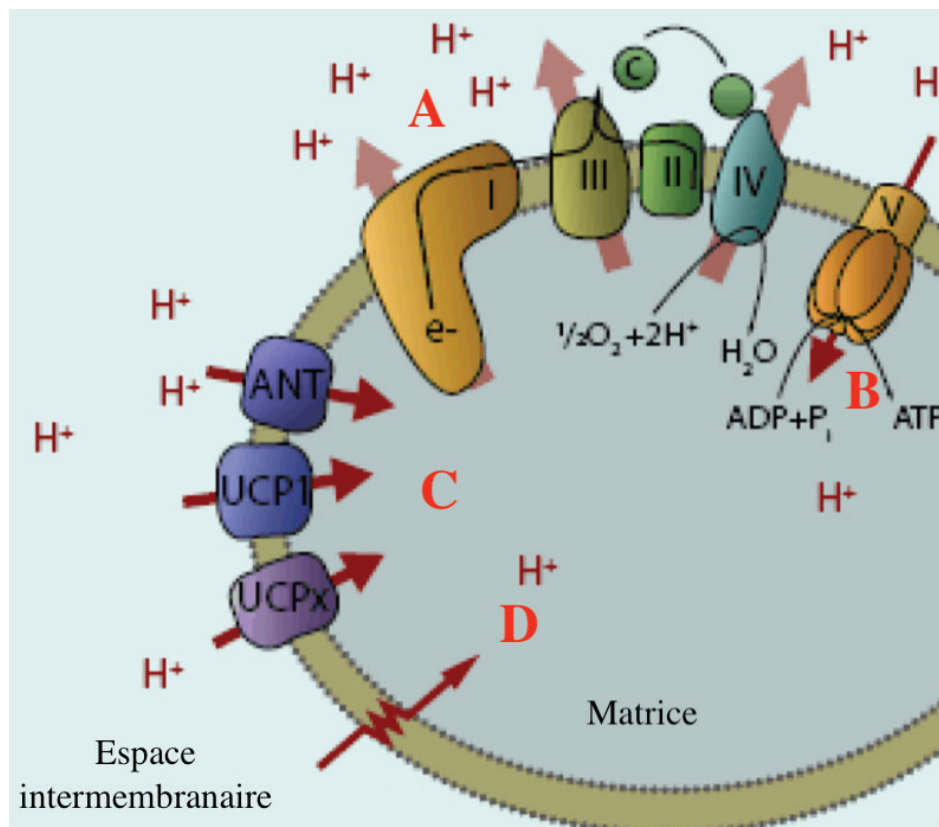


Figure I.16 : Les mécanismes de fuite de protons

Lors de la respiration mitochondriale, trois des complexes (I, III et IV) sont des pompes à protons, ils expulsent les protons de la matrice vers l'espace intermembranaire (A). Les protons retournent dans la matrice à travers l'ATP synthétase pour former l'ATP à partir d'ADP (B). Les protons peuvent retourner à la matrice indépendamment de l'ATP synthétase, soit par des protéines enchâssées sur la membrane interne (ANT, UCPs) (C) ou directement à travers les phospholipides de la membrane interne (D). L'énergie est dissipée sous forme de chaleur. *Adapté d'après Jastroch et al., 2010.*

b- Le côté sombre de la mitochondrie : la production d'espèces réactives de l'oxygène

Bien que la chaîne respiratoire mitochondriale soit un système efficace, la totalité des électrons n'atteignent pas le cytochrome c oxydase pour réduire l'oxygène en eau. Il peut se produire un transfert d'un électron célibataire du flux d'électrons circulant le long de la chaîne respiratoire sur l'O₂ générant ainsi un radical de l'oxygène : l'anion superoxyde. Ce phénomène de fuite d'électrons peut se produire dans des conditions physiologiques (Halliwell, 2006a). Bien qu'il y a plusieurs sites identifiés où les électrons peuvent fuir et générer un radical oxygéné (Brand, 2010; St-Pierre et al., 2002), les sites avec la plus grande capacité à produire l'anion superoxyde résident au sein des complexes I et III de la chaîne respiratoire (figure I.17) (Brand, 2010; Turrens, 2003).

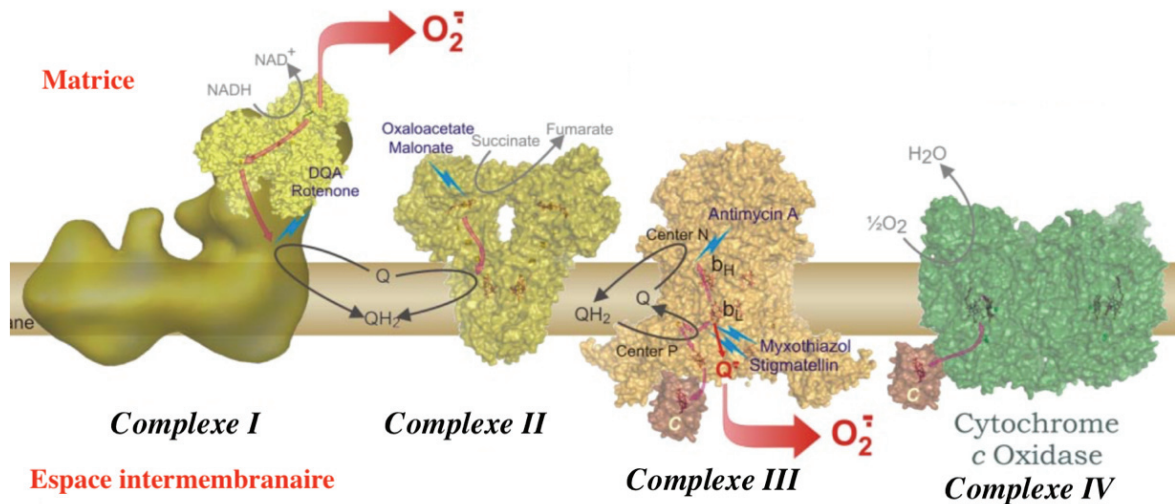


Figure I.17 : Production du superoxyde à travers les complexes I et III

Le flux d'électrons qui circule le long de la chaîne respiratoire mitochondriale a pour rôle de réduire l'oxygène en eau. Le système n'est pas 100% efficace et les électrons peuvent fuir à deux endroits distincts pour réagir avec l'oxygène pour former le superoxyde. Il s'agit du complexe I et du complexe III de la chaîne. *Adapté d'après Dröse et Brandt., 2008.*

Le complexe I peut produire l'anion superoxyde à travers deux mécanismes distincts. Au sein de ce complexe I, on retrouve différentes sous-unités contenant la flavine mononucléotide (FMN), des groupements fer-souffre (Fe-S) et le site de fixation à l'ubiquinone (figure I.18). Les électrons provenant du NADH circulent de la FMN jusqu'à réduire l'ubiquinone en ubiquinol en passant par les groupements Fe-S. La fuite d'électrons est faible durant la respiration normale, mais augmente drastiquement en présence de roténone, inhibiteur du complexe I, qui agit au niveau du site de fixation de l'ubiquinone (Jastroch et al., 2010; Wang et al., 2010). Des preuves suggèrent que la fuite des électrons vers la matrice se produit à la fois au niveau du site FMN et des groupements Fe-S (Murphy, 2009).

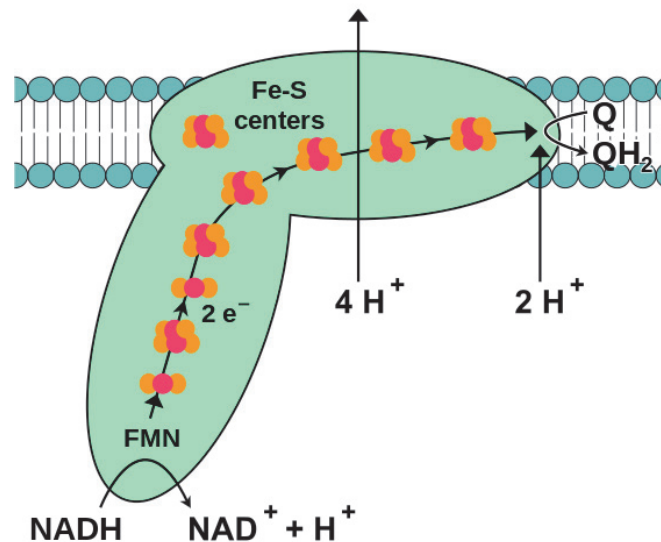


Figure I.18 : Représentation schématique du complexe I de la chaîne respiratoire

Les électrons issus du NADH du FMN jusqu'à l'ubiquinone réduit en ubiquinol. D'après *Commons.wikimedia.com*.

Le second mécanisme est ce qu'on appelle le flux inverse d'électrons qui se produit lorsque la respiration est supportée par le FADH_2 . Ce substrat réduit l'ubiquinone et génère une force proton motrice conduisant les électrons au sein du complexe I et réduit le NAD^+ en NADH au niveau du site FMN. Il en résulte une augmentation drastique de la production d'anion superoxyde ([Jastroch et al., 2010](#); [Murphy, 2009](#)).

Au sein du complexe III, la production de l'anion superoxyde est surtout liée à la configuration électronique de l'ubiquinone. Les quinones peuvent se retrouver sous trois états d'oxydoréduction différents : une forme réduite (ubiquinol, UbH_2), une forme semi-réduite (semi-ubiquinone, $\text{UbH}\bullet$), ou une forme oxydée (ubiquinone, Ub). La forme semi-réduite est hautement instable et est capable de réagir rapidement avec l'oxygène pour former l'anion superoxyde, (**figure I.19**) ([Lacraz, 2009](#)).

Bien que le taux de production de l'anion superoxyde au niveau du complexe III peut être très faible en comparaison avec celui du complexe I, surtout à travers le flux inverse d'électrons, le taux peut grandement augmenter sous certaines conditions physiologiques. Les ROS produites par le complexe III sont importantes pour la stabilisation de HIF-1 α et HIF-2 α en condition hypoxique ([Guzy and Schumacker, 2006](#)). Les ROS produites par la mitochondrie peuvent être régulées par différents facteurs qui affectent le flux d'électrons, tels que le potentiel de membrane, les inhibiteurs de la chaîne respiratoire, les ROS elles-mêmes, l'hyperoxie et l'hypoxie/ischémie ([Wang et al., 2010](#)).

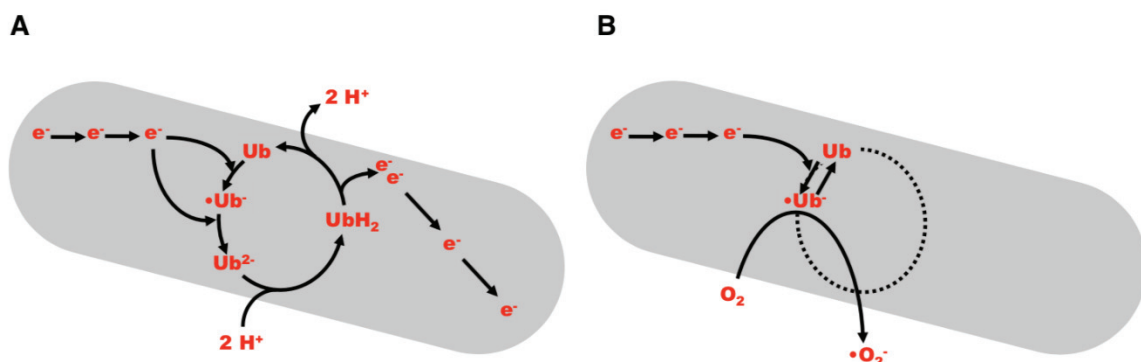


Figure I.19 : Production du superoxyde par le cycle du coenzyme Q

Deux électrons sont nécessaires pour réduire l'ubiquinone (Ub) en ubiquinol (UbH₂) (A). Toutefois, si l'état semi-réduit de l'ubiquinone (UbH•) réagit avec l'O₂, il y a formation du superoxyde (B). D'après Lacraz, 2009.

c- La NADPH oxydase (NOX)

La NOX est un complexe enzymatique constitué de plusieurs sous-unités localisées dans la membrane plasmique et les membranes des organites cellulaires, qui catalyse le transfert d'un électron de la NADPH à une molécule d'oxygène générant la production du radical superoxyde (O₂^{•-}). Cette enzyme a été identifiée pour la première fois dans les phagocytes où sa fonction de produire des ROS est essentielle pour lutter contre les hôtes non spécifiques (microbes) durant la phagocytose (Lambeth, 2004). Il a été par la suite trouvé d'autres NOXs localisées dans plusieurs autres types cellulaires. Un total de 7 isoformes de la NOX a été identifié, incluant les NOX 1 à 5 et la *dual oxydase* (DUOX 1 et 2). Ces enzymes produisent des ROS de manière régulée en réponse à des facteurs de croissance ou à des cytokines (Lambeth, 2004). Ces isoformes partagent le même mécanisme fondamental, mais diffèrent les uns des autres par leurs cœurs catalytiques (Wang et al., 2010). La plus étudiée est la NOX2 qui se trouve dans les phagocytes, mais également dans les cellules non phagocytaires incluant les cellules du système nerveux central comme les neurones, la microglie et les astrocytes (Wang et al., 2010). NOX2 contient un cœur catalytique gp91^{phox}, une petite sous-unité transmembranaire p22^{phox} et 4 sous-unités régulatrices appelées protéines Phox incluant p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} et une petite GTPase (Rac1 ou 2) (figure I. 20) (Bedard and Krause, 2007). Le cœur catalytique gp91^{phox} contient le site de fixation pour le NADPH, le FAD et 2 domaines hèmes qui peuvent subir des cycles d'oxydoréduction. Ces réactions sont catalysées en deux étapes utilisant le NADPH comme substrat. Dans la première étape, les électrons sont donnés par le NADPH du côté cytosolique et transférés au FAD. Un seul électron du FADH₂ est transféré au centre fer

de l'hème interne dans la seconde étape. Puis l'électron est à son tour transféré à l'hème externe avant d'être accepté par l'oxygène moléculaire pour former l'anion superoxyde qui peut à son tour être converti en peroxyde d'hydrogène, lequel peut jouer son rôle physiologique ou pathologique dans la cellule (**figure I.20**) (Lambeth, 2004). Dans l'état de repos, les 4 sous-unités catalytiques sont dissociées du cœur gp91^{phox} et de p22^{phox}, ce qui rend inactive NOX2. L'enzyme devient active lorsque les sous-unités régulatrices sont transloquées vers le cœur catalytique initié par des signaux de stress ou des agonistes (**figure I.20**) (Wang et al., 2010). Ce processus d'activation-inactivation représente une importante étape de régulation des NOXs. Bien que le NADH peut aussi jouer le rôle de substrat, son affinité pour les membres de la famille NOX est beaucoup plus faible. Outre son rôle dans le système immunitaire (combattre les infections), les NOXs et plus particulièrement NOX2 sont impliquées dans une large variété de processus physiologiques comme la prolifération cellulaire, l'apoptose ou encore la signalisation cellulaire à travers l'oxydation de certaines protéines tels que des canaux ioniques ou des récepteurs membranaires (Bedard and Krause, 2007; Lambeth, 2004; Lavie, 2015; Wang et al., 2010).

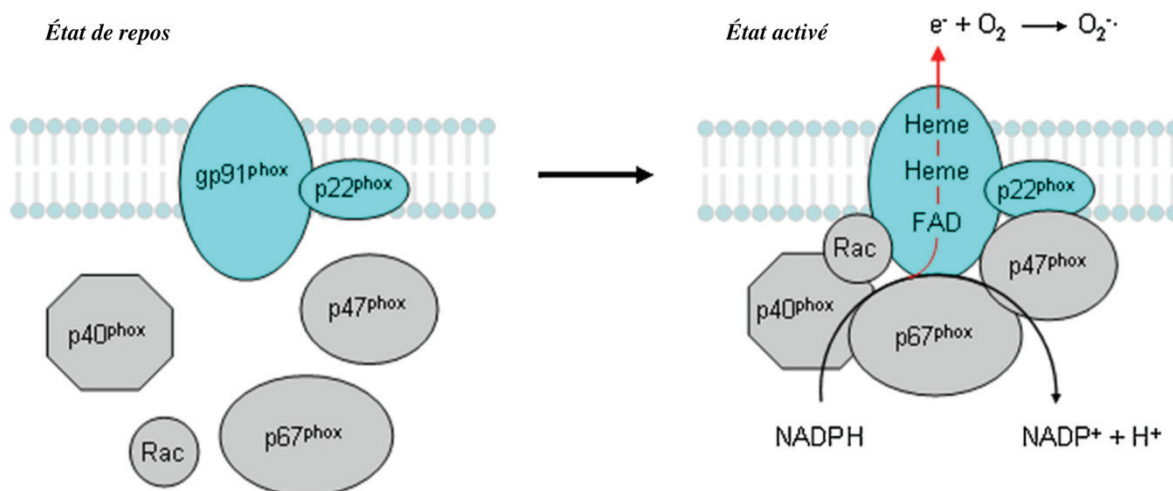


Figure I.20 : Fonctionnement de la NADPH Oxydase (NOX)

Les sous-unités régulatrices de la NOX sont dissociées des cœurs catalytiques à l'état de repos. Lorsque la NOX est activée, les sous-unités régulatrices se rapprochent des sous-unités catalytiques. D'après Wang et al., 2010.

3.1.3) Les défenses antioxydantes

Les défenses antioxydantes impliquent toutes les molécules qui peuvent contrecarrer les ROS produits en excès et protéger les cellules et les tissus contre les dommages oxydatifs. Cela inclut plusieurs systèmes enzymatiques aussi bien que des molécules non enzymatiques et des molécules de séquestration des ions métalliques. **Table 3.**

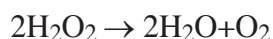
Enzymes (principalement intracellulaires) : -Superoxyde dismutase (SOD) -Glutathion peroxydase (GPx) -Glutathion réductase (GR) -Catalase (principalement localisée dans le peroxysome)
Antioxydants de faible poids moléculaire (intra et extracellulaires) : -Vitamine C (acide ascorbique) -Vitamine E (α-tocophérol) -Glutathion (GSH) -Flavonoïdes -Caroténoïdes -Acide urique
Molécules de séquestration des ions métalliques : -Plasma transferrine (Fe ³⁺) -Ferritine (Fe ³⁺) - Métallothionéines intracellulaires (Zn ²⁺ ·Cu·Hg ²⁺)

Tableau I.3 : Les 3 principales catégories de défenses antioxydantes

D'après Evans and Halliwell., 1999

a- Les systèmes enzymatiques.

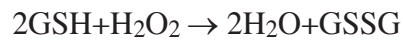
La superoxyde dismutase (SOD) est l'enzyme catalysant la dismutation du $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 et oxygène. Elle permet aussi de diminuer la formation du peroxynitrite (Halliwell B, 2001) :



La SOD possède trois isoformes : cytosolique (SOD_{Cu-Zn}, SOD1), mitochondriale (SOD_{Mn}, SOD2) et extracellulaire (SOD3). La SOD mitochondriale apparaît comme étant la plus importante. Les souris transgéniques invalidées pour cette enzyme meurent peu de temps après leur naissance avec d'importants dommages mitochondriaux dans plusieurs tissus alors qu'en absence de la SOD cytosolique, les souris restent viables, mais avec d'importants problèmes physiologiques (Lebovitz et al., 1996; Melov et al., 1999).

H_2O_2 qui est produit par la SOD est converti en eau par la catalase (localisée dans le peroxysome), la thiorédoxine peroxydase et la glutathion peroxydase (GPx), (figure I.21) (Halliwell B, 2001; Lavie, 2015). La prise en charge de H_2O_2 est primordiale afin d'éviter la production du radical hydroxyle, connaissant sa grande réactivité avec les biomolécules de la cellule (Halliwell and Gutteridge, 2015). La glutathion peroxydase est située dans la

mitochondrie et le cytosol, elle dépend de la disponibilité en glutathion (GSH) et permet la réaction d'oxydoréduction suivante :



La glutathion réductase permet de recycler le glutathion oxydé (GSSG) :



La mitochondrie est capable de séquestrer le GSH dans la matrice via un transporteur permettant l'entrée de la molécule du cytosol vers la mitochondrie (Fernández-Checa et al., 1998).

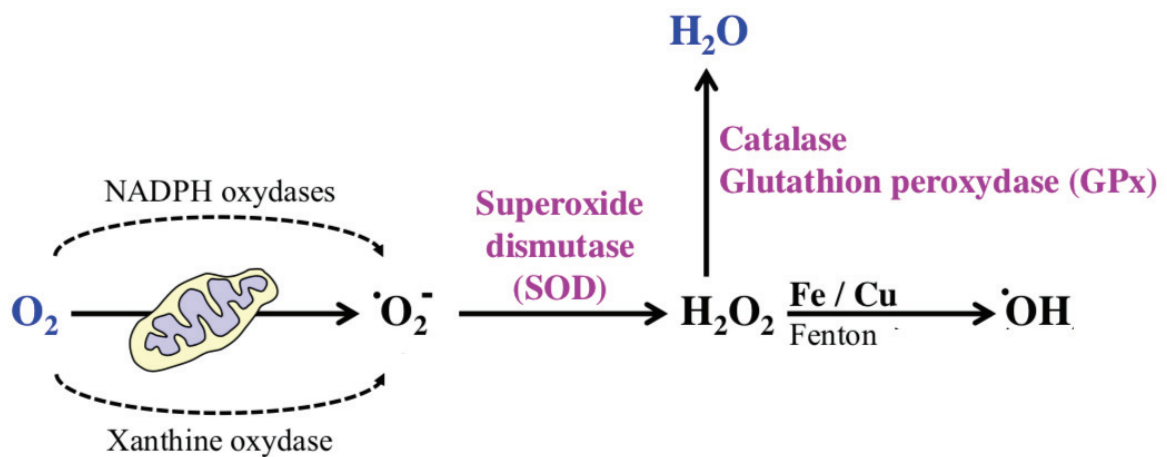


Figure I.21 : Principales défenses antioxydantes enzymatiques

L'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) est converti par la superoxyde dismutase (SOD) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), lui-même converti en eau par la catalase ou la glutathion peroxydase (GPx). D'après cours Roussel., 2013.

b- Les systèmes non enzymatiques.

Des petites molécules non enzymatiques agissent également comme antioxydant, incluant la vitamine C (acide ascorbique), la vitamine E (α -tocophérol), les flavonoïdes, les caroténoïdes et la GSH (Halliwell B, 2001).

La vitamine C, E, les caroténoïdes (β carotène) sont des molécules piégeuses capables de stabiliser les radicaux libres en captant leur électron célibataire. La vitamine C peut chélater plusieurs espèces réactives comme $\text{O}_2^{\bullet-}$ et $\text{OH}^{\bullet}$. Malgré son rôle prédominant comme antioxydant, la vitamine C peut également être pro-oxydante en réduisant l'ion Fe^{3+} en Fe^{2+} favorisant la réaction de Fenton (Evans and Halliwell, 1999). La vitamine C radicalaire (radical ascorbyl) est régénérée de façon enzymatique par la GSH, elle-même régénérée par la glutathion réductase aux dépens du NADPH (figure I.22) (Lacraz, 2009).

La molécule GSH est l'antioxydant intracellulaire le plus abondant et immédiat capable de chélater le radical hydroxyle et d'éliminer le peroxyde d'hydrogène ; il agit également comme substrat pour la GPx (Lavie, 2015).

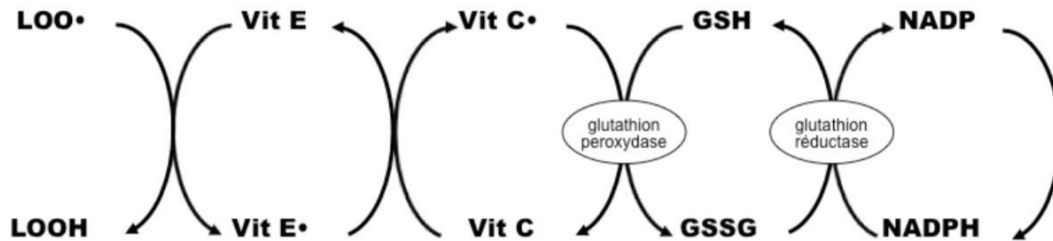


Figure I.22 : Cycles réactionnels de régénération des antioxydants

GSH, glutathion réduit; GSSG, glutathion oxydé; Vit, vitamine; LOO•, radical peroxyde lipidique; LOOH, hydroperoxyde lipidique. *D'après Lacraz, 2009*

c- Autres systèmes antioxydants

Il existe des mécanismes de séquestration des ions métalliques comme le fer et le cuivre. Par exemple dans le plasma humain, la transferrine est une protéine qui, en fixant le fer, permet d'éviter la toxicité cellulaire par le fer libre (Halliwell and Gutteridge, 1984). Dans les cellules le fer est stocké dans la ferritine, alors que le cuivre est stocké dans les métallothionéines (Halliwell B, 2001). Il est indispensable de ne pas laisser libres ces ions métalliques afin d'éviter la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton.

Le facteur de transcription Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) joue un rôle important. En se fixant sur un élément de réponse antioxydant de l'ADN, il va pouvoir réguler un nombre important de gènes visant à atténuer et protéger contre le stress oxydatif. On peut citer par exemple l'expression de gènes codants pour la SOD, la biosynthèse du glutathion et pour plusieurs protéines responsables du métabolisme mitochondrial (Reddy et al., 2014). Nrf2 est activé par les ROS et la réoxygénation dans l'ischémie/reperfusion permet l'expression d'un certain nombre de gènes capables de protéger la cellule (Lavie, 2015).

3.1.2) Effet des ROS sur les biomolécules de la cellule

La réactivité des ROS conduit à des dommages sur un grand nombre de biomolécules constitutives de la cellule incluant surtout les lipides, les protéines et les acides nucléiques de l'ADN. On parle alors de dommages oxydatifs qui sont la résultante (Halliwell B, 2001) :

- 1- du stress oxydatif.
- 2- d'un système de défense antioxydante inadéquat.

3- d'une combinaison de 1 et 2.

a- Lipides :

Les lipides sont les molécules les plus sensibles au stress oxydatif, surtout les acides gras polyinsaturés. Quand le radical hydroxyle rencontre les lipides, il va se produire un phénomène qu'on dénomme peroxydation lipidique. Brièvement ce processus implique : (i) le retrait d'un atome d'hydrogène d'un lipide par le radical hydroxyle; (ii) le lipide radicalaire réagit avec l'oxygène pour former le radical peroxyde; (iii) ce dernier peut attaquer les chaînes lipidiques adjacentes et propager la réaction de peroxydation. La réaction en chaîne génère des lipides hydroperoxydes qui, lorsqu'ils s'accumulent dans la membrane, la déstabilisent en générant des macrospores induisant une fuite d'ions (**figure I.23**) (Lacraz, 2009). Durant ces réactions, les sous-produits électrophiles des radicaux libres produits sont délétères pour les protéines et l'ADN. Il s'agit principalement d'aldéhydes et d'époxydes. Ce sont ces produits que l'on mesure lorsque l'on veut évaluer la peroxydation lipidique. Les plus fréquents sont le dialdéhyde malonique ou malondialdéhyde (MDA), le 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), les acides thiobarbituriques (TBARS) et le (F2) 8-isoprostane (Esterbauer and Cheeseman, 1990; Lacraz, 2009; Lavie, 2015). Les conséquences de la peroxydation lipidique varient selon le type de lipides touchés. Par exemple, la peroxydation des phospholipides membranaires entraîne des modifications structurelles et fonctionnelles des membranes comme une diminution de la fluidité membranaire, la création de pores hydrophiles et la diminution du potentiel de membrane augmentant la perméabilité aux protons et autres ions (Gutteridge, 1995; Sevanian and Hochstein, 1985).

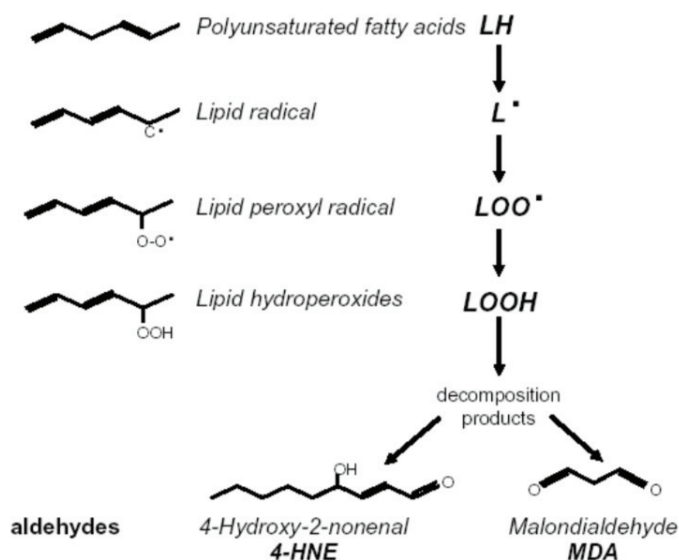


Figure I.23 : Mécanisme de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique conduit à la formation de produits de décomposition comme le 4-Hydroxy-2-nonenal (4-HNE) et le malondialdéhyde (MDA). D'après cours Roussel, 2013

b- Protéines

Les oxydations protéiques sont causées par la réaction des résidus d'acides aminés avec les ROS. Elles peuvent être classées comme réversibles ou non réversibles. La plupart des oxydations protéiques sont impliquées dans les processus de signalisation qui sont bénéfiques pour la cellule. Cependant, l'oxydation des protéines peut aboutir à l'inactivation de celles-ci en affectant leurs propriétés biologiques. Parmi les oxydations protéiques réversibles, on peut citer l'oxydation du groupement sulfhydryle (ou thiol :SH) largement répandue dans les protéines enzymatiques (Cai and Yan, 2013; Lacraz, 2009). Les groupes SH des acides aminés de la cystéine et de la méthionine lorsqu'ils sont oxydés peuvent aboutir à la création de ponts disulfures (S-S) réversibles (Lavie, 2015). Parmi les oxydations non réversibles, on peut trouver l'introduction d'un groupement carbonyle sur les acides aminés tels que l'arginine, l'histidine, la proline ou la lysine. C'est le marqueur le plus utilisé pour évaluer l'oxydation des protéines (Cai and Yan, 2013). Il peut également se produire l'ajout de sous-produits réactionnels d'oxydation comme ceux issus de la peroxydation lipidique (Lacraz, 2009)

c- ADN:

L'acide désoxyribonucléique ou ADN est hautement sensible aux ROS. L'attaque radicalaire de l'ADN peut être classée en au moins 5 grandes classes. Parmi elles : (i) les bases oxydées; (ii) la formation de sites abasiques; (iii) les cassures simples et doubles brins; (iv) les pontages ADN-protéines; et (v) l'adduit de dérivés de peroxydations lipidiques (**figure I.24**) (Cadet et al., 2002). Toutes les bases peuvent être oxydées par les ROS mais la plus étudiée est la 8-hydroxyguanine (8-OH-G) (Lavie, 2015).

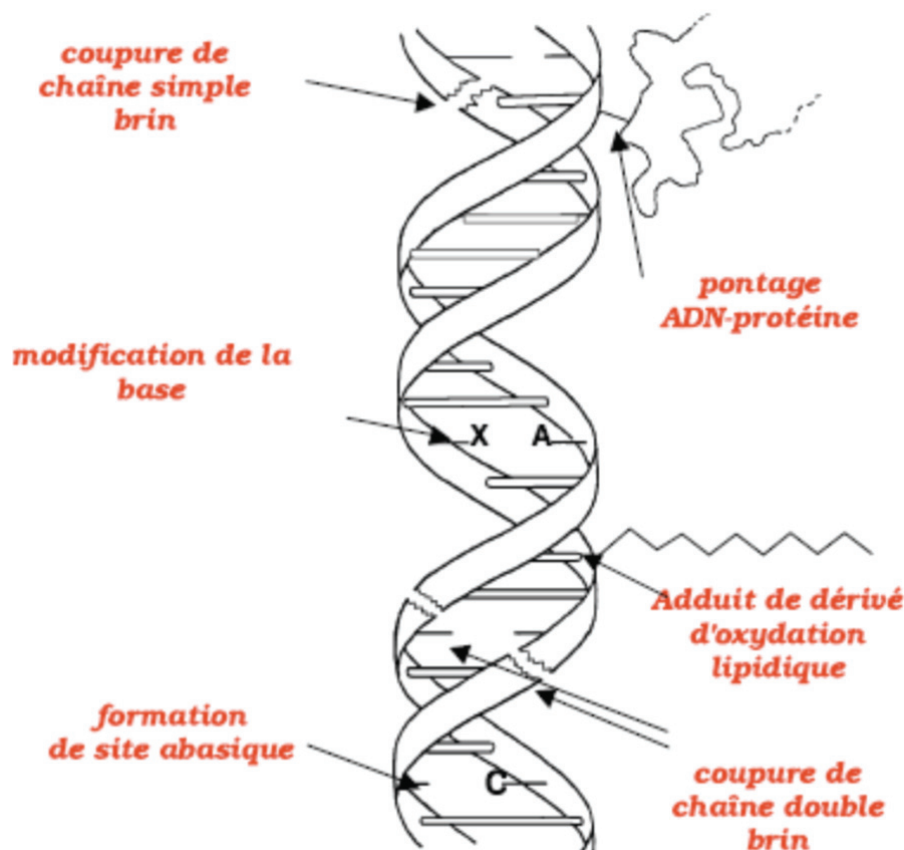


Figure I.24 : Les différentes catégories d'attaques radicalaires
D'après cours Roussel, 2013

3.2) Le cerveau : un organe sensible au stress oxydatif.

Tous les organes subissent des dommages oxydatifs, mais le cerveau est celui connu pour être le plus sensible. Le stress oxydatif serait responsable de plusieurs maladies neurodégénératives incluant la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique (maladie de Charcot), la maladie de Huntington, l'ataxie de Friedreich et la maladie à prions. Pour plus de détails, voir ([Halliwell, 2006a](#)).

La première raison est la grande quantité d'oxygène consommée par le cerveau. Chez l'adulte humain, même si le poids du cerveau est faible par rapport au corps humain, il consomme 20 % d'oxygène au niveau basal. Cette forte demande en oxygène est nécessaire pour supporter les besoins en ATP importants pour le fonctionnement des neurones tels que le maintien du potentiel de membrane (pour la propagation des potentiels d'actions), ainsi que le stockage et la libération des neurotransmetteurs ([Halliwell, 2006a](#); [Halliwell B, 2001](#)). Un moyen de défense du cerveau contre le stress oxydatif est de maintenir le niveau d'oxygène intracellulaire bas permettant d'éviter la fuite d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Les autres raisons qui rendent le cerveau vulnérable au stress oxydatif sont ([Halliwell B, 2001](#); [Lagranha et al., 2018](#)):

- Le cerveau possède une très grande quantité d'ions métalliques (fer et cuivre). Plusieurs zones du cerveau (substance noire, putamen, noyau caudé) ont un fort contenu en fer (Connor and Benkovic, 1992). Le fer (et le cuivre) est capable de réagir avec H_2O_2 pour former le radical hydroxyle à travers la réaction de Fenton.
- Le cerveau utilise en grande quantité le glutamate comme neurotransmetteur excitateur. L'augmentation extracellulaire du glutamate conduit à une élévation du Ca^{2+} intracellulaire qui active des systèmes pro-oxydants tels que la phospholipase A2 et la NO synthase neuronale (nNOS).
- Les lipides des membranes neuronales contiennent un haut niveau d'acides gras polyinsaturés tels que l'acide docosahexaénoïque ($C_{22:6}$). Ces acides polyinsaturés sont extrêmement susceptibles à la peroxydation lipidique par rapport aux lipides saturés.
- Les défenses antioxydantes dans le cerveau sont modestes en particulier la catalase qui est faible dans la plupart des régions du cerveau. Il y a en fait une disparité du niveau de catalase selon les régions du cerveau, celle-ci étant plus élevée dans l'hypothalamus et la substance noire que dans le cortex et le cervelet (Brannan et al., 1981).

3.3) Le stress oxydatif dans les modèles d'HI

Précédemment, nous avons décrit les conséquences systémiques de l'HI chez l'animal. Nous savons maintenant que la principale cause de ces morbidités systémiques est le stress oxydatif.

3.3.1) Le stress oxydatif dans l'induction de l'hypertension artérielle systémique

L'hypertension artérielle systémique est principalement la conséquence d'une augmentation de l'activité sympathique due à l'exacerbation de l'activité chémoréflexe du corps carotidien (Prabhakar et al., 2015). Il a été proposé que les ROS générées durant les phases de réoxygénation expliqueraient l'altération du fonctionnement des corps carotidiens.

a- Dans le corps carotidien

L'étude *ex vivo* du corps carotidien chez le rat exposé en HI (21-5 % O_2 , 10 jours-8h/jours) rapporte une augmentation des ROS évaluée par la diminution de l'activité de l'aconitase (Peng et al., 2003) et l'augmentation du niveau de MDA (peroxydation lipidique) (Peng et al., 2013) dans les cellules chémoréceptrices de type 1 du corps carotidien. Sept jours d'exposition (21-4 % O_2 , 60 cycles/heure) sont suffisants pour augmenter le stress oxydatif dans le corps carotidien, tel qu'évalué par l'augmentation du (F2)-8 isoprostane (Lam et al., 2012).

L'activation de la NADPH oxydase et plus précisément l'activation de NOX 2 est en partie responsable de cette élévation de ROS dans le corps carotidien. L'HI augmente de près de 30 fois l'ARNm de NOX2 dans cet organe (Peng et al., 2009). La NOX2, en plus de son rôle dans

la production des ROS, interagirait avec la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) pour diminuer l'activité du complexe I et augmenter la fuite des électrons à travers ce complexe. Il en résulte une augmentation de la production de ROS mitochondriales évaluée par la diminution de l'activité de l'aconitase mitochondriale (Khan et al., 2011). Effectivement, l'activité du complexe I de la CRM est diminuée dans le corps carotidien chez des rats soumis à une HI, alors que l'activité du complexe III reste inchangée (Peng et al., 2003). En hypoxie continue, la production de ROS a surtout lieu par fuite d'électrons du complexe III de la CRM (Guzy and Schumacker, 2006) suggérant deux mécanismes bien distincts entre l'hypoxie soutenue et l'hypoxie intermittente. Outre la NOX et la CRM qui sont clairement impliqués dans la production de ROS induits par l'HI, l'activité de la xanthine oxydase (enzyme produisant le radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$) est augmentée dans des cellules PC12 exposées à une HI (Nanduri et al., 2013).

L'utilisation d'antioxydants comme piègeur de ROS chez le rat, telle que la vitamine C, (Del Rio et al., 2010), un mimétique de SOD (MnTMPyP) (Peng et al., 2003; Peng and Prabhakar, 2004), un inhibiteur de la NOX (apocynin) (Peng et al., 2009) et un inhibiteur de la Xanthine oxydase (allupurinol) (Morgan et al., 2016b), permet d'éviter l'installation de la sLTF et l'augmentation de la réponse à l'hypoxie par le corps carotidien causées par l'HI. De même, l'invalidation pour la sous-unité catalytique de la NOX 2 (gp91^{phox}) chez des souris transgéniques aboutit aux mêmes résultats que l'utilisation des antioxydants (Peng et al., 2009). De plus, l'hypertension artérielle systémique ne s'installe pas chez ces animaux traités avec des antioxydants ou invalidés génétiquement pour la NOX 2 (Khan et al., 2011; Prabhakar et al., 2015). L'utilisation de l'inhibiteur de la xanthine oxydase (allupurinol) permet d'éviter également l'élévation de la pression artérielle systémique chez le rat après 10 jours d'HI (21-5 % O_2 10 jours-8h/jour) (Nanduri et al., 2013).

La sensibilisation des corps carotidiens par l'HI induit également l'apparition de désordres respiratoires comme une augmentation de la survenue des apnées. L'ajout d'apocynine (inhibiteur de la NOX) ou du tempol, (mimétique de SOD) dans l'eau de boisson de rats exposés l'HI (21-5 % O_2 7 jours-8h/jours) évite l'augmentation des apnées (Edge et al., 2012).

b- Dans le tronc cérébral

Seule l'étude de Peng et ses collaborateurs en 2011 a évalué le stress oxydatif dans les zones du tronc cérébral activées par l'HI (NTS et RVLM). L'activité de la NOX et la quantité de MDA augmente dans le NTS et la RVLM alors que l'activité de la SOD cytosolique diminue dans ces régions après avoir soumis les rats à une HI (21-5 % O_2 10 jours-8h/jours). Aucune différence n'est observée dans une région contrôle du tronc cérébral qui ne reçoit pas les

afférences provenant des corps carotidiens (Peng et al., 2014). De plus, dans ces régions on observe une augmentation de l'expression de HIF-1 α (impliquée dans l'augmentation de la production de ROS) et une diminution de HIF-2 α (impliquée dans l'augmentation des défenses antioxydantes) alors qu'aucune modification n'est observée dans la même région contrôle du tronc cérébral (Peng et al., 2014).

c. Dans la médullosurrénale

La médullosurrénale est l'un des principaux organes terminaux du système nerveux sympathique. L'activation des cellules chromaffines et la libération des catécholamines induites par l'HI résultent de l'augmentation des ROS évaluée par la diminution de l'activité de l'aconitase cytosolique et mitochondriale dans la médullosurrénale (Kumar et al., 2006). Le traitement avec un mimétique de SOD (MnTMPyP) ou du glutathion (antioxydant non enzymatique) permet de prévenir l'augmentation de la libération des catécholamines (adrénaline et noradrénaline) par l'HI et évite l'élévation de la pression artérielle systémique chez ces animaux (Kumar et al., 2006). Le dérèglement de la glande médullosurrénale, comme le corps carotidien participe grandement à l'installation de l'hypertension artérielle systémique induite par l'HI.

d. Dans les vaisseaux

L'HI est connue pour augmenter dans le plasma l'endothéline-1, le plus puissant peptide vasoconstricteur, synthétisé par les cellules endothéliales qui participe à l'élévation de pression artérielle en synergie avec l'augmentation de l'activité sympathique (Kanagy et al., 2001). Ce peptide est connu pour être activé par les ROS dont le peroxyde d'hydrogène (Kaehler et al., 2002). Le traitement avec un mimétique de la SOD (tempol) chez des rats exposés à l'HI (21-5 % O₂-7 jours-7h/jour) diminue la production de superoxyde dans les artères, la quantité plasmatique d'endothéline-1 et prévient l'élévation de la pression artérielle systémique (Troncoso Brindeiro et al., 2007).

3.3.2) Le stress oxydatif dans les troubles neurocognitifs

Le modèle murin de SAOS induit une hypersomnolence. On retrouve une augmentation du stress oxydatif évalué par la quantité du F2-isoprostane (peroxydation lipidique) et des protéines carbonylées dans les régions liées à l'éveil tel que le thalamus et le prosencéphale (Veasey et al., 2004a; Zhan et al., 2005). Des souris transgéniques invalidées pour la NOX et des souris traitées avec de l'apocynine (inhibiteur de la NOX) montrent une diminution de l'hypersomnolence après 8 semaines d'exposition à l'HI (21-10 % O₂-10h/jour) (Zhan et al., 2005).

Les altérations cognitives comme le déficit d'apprentissage et de mémorisation spatiale en HI sont également corrélées avec une augmentation de la peroxydation lipidique (MDA et F2-isoprostane) dans le cortex cérébral. Le traitement avec un antioxydant protégeant de la peroxydation lipidique (PNU-101033) permet d'améliorer ces troubles neurocognitifs (Row et al., 2003). Des souris transgéniques invalidées pour la NOX (Nair et al., 2011) et surexprimant la SOD mitochondriale (Shan et al., 2007) possèdent moins de dommages oxydatifs (peroxydation lipidique) dans le cortex et l'hippocampe induits par l'HI, conduisant à une amélioration de l'apprentissage et de la mémorisation spatiale évalués par le test de Morris. Il semble que l'activation de la NOX est importante dans l'apparition de la somnolence et dans les désordres d'apprentissage induits par l'IH, d'où une augmentation de la quantité d'ARNm de la sous-unité catalytique de la NOX (gp91^{phox}) dans une multitude de régions du cerveau (Zhan et al., 2005) dans les modèles d'HI.

3.3.3) Le stress oxydatif chez l'homme atteint de SAOS

Les paragraphes suivants tentent de décrire les connaissances sur le stress oxydatif chez l'homme.

a. Les biomarqueurs circulants

De nombreuses études cliniques ont évalué des biomarqueurs du stress oxydatif au niveau du plasma, des urines, de la salive et dans l'air expiré (Prabhakar et al., 2007b). La peroxydation lipidique évaluée par la quantité de TBARS dans le plasma (Lavie et al., 2004) et dans les particules de LDL (Barceló et al., 2000) augmente chez les sujets avec SAOS. Dans l'air expiré et le plasma, le (F2)-isoprostane est augmenté chez les sujets atteints de SAOS (Carpagnano et al., 2003). Dans chacun des cas, le traitement par pression positive continue diminue la peroxydation lipidique tendant à rejoindre des valeurs de sujets sains (Barceló et al., 2000; Carpagnano et al., 2003; Lavie et al., 2004). Les niveaux du 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), marqueur de l'oxydation des acides nucléiques de l'ADN sont plus élevés dans les urines de sujets atteints de SAOS sévère (IAH $\geq$ 30 apnées/heure) par rapport à ceux atteints de SAOS modéré (IAH < 30 apnées/heure). Le 8-OHdG est corrélé avec le niveau de désaturation artérielle en oxygène (Yamauchi et al., 2005). Pour plus de détails, une liste non exhaustive des différentes études évaluant les principaux biomarqueurs du stress oxydatif chez des sujets atteints de SAOS sont présentées par (Prabhakar et al., 2007b).

b. Les indices antioxydants

La diminution des capacités antioxydantes a été décrite chez les sujets avec SAOS (Christou et al., 2003; Lavie, 2015; Mancuso et al., 2012). La quantité totale de glutathion plasmatique est plus basse chez les sujets atteints de SAOS (Mancuso et al., 2012). De même, Sales et ses

collègues ont évalué dans le plasma les marqueurs antioxydants non enzymatiques et enzymatiques et ont rapporté que chez les personnes avec SAOS il y a un niveau plus faible de vitamine E et B ainsi qu'une diminution de l'activité de la SOD. Cependant, il n'y a pas de différence pour l'activité de la catalase, ni pour la quantité de vitamine C et de glutathion ([Sales et al., 2013](#)). L'activité de la paraxonase-1 (PON-1), enzyme qui permet de protéger les HDL et les LDL contre l'oxydation, est plus faible chez les sujets avec SAOS ([Lavie, 2015](#)).

3.4) Conclusion

De nombreuses données soutiennent l'hypothèse que chez l'homme et chez l'animal, le stress oxydatif joue un rôle important dans le développement des morbidités systémiques. Le traitement avec des antioxydants chez l'animal soumis à une HI a montré ses effets bénéfiques sur l'hypertension artérielle systémique ([Khan et al., 2011](#); [Nanduri et al., 2013](#); [Peng et al., 2006](#)) et sur les altérations neurocognitives ([Row et al., 2003](#); [Zhan et al., 2005](#)). Chez l'homme, il est difficile de trouver des études utilisant des antioxydants chez des sujets atteints de SAOS. Celle de Grebe et ses collaborateurs rapporte une amélioration de la fonction endothéliale après une seule dose de vitamine C en intraveineux, bien qu'aucun marqueur de stress oxydatif n'ait été évalué ([Grebe et al., 2006](#)). Toutefois, il a été rapporté que le traitement pendant trois mois avec des vitamines antioxydantes n'induit aucune amélioration sur la fonction endothéliale, et ce, malgré l'augmentation significative du niveau de ces vitamines dans le plasma ([Lavie, 2015](#)).

De nos jours, l'utilisation d'antioxydants est de plus en plus controversée. En effet, si la dose, le temps et le traitement par des antioxydants ne sont pas finement régulés, ce traitement pourrait altérer la balance redox et provoquer l'inhibition de voies de signalisation essentielles pour la survie et la fonction de la cellule. Par exemple, les ROS mitochondriales sont importantes dans l'adaptation à l'hypoxie soutenue, la régulation de l'autophagie, l'immunité, la différenciation et le vieillissement ([Schieber and Chandel, 2014](#); [Sena and Chandel, 2012](#)). Il apparaît donc qu'éviter la dysrégulation des producteurs de ROS comme la chaîne respiratoire mitochondriale ou la NADPH oxydase semble une meilleure thérapie que l'inhibition des systèmes pro-oxydants ou la chélation des ROS. L'estradiol constitue un puissant antioxydant naturel capable de réguler plusieurs enzymes antioxydantes ainsi que le fonctionnement de plusieurs producteurs de ROS comme la chaîne respiratoire mitochondriale ([Zhang et al., 2009](#)).

III) Traitements hormonaux de la ménopause :

implication de l'estradiol

1) La ménopause

Les femmes sont connues pour vivre plus longtemps que les hommes et être moins enclines à développer certaines maladies cardiovasculaires et neurologiques. Cependant après la ménopause beaucoup de désordres cliniques apparaissent chez la femme. C'est également le cas concernant les désordres respiratoires du sommeil (**voir partie I.5.3**). La diminution des hormones stéroïdiennes et particulièrement l'estradiol lors de la ménopause est un phénomène associé à une augmentation du stress oxydatif.

1.1) Définition

On définit de façon générale la ménopause comme la perte des menstruations après une période d'aménorrhée d'environ 1 an qui commence entre 40 et 55 ans ([Miquel et al., 2006](#)), avec un âge moyen d'apparition de 51,3 ans ([McKinlay et al., 1992](#)). La ménopause est d'un point de vue clinique l'extinction de l'activité ovarienne qui se traduit par une forte diminution de synthèse des hormones sexuelles par les ovaires telles que la progestérone et les estrogènes.

Le terme « estrogène » se réfère à un petit groupe d'hormones stéroïdiennes important dans le contrôle des cycles reproductifs. Les estrogènes sont synthétisés sous trois formes; l'estrone (E₁) l'estradiol (E₂) et l'estriol (E₃). La forme prédominante durant le stade reproductif est le 17 β -estradiol (par la suite, on utilisera seulement le terme estradiol) produit par la conversion de la testostérone via l'aromatase P-450 (**figure I.25**) ([Ryan, 1982](#)). Les estrogènes sont principalement synthétisés par les ovaires, les glandes surrénales et le placenta, mais peuvent être produits *de novo* dans le système nerveux central; on alors parle de neurostéroïde ([Mellon and Griffin, 2002](#)). La ménopause est un phénomène naturel même s'il peut résulter d'autres causes telles une chirurgie ou une chimiothérapie ([Doshi and Agarwal, 2013](#)). La ménopause peut se différencier en 3 stades distincts : (i) la préménopause (stade reproductif) ; (ii) la periménopause et ; (iii) la postménopause ([Doshi and Agarwal, 2013](#); [Santoro and Randolph, 2011](#)).

On sait que les estrogènes ont pour cible les organes ayant un rôle dans la reproduction (utérus, vagin, glandes mammaires) mais également les organes non reliés à la reproduction comme le cerveau, le système cardiovasculaire, le foie et le tissu osseux. La diminution des estrogènes se traduit par le déclenchement d'une variété de signes et de symptômes pathophysiologiques.

Au niveau expérimental, chez l'animal (principalement chez le rongeur) l'ablation bilatérale des ovaires est un modèle qui reproduit les effets de la ménopause à long terme chez la femme. Ce modèle d'ovariectomie (ou oophorectomie) permet ainsi de comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la ménopause ainsi que les effets d'un traitement hormonal.

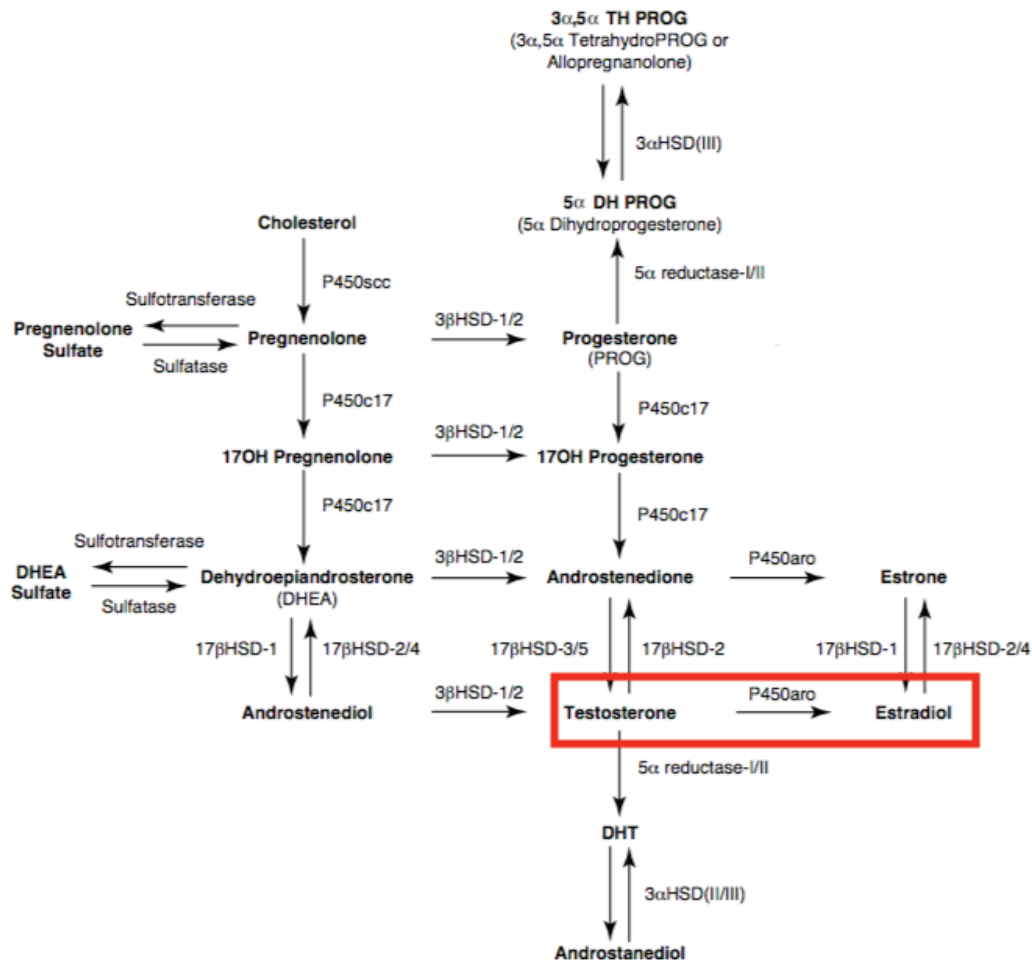


Figure I.25 : Représentation schématique de la voie de synthèse de l'estradiol

La synthèse de l'estradiol est produite par la conversion de la testostérone à l'aide de l'aromatase P450. D'après Mellon et Griffin., 2002.

1.2) Symptômes liés à la ménopause

Parmi les premiers symptômes liés à la diminution drastique des hormones stéroïdiennes, on peut citer une hyper sensibilité mammaire, les symptômes vasomoteurs (bouffées de chaleur), les insomnies et les accès de migraine. Plus tard apparaissent des problèmes génito-urinaires comme une atrophie génitale, des saignements vaginaux, des désordres sexuels et des infections urinaires fréquentes (Zapantis and Santoro, 2003). La présence et la sévérité de ces symptômes varient d'une personne à l'autre. Les bouffées de chaleur sont les phénomènes les plus courants chez la femme et sont ressenties chez 55 % des femmes ménopausées (Santoro and Randolph, 2011). L'apparition de l'ostéoporose, le vieillissement de la peau, les problèmes

cardiovasculaires (athérosclérose) et les désordres métaboliques sont d'autres conséquences qui altèrent la santé et la qualité de la vie chez la femme ménopausée (Miquel et al., 2006).

1.3) Ménopause et stress oxydatif

De nombreuses preuves suggèrent un déséquilibre de la balance pro- et antioxydante chez les femmes ménopausées qui corrèle avec l'apparition des symptômes cités précédemment. Par exemple, les femmes qui ressentent des bouffées de chaleur ont un niveau d'activité antioxydante plus faible que celles ne ressentant pas ce symptôme (Leal Hernández et al., 2000). Les marqueurs du stress oxydatif comme le niveau de MDA, de 4-HNE et l'oxydation des LDL (ox LDL) sont plus élevés chez les femmes ménopausées par rapport à celles encore fertiles. De plus, l'activité de la GPx est réduite chez les femmes ménopausées suggérant un niveau de défense contre le stress oxydatif plus faible (Signorelli et al., 2006). La ménopause peut également résulter d'une chirurgie avec ablation des ovaires afin de prévenir le développement de certains cancers ovariens. Les femmes subissant cette chirurgie voient leur taux d'estradiol diminué de 92 % et possèdent un niveau d'expression d'ARNm de certaines enzymes antioxydantes (SOD, GPx et catalase) plus faible dans le sang, tout comme la quantité de GSH (molécule antioxydante) sanguin par rapport à des femmes n'ayant pas subies cette chirurgie (Bellanti et al., 2013). La ménopause naturelle ou provoquée aboutit à un état pro-oxydant chez la femme, liée en grande partie au déclin de cet antioxydant naturel qu'est l'estradiol.

1.4) Hormonothérapie (HRT)

1.4.1) Effet sur les conséquences systémiques

Les thérapies pour lutter contre les conséquences de la ménopause ont pris différentes tournures au cours du temps. À la fin des années 80, plusieurs études observationnelles suggéraient que les thérapies hormonales (HRT) estrogéniques et progestatives pour les femmes ménopausées étaient bénéfiques contre l'ostéoporose, les maladies coronariennes et les démences. L'*American College of Physicians* avait alors recommandé en 1992 l'utilisation des HRT comme une stratégie de prévention face aux conséquences de la ménopause (Lobo et al., 2016). En 1991, voit le jour aux États-Unis la *Women Health Initiative (WHI)* qui a pour but d'étudier les effets des HRT sur les maladies cardiovasculaires, les fractures liées à l'ostéoporose, les cancers du sein et les cancers colorectaux à l'aide d'une cohorte de 161 808 femmes ménopausées âgées de 50 à 79 ans (WHI lien internet). Les premiers résultats sont publiés en 2002 dans le « *Journal of the American Medical Association* ».

Le traitement pour les femmes ménopausées à base d'estradiol conjugué équín et d'acétate de médroxyprogestérone, en comparaison au groupe contrôle :

- augmente les risques de maladies cardiovasculaires comme les accidents vasculaires cérébraux, l'athérosclérose et les maladies thromboemboliques veineuses (Rossouw et al., 2002).
- augmente les cancers du sein (+26 %), mais diminue les cancers colorectaux (-37 %) avec aucun effet sur le cancer de l'utérus (Chlebowski et al., 2003; Rossouw et al., 2002).
- diminue de 24 % les fractures totales liées à l'ostéoporose (Rossouw et al., 2002).
- n'induit aucune amélioration des fonctions cognitives (maladie d'Alzheimer ou démence) (Rapp et al., 2003).

La conclusion de la part de la *WHI* est que comme les bénéfices ne compensent pas les risques, les traitements hormonaux doivent donc être stoppés immédiatement. En Angleterre, la même conclusion a été rapportée après une étude réalisée sur plus d'un million de femmes âgées de 50 à 64 ans prenant des HRT (*Million Women Study*). (Beral and Million Women Study Collaborators, 2003).

En conséquence, les taux de prescriptions des HRT ont diminué de la part des praticiens, même pour les femmes ayant des symptômes sévères de ménopause (Lobo et al., 2016). Cependant, ces études ont fait l'objet de nombreuses critiques de la part du monde scientifique. Il leur est reproché de contenir de nombreux biais (Klaiber et al., 2005; van der Mooren and Kenemans, 2004a). Par exemple, la réanalyse des résultats obtenus par la *WHI* (Rossouw et al., 2002) rapporte que les maladies coronariennes et le risque sur le cancer du sein sont réduits après une HRT chez les femmes ménopausées les plus jeunes (50-59 ans) (Klaiber et al., 2005; Lobo et al., 2016).

À la suite de ces nombreuses études, de multiples congrès internationaux ont abouti à un consensus (Burger et al., 2004) sur l'utilisation des HRT qui pourraient être administrées si la femme :

- (1) présente une ménopause précoce.
- (2) présente des symptômes sévères liés à la ménopause.
- (3) présente un fort risque d'ostéoporose, après avoir considéré d'autres thérapies alternatives.
- (4) décide de son plein gré d'être traitée avec une HRT, après avoir reçu des informations adéquates sur les risques potentiels.

1.4.1) Effet sur le stress oxydatif

À l'encontre des effets contradictoires sur l'usage des HRT sur les effets systémiques, il n'y a aucune contestation sur les effets bénéfiques contre le stress oxydatif. Chez des femmes ménopausées traitées avec de l'estradiol seul ou combiné à un progestatif, une réduction de la peroxydation lipidique et une augmentation du statut antioxydant total sont observées dans les deux cas ([Bednarek-Tupikowska et al., 2004](#)), ainsi qu'une augmentation des activités de la SOD, de la GPx et de la Catalase dans le sérum ([Bednarek-Tupikowska et al., 2006](#)). L'observation que le progestatif seul n'a aucun effet suggère qu'il s'agit bien de l'estradiol qui possède ce pouvoir antioxydant ([Bednarek-Tupikowska et al., 2006, 2004](#)). Chez les femmes ayant une ménopause non naturelle (ablation des ovaires), le traitement avec du Dermestil (patch estrogénique), renforce les défenses antioxydantes en augmentant l'expression de l'ARNm de la SOD, la GPx et la catalase ([Bellanti et al., 2013](#)).

De plus, un traitement oral (2 mg/jour d'estradiol) et transdermique (1,5 mg/jour d'estradiol) permet de réduire la pression artérielle systémique moyenne (passant de 92 mmHg à 85 mmHg), la quantité de catécholamines plasmatiques (noradrénaline et adrénaline) ainsi que le niveau de 8-isoprostane (marqueur de l'oxydation lipidique) ([Maffei et al., 2006](#)). Ainsi, chez la femme ménopausée, l'hypertension artérielle systémique est corrélée à une augmentation du stress oxydatif ([Lassègue and Griendling, 2004](#)). L'estradiol devient donc un traitement efficace contre l'hypertension à travers son efficacité contre le stress oxydatif.

1.5) Autre traitement : les modulateurs sélectifs des récepteurs estrogéniques (SERMs)

Les SERMs sont des composés qui selon le type d'organe ont des propriétés antagonistes ou agonistes des récepteurs de l'estradiol (ERs). Parmi les plus connus et régulièrement utilisés en clinique afin de prévenir l'ostéoporose et le cancer du sein, on peut citer le tamoxifène de première génération et le raloxifène de seconde génération ([Komm and Mirkin, 2014; Mirkin and Pickar, 2015](#)). Toutefois, le tamoxifène, bien qu'efficace contre le cancer du sein, stimule l'endométriose et augmente le risque d'hyperplasie de l'utérus ([Cohen, 2004](#)).

Un des dernier SERM mis au point est le bazédoxifène (BZA). Structuellement distinct des autres SERMs (**figure I.26**), il a une affinité 10 fois plus faible pour le récepteur α de l'estradiol (ER α) que le raloxifène ([Komm and Mirkin, 2014](#)). Il est surtout utilisé en clinique pour la prévention et le traitement de l'ostéoporose chez les femmes ménopausées en réduisant le nombre de fractures. Une étude sur des femmes ménopausées en santé traitées pendant 24 mois avec du bazédoxifène ne rapporte pas de changement de l'épaisseur de l'utérus ni de

changement du volume des ovaires ou encore l'apparition de cancers ovariens (Pinkerton et al., 2009).

Les SERMs et principalement le bazedoxifène, semblent être une thérapie très efficace contre les conséquences de la ménopause, sans provoquer d'effets secondaires néfastes rapportés par la « Women Health Initiative » (Rossouw et al., 2002) (une perspective clinique sera apportée dans la partie discussion générale).

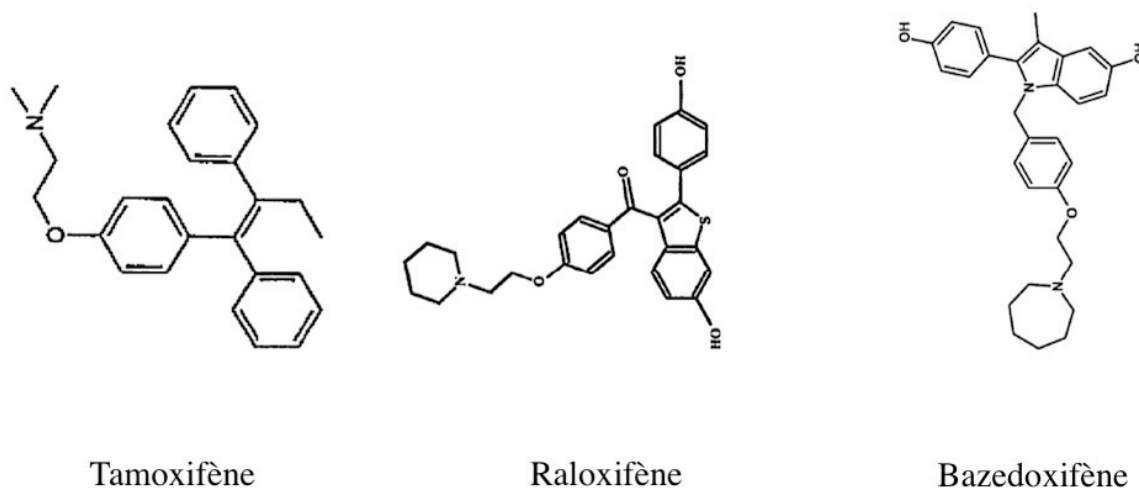


Figure I.26 : Structure chimique des principaux modulateurs sélectifs des récepteurs de l'estradiol (SERMs) D'après Komm et Mirkin., 2014

1.6) conclusion

La majorité des symptômes de la ménopause apparaissent avec la diminution graduelle de l'estradiol, où le stress oxydatif semble jouer un rôle majeur dans l'apparition de ces symptômes.

Il est clair qu'il existe une relation étroite entre l'hormonothérapie et le niveau de stress oxydatif. Toutefois, la nature de cette relation reste à confirmer (Doshi and Agarwal, 2013).

La «Women's Health Society» recommande l'utilisation de modèles animaux afin de mieux identifier les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les conséquences systémiques liées à la ménopause et à l'hormonothérapie, notamment en ce qui concerne les troubles du sommeil (Mallampalli and Carter, 2014).

2) L'estradiol

2.2) Les récepteurs de l'estradiol

Les estrogènes est plus particulièrement le 17 β estradiol (E₂) déclenchent une large variété d'effets biologiques à travers différents récepteurs membranaires et nucléaires. Ces effets peuvent être séparés en deux catégories : les effets génomiques et non génomiques.

2.2.1) Effets génomiques

Il est actuellement bien accepté que la majorité des effets de l'estradiol sont médiés par deux récepteurs nucléaires, ER α et ER β (ERs), membres de la superfamille des récepteurs nucléaires. Étant des facteurs de transcription, la fixation de l'hormone sur son récepteur permet un changement de conformation de ER, qui se dimérise avant d'être transporté dans le noyau et de se fixer sur les éléments de réponse aux estrogènes (EREs) localisés sur les promoteurs des gènes cibles. En l'absence de ligand, les ERs se trouvent séquestrés entre des protéines chaperonnes telles que les protéines de choc thermique HSP 90 et 70 (Björnström and Sjöberg, 2005). ER α et ER β partagent 97 % d'homologie pour la région de liaison à l'ADN et 59 % d'homologie pour la région fixant le ligand (AF2) (figure I.27) (Le Saux, 2007).

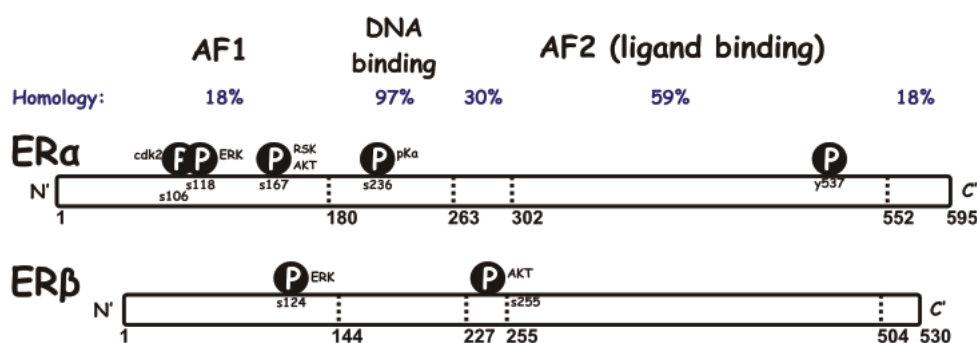


Figure I.27 : Représentation schématique des récepteurs nucléaires ER α et ER β

Les récepteurs nucléaires ER α et ER β partagent 97 % d'homologie pour la région de liaison à l'ADN et 60 % pour la région fixant le ligand. D'après Li et al., 2004

Les ERs peuvent également moduler l'expression de nombreux gènes sans se fixer à l'ADN, mais en interagissant avec d'autres facteurs de transcription. Par exemple, l'interaction des ERs avec le facteur de transcription « activator protein 1 » (AP-1) est l'exemple typique de cette interaction protéine-protéine (Göttlicher et al., 1998).

ER α et ER β sont exprimés dans de nombreuses zones dans le cerveau, avec une prédominance de ER β dans le cortex (Shughrue et al., 1997). Les ERs sont capables de fixer le 17 β estradiol (E₂) mais également des composés non stéroïdiens comme les modulateurs sélectifs des

récepteurs à l'estradiol (SERMs). Par exemple, le 4,4',4''-(4-Propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol (PPT) est 410 fois plus sélectif pour ER α que ER β alors que le diarylpropionitrile (DPN) est 70 fois plus sélectif pour ER β que ER α (**figure I.28**) (Irwin et al., 2012).

ER β est aussi trouvé dans la mitochondrie (appelé mtER β) (Yang et al., 2004) où il est capable de réguler la fonction mitochondriale en induisant l'expression des gènes de la chaîne respiratoire mitochondriale (Chen et al., 2005; Irwin et al., 2012; Nilsen and Brinton, 2004). Le génome mitochondrial contient les éléments de réponse aux estrogènes (EREs) permettant la fixation directe de ER β (Demonacos et al., 1996). Même si la littérature suggère qu'il s'agit principalement de ER β qui est importé dans la mitochondrie, ER α est également trouvé dans la mitochondrie et est capable d'exercer ses effets directement sur le génome mitochondrial (Chen et al., 2005).

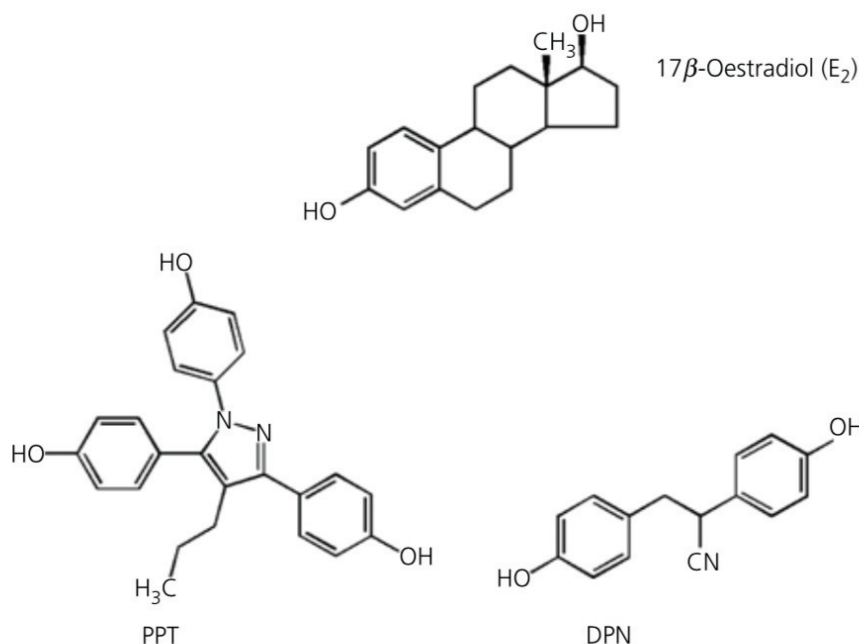


Figure I.28 : Structure chimique du 17 β -estradiol (E₂) et des modulateurs sélectifs des récepteurs de l'estradiol.

Le propylpyraoletriol (PPT) agoniste de ER α et le diarylpropionitrile (DPN) agoniste de ER β .
Adapté d'après Irwin et al., 2012

2.2.2) Effets non-génomiques

De nombreux effets de l'estradiol sont trop rapides et ne peuvent donc pas dépendre des effets génomiques. On parle d'actions non génomiques médiées par des récepteurs membranaires. Le premier récepteur à être activé par l'estradiol est GPER. L'activation de GPER (G-Protein-coupled estrogen receptor) déclenche une cascade de signalisation rapide. À travers ce

récepteur, l'estradiol active une protéine Gs qui permet d'augmenter l'activité de l'adénylate cyclase (production AMPc), la voie PI3K-Akt et la voie MAPK. La localisation cellulaire de la GPER semble controversée, certains groupes la localise à la membrane plasmique alors que d'autres suggèrent sa présence sur la membrane du réticulum endoplasmique (Brinton et al., 2015; Prossnitz and Barton, 2011). Des récepteurs classiques ERs attachés à la membrane plasmique mER α et mER β sont capables d'activer les voies de signalisation MAPK et PI3K-Akt. Il existe également un mode de connexion entre l'action non génomique et l'action génomique. Par exemple, dans le cerveau, l'activation des récepteurs membranaires (mER α et mER β) par l'estradiol conduit à travers la cascade des voies MAPK et PI3K-Akt à la phosphorylation et l'activation des facteurs de transcription CREB et NF- κ B. L'estradiol aboutit à l'expression de gènes ayant sur leurs promoteurs les éléments de réponses à CREB et NF- κ B (Björnström and Sjöberg, 2005). L'estradiol à travers CREB et NF- κ B déclenche l'expression de protéines impliquées dans l'apprentissage, la mémorisation, la transmission synaptique et la croissance neuronale (Brinton et al., 2015). MAPK est capable de phosphoryler la région AF-1 des récepteurs nucléaires ER α et ER β et de moduler leurs fonctions (Kato et al., 1995), suggérant que les récepteurs membranaires mER α et mER β sont capables, en activant MAPK, de moduler la fonction des récepteurs nucléaires ER α et ER β . Les différents récepteurs de l'estradiol localisés dans le cerveau sont présentés **figure I.29**.

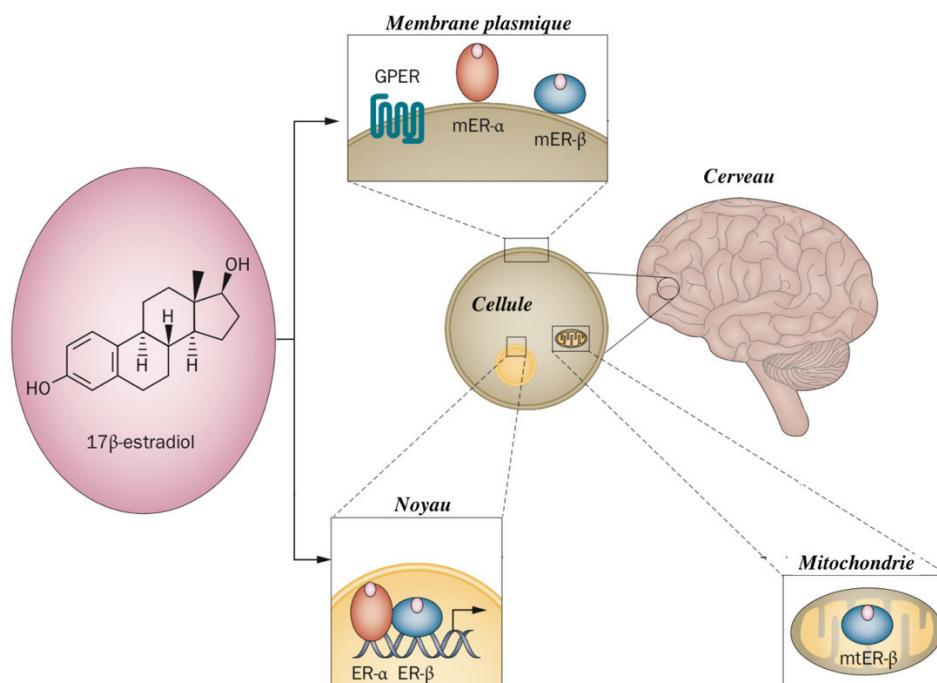


Figure I.29 : Localisation des différents récepteurs de l'estradiol dans une cellule cérébrale.

On retrouve deux récepteurs nucléaires ERs (ER α et ER β) jouant le rôle de facteurs de transcription dans le noyau. Le récepteur β est également capable d'être transloqué dans la mitochondrie et de se fixer à l'ADN mitochondrial (mt ER β). Trois récepteurs membranaires sont localisés à la membrane plasmique de la cellule, GPER, mER α et mER β et permettent l'activation de voies non génomiques. Adapté d'après Brinton et al., 2015

2.2) Estradiol et son rôle antioxydant

Il a été proposé que la longévité de la vie chez le sexe féminin en comparaison au sexe masculin est en partie liée aux effets antioxydants de l'estradiol, quelle que soit l'espèce étudiée, humaine (Asdell et al., 1967) ou animale (Borrás et al., 2003). Une forte corrélation négative a été observée entre l'activité de la catalase et de la glutathion peroxydase hépatique avec la longévité de plusieurs espèces, dont la souris, le rat, le cochon d'Inde, la grenouille, le crapaud, la truite, le canari et le pigeon (Lopez-Torres et al., 1993). Ces observations suggèrent que la quantité de ROS (H_2O_2) est plus faible, d'où une diminution de l'activité des défenses antioxydantes.

Dans ce sens, chez des rongeurs ovariectomisés, une augmentation du stress oxydatif est observée. Par exemple chez le rat, on retrouve une augmentation de la production de H_2O_2 et une diminution du niveau de GSH dans le cerveau et dans le foie (Borrás et al., 2010), une diminution de l'activité de l'aconitase (marqueur de stress oxydatif) et de l'activité de la SOD mitochondriale dans le cerveau (Razmara et al., 2007), une augmentation de la peroxydation lipidique et des protéines carbonylées dans le cerveau (Sandhir et al., 2014). Le remplacement avec de l'estradiol dans chacune de ces études permet de retrouver un niveau de stress oxydatif similaire à celui des femelles non ovariectomisées (Borrás et al., 2003; Razmara et al., 2007; Sandhir et al., 2014). Chez des ratte naturellement ménopausées, l'administration d'estradiol (0,1 µg/g) en sous-cutané pendant un mois permet de récupérer l'activité de la SOD cytosolique dans le cerveau, le cœur, le foie, le rein et l'utérus qui était réduite par la ménopause (Moorthy et al., 2005). De même, l'utilisation de SERMs (les agonistes des récepteurs $ER\alpha$ (PPT) et $ER\beta$ (DPN) chez des ratte ovariectomisées, permet de réduire la peroxydation lipidique et d'augmenter la quantité de peroxyrédoxine (une peroxydase capable de prendre en charge H_2O_2) (Irwin et al., 2012). Les effets antioxydants de l'estradiol ont lieu avec des doses physiologiques chez ces modèles animaux, tout comme chez l'humain. Les effets antioxydants de l'estradiol ont été démontrés supérieurs à l'usage des antioxydants vitaminiques, comme la vitamine E (Diplock et al., 1998) ou un combiné de vitamine A et C (El Habachi et al., 2014). Les effets bénéfiques de l'estradiol contre le stress oxydatif sont surtout d'origine mitochondriale suggérant une régulation fine de la fonction de la chaîne respiratoire par cette hormone.

2.3) Estradiol et fonction de la chaîne respiratoire mitochondriale dans le cerveau

La dysfonction mitochondriale est responsable d'un certain nombre de maladies neurodégénératives liées à l'âge (Morán et al., 2012). La défectuosité de la structure

mitochondriale et de la fonction de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) a été observée chez des patients souffrants des maladies de Parkinson (Kösel et al., 1999) et d'Alzheimer (Castellani et al., 2002). Les pertes de la fonction mitochondriale et de la production d'ATP sont observées souvent avant le développement des maladies cliniques. Il en résulte une diminution des défenses cellulaires et des processus de réparation. Également, il peut se produire des dysfonctions au niveau des macromolécules constitutives de la cellule et une diminution des capacités de la cellule à répondre adéquatement à un stress externe ou interne (Nilsen and Brinton, 2004). Prévenir cette dysfonction du métabolisme énergétique est une stratégie importante contre la mort cellulaire neuronale observée dans plusieurs maladies neurodégénératives. C'est dans cette optique que, dans les années 90, de nombreuses études se sont concentrées sur les effets neuroprotecteurs de l'estradiol, en particulier antioxydants, et sur le fonctionnement mitochondrial (Behl, 2002; Brinton et al., 2015; Chen et al., 2005). Plusieurs observations suggèrent que la chaîne respiratoire mitochondriale est une des cibles majeures des estrogènes. Par exemple, l'incidence de la maladie de Parkinson est plus faible chez les femmes que chez les hommes (Dluzen and McDermott, 2000). L'induction de la maladie de Parkinson chez la souris par l'administration d'une neurotoxine le MPTP induit une inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale en se fixant sur le même site que la roténone (inhibiteur du complexe I), conduisant à une diminution de la production d'ATP et une augmentation de la production de H₂O₂ (Fabre et al., 1999; Nicklas et al., 1985). L'administration de cette substance à des souris mâles conduit à une dysfonction de la mitochondrie et à la perte des neurones dopaminergiques dans plusieurs régions du cerveau, alors que chez les femelles il n'y a aucun effet de l'administration du MPTP (Kenchappa et al., 2004). Il y est donc suggéré que les effets de l'estradiol sur la mitochondrie peuvent expliquer son rôle neuroprotecteur.

En effet, des rattes ovariectomisées et supplémentées en E₂ (30µg/kg) montrent une augmentation (i) de la respiration mitochondriale avec les substrats du complexe I (glutamate + malate) ; (ii) de l'activité de la cytochrome c oxydase (complexe IV) ; (iii) de la quantité d'expression de l'ATP synthase (complexe V) et (iv) une diminution de la peroxydation lipidique évaluée par la méthode des TBARS dans un homogénat de cerveau (**figure I.30**) (Irwin et al., 2008). Ces données suggèrent que l'E₂ est capable de moduler le métabolisme mitochondrial, conduisant à une augmentation de la production d'ATP et à une diminution du stress oxydatif. Cette tendance des effets protecteurs de l'E₂ est également montrée sur des cellules endothéliales cérébrales en culture. L'incubation de ces cellules avec de l'E₂ réduit la fuite du cytochrome c (jouant le rôle d'antioxydant en diminuant la fuite d'électrons) de la mitochondrie. De plus, on retrouve une diminution de la production de l'anion superoxyde et

de l'inhibition de l'activité de l'aconitase (Ali Razmara et al., 2008). La dysfonction de la chaîne respiratoire mitochondriale et l'augmentation des ROS mitochondriales provoquent un cercle vicieux dans la mitochondrie et augmentent les dommages oxydatifs de l'ADN mitochondrial. Puisque l'ADN mitochondrial code l'ensemble des protéines de la chaîne respiratoire, il aboutit à une plus grande dysfonction de la chaîne respiratoire (Nilsen and Brinton, 2004), alors que l'estradiol en réduisant les dommages de l'ADN mitochondrial prévient la dysfonction de la chaîne respiratoire mitochondriale (Borrás et al., 2010, 2003) et assure sa fonction neuroprotectrice.

La modulation de la chaîne respiratoire par l'E₂ passe par ses récepteurs nucléaires ERs qui, en se fixant sur l'ADN nucléaire, augmentent l'expression des protéines de la chaîne respiratoire qui sont importées dans la mitochondrie. Ces récepteurs (ER α et ER β) sont également transloqués dans la mitochondrie, se fixent à l'ADN mitochondrial et augmentent la synthèse des protéines codées par le génome mitochondrial (Chen et al., 2005; Nilsen and Brinton, 2004). L'assemblage des sous-unités de la chaîne respiratoire mitochondriale issues du génome nucléaire et du génome mitochondrial augmente la respiration mitochondriale et le métabolisme énergétique (Irwin et al., 2012, 2008), et diminue le stress oxydatif mitochondrial (Borrás et al., 2010, 2003; Razmara et al., 2007).

L'E₂ a donc un rôle primordial dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Au vu de son rôle déjà connu dans la modulation de l'expression et de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, GPx et catalase) (Moorthy et al., 2005), l'E₂ devient une thérapie prometteuse contre des maladies impliquant une dysfonction de la mitochondrie et un stress oxydatif élevé.

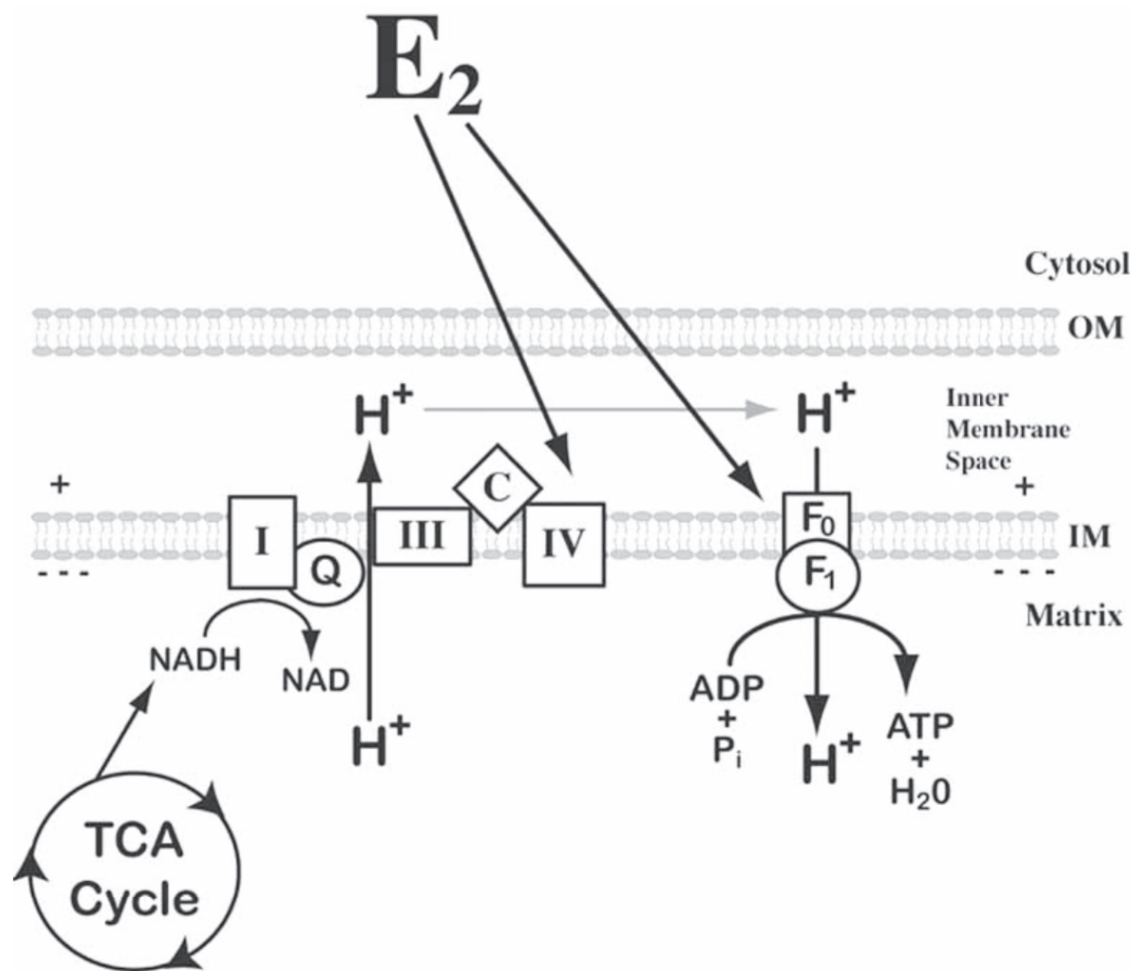


Figure I.30 : Effet de l'estradiol (E_2) sur la chaîne respiratoire mitochondriale

L'estradiol augmente l'expression et l'activité du complexe IV (cytochrome c oxydase) et V (ATP synthétase) de la chaîne respiratoire mitochondriale. L'estradiol augmente ainsi l'efficacité de la respiration des mitochondries dans le cerveau et la production d'ATP par l'ATP synthétase. *D'après Nilsen et Brinton., 2004*

Partie II

Hypothèse générale et objectifs

Sachant que :

- Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil et ses conséquences augmentent à la ménopause (Bixler et al., 2001; Young et al., 2003).
- La ménopause et le syndrome d'apnées obstructives du sommeil impliquent une augmentation du stress oxydatif (Doshi and Agarwal, 2013; Lavie et al., 2004).
- L'estradiol est un puissant antioxydant naturel chez la femme, dont les niveaux circulants déclinent drastiquement à la ménopause (Bellanti et al., 2013).
- L'estradiol est capable par l'intermédiaire de ses récepteurs nucléaires ERs (ER α et ER β) de moduler la chaîne respiratoire mitochondriale, siège de la production d'énergie et producteur majeur des espèces réactives de l'oxygène (Chen et al., 2005; Nilsen and Brinton, 2004).

L'hypothèse générale de cette thèse est que l'estradiol et les modulateurs sélectifs des récepteurs à l'estradiol que sont le PPT (agoniste ER α) et le DPN (agoniste ER β) permettent de prévenir les conséquences systémiques, cellulaires et moléculaires de l'hypoxie intermittente.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons utilisé un modèle animal ovariectomisé (OVX) exposé à l'hypoxie intermittente (21-10 % O₂ -8h/jour) pendant 7 jours (afin de mimer l'hypoxémie observée chez l'homme) et un modèle transgénique invalidé pour le récepteur β de l'estradiol pour déterminer **les objectifs généraux** suivants :

- 1- Est-ce que l'estradiol permet de prévenir les dysfonctions cardio-respiratoires secondaires à l'HI ?
- 2- Est-ce que l'estradiol permet de limiter le stress oxydatif cérébral et périphérique secondaire à l'HI ?
- 3- Est-ce que l'HI induit une dysfonction mitochondriale dans le cerveau ?
- 4- Est-ce que les SERMs des récepteurs ER α et ER β permettent d'éviter une dysfonction mitochondriale en HI ?
- 5- Est-ce que le récepteur β de l'estradiol (ER β) est impliqué dans le contrôle cardio-respiratoire et la fonction mitochondriale dans le cerveau ?

Afin de répondre à ces objectifs, nous avons mis en place 3 études différentes. Les objectifs plus spécifiques à chaque étude sont décrits brièvement ici.

Le **Chapitre 1** vise à étudier la protection conférée par un traitement estrogénique (17 β -estradiol) contre les altérations cardio-respiratoires d'une part et contre le stress oxydatif cérébral et périphérique d'autre part.

La première partie s'est concentrée sur des variables systémiques. L'étude de Mifflin et ses collègues en 2005 rapporte que l'élévation de la pression artérielle systémique liée à l'HI est plus élevée chez les ratte OVX que chez les femelles intactes, suggérant que les hormones ovariennes sont nécessaires à la protection contre l'apparition de l'hypertension par l'HI (Hinojosa-Laborde and Mifflin, 2005). Cependant, une autre étude ne trouve pas cet effet protecteur (Souza et al., 2015).

1. Nous avons donc décidé dans un modèle animal d'utiliser le remplacement hormonal par une dose journalière d'estradiol afin de confirmer ou non la protection qu'apporte l'estradiol contre l'élévation de pression artérielle systémique.

Nous savons également que l'HI induit des changements ventilatoires liés à la sensibilisation des chémorécepteurs périphériques (Prabhakar, 2001).

2. Nous avons décidé d'évaluer également les variables ventilatoires, la stabilité du patron respiratoire ainsi que les réponses ventilatoires à l'hypoxie et l'hypercapnie. Cette première partie a pour but de voir si notre traitement avec de l'estradiol permet d'atténuer ou d'éviter complètement les conséquences systémiques cardio-respiratoires liées à l'HI.

La deuxième partie de cette même étude s'est concentrée sur l'évaluation du stress oxydatif. Nous avons fait l'hypothèse que l'utilisation de l'estradiol, un antioxydant naturel et puissant capable de moduler les défenses antioxydantes chez l'homme (Bellanti et al., 2013) et chez l'animal (Moorthy et al., 2005), serait capable de limiter le stress oxydatif cérébral induit par l'HI.

3. Nous avons évalué le stress oxydatif dans deux régions du cerveau, le tronc cérébral contenant les centres de la respiration, les aires sympathoexcitatrices, ainsi que les zones responsables de l'intégration des fibres afférentes des chémorécepteurs artériels périphériques. L'autre région étudiée est le cortex, connu comme une des régions du cerveau les plus sensibles au stress oxydatif. Cette zone a été utilisée comme contrôle afin de voir si l'HI conduit à de fortes différences de stress oxydant en fonction de la zone cérébrale étudiée. Au niveau périphérique, le stress oxydatif a été évalué sur les glandes surrénales, un des organes terminaux de l'activation sympathique qui semble

jouer selon plusieurs études un rôle clé dans le développement de l'hypertension artérielle systémique causée par l'HI (Bao et al., 1997; Kumar et al., 2006).

Le **Chapitre 2** vise à comprendre le rôle de la mitochondrie en HI, ainsi que les deux agonistes des récepteurs nucléaires à l'estradiol, le récepteur α et β (ER α et ER β). Avant notre étude, peu se sont penchés précisément sur le fonctionnement mitochondrial, et ce bien que l'on sache qu'il s'agit de l'organite produisant majoritairement les ROS et impliqué dans la production d'énergie et la mort programmée des cellules (apoptose) (Jastroch et al., 2010; Skulachev, 1998). Seule l'étude de Douglas et ses collaborateurs a mesuré la respiration mitochondriale sur des mitochondries isolées d'un homogénat de cerveau de rats soumis à une HI. Cependant, cette étude s'est limitée à utiliser seulement les substrats du complexe I et a été réalisée sur des animaux nouveau-nés (Douglas et al., 2010). Avant d'étudier le rôle des agonistes, il est important de comprendre ce que l'HI cause sur la fonction mitochondriale.

1. Nous nous sommes focalisés sur le cortex au vu des résultats rapportés dans le chapitre 1 montrant que le cortex est bien plus vulnérable au stress oxydatif que le tronc cérébral. Nous avons travaillé sur des poinçons de cortex perméabilisés à la saponine (cellules entières) pour disséquer les propriétés intrinsèques de la mitochondrie (respiration mitochondriale et production de ROS).
2. Nous avons également voulu savoir si l'HI conduit à une adaptation métabolique causée par la dysfonction mitochondriale. Nous avons donc évalué l'activité de la pyruvate déshydrogénase.

Le rôle des deux récepteurs nucléaires (ER α et ER β) dans la modulation du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale est important (Nilsen and Brinton, 2004).

3. Nous avons utilisé les agonistes des récepteurs nucléaires ER α et ER β afin de savoir s'ils permettent d'éviter la dysfonction mitochondriale cérébrale induite par l'HI.

Beaucoup ont regardé les effets thérapeutiques neuroprotecteurs de l'estradiol sur le fonctionnement mitochondrial du système nerveux central dans des maladies neurodégénératives qui apparaissent à la ménopause [voir les revues de (Chen et al., 2005; Nilsen and Brinton, 2004)], mais jamais en lien avec le SAOS.

Enfin, il est important de mentionner ici que nous avons utilisé des SERMs spécifiques des récepteurs α et β . Le but est de différencier précisément le rôle que jouent ces deux récepteurs dans le fonctionnement mitochondrial. De plus, les SERMs à la dose que nous avons utilisée, n'induisent pas d'effet sur les organes reproducteurs (Irwin et al., 2012).

Le **Chapitre 3** est particulier, car il n'implique pas l'utilisation de l'hypoxie intermittente. Ce chapitre vise à comprendre plus particulièrement le rôle du récepteur β de l'estradiol (ER β) sur les fonctions cardio-respiratoires dans un modèle de souris invalidé pour ER β (ER β KO) chez des souris jeunes (5-6 mois) et âgées (17-18 mois). ER β est exprimé en majorité dans les vaisseaux sanguins et sa déficience conduit à une altération de la fonction vasculaire avec l'apparition d'une hypertension artérielle systémique (Zhu et al., 2002). Cependant on ne sait pas si cette altération est âge dépendant d'une part et si les paramètres respiratoires sont affectés par la déficience de ER β d'autre part. De plus, la littérature suggère qu'il s'agit principalement du récepteur β qui est localisé dans la mitochondrie (Chen et al., 2005; Yang et al., 2004).

1. Nous avons donc voulu tester s'il y a un lien entre les variables respiratoires au niveau systémique et la respiration mitochondriale au niveau cellulaire. Ce chapitre vise à renforcer les résultats des deux premiers chapitres qui ont plutôt utilisé le remplacement hormonal (estradiol et agonistes de ses récepteurs α et β) sur les fonctions cardio-respiratoires et mitochondriales. Ici, l'utilisation d'un modèle transgénique nous permet de comprendre un autre aspect du rôle de l'estradiol.

Perspective générale de ce projet :

L'ensemble des études réalisées pour cette thèse est utile d'un point de vue fondamental et clinique.

Sur le plan fondamental, nous sommes maintenant en mesure de comprendre que l'HI implique une dysfonction de la mitochondrie et que l'estradiol et les SERMs réduisent le stress oxydatif cérébral induit par l'HI en régulant la chaîne respiratoire mitochondriale et les enzymes antioxydantes.

Sur le plan clinique, bien que cette thèse n'inclue pas d'études sur des sujets humains, on peut suggérer au vu de nos résultats sur les variables systémiques que l'estradiol pourrait être une thérapie efficace pour lutter contre le SAOS et les conséquences systémiques qui lui sont associées.

Partie III

Chapitre I

Estradiol protects against cardio-respiratory dysfunctions and oxidative stress in intermittent hypoxia.

Sofien Laouafa^{1,2}, Alexandra Ribon-Demars^{1,3}, François Marcouiller¹, Damien Roussel³, Aida Bairam¹, Vincent Pialoux^{3,4}, Vincent Joseph¹.

1 : Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada.

2 : CNRS, UMR 5023, Université Claude Bernard Lyon 1, 8, Rue R. Dubois, Bâtiment Dubois, Villeurbanne, 69622, France.

3 : Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Laboratoire interuniversitaire de biologie de la motricité EA7424, 69100, Villeurbanne, France

4 : Institut Universitaire de France, France

Running title : E₂ prevents oxidative stress in female rats exposed to IH.

Avant-propos :

Ce chapitre a été publié dans le journal « SLEEP » le 1^{er} aout 2017.

Ce chapitre se décompose en deux grandes parties. La partie systémique réalisée à Québec (Canada) et la partie stress oxydatif réalisée à Lyon (France). Il a été partiellement présenté à différents congrès internationaux :

- **The 14th international on Sleep and breathing, 25-28 October 2015, Portho de Galinhas (Brazil).** Estradiol prevents cardio-respiratory dysfunctions induced by chronic intermittent hypoxia in female rats.
- **APS Conference, Cardiovascular, renal and metabolic diseases: Physiology and gender, 17-20 November 2015, Annapolis (USA).** Estradiol prevents cardio-respiratory dysfunctions induced by chronic intermittent hypoxia in female rats.
- **American Thoracic Society (ATS), 13-18 May 2016, San Francisco (USA).** Estradiol Prevents Brain Oxidative Stress Induced by Chronic Intermittent Hypoxia in Female Rats.
- **The 15th world congress on Menopause, 28 September-1 October 2016, Prague (Czech Republic).** Estradiol Prevents Brain Oxidative Stress Induced by Chronic Intermittent Hypoxia in Female Rats.

- **Congrès Québécois en Santé Respiratoire (CQSR), 4-5 novembre 2016, Montréal.**
Estradiol Prevents Brain Oxidative Stress Induced by Chronic Intermittent Hypoxia in Female Rats.

J'ai participé à toutes les étapes de cet article, incluant la conception, la réalisation, l'interprétation et l'écriture.

1) Résumé en français

Objectifs de l'étude : Nous avons testé l'hypothèse que l'estradiol (E2) protège contre les désordres cardio-respiratoires et le stress oxydatif induits par l'hypoxie intermittente chronique (HI) chez des ratte adultes.

Méthodes : Des ratte Sprague-Dawley (230-250g) ont été ovariectomisées (OVX) et implantées avec une pompe osmotique délivrant du véhicule (Veh) ou de l'E2 (0,5 mg / kg / jour). Après 14 jours de récupération, les ratte ont été exposées à une HI (21% -10% O₂ - 8 heures / jour - 10 cycles / heure) ou laissées à l'air ambiant (RA). Après 7 jours d'exposition à l'hypoxie intermittente ou à l'air ambiant, ont été mesurés la pression artérielle (brassard à la queue), le métabolisme au repos (calorimétrie indirecte), la ventilation minute, la fréquence des soupirs et des apnées au repos et la réponse ventilatoire à l'hypoxie et à l'hypercapnie (pléthysmographie à corps entier). Ont été récupérés le cortex cérébral, le tronc cérébral et les glandes surrénales pour mesurer i) l'activité de la NADPH et de la xanthine oxydase (enzymes pro-oxydantes) ; ii) l'activité de la glutathion peroxydase et de la superoxyde dismutase mitochondriale et cytosolique (enzymes antioxydantes) et iii) la peroxydation lipidique et l'oxydation protéique (marqueurs du stress oxydatif).

Résultats : l'hypoxie intermittente a augmenté la pression artérielle systémique, la fréquence des apnées au repos et les réponses ventilatoires à l'hypoxie et à l'hypercapnie mais réduit le métabolisme au repos. L'hypoxie intermittente a également augmenté les activités enzymatiques pro-oxydantes et diminué l'activité des enzymes antioxydantes dans le cortex. Le traitement E2 a réduit le poids corporel et évite les effets de l'hypoxie intermittente.

Conclusions : L'estradiol prévient les troubles cardio-respiratoires et le stress oxydatif induits par l'HI. Ces observations peuvent aider à mieux comprendre les mécanismes sous-jacents reliant la ménopause et l'apparition de l'apnée du sommeil chez les femmes, et mettre en évidence un avantage potentiel de l'hormonothérapie.

Mots-clés : Pression artérielle ; physiologie de la respiration ; OSA - Pharmacothérapie ; contrôle respiratoire ; désordres respiratoires du sommeil ; sommeil chez la femme.

2) Abstract

Study Objectives: We tested the hypothesis that estradiol (E_2) protects against cardio-respiratory disorders and oxidative stress induced by chronic intermittent hypoxia (CIH) in adult female rats.

Methods: Sprague-Dawley female rats (230-250g) were ovariectomized (OVX) and implanted with osmotic pumps delivering vehicle (Veh) or E_2 (0.5 mg/kg/day). After 14 days of recovery, the rats were exposed to chronic CIH (21%-10% O_2 - 8 hours/day - 10 cycles/hour) or room air (RA). After 7 days of CIH or RA exposure, we measured arterial pressures (tail cuff), metabolic rate (indirect calorimetry), minute ventilation, the frequency of sighs and apneas at rest, and ventilatory responses to hypoxia and hypercapnia (whole body plethysmography). We collected the cerebral cortex, brainstem, and adrenal glands to measure the activity of NADPH and xanthine oxidase (pro-oxidant enzymes), glutathione peroxidase and the mitochondrial and cytosolic superoxide dismutase (antioxidant enzymes) and measured lipid peroxidation and advanced oxidation protein products (markers of oxidative stress).

Results: CIH increased arterial pressure, the frequency of apnea at rest and the hypoxic and hypercapnic ventilatory responses and reduced metabolic rate. CIH also increased oxidant enzyme activities, and decreased antioxidant activity in the cortex. E_2 treatment reduced body weight and prevented the effects of CIH.

Conclusions: E_2 prevents cardio-respiratory disorders and oxidative stress induced by CIH. These observations may help to better understand the underlying mechanisms linking menopause and occurrence of sleep apnea in women and highlight a potential advantage of hormone therapy.

Keywords: Blood Pressure; Breathing Physiology; OSA – Pharmacotherapy; Respiratory Control; Sleep Disordered Breathing; Sleep in Women.

Statement of Significance.

Sleep apnea induces constant variation of arterial oxygen levels, leading to oxidative stress, hypertension and further respiratory disorders. The prevalence of sleep apnea is higher in men than in premenopausal women and increases after menopause in women. Ovarian hormones exert protective roles against sleep apnea, but the underlying mechanisms are unknown. We used ovariectomized adult female rats exposed to chronic intermittent hypoxia (CIH – a valuable model of sleep apnea) and ask if systemic exogenous administration of estradiol protects against cardiorespiratory and oxidative stress damages. Our results show that estradiol protects against elevated blood pressure, respiratory disorders, and oxidative stress in the brain and adrenal glands of female rats exposed to CIH.

3) Introduction

One of the main features of sleep apnea is chronic intermittent hypoxemia which leads to an increased oxidative stress, defined as an imbalance between the production and elimination of reactive oxygen species (ROS) ([Dumitrascu et al., 2013](#); [Eisele et al., 2015](#); [Iturriaga et al., 2015](#); [Lavie, 2015](#); [Peng et al., 2013](#); [Pialoux et al., 2009](#)), and oxidative stress appears as a major contributor to cardiovascular (hypertension, stroke), neurological (cognitive impairments, mood disorders) and metabolic (insulin resistance, type II diabetes) consequences observed in patients suffering from sleep apnea ([Almendros et al., 2014](#); [Gileles-Hillel et al., 2016](#); [Lavie, 2015](#); [Olea et al., 2014](#); [Pialoux et al., 2011](#)). Animal models of sleep apnea demonstrate that exposure to intermittent hypoxia increased the hypoxic ventilatory response and induced arterial hypertension by enhancing the activity of peripheral chemoreceptors in response to hypoxia by a mechanism involving exaggerated ROS production ([Iturriaga et al., 2015](#); [Morgan et al., 2016b](#); [Peng et al., 2013](#); [Prabhakar et al., 2015, 2012](#)). Similarly, neuronal damage and cognitive impairment might be due to ROS overgeneration secondary to a mitochondrial dysfunction, leading to cytochrome-c release from mitochondria and apoptosis ([Douglas et al., 2010](#)).

The prevalence of sleep apnea is higher in men than in premenopausal women (with a men:women ratio of 2:1 to 3:1) ([Bixler et al., 2001](#); [Redline et al., 1994](#)) and its occurrence is 3 to 4 times higher in women after vs before menopause ([Bixler et al., 2001](#); [Redline et al., 1994](#); [Young et al., 2003](#)). Epidemiological studies have reported that hormonal replacement therapy reduces the frequency of sleep apnea in postmenopausal women after adjustment for other known risk factors (age, body mass index and neck circumference). However, a potential “healthy user bias” was recently suggested¹⁹. Netzer et al²⁰ reported that plasma levels of ovarian

hormones are inversely correlated with the frequency of obstructive sleep apnea while recent studies showed that in depressed women in peri- and postmenopause low estradiol level correlates with high frequency of apnea, and in pregnant women low progesterone level correlates with high apnea frequency. In this context progesterone is well known as a potent respiratory stimulant in humans and animal models (for review see [\(Joseph et al., 2013\)](#)), and the effects of progesterone on nuclear (Marcouiller et al., 2014) and membrane receptors ([\(Boukari et al., 2016, 2015\)](#)) could contribute to reduce apnea frequency by increasing the respiratory drive in normoxia and in response to hypoxia or hypercapnia. While estradiol (E₂) does not have a direct respiratory stimulant effect ([\(Bayliss et al., 1987\)](#)) it could have complementary protective roles against the deleterious consequences of sleep apnea and intermittent hypoxia. For example, E₂ helps to maintain adequate contractile properties of the upper airways dilating muscles in adult female rats exposed to intermittent hypoxia ([\(Liu et al., 2009\)](#)). E₂ is also a potent antioxidant that can reduce cellular ROS content. Indeed, in naturally menopausal rats, E₂ treatment increases the activity of the Cu-Zn superoxide dismutase enzyme (SOD_{Cu-Zn}) in different tissues including brain, heart, kidney and uterus ([\(Moorthy et al., 2005\)](#)). The main producers of ROS (in particular of the superoxide anion - O₂⁻) are the mitochondria, NADPH oxidase, and xanthine oxidase ([\(Cadenas and Davies, 2000; Lavie, 2015\)](#)), and E₂ also downregulates their activity. For example, mitochondrial ROS production in brain and liver is reduced by E₂ in male rats ([\(Borrás et al., 2010, 2003\)](#)). E₂ through its genomic receptors (ER α and ER β) increases the expression and activity of the mitochondrial respiratory chain enzymes, leading to an increase of oxidative phosphorylation, a reduction of electron leaks and, therefore a decreased production of mitochondrial ROS. ER α and ER β have also been demonstrated to regulate the expression and activity of SOD ([\(Irwin et al., 2012\)](#)).

Previous studies using adult female rats exposed to intermittent hypoxia have reported conflicting results. A recent study showed an increased arterial tension and respiratory instabilities after 35 days of exposure to intermittent hypoxia reaching 6% O₂ - every 9 minutes ([\(Souza et al., 2015\)](#)), while it was previously reported that, compared to male or ovariectomized female rats, intact females had a lower elevation of arterial blood pressure after 7 days (10% O₂ - every 6 minutes) of intermittent hypoxia ([\(Hinojosa-Laborde and Mifflin, 2005\)](#)).

In the present study, we tested the hypothesis that E₂ protects against oxidative stress induced by intermittent hypoxia in ovariectomized (OVX) female rats. We used systemic administration of E₂ to address the putative effects on peripheral chemoreceptors (which are involved in development of hypertension in intermittent hypoxia ([\(Iturriaga et al., 2015; Morgan et al., 2016b; Peng et al., 2013; Prabhakar et al., 2015; Prabhakar and Kumar, 2010\)](#)) and in the central nervous system, which is also an important target of oxidative stress in intermittent hypoxia

(Almendros et al., 2014; Douglas et al., 2010). We measured arterial pressure, breathing pattern at rest and in response to hypoxia or hypercapnia (as an index of peripheral chemoreceptor responses), and activities of pro- and antioxidant enzyme in cytosolic and mitochondrial protein extracts in the central (cortex and brainstem) and peripheral (adrenal glands) nervous system after 7 days of chronic intermittent hypoxia (CIH) or room air. Our results are consistent with the hypothesis that E_2 acts as a potent antioxidant in female rats exposed to CIH, preventing cardio-respiratory dysfunction.

4) Material and methods

4.1) Ethical approval

All experimental protocols have been approved by the animal protection committee of the Centre de Recherche du CHU de Québec in accordance with the Canadian Council on Animal Care in Science. We used a total of 40 Sprague-Dawley female rats (220-250g/57-70 days old) purchased at Charles Rivers Laboratories (Saint-Constant, QC, Canada). All animals had *ad-libitum* access to food and water and were maintained on a 12/12h light/dark cycle.

4.2) Experimental group

We used four groups of adult female rats (10 females/groups): two groups of ovariectomized rats were treated with vehicle (2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin - 200 μ g/ml – Cayman Chemicals catalogue# 16169) and exposed either to room air (OVX-Veh RA) or chronic intermittent hypoxia (OVX-Veh CIH). The 3rd group was OVX rats treated with 17 β estradiol (0.5mg/kg/day – Sigma-Adrich catalogue# E8875) and exposed to CIH (OVX- E_2 CIH), and the 4th group was sham-operated rats treated with vehicle and exposed to room air (Sham-Veh RA) serving as a control for the effect of OVX under room air conditions.

4.3) Surgical procedures

Rats were anesthetised under isoflurane (4% induction then 2%) and the ovaries were removed through bilateral flank incisions. The level of anesthesia was verified before and during the surgery by the lack of reflex responses to frequent tail pinching. In sham-operated rats the ovaries were left intact. The animals were implanted subcutaneously in the upper mid-back region with an osmotic pump (Alzet®; model 2ML4 – flow of 60 μ l/day during 28 days) filled with vehicle or 17 β estradiol (0.5 mg/kg/day – adjusted to body weight on the day of surgery). All animals received pre- and post-operative analgesics for 48 hours (bupivacaine, lidocaine,

subcutaneous injection, respectively 3.5 and 7 mg/kg in 2.5 ml/kg) according to our normalized protocols.

4.4) Chronic intermittent hypoxia exposure

After 2 weeks of recovery, the rats were housed in a Plexiglas chamber (internal volume 0.05m³), connected to an oxycycler (Biospherix, Redfield, NY, USA). Oxygen dropped from 21% to 10% in 90 seconds, holding O₂ at 10% for 30 seconds, then returned to 21% in 70 seconds and holding at 21% for 120 seconds, at the rate of 10 cycles/hour for 8 consecutive hours between 8:30am - 4:30pm during 7 days. Rats exposed to room air (RA) were placed in the same room that those exposed to CIH.

4.5) Body weight and food intake

Body weight and food intake were assessed weekly during 4 consecutive weeks starting one week before the surgery. For measurements of food intake, all rats were housed individually with a known amount of food. Every week the amount of remaining food was weighed (including the food inside the cage if necessary), to calculate the energy intake for each animal in Kj/day/Kg using the energy content of the food (13.80 Kj/g - Teklad Global 19% Protein Extruded Rodent Diet – Teklad Diets, Madison, WI, USA).

4.6) Systemic measurements

Arterial blood pressure and heart rate were measured by the tail cuff method by volume pressure recording (*CODA system – Kent Scientific, Torrington, CT, USA*) in conscious rats after exposure to CIH or RA between noon and 1:00pm. The animal was placed in a restrainer tube over a warmed blanket. After 30 minutes of habituation, several recordings were performed, separated at least by 5 minutes. We have reported the mean of the 3 lowest values for systolic, diastolic, and mean arterial pressures. Tail cuff recording requires restraint of the animal, however this method is recognized as a reliable and accurate measure of arterial blood pressure compared to simultaneous telemetry measurements with a chronic aortic catheter ([Feng et al., 2008](#)).

Recording of respiratory and metabolic parameters.

After 7 days in CIH or RA, animals were housed in a whole-body flow-through plethysmograph chamber for adult rats (EMKA technologies, Paris, France). The chamber was constantly flushed with room air (1500 ml/min), and a sub-sampling pump (75 ml/min) was used to collect out-flowing air. A built-in pneumotachograph measured airflow related to breathing. Before the experiment, the chamber was calibrated *via* measurement of the airflow generated by the

rapid injection of 0.5 ml of air. Water pressure, CO₂ and O₂ levels in the out-flowing air were continuously measured using specific gas analyzers (RH-300, CA-10 and FC-10, Sable Systems, Las Vegas, NV, USA) calibrated using a certified dry gas mix (Linde Canada Limite, Vanier, Qc, Canada). Each hour during recordings we also measured water pressure, CO₂ and O₂ levels in the inflowing air, these values were used to calculate O₂ consumption and CO₂ production rate as previously described (Boukari et al., 2016). The temperature of the plethysmograph chamber was recorded with a thermocouple, and the rectal temperature of the rat was measured at the end of the recording. All signals were digitized (Micro 1401 data acquisition system, Cambridge Electronic Design, Cambridge, England) and stored on a computer running the Spike 2 software (version 7.06 - CED). All measurements were performed continuously between 9:00am and 1:00pm, ensuring enough time to obtain respiratory and metabolic parameters reflecting a resting state and evaluate the frequency of apneas in periods of sleep, as assessed by behavioural (animals in curled-up position) and respiratory pattern criteria (Boukari et al., 2016, 2015).

Test of chemoreflex function.

After the recordings in normoxia, the animals were sequentially exposed to hypoxia (12% O₂) and hypercapnia (5% CO₂) for 10 min each separate by 10 min of normoxia. At the end of the recordings, the animals were deeply anesthetized by isoflurane (3%), the level of anesthesia was assessed by the lack of reflex responses to tail pinch, a sample of blood was taken by cardiac puncture, then the animals were sacrificed by decapitation, the cortex, brainstem and adrenal glands were harvested, immediately frozen on dry ice, and stored at -80°C for further analysis. All pumps were removed, and we verified that the remaining volume in each pump was 0.5 ml as expected. Serum estradiol level was measured using an Elisa Immunoassay kit (Cayman chemicals catalogue# 582251).

4.7) Data analysis

Metabolism and respiratory parameters at rest.

We applied a standard approach to determine the resting state defined as the period of quiet and regular breathing pattern with the lowest respiratory frequency (fR) and CO₂ value in the outflowing gas line. Of note, the investigator performing the analysis was not blinded to the groups. O₂ consumption (VO₂) and CO₂ production (VCO₂) rate were calculated using the standard equations as described previously (Boukari et al., 2016). The respiratory exchange ratio (RER) was calculated as VCO₂/VO₂. O₂ consumption and CO₂ production were expressed as volume (ml) per minutes and 100 grams body weight in ambient conditions of atmospheric pressure, temperature and water pressure.

Respiratory frequency (fR), tidal volume (V_T) and minute ventilation (V_E) were determined during periods of calm and regular breathing pattern without interruptions by sighs or apneas. V_T was calculated as described previously (Boukari et al., 2016, 2015; Jochmans-Lemoine et al., 2016) using the standard equation for whole body plethysmography, and expressed as volume (ml) per 100 grams body weight in body conditions of temperature, saturated with water pressure (BTPS).

Frequency of sighs and apneas, and variability of the breathing pattern at rest.

We selected a period of calm and regular breathing pattern lasting about 1 hour towards the end of the 4th hour of recording to evaluate the frequency of sighs, post-sigh and spontaneous apneas. It should be noted that this likely reflects apneas occurring during REM and non-REM sleep. Sighs are characterized by a profound inspiration with a volume that is at least twice the normal tidal volume, and a rapid expiration that can be followed by apneas. Apneas are defined as 2 missed breaths. Post-sigh apneas occur immediately or a few seconds after the sigh (typically 5 to 6 seconds) while spontaneous apneas occur without preceding sigh (Marcouiller et al., 2014). Breathing variability was calculated by the Poincaré plot method for determining variability indexes SD1 and SD2 as described by Brennan et al (Brennan et al., 2001). For each animal, we averaged the variability indexes for 2-3 periods lasting about 400 breaths on a stable portion of the respiratory trace without sigh or apnea.

Test of chemoreflex function.

We selected the longest period of stable breathing pattern with the lowest respiratory frequency during the last 5min after the onset of exposure. All responses were normalized as % increase compared to a baseline value measured before the exposure to test gas.

4.8) Oxidative stress enzyme activities

Protein extraction and assays.

Protein fractions were extracted from frozen cortex, brainstem and adrenal glands. After homogenization in phosphate buffer, different centrifugations (all at 4°C) were used to separate cytosolic and mitochondrial fractions. Briefly, the samples were centrifuged 4 min at 1500g (the supernatant of this centrifugation was used to measure MDA level – see below) followed by a second centrifugation for 10 min at 12000g, and the supernatant (cytosolic fraction) was collected. The pellet was re-suspended in a mitochondrial isolation buffer (250mM sucrose, 1mM EGTA, 20mM Tris-base, PH 7.3) and centrifuged 10 min at 1500g. Finally, a last centrifugation at 9000 g for 10 min was performed and the pellet (mitochondrial fraction) was re-suspended in 200 μ l of mitochondrial isolation buffer. These two fractions were stored at -

80°C until analyses. The concentration of proteins in each fraction was determined by a standard colorimetric BCA assay kit (Thermo Scientific, catalogue#23225) and all subsequent measurements were normalized to protein concentration.

Xanthine Oxidase (XO).

XO activity was assessed using a cocktail containing nitroblue tetrazolium (NTB - 2.2 mM in water), Tris-HCL pH 8 (2.8 mM), and diethylene-triamine-penta-acetic acid (1.3 mM in Tris-HCL) and a fresh solution of hypoxanthine (500 μ M in Tris-9HCL/well). Then, 50 μ l of sample, 200 μ l of cocktail and 30 μ l of hypoxanthine solutions were added to each well and the plate was gently shaken for 40 min at room temperature. The absorbance of the complex (formazan blue) formed by NTB and the superoxide anion produced by XO in the sample was read at 560 nm every 5 min for 1h; XO activity corresponded to the slope of the formation of formazan blue by the time.

NADPH Oxidase (NOX).

NOX activity was assessed using the same cocktail solution that XO and a fresh solution of NADPH 1mM. Then, 20 μ l of sample, 250 μ l of cocktail, and 30 μ l (100 μ M/well) of NADPH were added to each well and the plate was shaken 2 min at room temperature. The absorbance was read at 560 nm every 50 seconds for 10 minutes. NOX activity corresponded to the slope of the formation of formazan blue by the time

Cytosolic and mitochondrial Superoxide dismutase (SOD_{Cu-Zn} and SOD_{Mn})

SOD activity was measured in cytosolic and mitochondrial fractions. SOD_{Cu-Zn} activity was determined in the cytosolic fraction by the degree of inhibition of the reaction between $O_2^{\cdot-}$ produced by a hypoxanthine-xanthine oxidase system and NTB. We used the cocktail detailed for the XO and NOX activities plus hypoxanthine (0.19 mM). A fresh solution of xanthine oxidase (1.02 units/ml) was prepared, then, we added 20 μ l of sample, 250 μ l of cocktail and 20 μ l of XO to each well and mix the plate for 4-5 seconds at room temperature. The absorbance was quickly read at 450 nm every 50 seconds for 5 minutes. SOD_{Mn} activity was similarly determined in the mitochondrial fraction. For this assay, 4 wells were used as blanks, with 20 μ l of PBS 1X rather than samples, and 1mM of NaCN was added in all the wells to inhibit SOD_{Cu-Zn} . SOD activity corresponded to the difference between the slopes of the formation of formazan blue by the time of the blank and each sample.

Glutathione peroxidase (GPX).

Activity of GPX was determined as the rate of oxidation of NADPH to $NADP^+$ in a cocktail solution containing glutathione reductase, NADPH (1.7 mM) and reduced glutathione (1.6 mM in water) using H_2O_2 (0.036% in water) as substrate (Paglia and Valentine, 1967). We added 20

μl of sample, 200 μl of PBS 1X, 30 μl of the cocktail solution and 30 μl of H_2O_2 solution to each well and mix the plate 4-5 seconds at room temperature. The absorbance was quickly read at 340 nm every 50 seconds for 5 minutes. GPX activity was measured as the slope of the NADPH extinction by time.

4.9) Makers of oxidative stress

Advanced oxidation protein products (AOPP)

AOPP are markers of protein oxidation, they were measured according to the semi-automated methods developed by Witko-Sarsat et al ([Witko-Sarsat et al., 1996](#)) The cytosolic concentrations of AOPP were determined by spectrophotometry and were calibrated with a chloramine-T solution that absorbs at 340 nm in the presence of potassium iodide (KI). The absorbance of the reaction mixture was immediately read at 340 nm on the microplate reader against a blank containing PBS, KI and acetic acid.

Malondialdehyde (MDA)

MDA is a marker of lipids peroxidation regularly used for evaluating oxidative stress. Concentrations of MDA were determined as described by Pialoux et al ([Pialoux et al., 2006](#)). Briefly, the pink chromogen was extracted with n-butanol and its absorbance was measured at 532nm by spectrophotometry. MDA concentration was calculated using 1,1,3,3-tetraethoxypropane as standard.

4.10) Statistical analysis

We used GraphPad prism software for all analyses. All data were analyzed using a one-way ANOVA followed by a post-hoc test (Fisher's Least Significance Difference). All data are presented as means (SD or range) or as Tukey plots. The significant P values was set a 0.05.

5) Results

The mean level of serum estradiol was higher in Sham-Veh RA rats (617 (960) pg/ml - range non-detectable – ND - to 2391) and in OVX-E₂ CIH rats (1992 (2400) – range 423 to 6284) compared to OVX-Veh RA rats (4.1 (7.1) - ND to 15.7), and OVX-Veh CIH rats (2.9 (6.7) - ND to 16.7 – ANOVA P value 0.02).

Role of ovariectomy, CIH and estradiol on body weight, and energy intake.

All animals were weighed one week before the surgery, on the day of surgery, and all subsequent weeks. Weight differences were apparent on the day of surgery (Fig. II.1A), but all animals had a similar weight gain and energy intake the preceding week (Fig. II.1B and 1C). On the first week after the surgery, the animals treated with E_2 lose weight (Fig. II.1B) and had a reduced energy intake (Fig. II.1C). Compared to SHAM-operated rats, OVX rats had an increased weekly weight gain during the 2nd and 3rd week post-surgery without altered energy intake. These effects of OVX and E_2 treatment were expected and are well known in female rats (Butera, 2010). Weekly weight gain was lower in OVX rats exposed to CIH than in OVX rats exposed to RA (Fig. II.1B), but the energy intake was similar between groups (Fig. II.1C).

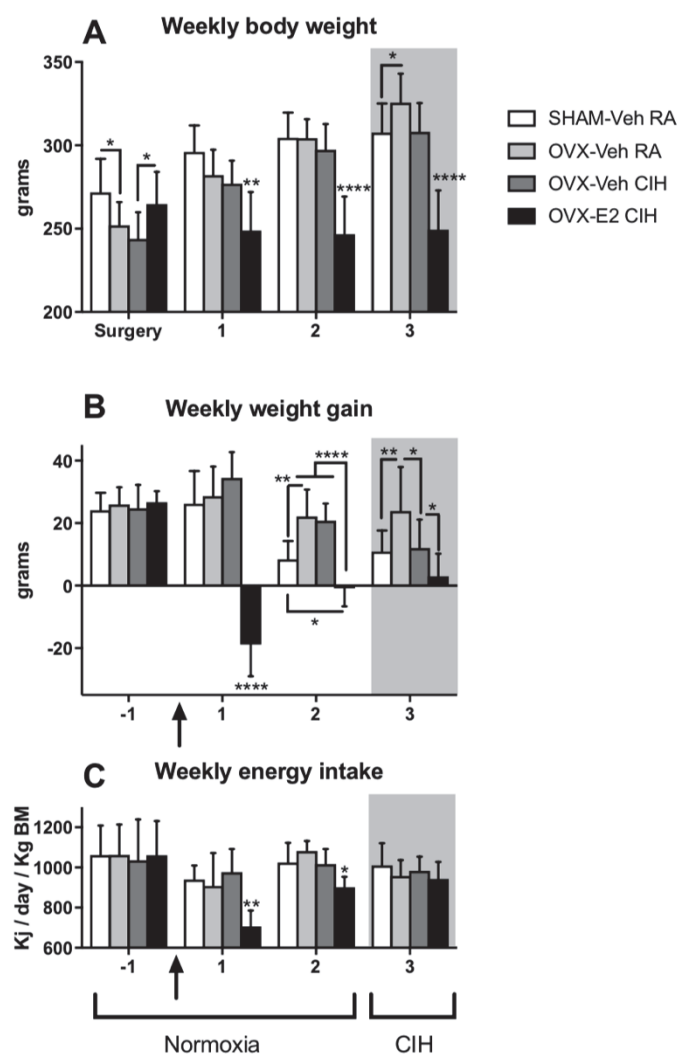


Figure II.1 : Evolution of body weight (A), weekly weight gain (B), and weekly energy uptake (C) over the course of the experiments.

X-axis: weeks relative to surgery (indicated by the arrow at the bottom of graphs B and C). CIH or RA exposures are performed during week 4. All values are mean $\pm$ sem. *, **, *****: $P < 0.05$, < 0.01 , and < 0.0001 vs. corresponding groups (as indicated), or vs. all other groups. All values mean $\pm$ SD. The period of CIH exposure is indicated by the grey blocks.

5.1) Estradiol protects against metabolic alterations induced by CIH.

Rectal temperature measured during respiratory recordings was similar in all groups: 36.5 (0.4 – range 35.8 to 37.0) °C in Sham-Veh RA rats, 36.7 (0.4 – 36.3 to 37.5) in OVX-Veh RA rats, 36.6 (0.2 – 36.2 to 36.9) in OVX-Veh CIH rats, and 36.7 (0.4 – 36 to 37.5) in OVX-E₂ CIH rats. Rats exposed to CIH had lower VO₂ and VCO₂ at rest than non-exposed rats (Fig. II.2A&B), and the RER was increased in OVX-Veh CIH rats compared to SHAM-Veh RA rats (Fig. II.2C). E₂ treatment prevented the decrease of metabolic rate induced by CIH and restored a low VCO₂/VO₂.

Minute ventilation was lower in OVX-Veh RA rats than in SHAM rats (Fig. II.2D) due to a concomitant (but not significant) decrease of respiratory frequency and tidal volume (Fig. II.2E-F). In rats exposed to CIH, tidal volume was higher in rats treated with E₂ than in rats treated with Veh (Fig. II.2F). V_E/VO₂ was higher in OVX-Veh rats exposed to CIH than in OVX-Veh rats exposed to RA (Fig. II.2G), but there was no significant change of V_E/VCO₂ (Fig. II.2H).

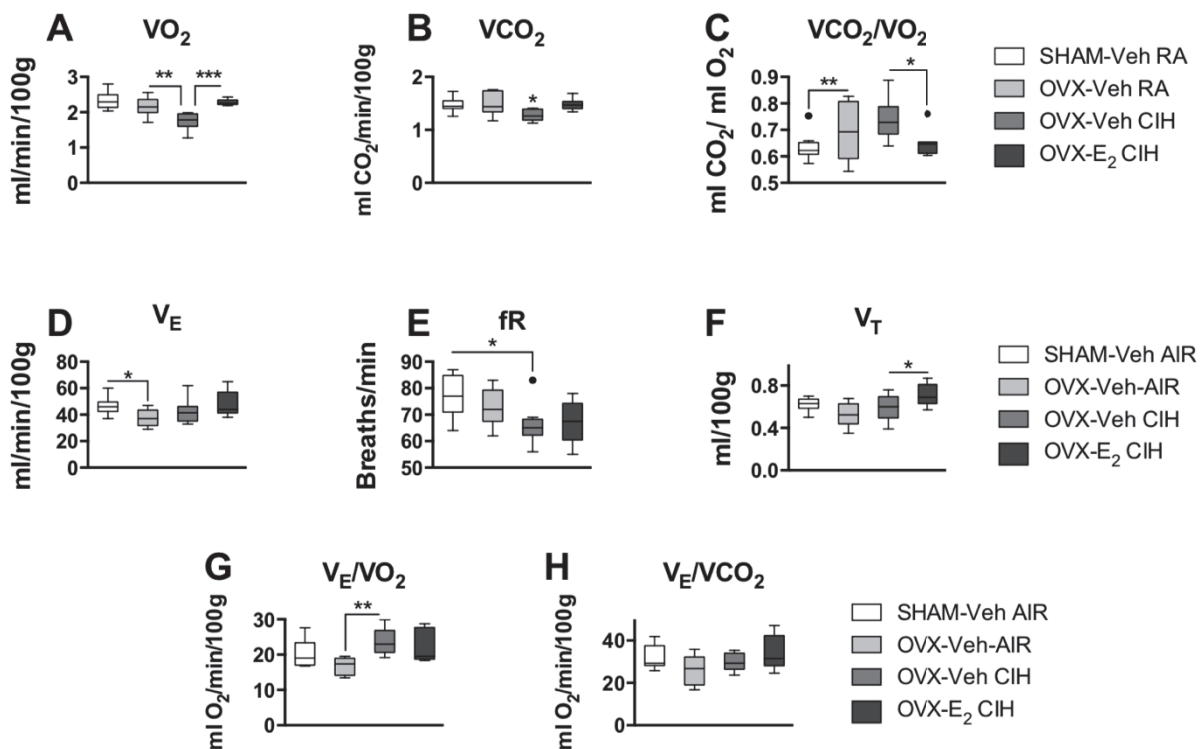


Figure II.2 : Respiratory and metabolic parameters recorded at rest

In sham or ovariectomized (OVX) female rats, treated with vehicle (Veh) or estradiol (E₂), and exposed to room air (RA) or chronic intermittent hypoxia (CIH). **A:** O₂ consumption rate (VO₂: ml/min/100g), **B:** CO₂ production rate (VCO₂: ml/min/100g), **C:** Respiratory exchange ratio (VCO₂/VO₂), **D:** Minute ventilation (V_E: ml/min/100g), **E:** Breathing frequency (fR: breaths/min), **F:** Tidal volume (V_T: ml/100g), **G:** Respiratory equivalent ratio for O₂ (V_E/VO₂) and **H:** Respiratory equivalent ratio for CO₂ (V_E/VCO₂). Tukey plots show median (central line), 25th and 75th percentile (lower and upper box limits), maximum and minimum values (error bars). Individual values that are below or above the 25th or 75th percentile + or – 1.5 the interpercentile range are indicated as black dots (below or above the box). *, **, ***: P<0.05, <0.01, and <0.001.

5.2) Estradiol prevents the increase of arterial pressure and heart rate induced by CIH.

Compared to OVX and Sham rats exposed to room air, the mean, diastolic and systolic arterial pressures (Fig. II.3A-C) and heart rate (Fig. II.3 D) were higher in rats exposed to CIH. In rats treated with E_2 and exposed to CIH arterial pressure remained at a normal level (Fig. II.3A-C), and heart rate was lower compared to OVX and Sham rats exposed to room air (Fig. II.3D). Compared to sham operated animals exposed to room air, ovariectomy alone had no effect on MAP.

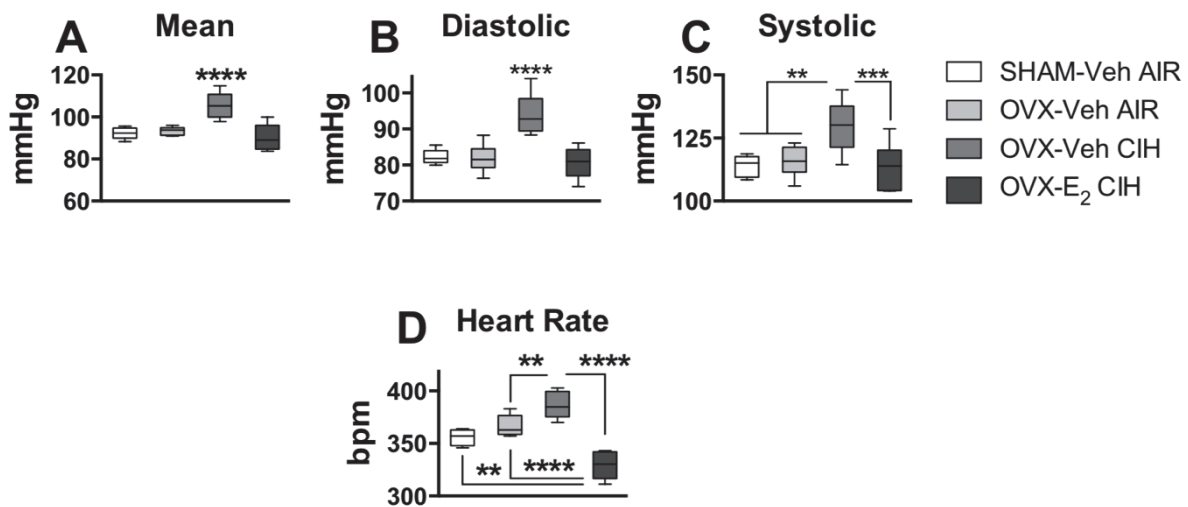


Figure II.3 : Mean (A), diastolic (B), systolic (C), arterial pressure (in mmHg), and heart rate (D in bpm)

In sham or ovariectomized (OVX) female rats, treated with vehicle (Veh) or estradiol (E_2), and exposed to room air (RA) or chronic intermittent hypoxia (CIH). Tukey plots show median (central line), 25th and 75th percentile (lower and upper box limits), maximum and minimum values (error bars). **, ***, **** p<0.01, <0.001, and <0.0001 vs. corresponding groups (as indicated), or vs. all other groups.

5.3) Estradiol reduces the frequency of sighs and apneas and promotes stability of the breathing pattern during exposure to chronic intermittent hypoxia.

The frequency of sighs (Fig. II.4) and post-sigh apnea (Fig. II.5) were higher in OVX-Veh RA compared to Sham-Veh RA demonstrating an effect of OVX. Exposure to CIH further increased the frequency of sighs, post-sigh and spontaneous apneas (Fig. II.4 and II.5A-C). Rats exposed to CIH and treated with E_2 had a lower frequency of sighs and apneas compared to OVX-Veh CIH rats. No difference was observed for the mean apnea duration (Fig. II.5C).

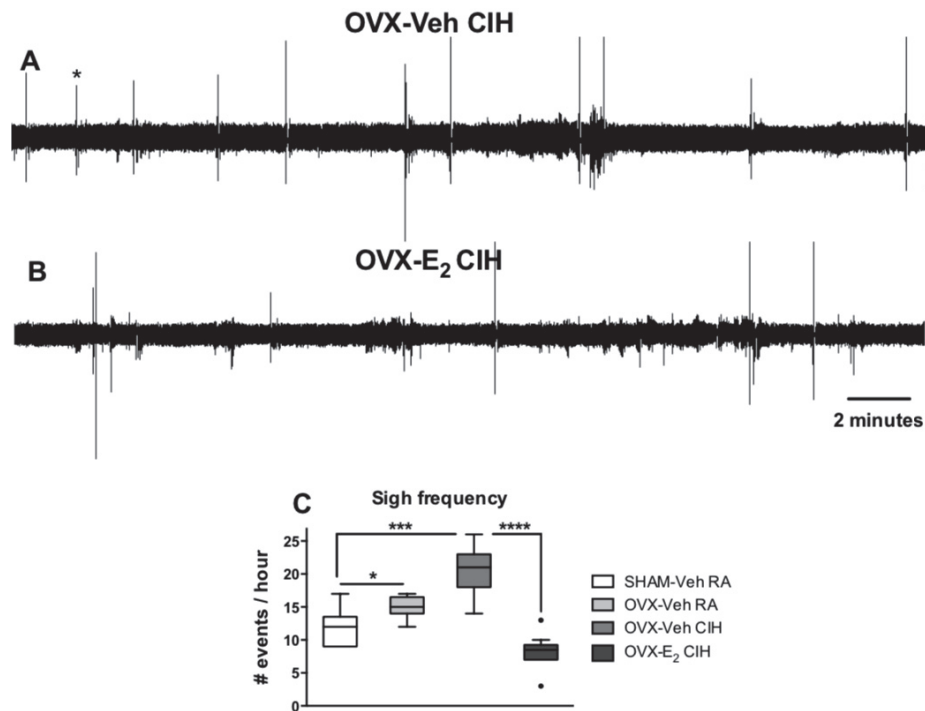


Figure II.4 : Sigh frequency at rest

In sham or ovariectomized (OVX) female rats, treated with vehicle (Veh) or estradiol (E₂), and exposed to room air (RA) or chronic intermittent hypoxia (CIH). **A-B**: typical respiratory recordings at rest in one OVX-Veh CIH and one OVX-E₂ CIH female rat. One sigh noted (*) in the OVX-Veh CIH female. Note the low sigh frequency in the rat treated with E₂. **C**: Group results showing sigh frequency at rest. Tukey plots show median (central line), 25th and 75th percentile (lower and upper box limits), maximum and minimum values (error bars). Individual values that are below or above the 25th or 75th percentile + or - 1.5 the interpercentile range are indicated as black dots (below or above the box). *, ***, ****: P<0.05, <0.001, and <0.0001 vs. corresponding group as noted.

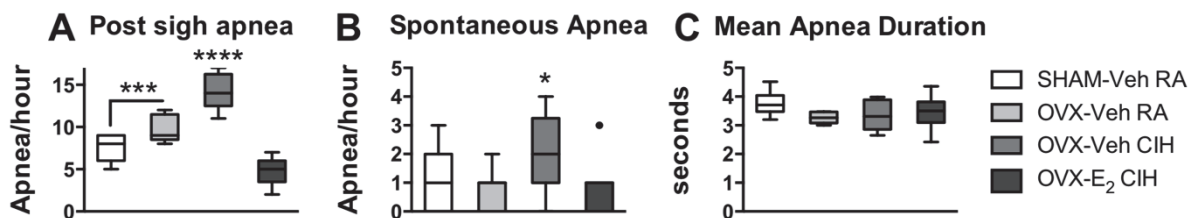


Figure II.5 : Apnea frequency and duration at rest

In sham or ovariectomized (OVX) female rats, treated with vehicle (Veh) or estradiol (E₂), and exposed to room air (RA) or chronic intermittent hypoxia (CIH). **A-B**: frequency of post-sigh and spontaneous apneas (/hour), **C**: mean duration of post-sigh and spontaneous apneas. Tukey plots show median (central line), 25th and 75th percentile (lower and upper box limits), maximum and minimum values (error bars). Individual values that are below or above the 25th or 75th percentile + or - 1.5 the interpercentile range are indicated as black dots (below or above the box). *, ***, ****: P<0.05, <0.001, and <0.0001 vs. corresponding group as noted or vs. all other groups.

The breath-by-breath stability of the breathing pattern was evaluated on about 400 regular breaths. Examples of Poincaré plots are represented in figure II.6A. Compared to Sham-Veh RA and OVX-Veh RA, the variability indexes SD1 and SD2 was higher in OVX-Veh CIH rats, whereas with E_2 there is no difference observed (Fig. II.6B).

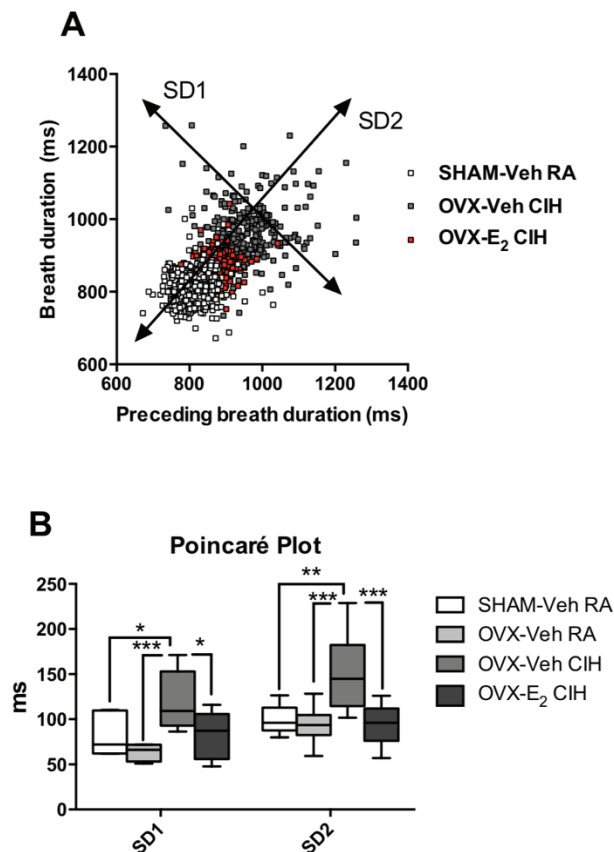


Figure II.6 : Stability of the breathing pattern at rest

In sham in sham or ovariectomized (OVX) female rats, treated with vehicle (Veh) or estradiol (E_2), and exposed to room air (RA) or chronic intermittent hypoxia (CIH). **A:** Minute ventilation, **B:** Respiratory frequency, and **C:** Tidal volume as % changes vs baseline. Tukey plots show median (central line), 25th and 75th percentile (lower and upper box limits), maximum and minimum values (error bars). Individual values that are below or above the 25th or 75th percentile + or – 1.5 the interpercentile range are indicated as black dots (below or above the box). *, **, ***: $P < 0.05$, < 0.01 , and < 0.001 , vs. corresponding group as noted.

5.4) Estradiol prevents the increase in chemoreflex function during exposure to chronic intermittent hypoxia

The responses to hypercapnia (5% CO_2) and hypoxia (12% O_2) were higher in OVX-Veh CIH rats compared to Sham-Veh RA (Fig. II.7A). This is mainly due to the increase of fR rather than V_T (Fig. II.7B and C). E_2 treatment blunted this increase in hypoxia but not in hypercapnia, thus suggesting an effect of E_2 on the carotid bodies, the main sensor of arterial O_2 pressure.

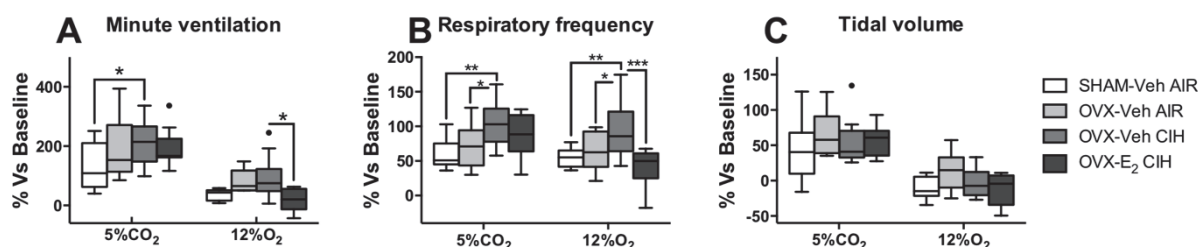


Figure II.7 : Hypoxic and hypercapnic ventilatory responses

In sham or ovariectomized (OVX) female rats, treated with vehicle (Veh) or estradiol (E₂), and exposed to room air (RA) or chronic intermittent hypoxia (CIH). **A:** Minute ventilation, **B:** Respiratory frequency, and **C:** Tidal volume as % changes vs baseline. Tukey plots show median (central line), 25th and 75th percentile (lower and upper box limits), maximum and minimum values (error bars). Individual values that are below or above the 25th or 75th percentile + or - 1.5 the interpercentile range are indicated as black dots (below or above the box). *, **, ***: P<0.05, <0.01, and <0.001, vs. corresponding group as noted.

5.5) Estradiol protects against pro-oxidant status during exposure to chronic intermittent hypoxia

The activity of NOX was increased in the cortex and brainstem in animals exposed to CIH (Fig. II.8A) compared to Sham-Veh RA and OVX-Veh RA and E₂ treatment suppressed this effect. In the adrenals, there was no significant effect of CIH exposure but in animals exposed to CIH the activity of NOX was lower in animals treated with E₂ than in animals exposed to CIH. In contrast, there was no effect of CIH on XO activity. It should be acknowledged that we failed to detect XO activity in the brainstem. In the adrenal gland, XO activity was higher in OVX-Veh CIH rats but not in OVX-E₂ CIH compared to OVX-Veh RA (Fig. II.8B).

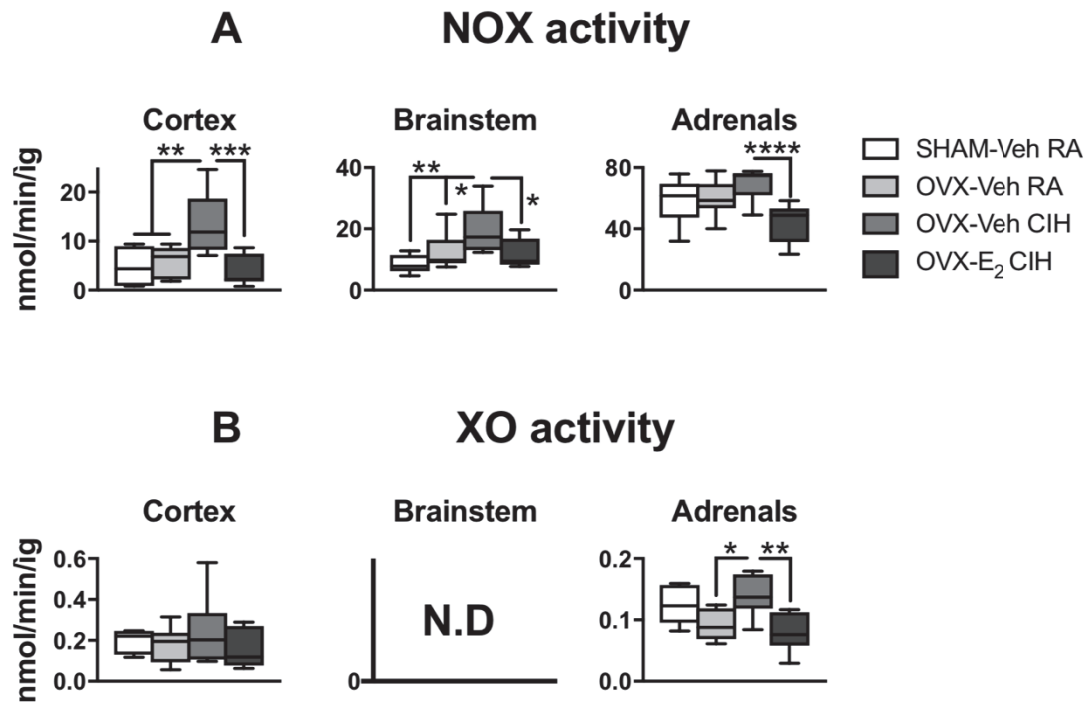


Figure II.8 : Activity of NADPH oxidase (NOX: A) and xanthine oxidase (XO: B)

All in nmol/min/ μ g proteins, in the cortex, brainstem, and adrenal glands of sham or ovariectomized (OVX) female rats, treated with vehicle (Veh) or estradiol (E₂), and exposed to room air (RA) or chronic intermittent hypoxia (CIH). Tukey plots show median (central line), 25th and 75th percentile (lower and upper box limits), maximum and minimum values (error bars). *, **, ***, ****: P<0.05, <0.01, <0.001, and <0.0001 vs. corresponding group as noted.

The activity of both GPX and SOD_{Cu-Zn} (two cytosolic antioxidant enzymes) was lower in the cortex after exposure to CIH. This decrease was prevented by E₂ treatment (Fig. II.9A and B). We did not observe significant effect in the brainstem or adrenals. For cortical SOD_{Mn}, the rats exposed to CIH have a tendency to express the lowest values of the 4 groups and in animals exposed to CIH SOD_{Mn} activity was higher in rats treated with E₂ than in rats treated with Veh (Fig. II.9C).

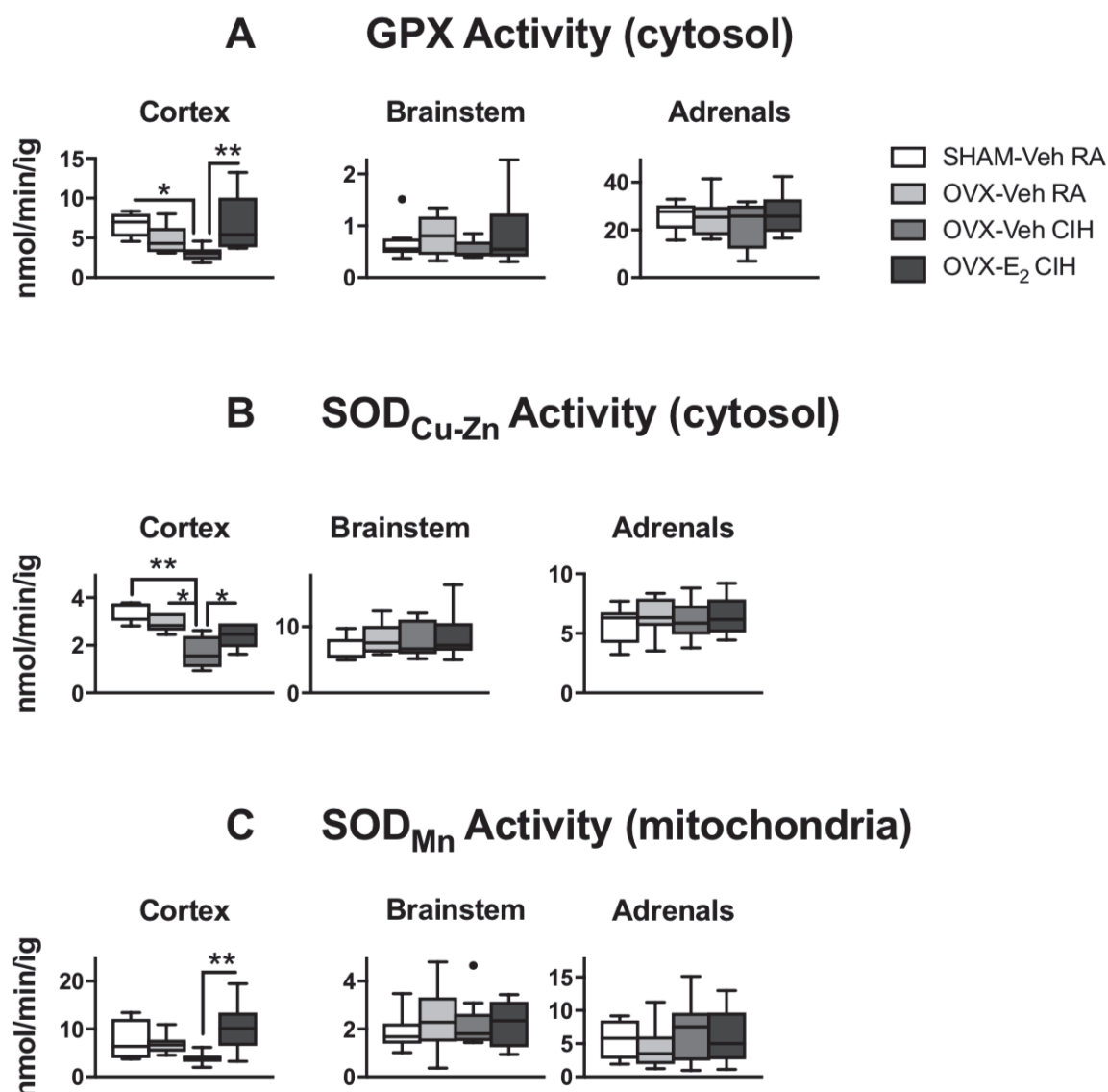


Figure II.9 : Activity of glutathione peroxidase (GPX: A) and superoxide dismutase (SOD) in cytosolic (B) or mitochondrial fractions (C)

All in nmol/min/ μ g proteins) from the cortex, brainstem, and adrenal glands of sham or ovariectomized (OVX) female rats, treated with vehicle (Veh) or estradiol (E₂), and exposed to room air (RA) or chronic intermittent hypoxia (CIH). Tukey plots show median (central line), 25th and 75th percentile (lower and upper box limits), maximum and minimum values (error bars). Individual values that are below or above the 25th or 75th percentile + or - 1.5 the interpercentile range are indicated as black dots (below or above the box). *, **: P<0.05, and <0.01 vs. corresponding group

The NADPH/SOD_{Cu-Zn} ratio was higher in OVX-Veh CIH in the cortex and the brainstem compared to the other group (Fig. II.10A). This result is due to the increase of NOX activity and the diminution of SOD activity in rats treated with vehicle and exposed to CIH.

In the brainstem and in the cortex there was a higher level of MDA in rats exposed to CIH compared with controls and this increase was prevented by E₂ treatment. In the adrenals, the

level of MDA was also increased by exposure to CIH but E₂ treatment did not prevent this effect. Regarding AOPP, no difference was found between each group (Fig. II.10 C).

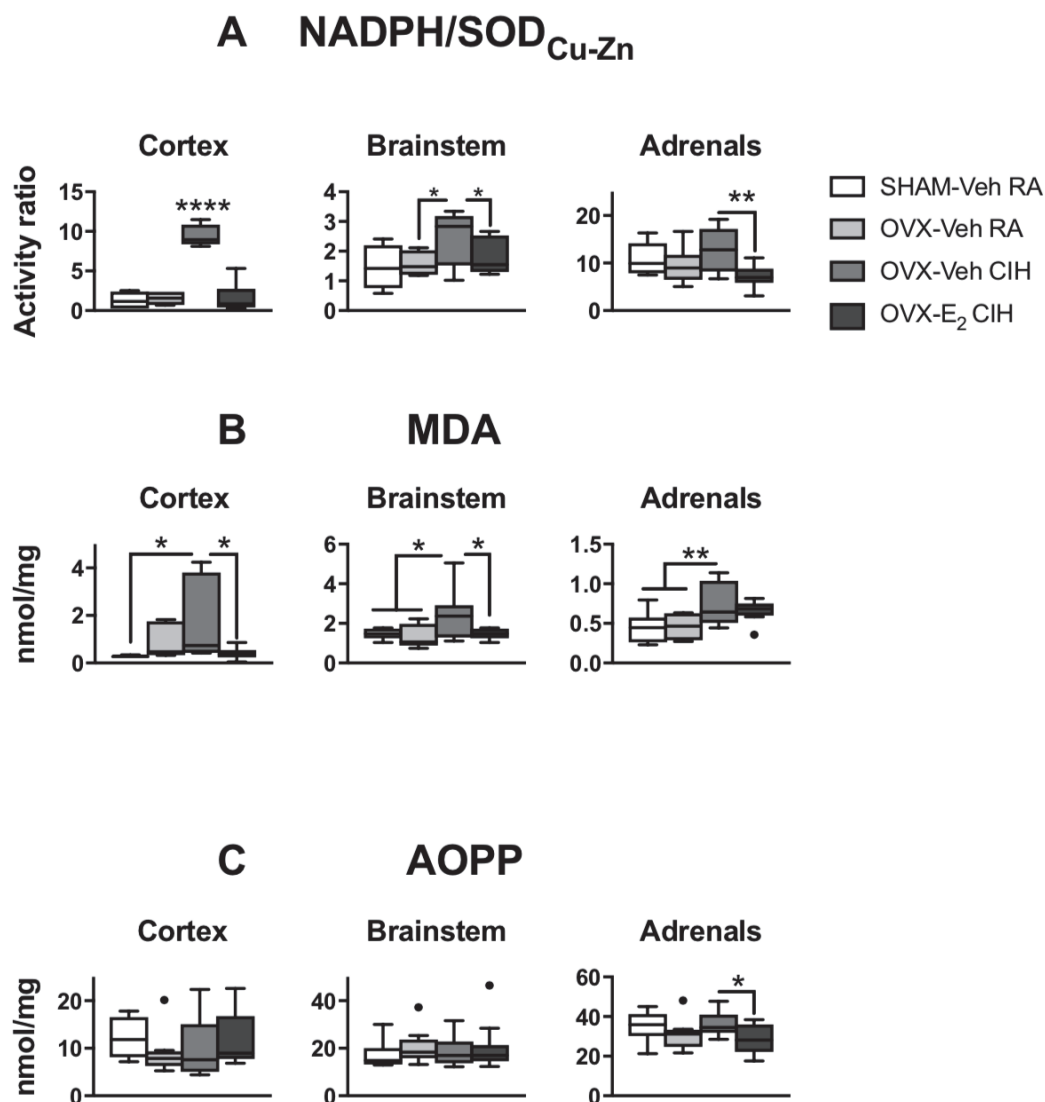


Figure II.10 : Ratio of NADPH to SOD_{Cu-Zn} activities (A), malondialdehyde (MDA: B in mmol/mg protein) and advanced oxidation protein products (AOPP: C in mmol/mg protein) levels

in the cortex, brainstem, and adrenal glands of sham or ovariectomized (OVX) female rats, treated with vehicle (Veh) or estradiol (E₂), and exposed to room air (RA) or chronic intermittent hypoxia (CIH). Tukey plots show median (central line), 25th and 75th percentile (lower and upper box limits), maximum and minimum values (error bars). Individual values that are below or above the 25th or 75th percentile + or – 1.5 the interpercentile range are indicated as black dots (below or above the box). *, **, ****: P<0.05, <0.01, and <0.0001 vs. corresponding group as noted or vs all other groups.

6) Discussion

We report in the present study that E₂ supplementation protects against the development of hypertension, respiratory disorders, and oxidative stress in the central nervous system and adrenal glands in female rats exposed to CIH. E₂ treatment during exposure to CIH also prevents

against the decrease of metabolic rate and maintains the RER at a low level. Overall these data suggest that E_2 could be a potential candidate target to protect women against the deleterious consequences of sleep apnea and suggest that endogenous E_2 plays a protective role in premenopausal women by contributing to the lower occurrence of sleep apnea, and the associated oxidative stress (Block et al., 1979; Young et al., 2003). This hypothesis is strengthened by studies showing that in women, low level of estradiol correlates with high frequency of sleep apnea (Galvan et al., 2017; Netzer et al., 2003).

Our data also indicate that compared to the Sham control group, OVX leads to a lower minute ventilation at rest and a higher frequency of sighs and post-sigh apneas. However, this group does not allow determining whether E_2 or progesterone contributes to this effect, but we might emphasize that compared to the sham group, the perturbations induced by CIH exposure were higher than those induced by OVX alone. As expected E_2 treatment reduces food intake and body weight, an effect that mostly depends upon reduction of meal size mediated by the effects of estradiol on feeding behavior circuits of the central nervous system (Butera, 2010; Eckel, 2011). One may argue that the lower body weight, and possible reduction of adipose tissue induced by E_2 treatment might contribute to reduce arterial pressure and oxidative stress. However, in subsequent experiments we have treated OVX female rats exposed to CIH with a selective agonist of E_2 receptor alpha and found a reduced blood pressure (Boukari et al., 2017), without alteration of body weight (321 ± 26 vs 314 ± 17 g in OVX-Veh-CIH – body weight data was not included in the review paper), showing that, at least for blood pressure, the effects of E_2 in our CIH model do not depend on a reduction of body weight. Furthermore, in human, progesterone reduces apnea frequency after adjustment for the effects of known confounding factors, including body weight, in postmenopausal women (Shahar et al., 2003) or during pregnancy (Lee et al., 2017), showing that the effects of steroid on apnea frequency might not depend on body weight. On the other hand, it is becoming increasingly clear that dysfunction and inflammation of visceral adipose tissue contributes to the metabolic consequences of CIH (Carreras et al., 2015; Drager et al., 2010), and it might be argued that the reduced adipose tissue mass induced by E_2 treatment during CIH contributes to its protective effects. Assessing the potential interactions between adipose functions, metabolic disturbances, and hormonal status in animal exposed to CIH is an appealing avenue of research.

Exposure to CIH in rodents is regularly used to mimic sleep apnea (Dumitrascu et al., 2013; Iturriaga et al., 2015; Morgan et al., 2016b, 2016a; Prabhakar et al., 2015) and the systemic manifestations seen in apneic patients (Eisele et al., 2015). Our results are consistent with previous studies showing that CIH induces an elevation of the hypoxic ventilatory response (Morgan et al., 2016a, 2016b). This is mostly due to an increased activity and hypoxic

responsiveness of the peripheral chemoreceptors (Peng et al., 2003), that also leads to increased activity of the sympathetic system and arterial hypertension (Lesske et al., 1997; Prabhakar et al., 2012). Our results are also consistent with previous studies reporting that the increased O₂ sensitivity of peripheral chemoreceptors is involved in the instability of the breathing pattern, elevated apnea frequency and hypertension observed in CIH (Edge et al., 2012; Lesske et al., 1997; Peng et al., 2014, 2011). Indeed, we observed that CIH increased the frequency of apneas, the breath-to-breath variability, and the frequency of sighs recorded at rest.

We previously showed that in adult female mice sighs recorded during sleep were associated with micro-arousals (up to 5 seconds - assessed by EMG/EEG electrodes), a sign of sleep fragmentation and poor sleep quality (Marcouiller et al., 2014). Although we have not recorded sleep/wake states in the current study, we reported in adult female mice that prolonged periods of stable and regular breathing pattern were associated with non-REM sleep (Marcouiller et al., 2014). Therefore, we might argue that the enhanced sigh frequency observed after exposure to CIH could also represent an increased frequency of micro-arousals. Interestingly, it has been reported that intermittent hypoxia leads to hyper somnolence and increased sleep propensity through an increase in NADPH oxidase activity in regions containing wake-active neurons (Zhan et al., 2005). It could be thus hypothesized that the increased NADPH oxidase activity in these regions may also increase micro-arousals and sighs frequency. By reducing NADPH oxidase activity, E₂ could reduce these 2 features in animals exposed to CIH.

At the cellular level, CIH is associated with generation of ROS in the peripheral chemoreceptors, adrenal medulla and in the brainstem areas that receive the terminal nerves from the carotid bodies (Dumitrascu et al., 2013; Eisele et al., 2015; Iturriaga et al., 2015; Prabhakar et al., 2015, 2012; Prabhakar and Kumar, 2010). In the peripheral chemoreceptors of rats exposed to CIH, the expression of the NADPH oxidase family members Nox1, Nox2, and Nox3 is increased (Khan et al., 2011; Peng et al., 2009, 2003; Prabhakar et al., 2015). This enzymatic induction is mediated by increased expression of HIF-1 α , while the down regulation of SOD_m is mediated by a reduced expression of HIF-2 α (Semenza and Prabhakar, 2015). Treatments of rats exposed to CIH with different antioxidant drugs including MnTMPyP (a membrane-permeable O₂ scavenger) or apocynin (an inhibitor of NADPH oxidase) have been shown to blunt the exaggerated hypoxic responses of the peripheral chemoreceptors, and prevents the increase in sympathetic activity, mean arterial pressure (Peng et al., 2013; Prabhakar et al., 2015) and apnea frequency (Edge et al., 2012). Other antioxidant molecules such as ascorbic acid also prevent the development of hypertension in rats exposed to CIH (Iturriaga et al., 2015), and inhibitors of NADPH or xanthine oxidases in rats prevent the elevation of hypoxic ventilatory response and the decrease of metabolic rate after exposure to

CIH ([Morgan et al., 2016b](#)). Clinical studies are consistent with these data, and it has been shown in apneic patients that treatment with a xanthine oxidase inhibitor reduces vascular dysfunction ([El Solh et al., 2006](#)).

Consistently with these previous studies, our results show that CIH increased the activity of NADPH oxidase in the central nervous system (cortex and brainstem) and increased the activity of xanthine oxidase in the adrenal glands. CIH also decreased the activity of GPX and SOD in the cortex, but not in the brainstem or in the adrenal glands. As a consequence, the cortex appears to be more sensitive to CIH in regard to oxidative stress, which is reflected by the highest ratio of NADPH oxidase to SOD_{Cu-Zn} activity. It has been reported that CIH enhanced NADPH oxidase activity and reduced SOD activity in brainstem regions that receive the afferent inputs from the peripheral chemoreceptors in the nucleus tractus solitarius and in the ventrolateral medulla ([Peng et al., 2014](#)) but not in neighboring brainstem regions. These effects are not reported after chemodenervation, suggesting that in the brainstem, oxidative stress is due to the enhanced activity of the peripheral chemoreceptors ([Peng et al., 2014](#)), at least in the regions that receive the afferent inputs from the peripheral chemoreceptors. However, our results show that CIH enhances NADPH oxidase activity in the brainstem and leads to higher MDA levels. Because we used whole brainstem samples we cannot state if this response is homogenous across the organ or region specific ([Peng et al., 2014](#)). The assessment of the protein content of NADPH oxidase subunit at the origin of superoxide production and its activity in specific area of the brain involved in respiratory should be performed in further studies to better understand the role of E₂ in the regulation of ventilation and oxidative stress. Nonetheless, the modulation of antioxidant enzyme activities in the cortex by CIH suggests a direct oxidative stress effect, independently of peripheral chemoreceptors activity. In our study, E₂ prevents the changes of antioxidant enzyme activities in the cortex and brainstem. Although the antioxidant enzyme activities were not measured in peripheral chemoreceptors, we can speculate that E₂ could also act at this level to reduce oxidative stress damages, contributing to its protective effects against elevated blood pressure and respiratory disorders induced by CIH. Finally, it is worth mentioning that in the peripheral chemoreceptors of rats exposed to IH, the activity of the complex I of the mitochondrial electron transport chain is reduced, and may thus lead to elevated mitochondrial ROS production ([Khan et al., 2011](#); [Peng et al., 2003](#)). Another study suggested that in newborn mice exposure to IH induces neuronal death by increased ROS production due to a reduced mitochondrial and complex I respiratory activity. Our results are in line with these previous studies, showing a decreased activity of SOD in the mitochondrial fraction, which could contribute to exaggerated ROS production. It seems particularly important to note that estradiol enhances mitochondrial respiration, avoid excessive

mitochondrial ROS production (Arnold et al., 2012) and specifically increases the activity of mitochondrial SOD (Razmara et al., 2007). Therefore, it might be hypothesized that E₂ protects against “mitochondrial dysfunction” induced by CIH, a state of mitochondrial function characterized by low activity of the electron transport chain, leading to high electron leak and elevated ROS production by electron transport chain complexes I and III (Martin D. Brand and Nicholls, 2011). Interestingly, our data show that CIH also increased the hypercapnic ventilatory response, but this effect was not suppressed by E₂ treatment. Previous studies in mice also reported that CIH increased the hypoxic and hypercapnic ventilatory responses, and that HIF-1 α and ROS production are required to elevate the hypoxic but not the hypercapnic ventilatory response (Peng et al., 2006). This suggests that E₂ could also reduce HIF-1 α expression in CIH, as shown previously in response to hypoxia in Hep3B cells (Mukundan et al., 2004).

In conclusion, E₂ can protect against respiratory dysfunctions and is able to prevent the elevation of arterial blood pressure induced by intermittent hypoxia in female rats. E₂ also efficiently protects against oxidative stress in the central and peripheral nervous system. Based on the current literature, this suggest that E₂ may act on peripheral chemoreceptors and on their central integration site in the brainstem during exposure to intermittent hypoxia preventing ROS generation, therefore shunting the sympathetic activation and high blood pressure usually resulting from this intermittent hypoxia. In addition, E₂ also decreases oxidative stress in the central nervous system and in the adrenal glands, which might also contribute to alleviate systemic and neurological impairments associated with intermittent hypoxia. Since E₂ supplementation was shown beneficial for mortality and morbidities and safe in regard to breast cancer for women at least up to 70 years if started within 10 years of menopause (Comhaire and Depypere, 2015), our data suggest that E₂ supplementation could be considered in post-menopausal women experiencing high levels of sleep apnea in accordance to the clinical guidelines.

Disclosure Statement (Conflict of Interest):

Funding: SL and ARD supported by Région Rhône Alpe (Programme Explo'ra Doc), SL supported by Consulat Général de France à Québec (Programme Frontenac). Study founded by CIHR (VJ: MOP-102715 and AB: MOP-119272).

Financial arrangements or connections that are pertinent to the submitted manuscript: None

Non-financial interests that could be relevant: None

Chapitre II

Estradiol receptor agonists α and β prevent brain mitochondrial dysfunction in intermittent hypoxia.

Avant-propos :

D'après le chapitre 1, l'exposition à l'HI des ratte ovariectionisées conduit à une augmentation du stress oxydatif avec une augmentation de l'activité de la NOX et une réduction des défenses antioxydantes (SOD et GPx). Cependant, ce premier chapitre ne nous renseigne pas sur l'implication de la chaine respiratoire mitochondriale, principale productrice de ROS. En se fixant sur ses récepteurs ER α et ER β , l'E2 est capable de stimuler la respiration mitochondriale, augmenter la production d'ATP et réduire la production de ROS. Nous avons conduit cette seconde étude afin de savoir le rôle que tient la chaine respiratoire mitochondriale en HI dans le cortex cérébral, ainsi que le rôle des récepteurs nucléaires ER α et ER β dans un modèle de ratte ovariectionisées.

Ce travail a été partiellement présenté à Experimental Biology à Chicago du 22 au 26 avril 2017. Il a fait l'objet d'une publication dans les actes de congrès dans le « Faseb Journal » sous le titre « Estradiol receptor agonists α and β protect against brain mitochondrial dysfunction in a model of sleep apnea.

Il sera prochainement soumis à « l'European Respiratory Journal » ou à « l'American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology ».

J'ai participé à toutes les étapes de ce prochain article, de la conception, la réalisation, l'interprétation et l'écriture.

Je tiens à remercier le Dr David Gozal de l'université de Chicago pour ces précieux conseils sur cet article.

1) Résumé en français

Objectifs de l'étude : Nous avons testé l'hypothèse que l'hypoxie intermittente (HI) induit une dysfonction mitochondriale dans le cerveau chez des ratte adultes et que les agonistes α et β des récepteurs à l'estradiol protègent contre cet effet.

Méthodes : Des ratte femelles Sprague-Dawley (230-250g) ont été ovariectomisées (OVX) et implantées avec des pompes osmotiques délivrant continuellement du véhicule (OVX-Veh), PPT (OVX-PPT – agoniste de ER α -30 μ g/kg/day) ou DPN (OVX-DPN – agoniste de ER β -100 μ g/kg/day). Deux semaines plus tard, les ratte ont été exposées à une HI (21% -10% O₂ - 8 heures / jour - 10 cycles / heure) ou laissées à l'air ambiant (RA). Nous avons utilisé du tissu frais de cortex perméabilisé avec de la saponine pour mesurer la fonction mitochondriale (consommation d'O₂ et production de H₂O₂) avec un respiromètre de haute résolution (*O2K Oroboros*). L'activité de la pyruvate déshydrogénase (PDH) et de la citrate synthase (CS) a été mesurée par une méthode colorimétrique.

Résultats : Avec les substrats du complexe I (Pyruvate/Glutamate/Malate) et en présence d'ADP, les ratte exposées en HI ont une réduction de la consommation d'O₂ par rapport à celles laissées à l'air ambiant. Le traitement DPN et PPT permet de prévenir cette altération. Avec le substrat du complexe II (Succinate) et ADP, il n'y a pas d'effet de l'HI, mais la consommation d'O₂ est plus élevée chez les OVX-PPT que chez les OVX-DPN. Avec les substrats du complexe I et II et ADP, la consommation d'O₂ est réduite par l'HI comparé au OVX-Veh RA et ceci est partiellement prévenu par le traitement DPN alors que les ratte OVX-PPT ont la plus haute consommation d'O₂. La production de H₂O₂ mesurée par fluorimétrie avec les substrats des complexes I et II est augmentée en HI par rapport aux ratte laissées en RA et ceci est prévenu par le traitement DPN et PPT. Aucune différence n'est observée pour l'activité de la citrate synthase mais l'HI a diminué l'activité de la pyruvate déshydrogénase et ceci est prévenu par le traitement DPN et PPT.

Conclusions : Nous concluons que chez les ratte OVX, l'HI altère la chaîne respiratoire mitochondriale au niveau du complexe I conduisant à une augmentation de la production de ROS (H₂O₂). Les agonistes sélectifs de ER α et ER β empêchent le dysfonctionnement mitochondrial. ER α semble plus efficace pour augmenter la fonction respiratoire mitochondriale dans ce modèle. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour les femmes ménopausées souffrant de SAOS.

Mots-clés : Mitochondrie ; SERMs ; SAOS - Pharmacothérapie ; agonistes de ER α et ER β ;
Désordres respiratoires du sommeil.

2) Abstract

Study Objectives: We tested the hypothesis that intermittent hypoxia (IH) induces a mitochondrial dysfunction in the brain of adult female rats, and that agonists of α and β estradiol receptors (ER) protect against this effect.

Methods: Female rats were ovariectomized (OVX) and implanted with an osmotic pump continuously delivering vehicle (OVX-Veh), PPT (OVX-PPT – ER α agonist - 30 μ g/kg/day) or DPN (OVX-DPN - ER β agonist - 100 μ g/kg/day). Two weeks later, the animals were exposed to intermittent hypoxia (IH- 21-10% O₂ – 10 cycles/hour – 8 hours/day – 7 days) or room air (RA). We then used fresh brain cortex tissue (~2 mg) permeabilized with saponin to assess mitochondrial functions (O₂ consumption and H₂O₂ production) with high-resolution respirometry (*O2k- Oroboros*). Pyruvate Dehydrogenase (PDH) and citrate synthase (CS) activity were measured by colorimetric method.

Results: With substrates of complex I (Pyruvate/Glutamate/Malate) and in presence of ADP, rats exposed to IH have a reduced O₂ consumption compared to RA rats. PPT and DPN treatments prevented this alteration. With the substrate of complex II (succinate) and ADP, there was no effect of IH, but O₂ consumption was higher in OVX- PPT rats compared to OVX- IH rats. With the substrates of complexes I and II and ADP, O₂ consumption was reduced by IH exposure compared to RA, and this was partially prevented by DPN, while OVX-PPT rats had the highest O₂ consumption. H₂O₂ production measured by fluorometry with the substrates of complexes I and II and ADP is increased by exposure to IH compared to RA, and this is prevented by DPN and PPT. No differences were observed for activity of Citrate synthase but IH was decreased activity of PDH and this was prevented by DPN and PPT treatments.

Conclusion: We conclude that in OVX female rats, IH impairs the mitochondrial respiratory chain through the complex I leading to an increase of ROS (H₂O₂) production. Selective agonists of ER α and ER β prevent the mitochondrial dysfunction. ER α appears more efficient to increase mitochondrial respiratory function in this model. This opens new perspectives for menopausal women suffering of sleep apnea.

Keywords: mitochondria; SERMs; OSAS – Pharmacotherapy; agonist ER α and ER β ; Sleep Disordered Breathing.

3) Introduction

Obstructive sleep apnea (OSA) is a highly prevalent condition characterized by repeated and frequent prolonged pauses in breathing during sleep. Chronic intermittent hypoxia (CIH) produces constant variation of arterial oxygen level (chronic hypoxemia) and is regularly used in animals to mimic sleep apnea (Fletcher et al., 1992b; Morgan et al., 2016a; Prabhakar et al., 2015; Prabhakar and Kumar, 2010). CIH induces the same consequences that OSA like systemic morbidities (hypertension, neurocognitive impairments and metabolic disturbances) and cellular dysregulation with a strong oxidative stress by the production of reactive oxygen species (ROS). ROS are a highly reactive molecule that interact with DNA, lipids and proteins (Halliwell, 2006b; Halliwell B, 2001; Halliwell and Gutteridge, 1984). It has been postulated by numerous studies that oxidative stress is the main responsible of systemic morbidities observed in the patients suffering of sleep apnea and rodents exposed to CIH (Barceló et al., 2000; Lavie, 2015; Lavie et al., 2004; Prabhakar et al., 2015, 2007b).

OSA has a lower prevalence in women than men but increases after menopause in women (Bixler et al., 2000; Young et al., 2003). In post-menopausal women, hormone replacement therapy reduces the frequency of sleep apnoea after adjustment for other known risk factors (age, body mass index and neck circumference) (Young et al., 2003). Furthermore, the level of estradiol is negatively correlated with sleep apnea in post-menopausal women (Galvan et al., 2017; Netzer et al., 2003).

We previously reported that in ovariectomized female rats, estradiol treatment decreases mean arterial pressure, post sigh and spontaneous apneas and brain oxidative stress induced by CIH (Laouafa et al., 2017b). However, the role of mitochondria, the major source of ROS has not been investigated.

Boras and al showed that oxidative stress from mitochondria in brain and liver is more important in male than female rats (Borrás et al., 2003). Suggesting that estradiol induces its antioxidant effects directly on mitochondria (Borrás et al., 2010).

Most known biological effects of estrogen, a major female gonadal steroid, are mediated by binding of the hormone to estrogen receptor (ER) subtypes, ER α and ER β . The ERs belong to a member of the nuclear hormone family of intracellular receptors that function as ligand-dependent transcriptional coactivators (Björnström and Sjöberg, 2005). ER α and ER β are able to translocate into the mitochondria to regulate mitochondrial structure and function of mitochondrial respiratory chain (Chen et al., 2005; Nilsen and Brinton, 2004; Yang et al., 2004). This lead to an increase of oxidative phosphorylation, a reduction of electron and cytochrome

c leaks and, therefore a reduction of ROS productions by mitochondria (Irwin et al., 2008; Ali Razmara et al., 2008; Razmara et al., 2007).

We hypothesize that both ER subtypes contribute to protect against brain mitochondrial dysfunction in CIH. To determine the relative contribution of ER α and ER β on brain mitochondrial function during CIH exposure, we used OVX female rats exposed to IH and treated with vehicle or selective ER modulators propylpyrazole triol (PPT) or diarylpropionitrile (DPN). PPT is 410-fold more selective for ER α than ER β , whereas DPN is 70-fold more selective for ER β than ER α (Irwin et al., 2012).

Our data indicate that exposure to CIH induced a mitochondrial dysfunction by decreasing O₂ consumption and increasing H₂O₂ production. Activation of Both ER differentially rescued the functional efficiency of brain mitochondria.

4) Material and methods

4.1) Animals

All experiments were approved by the local committee for animal care, in accordance with the Canadian council on animal care in science. The protocol was approved by the committee on the protection of animal of the CHUQ Research Center (Permit number: 2014-156). 24 females Sprague-Dawley rats (220-250g) were purchased from Charles-Rivers Laboratories (Saint-Constant, QC, Canada). All animals had access to food and water *ad-libitum* and were maintained on a 12:12h light-dark cycle. Weight of the female rats was assessed every week from the arrival until the end of protocol.

4.2) Surgical procedures

Rats were anesthetised under isoflurane (4% induction then 2%) and the ovaries were removed through bilateral flank incisions. The level of anesthesia was verified before and during the surgery by the lack of reflex responses to frequent tail pinching. In sham-operated rats the ovaries were left intact. The animals were implanted subcutaneously in the upper mid-back region with an osmotic pump (Alzet®; model 2ML4 – flow of 60 μ l/day during 28 days) filled with vehicle (2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin) or the estradiol receptor agonist α (propylpyraoletriol-PPT, Tocris) and β (diarylpropionitril-DPN, Tocris) – see dose below. All animals received pre- and post-operative analgesics for 48 hours (bupivacaine, lidocaine, subcutaneous injection, respectively 3.5 and 7 mg/kg in 2.5 ml/kg) according to our normalized protocols.

4.3) Chronic intermittent hypoxia exposure

After 2 weeks of recovery, the rats were housed in a Plexiglas chamber (internal volume 0.05m³), connected to an oxycycler (Biospherix, Redfield, NY, USA). Oxygen dropped from 21% to 10% in 90 seconds, holding O₂ at 10% for 30 seconds, then returned to 21% in 70 seconds and holding at 21% for 120 seconds, at the rate of 10 cycles/hour for 8 consecutive hours between 8:30am - 4:30pm during 7 days. Rats exposed to room air (AIR) were placed in the same room that those exposed to CIH.

4.4) Experimental group

We used four groups of adult female rats (6-7 females/groups): two groups of ovariectomized rats were treated with vehicle (2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin - 200 μ g/ml – Cayman Chemicals catalogue# 16169) and exposed either to room air (OVX-Veh AIR) or chronic intermittent hypoxia (OVX-Veh CIH). The 2 last groups were OVX rats treated with PPT (30 μ g/kg/day) and DPN (100 μ g/kg/day) and exposed to CIH (OVX-PPT (α) CIH) and (OVX-DPN (β) CIH).

4.5) Oxygen consumption and H₂O₂ production on permeabilized brain cortex

Rats were sacrificed with an overdose of anesthetic (ketamine/xylazine), the brain cortex was rapidly dissected and immediately used to perform measurements of oxygen consumption and H₂O₂ production rates using a high-resolution fluorespirometry system (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria).

Oxygen consumption

After calibration of the Oroboros chambers, punch cortex samples were weighted (2-3 mg), and recordings of O₂ consumption performed at 37°C in a respiration buffer (0.5 mM EGTA, 3mM MgCl₂, 60 mM potassium lactobionate, 10 mM KH₂PO₄, 20 mM Hepes, 110 mM sucrose, 1 g/l BSA). Based on a previous study establishing the optimal conditions ([Herbst and Holloway, 2015](#)), the samples are incubated in the recording chamber for 20 min with saponin (50 μ g/ml). For each sample, we have differentiated mitochondrial oxygen consumption linked to NADH oxidation through the mitochondrial respiratory complex I (pyruvate 5mM, malate 2mM), mitochondrial oxygen consumption linked to FADH₂ oxidation through the mitochondrial respiratory complex II (succinate 5mM and rotenone 0,5 μ M to block complex I activity) and mitochondrial oxygen consumption linked to NADH-FADH₂ oxidation through the mitochondrial respiratory complex I and II (pyruvate 5mM, malate 2mM, succinate 10mM). The basal oxygen consumption represents mitochondrial respiratory state 2. After equilibration

with the substrates, ADP (2.5mM) is added to the chambers to measure O₂ consumption under normal phosphorylating state (ATP synthesis – mitochondrial respiratory state 3). We then add cytochrome-c (10μM) to assess the integrity of mitochondrial membranes, then oligomycin (2.5μM) was added to block ATP synthesis and measure O₂ consumption due to leakage of protons in non-phosphorylating state (no ATP synthesis - state 4). Uncoupling is further exaggerated by adding graded bolus of carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP – 0.5 μM in 1μl/bolus) until reaching stable O₂ consumption. We then blocked the activity of the complex 3 with antimycin A (2.5 μM) to measure non-mitochondrial O₂ consumption (Residual oxygen flux - ROX) due to cytosolic oxidases. ROX was subtracted from all other measurements to report mitochondrial oxygen consumption. The respiratory control ratio (RCR) is a marker of the good functionality of the electron transport chain ([Martin D. Brand and Nicholls, 2011](#)) and was obtained by dividing respiratory state 3 by respiratory state 4.

H₂O₂ production

The rate of hydrogen peroxide formation was measured in parallel to oxygen consumption in the samples incubated with pyruvate, malate, and succinate (respiration through complexes I and II) by fluorimetric detection ([Krumshnabel et al., 2015](#)). We used Horseradish peroxidase (HRP, 1 U/mL) and Amplex Red fluorescent dye (10μM). The excitation wavelength was 525 nm and fluorescence detection was at 587 nm. Calibration were done by using known amounts of hydrogen peroxide (0,1μM) that were exogenously added to the recording chamber at the end of all experiments.

Data analysis

For rate of oxygen consumption and hydrogen peroxide production, data acquisition and analysis were performed with the DatLab® software, version 6 (Oroboros Instruments). The software is able to derivate oxygen consumption normalized for the amount of brain sample.

4.6) In vitro enzymatic activity

4.6.1) Measurement of Complex I activity

Frozen cortex (20 mg/ml) were homogenized in 100 mM phosphate buffer KPI (100 mM K₂HP0₄, 100 mM KH₂PO₄, PH7,4) + EDTA 2 mM. Then, the tissues were centrifuged for 10 minutes at 1500 g, and the supernatant was collected and kept frozen at -80°C. The concentration of proteins was determined by a standard colorimetric BCA assay kit (Thermo Scientific, catalogue # 23225) and complex I activity was normalized to protein concentration.

Complex I activity was assessed by measuring the disappearance rate of NADH by spectrophotometry. Briefly, the day of measurement, a solution containing 50 mM KPI buffer, 1 mM EDTA, 100 μ M decylubiquinone, and 3.75 mg/ml BSA (10%) was prepared. A similar solution was prepared with rotenone (10 μ M: inhibitor of complex I activity). 4 μ l of each sample was added in two different wells. In the first well, we added 250 μ l of solution containing rotenone, and in the second well we added 250 μ l of cocktail without rotenone. We then added 3 mM of NADH into each well, and read the absorbance at 340 nm every 15 seconds for 3 minutes to monitor the rate of NADH disappearance. Since NADH can be consumed by complex I of the mitochondria and by cytochrome b5 reductase, the activity of the complex I was obtained by subtracting the slope of the well with rotenone (activity without complex I) from the slope of the well without rotenone (total activity).

4.6.2) Measurement of cytochrome c oxidase (COX) activity

Maximum activity of the complex 4 (cytochrome c oxidase-COX) was measured with Oroboros by using ascorbate (2 mM) and tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD; 0.5mM) after inhibition of complex III with antimycin A (2.5 μ M). The rate was normalized by the quantity of tissue introduced into the chamber of the Oroboros.

4.6.3) Measurement of Pyruvate Dehydrogenase (PDH) activity

PDH activity was measured using a kit from Sigma aldrich (#MAK183) following the manufacturer's instruction. Briefly, 10 mg of brain cortex was homogenized in 100 μ l of ice cold PDH Assay Buffer. Then, the samples were centrifuged at 10.000 g for 5 minutes and the supernatant was transferred to a fresh tube. 40 μ l of sample was added to wells of 96-well plate in duplicate with appropriate reaction mixes (PDH assay buffer, PDH developer and PDH substrate). A standard-curve was obtained with serial dilutions of NADH solution (0 to 12.5 nmol/well). The plate was incubated for 3 minutes at 37°C and the absorbance was recorded at 450nm every 5 minutes for 30 minutes. The colorimetric product (NADH) was proportional to the enzymatic activity of PDH and normalized to the quantity of tissue.

4.6.4) Measurement of Citrate Synthase (CS) activity

CS activity was used as a marker of mitochondrial content ([Larsen et al., 2012](#)). CS was measured using a kit from Sigma aldrich (#MAK193) following the manufacturer's instruction. Briefly, 10 mg of brain cortex was homogenized in 100 μ l of ice cold CS Assay Buffer. Then, the samples were centrifuged at 10.000 g for 5 minutes and the supernatant was transferred to a fresh tube. 25 μ l of sample was added to wells of 96-well plates in duplicate with appropriate

reaction mixes (CS assay buffer, CS developer and CS substrate mix). A standard-curve was obtained with serial dilutions of GSH solution (0 to 40 nmol/well). The plate was incubated for 3 minutes at 25°C and the absorbance was recorded at 412nm every 5 minutes for 30 minutes. The colorimetric product (GSH) was proportional to the enzymatic activity of CS and normalized to the quantity of tissue.

4.7) Statistical analysis

We used GraphPad prism software for all analyses. All data were analyzed using a one-way ANOVA followed by a post-hoc test (Fisher's Least Significance Difference). All data are presented as means (SD or range) or as Tukey plots. The significant P values was set a 0.05.

Figure III.1 : Oxygen consumption with a high resolution fluorepirometer Oroboros

Oxygen consumption was measured using permeabilized cortex punch (2mg) in ovariectomized (OVX) female rats treated with vehicle (Veh) or estradiol receptor agonist α (PPT) and β (DPN) and exposed to room air (AIR) or chronic intermittent hypoxia (CIH). Typical mitochondrial respiratory recording with a high resolution fluorepirometer Oroboros shows the different respiratory states assessed (**A**), mitochondrial respiratory with pyruvate malate (PM) (**B**), succinate rotenone (SR) (**C**) and pyruvate malate succinate (PMS) (**D**). Tukey plots show median (central line), 25th and 75th percentile (lower and upper box limits), and maximum and minimum values (error bars). * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .005$ and **** $p < .001$ significantly different from OVX-Veh AIR. ° $p < .05$ and °°°° $p < .001$ significantly different from OVX-Veh CIH. \$\$ $p < .01$ and \$\$\$\$ $p < .001$ significantly different from OVX-PPT CIH

5.2) PPT and DPN treatments rescued RCR decreased by CIH

Respiratory control ratio (RCR) is defined as respiratory in state 3 divided by that in state 4. Compared to animal treated with vehicle (OVX-Veh AIR), exposure to CIH (OVX-Veh CIH) was decreased RCR with substrates of complex I (pyruvate-malate, PM) and substrates of complexes I and II (pyruvate-malate-succinate, PMS). No differences were observed with substrate of complex II alone (Succinate-Rotenone, SR). Treatment with PPT (OVX-PPT CIH) and DPN (OVX-DPN CIH) prevented the decrease of RCR with PM and PMS (Fig. III.2)

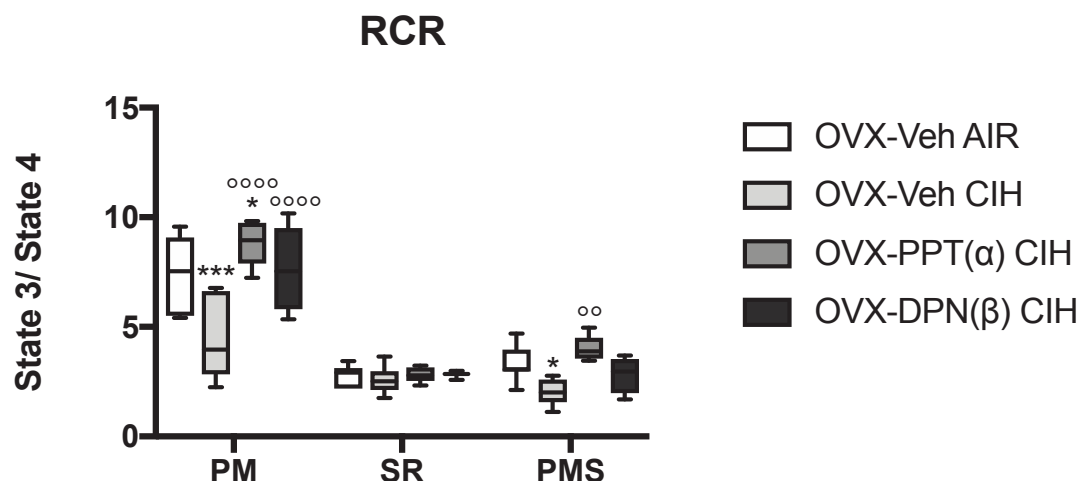


Figure III.2 : Respiratory control ratio (RCR)

Respiratory control ratio (RCR) was calculated as state 3/state 4 with oxygen consumption obtained with pyruvate malate (PM), succinate rotenone (SR) and pyruvate malate succinate (PMS) in ovariectomized (OVX) female rats treated with vehicle (Veh) or estradiol receptor agonist α (PPT) and β (DPN) and exposed to room air (AIR) or chronic intermittent hypoxia (CIH). Tukey plots show median (central line), 25th and 75th percentile (lower and upper box limits), and maximum and minimum values (error bars). * $p < .05$ and *** $p < .005$ significantly different from OVX-Veh AIR. °° $p < .01$ and °°° $p < .001$ significantly different from OVX-Veh CIH.

5.3) PPT and DPN treatments rescued H_2O_2 production increased by CIH

H_2O_2 production was evaluated in parallel to oxygen consumption with Pyruvate, malate, and succinate. The H_2O_2 production was higher in OVX-Veh CIH compared to control group (OVX-Veh AIR) for state 3 and with CCCP. This increase was prevented by PPT (OVX-PPT CIH) et DPN (OVX-DPN CIH) treatments (Fig. III.3) No difference was observed for state 4.

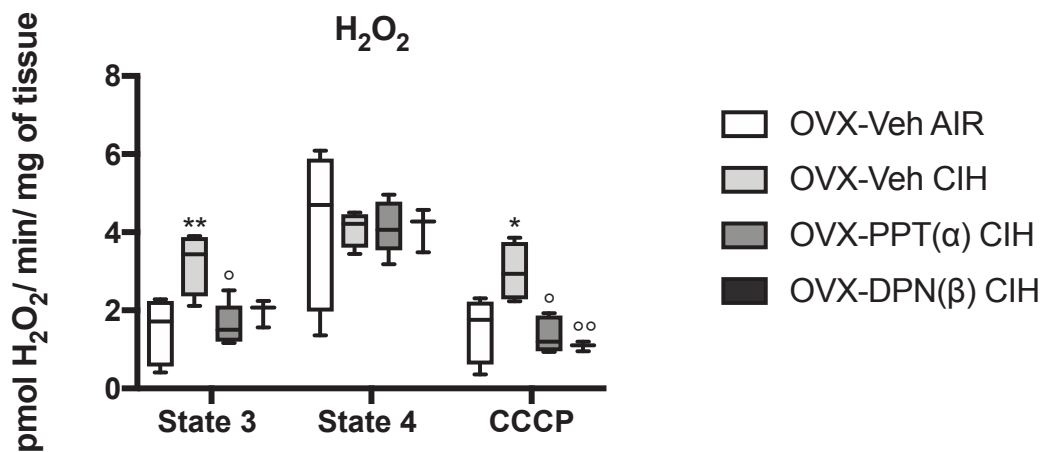


Figure III.3 : H₂O₂ production with a high resolution fluoroescpirometer Oroboros

H₂O₂ production was measured using fluorimetric detection on cortex punch (2mg) with the substrates pyruvate malate succinate (PMS) at different respiratory states in ovariectomized (OVX) female rats treated with vehicle (Veh) or estradiol receptor agonist α (PPT) and β (DPN) and exposed to room air (AIR) or chronic intermittent hypoxia (CIH). Tukey plots show median (central line), 25th and 75th percentile (lower and upper box limits), and maximum and minimum values (error bars). * $p < .05$ and ** $p < .01$ significantly different from OVX-Veh AIR. ° $p < .05$ and °° $p < .01$ significantly different from OVX-Veh CIH.

5.4) PPT and DPN treatments rescued PDH activity decreased by CIH

Activity of cytochrome c oxidase (COX) was decreased, by CIH (OVX-Veh CIH) but not significant ($P=0.056$). No difference was observed with PPT and DPN treatment (fig III.4A). Citrate synthase activity was not changed by exposure to CIH or by PPT and DPN treatments (fig III.4B). CIH was decreased activity of pyruvate dehydrogenase (PDH) compared to control group (OVX-Veh AIR). This decrease was prevented by PPT and DPN treatments. Effect of DPN treatment (OVX-DPN CIH) was higher than PPT treatment (OVX-PPT CIH) (fig III.4C).

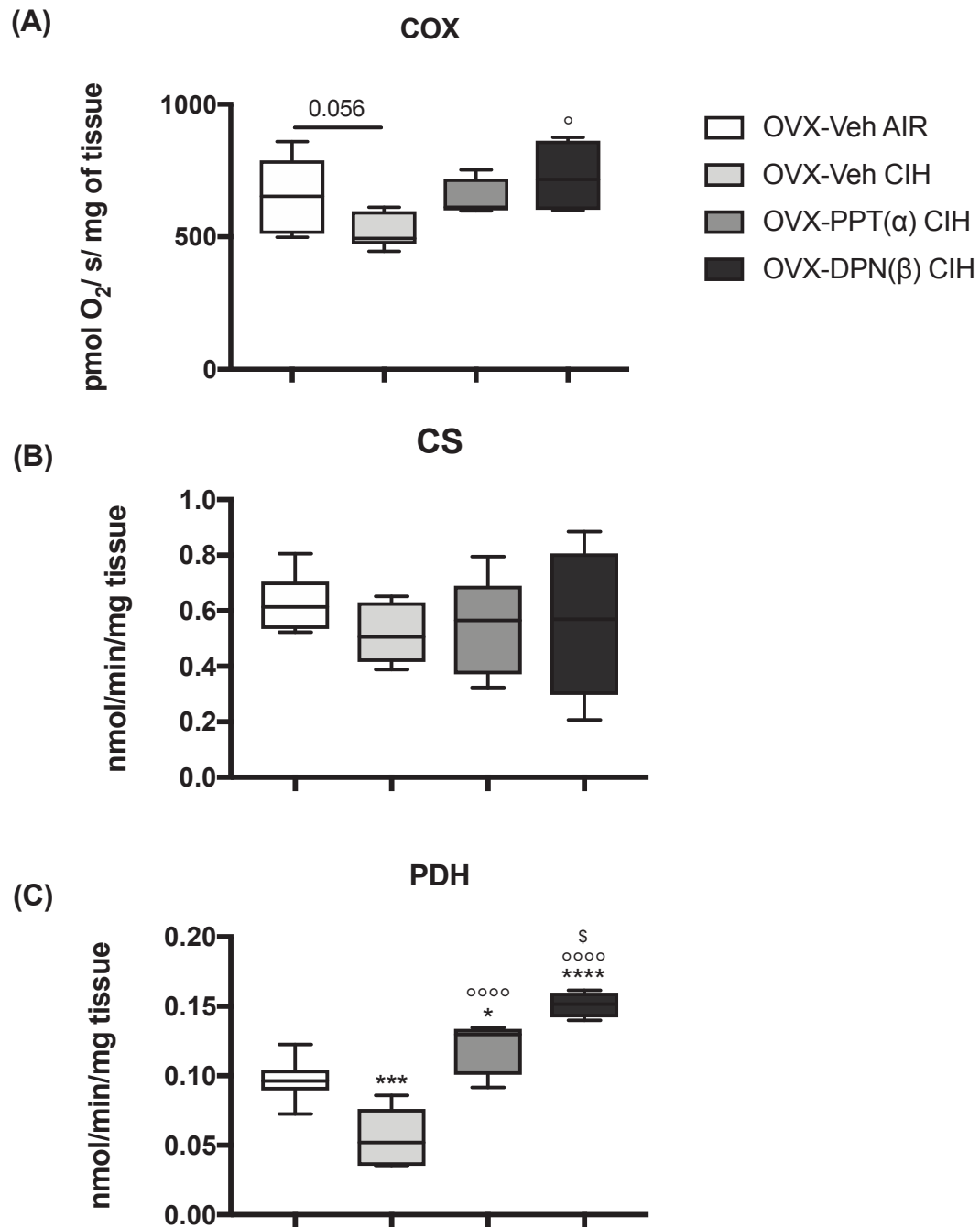


Figure III.4 : Activity of mitochondrial enzymes

complex IV (A), citrate synthase (CS) (B) and pyruvate dehydrogenase (PDH) (D) activity in ovariectomized (OVX) female rats treated with vehicle (Veh) or estradiol receptor agonist α (PPT) and β (DPN), and exposed to room air (AIR) or chronic intermittent hypoxia (CIH). Tukey plots show median (central line), 25th and 75th percentile (lower and upper box limits), and maximum and minimum values (error bars). * $p < .05$, *** $p < .05$ and **** $p < .001$ significantly different from OVX-Veh AIR. ° $p < .05$ and °°°° $p < .001$ significantly different from OVX-Veh CIH. \$ $p < .05$ significantly different from OVX-PPT CIH.

6) Discussion

Sachant que l'article n'a pas été soumis, la partie discussion de ce chapitre est apportée dans la partie IV conclusion/discussion générale.

Chapitre III

Role of Estradiol Receptor Beta (ER β) on Arterial Pressure, Respiratory chemoreflex and mitochondrial function in young and aged female mice

Sofien Laouafa^{1,2}, Damien Roussel², François Marcouiller¹, Jorge Soliz¹, Aida Bairam¹, and Vincent Joseph^{1*}.

1 : Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada.

2 : CNRS, UMR 5023, Université Claude Bernard Lyon 1, 8, Rue R. Dubois, Bâtiment Dubois, Villeurbanne, 69622, France.

*: Corresponding author: vincent.joseph@fmed.ulaval.ca

Avant-propos :

Ce chapitre a été accepté le 18 décembre 2017 et sera publié prochainement dans le journal « Advances in Experimental Medicine and Biology »

J'ai participé aux étapes de conception, la réalisation et l'interprétation de cet article. Je remercie François Marcouiller pour avoir grandement participé à certaines expériences.

Ce travail sera partiellement présenté à **Experimental Biology** qui se tiendra à San Diego du 20 au 25 avril 2018 et fera partie d'un papier de conférence publié dans « The FASEB » intitulé : Role of estradiol receptor Beta (ER β) on brain mitochondrial dysfunction and cardio-respiratory control in aged female mice.

1) Résumé en français

Nous avons testé l'hypothèse que le récepteur à l'œstradiol ER β est impliqué dans le contrôle respiratoire chez les souris femelles. Nous avons utilisé des souris Er β KO adultes (invalidées pour le récepteur β de l'œstradiol) jeunes (âgées de 5-6 mois) et âgées (17-18 mois) ou des souris contrôles de type sauvage (WT) pour évaluer la pression artérielle systémique (via un brassard sur la queue) et les soupirs et apnées (enregistrés par pléthysmographie à corps entier au repos). Nous avons également mesuré la réponse ventilatoire à une brève exposition (< 10 minutes) à l'hypoxie (12% O₂) ou à l'hypercapnie (5% CO₂). Comme ER β est localisé dans les mitochondries et que l'œstradiol et l'agoniste de Er β augmentent la consommation d'O₂ mitochondriale, nous avons évalué la respiration mitochondriale (à l'aide d'un système d'oxygène haute résolution) et l'activité in vitro du complexe I de la chaîne de transfert d'électrons dans des échantillons de cortex cérébral chez des souris femelles âgées de type sauvage et ER β KO. Comparativement aux jeunes souris WT, les jeunes souris ER β KO possèdent une pression artérielle systémique élevée, mais des réponses ventilatoires similaires à l'hypoxie et à l'hypercapnie. Chez les souris femelles ER β KO âgées comparées aux souris WT âgées, la pression artérielle systémique était plus faible, la fréquence des soupirs était plus élevée, la fréquence des apnées était plus faible, et les réponses ventilatoires hypoxiques et hypercapniques étaient réduites. Chez les souris ER β KO âgées, la respiration mitochondriale et l'activité du complexe I dans le cortex cérébral étaient plus faibles que chez les souris WT. Nous concluons que ER β a des effets spécifiques à l'âge sur les fonctions vasculaires et respiratoires chez les souris femelles.

2) Abstract

We tested the hypothesis that ER β is involved in respiratory control in female mice. We used young adult (5-6 months-old) and aged (17-18 months-old) ER β KO or wild-type controls (WT) female mice to assess arterial blood pressure (via a tail-cuff sensor) and indices of respiratory pattern (sighs and apneas – recorded by whole body plethysmography at rest). We also measured respiratory parameters at rest and in response to brief (<10 minutes) exposure to hypoxia (12% O₂) or hypercapnia (5% CO₂). Because ER β is localized in mitochondria, and because estradiol and ER β agonist increase mitochondrial O₂ consumption, we assessed the mitochondrial respiration (with a high-resolution oxygraph system) and the *in-vitro* activity of the complex I of the electron transfer chain in samples of brain cortex in aged wild-type and ER β KO female mice. Compared to young WT mice, young ER β KO mice had elevated arterial blood pressure, but similar ventilatory responses to hypoxia and hypercapnia. In old ER β KO female mice compared to old WT mice, the arterial blood pressure was lower, the frequency of sighs was higher, and the frequency of apneas was lower, and the hypoxic and hypercapnic ventilatory responses were reduced. In old ER β KO mice mitochondrial respiration and complex I activities in the brain cortex were lower than in WT mice. We conclude that ER β has age-specific effects on vascular and respiratory functions in female mice.

3) Introduction

Through their effects in the central nervous system, steroid hormones such as estradiol or progesterone play an essential role in the regulation of sexual behavior (Brinton et al., 2008; Micevych et al., 2015). These hormones are also involved in processes governing mood or cognition (Marrocco and McEwen, 2016) and regulate homeostatic functions such as thermoregulation or respiratory control (Behan and Wenninger, 2008; Boukari et al., 2017, 2015). Because the occurrence of sleep apnea is higher in men than in women and increases after menopause in women (Bixler et al., 2001; Block et al., 1979), it is of clinical relevance to better understand the effects of ovarian hormones on respiratory regulation. Earlier studies performed in cats suggested that the main effect of estradiol was limited to increase the expression of the progesterone receptor, thereby increasing the respiratory effect of progesterone (Bayliss et al., 1990). Thus, the effects of estradiol, and the role of the classical estradiol receptors (ER α and ER β) in respiratory control remain poorly investigated. Nonetheless, we have reported that in newborn rats, long-term treatment with estradiol slightly reduced respiratory frequency and increased the frequency and length of apnea under resting conditions (Lefter et al., 2008). During hypoxia, estradiol treatment suppressed the normal decrease of body temperature, without altering the ventilatory response (Lefter et al., 2008). Furthermore, we showed recently that estradiol protects against the increased chemoreflex activity and respiratory instabilities induced by exposure to intermittent hypoxia (Laouafa et al., 2017b), conceivably due to protective effects of estradiol against the oxidative stress induced by intermittent hypoxia (Laouafa et al., 2017b), and likely involve effect of estradiol on mitochondrial respiration and production of reactive oxygen species in female rats exposed to intermittent hypoxia (Laouafa et al., 2017a). These results indicate that estradiol could have important roles on respiratory regulation that remains poorly understood. The effects of estradiol could be more important under specific pathophysiological conditions, and/or may be specific to sex- or age.

Classical ERs belong to the superfamily of steroid receptors, acting as transcription factors able to modulate the expression of target genes that have an “Estrogen Response Element” in their promoter region (Harris, 2007). Two ERs have been described, ER α and ER β , that are coded by different genes (Kuiper et al., 1996). We previously reported by immunohistochemistry that ER β is expressed in the peripheral chemoreceptors of adult rats (Joseph et al., 2006), and ER β mRNA and protein are densely expressed in central areas involved in respiratory control including the nucleus tractus solitarius, locus coeruleus, and the parabrachial nucleus (Shughrue et al., 1997; Shughrue and Merchenthaler, 2001).

In the present study, we tested the hypothesis that ER β is involved in respiratory control in female mice. We used young adult (5-6 months-old) and aged (17-18 months-old) ER β KO female mice to assess respiratory parameters at rest and in response to brief (<10 minutes) exposure to hypoxia (12% O₂) or hypercapnia (5% CO₂). Because previous studies showed elevated arterial pressure in young ER β KO female mice (Zhu et al., 2002), we also recorded arterial pressure in young and aged mice. Finally, because ER β is localized to mitochondria, and because ER β agonist and estradiol increase mitochondrial O₂ consumption (Irwin et al., 2012), we assessed the mitochondrial respiration and the *in vitro* activity of the complex I of the electron transfer chain in samples of brain cortex in aged wild-type and ER β KO female mice.

4) Material and methods

We used female ER β KO mice (Krege et al., 1998) (B6.129P2-Esr2tm1Unc/J; n=9) and their recommended wild-type control (WT: C57BL/6J; n=7) from The Jackson laboratory. The mice were kept in our animal care facility under standard conditions with food and water available ad-libitum. All experiments were approved by our local ethic committee (Ref: 2014-156) and strictly adhered to the rules of the Canadian Council on Animal Care. We used the same mice at the age of 5-6 months (young) and 17-18 months (old) to perform measurement of arterial pressure and respiratory recordings. Old mice were sacrificed a few days after the last measurements and brain samples were used to assess mitochondrial respiration and *in vitro* activities of mitochondrial complex I.

4.1) Measurements of arterial pressure

Arterial blood pressure was measured as described previously in female rats (Laouafa et al. 2017b) by the tail cuff method and volume-pressure recording (CODA system – Kent Scientific, Torrington, CT, USA). Conscious mice were placed in a restrainer tube over a warmed blanket. After 30 minutes of habituation, several recordings were performed, separated at least by 5 minutes. We report the mean of the 3 lowest values for systolic, diastolic, and mean arterial pressures.

4.2) Respiratory and metabolic recordings

All recordings were performed as previously described for adult mice (Boukari et al., 2016; Marcouiller et al., 2014). Briefly, animals were placed in a whole-body plethysmograph chamber (Emka Technologies – Paris, France), flushed with fresh room air. For each animal,

the flow rate was adjusted to avoid excessive built-up of CO₂ within the recording chamber. Flow rate fluctuated between 160 and 250 ml/min, CO₂ was measured in the outflowing air and was between 0.4 and 0.6%. Mice were left undisturbed for 4 hours under room air to ensure a period of normoxic recordings representative of a resting state, during which mice spend much of their time asleep (Bastianini et al., 2017; Marcouiller et al., 2014). A subsampling pump was connected to the chamber for analysis of O₂%, CO₂%, and water pressure using dedicated gas analyzers (FC-10, CA-10 and RH-300 respectively, Sable Systems International, Las Vegas, NV, USA). During recordings, values of O₂%, CO₂% and water pressure in the inflowing gas line were periodically measured and later used for calculation of O₂ consumption and CO₂ production using standard equations (Boukari et al., 2016). Rectal temperature was measured at the end of the normoxic recording period. Following the 4h periods of recordings, the animals were exposed to brief periods of hypoxia (12% O₂ – 10 minutes) and hypercapnia (5% CO₂ – 10 minutes) in randomized order, with 10-15 minutes between each test.

4.3) Analysis of respiratory and metabolic rate variables

All respiratory and metabolic variables were analyzed as performed previously in adult rats or mice (Boukari et al., 2016; Laouafa et al., 2017b; Marcouiller et al., 2014), to report respiratory frequency, tidal volume, minute ventilation, O₂ consumption rate, and CO₂ production under normoxic conditions and in response to hypoxia or hypercapnia. Because exposure to hypoxia was short (<10 min) and measurements are typically taken around the 5th minute of exposure, we estimated that rectal temperature and metabolic rate were similar in hypoxia and normoxia. We used standard criteria to report sigh, post-sigh apnea, and spontaneous apnea frequency under resting conditions (Boukari et al., 2016; Laouafa et al., 2017b; Marcouiller et al., 2014).

4.4) Mitochondrial respiration recordings on permeabilized brain samples

In old mice, a few days after the respiratory measurements, the animals were sacrificed with an overdose of anesthetic (ketamine/xylazine), the brain cortex was rapidly dissected and immediately used to perform measurements of mitochondrial respiratory functions using an O2K Oroboros respirometer (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria).

After calibration of the Oroboros chambers, cortex samples were weighted (2-3 mg), and recordings of O₂ consumption performed at 37°C in a respiration buffer (0.5 mM EGTA, 3mM MgCl₂, 60 mM potassium lactobionate, 10 mM KH₂PO₄, 20 mM Hepes, 110 mM sucrose, 1 g/l BSA). Based on a previous study establishing the optimal conditions for measurements of mitochondrial respiration in permeabilized brain samples (Herbst and Holloway, 2015), the samples are incubated in the recording chamber for 20 min with saponin (50µg/ml). For each

sample, we have differentiated mitochondrial respiration linked to NADH oxidation through the mitochondrial respiratory complex I (using pyruvate 5mM, malate 0.2 mM, and glutamate 10mM as substrates), and mitochondrial respiration linked to FADH₂ oxidation through the mitochondrial respiratory complex II (succinate 5mM and rotenone 4μM to block complex I activity). After equilibration with the substrates, ADP (500 μM) is added to the chambers to measure O₂ consumption under normal phosphorylating state (ATP synthesis – mitochondrial respiratory state 3). We then add cytochrome-c to assess the integrity of mitochondrial membranes, then oligomycin (2 μg/mg tissue) was added to block ATP synthesis and measure O₂ consumption due to leakage of protons in non-phosphorylating state (no ATP synthesis - state 4). Uncoupling is further exaggerated by adding graded bolus of carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP – 0.5 μM in 1μl/bolus) until reaching stable O₂ consumption. We then blocked the activity of the complex 3 with antimycin A (2.5 μM) to measure non-mitochondrial O₂ consumption due to cytosolic oxidases. Finally, the maximum activity of the complex 4 (cytochrome c oxidase) is measured by using ascorbate (2 mM) and tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD; 0.5mM).

4.5) In vitro activity of the mitochondrial complex I

Frozen cortex (20 mg /ml) were homogenized in 100 mM phosphate buffer KPI (100 mM K₂HPO₄, 100 mM KH₂PO₄, PH7,4) + EDTA 2 mM. Then, the tissues were centrifuged for 10 minutes at 1500 g, and the supernatant was collected and kept frozen at -80°C. The concentration of proteins was determined by a standard colorimetric BCA assay kit (Thermo Scientific, catalogue # 23225) and complex I activity was normalized to protein concentration. Complex I activity was assessed by measuring the disappearance rate of NADH by spectrophotometry. Briefly, the day of measurement, a solution containing 50 mM KPI buffer, 1 mM EDTA, 100 μM decylubiquinone, and 3.75 mg/ml BSA (10%) was prepared. A similar solution was prepared with rotenone (10 μM: inhibitor of complex I activity). 4 μl of each sample was added in two different wells. In the first well, we added 250 μl of solution containing rotenone, and in the second well we added 250 μl of cocktail without rotenone. We then added 3 mM of NADH into each well, and read the absorbance at 340 nm every 15 seconds for 3 minutes to monitor the rate of NADH disappearance. Since NADH can be consumed by complex I of the mitochondria and by cytochrome b5 reductase, the activity of the complex I was obtained by subtracting the slope of the well with rotenone (activity without complex I) from the slope of the well without rotenone (total activity).

4.6) Statistics

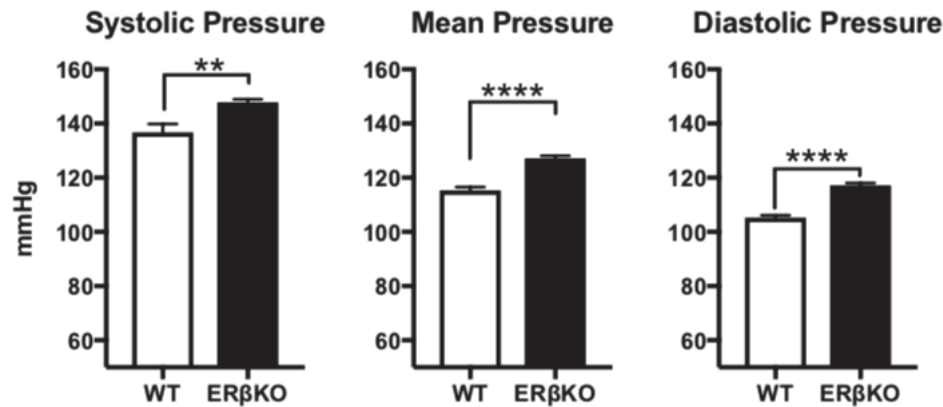
For arterial blood pressure, we used a student's t-test to assess if significant differences appeared between WT and ER β KO mice at each age. For respiratory variables at rest, we used a one-way ANOVA to assess if significant differences appear between groups (Young WT, young ER β KO, old WT, old ER β KO). When the ANOVA reported a significant effect ($P < 0.05$) we used a Fisher's LSD test to assess differences between WT and ER β KO mice with each age, and differences between old and young mice for each genotype. For the hypoxic or hypercapnic ventilatory response, we used 2 way-ANOVA for repeated measures, with genotype and gas exposure as grouping variables, followed by a post-hoc Fisher LSD test if significant effect of genotype or significant interaction between genotype and gas exposure appeared. All analyses were performed using GraphPad Prism 7. All values are reported as mean $\pm$ sem.

5) Results

5.1) Arterial pressure in young and old WT and ER β KO female mice

As previously reported in ER β KO mice ([Zhu et al. 2002](#)), the systolic, mean, and diastolic arterial pressures were elevated in young ER β KO compared to wild-type (Figure IV.1 – upper panels). However, in older mice there was an opposite effect, with ER β KO mice showing reduced diastolic and mean arterial pressures than wild-type (Figure IV.1 – lower panels).

Young Mice



Old Mice

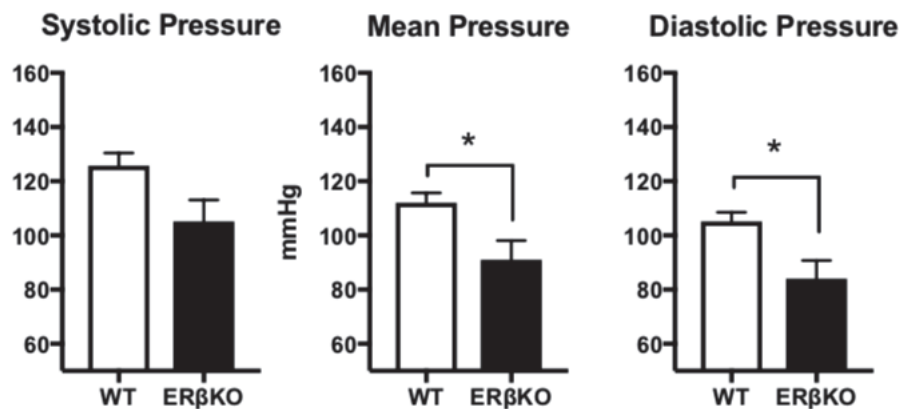


Figure IV.1 : Systolic, mean, and diastolic arterial pressure in young and old wild-type (WT) and ER β KO female mice.

*, **, ****: $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.0001$ ER β KO vs WT.

5.2) Body weight, respiratory and metabolic variables at rest in young and old WT and ER β KO female mice

Body weight was higher in ER β KO vs wild-type mice at both ages (Table 1), the mean of the difference between the WT and KO mice was 1.8 ± 0.8 g in young mice, and 14.2 ± 2.7 g in older mice, thus indicating a gradual increase in body weight during aging in ER β KO mice. Previous studies reported an increased body weight in ER β KO mice, which was associated with increased fat mass when mice reached 10-12 months of age ([Seidlova-Wuttke et al., 2012](#)) but not in younger (4 months-old) animals ([Ohlsson et al., 2000](#)). This suggests an important role

of ER β to avoid excessive adipose tissue accumulation during aging in female mice, but this remains poorly documented (Davis et al., 2013).

		WT	β ERKO
BW	Young	19.8 $\pm$ 0.3	21.5 $\pm$ 0.7*
	Old	28.4 $\pm$ 1.2 ^{ooo}	42.5 $\pm$ 2.2***,oooo
Tr	Young	36.0 $\pm$ 0.5	37.0 $\pm$ 0.2
	Old	36.3 $\pm$ 0.3	36.3 $\pm$ 0.3
fR	Young	163 $\pm$ 7	149 $\pm$ 6
	Old	162 $\pm$ 9	184 $\pm$ 9*, ^{oo}
V _T ml/100g	Young	0.50 $\pm$ 0.10	0.52 $\pm$ 0.08
	Old	0.65 $\pm$ 0.07	0.58 $\pm$ 0.08
V _E ml/min/100g	Young	83.5 $\pm$ 19.7	80.8 $\pm$ 14.9
	Old	105 $\pm$ 14	107 $\pm$ 20
VO ₂ ml/min/100g	Young	5.0 $\pm$ 0.6	5.3 $\pm$ 0.7
	Old	4.3 $\pm$ 0.5	4.1 $\pm$ 0.4
VCO ₂ ml/min	Young	3.7 $\pm$ 0.4	3.8 $\pm$ 0.4
	Old	2.9 $\pm$ 0.2	2.7 $\pm$ 0.7°
VCO ₂ /VO ₂	Young	0.772 $\pm$ 0.06	0.733 $\pm$ 0.02
	Old	0.703 $\pm$ 0.059	0.670 $\pm$ 0.028

Tableau II.4 : Respiratory and metabolic variables recorded at rest in young (5-6 months) and old (17-18 months) wild-type (WT) and ER β KO female mice.

BW: body weight (grams), Tr: rectal temperature (°C), fR: respiratory frequency (breaths/min), V_T: tidal volume (ml/100g), V_E: minute ventilation (=fR x V_T, in ml/min/100g), VO₂: O₂ consumption rate (ml/min/100 g), VCO₂: CO₂ production rate (ml/min/100g), VCO₂/VO₂: respiratory exchange ratio. Number of animals into each group: Young (7 WT and 8 KO), Old (6 WT and 9 KO).

*, ***: p<0.05, and p<0.001 ER β KO vs WT (same age)

^{oo}, ^{ooo}, ^{oooo}: p<0.01, p<0.001, and p<0.0001 old vs young (same genotype).

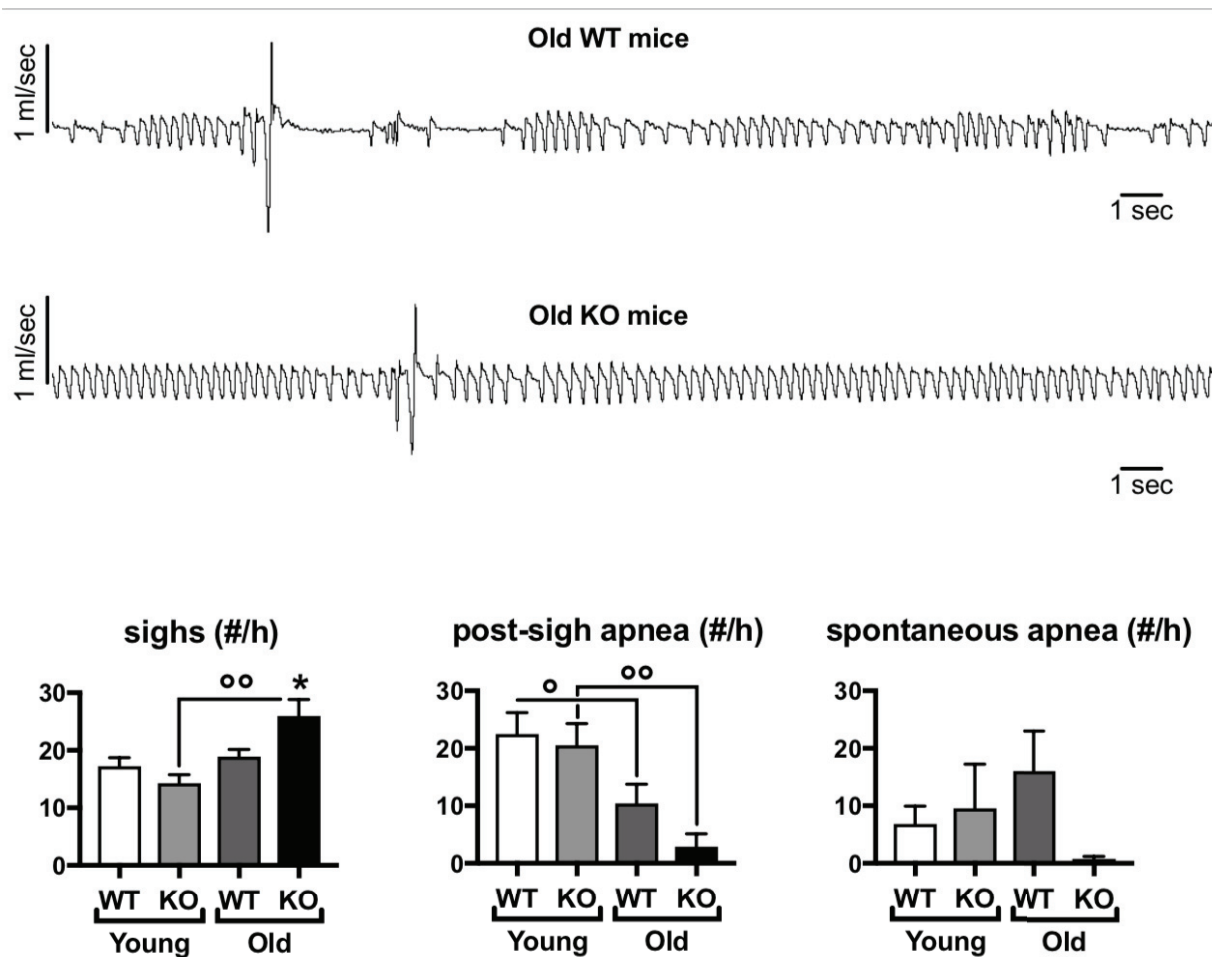


Figure IV.2 : Typical respiratory recordings from an old WT and an old ER β KO mice showing the occurrence of a sigh followed by apneas in the WT but not in the ER β KO mice

Lower panels: frequency of sigh, post-sigh apnea, and spontaneous apnea recorded at rest in young and old WT and ER β KO mice.

°: $p < 0.05$ ER β KO vs WT (same age).

°, °°: $p < 0.05$ and $p < 0.01$ old vs young (same genotype).

All respiratory and metabolic parameters measured at rest were similar between WT and ER β KO mice. Compared to young ER β KO, in old KO mice respiratory frequency was higher, and CO₂ production rate was lower (Table II.4). Interestingly, in old ER β KO mice the frequency of sigh was more elevated than in WT mice and in young KO mice (Figure IV.2). The frequency of post-sigh apnea was reduced by aging, and in aged ER β KO mice the frequency of post-sigh and spontaneous apnea were drastically reduced compared to aged WT mice.

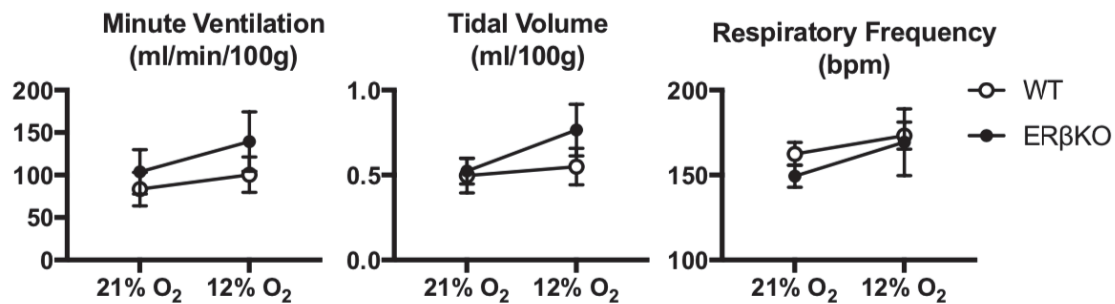
5.3) Hypoxic and hypercapnic ventilatory responses in young and old WT and ER β KO female mice

During the exposures to hypoxia and hypercapnia in young mice, there were no differences between wild-type and ER β KO (Figure IV.3). In aged mice, compared to wild-type controls

ER β KO aged mice had a reduced ventilatory response to hypoxia due to a lower tidal volume (Figure IV.4 – upper rows). In response to CO₂ exposure, minute ventilation was 39% lower in ER β KO compared to wild-type mice (Figure IV.4 lower rows), again due to a lower elevation of tidal volume in response to the CO₂ exposure.

Young Mice

Hypoxia



Hypercapnia

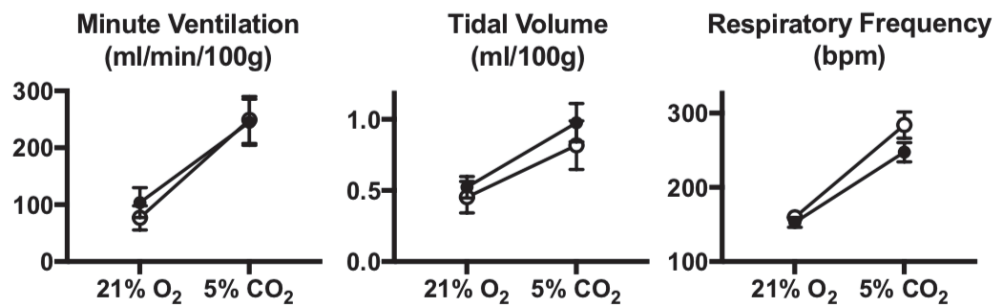
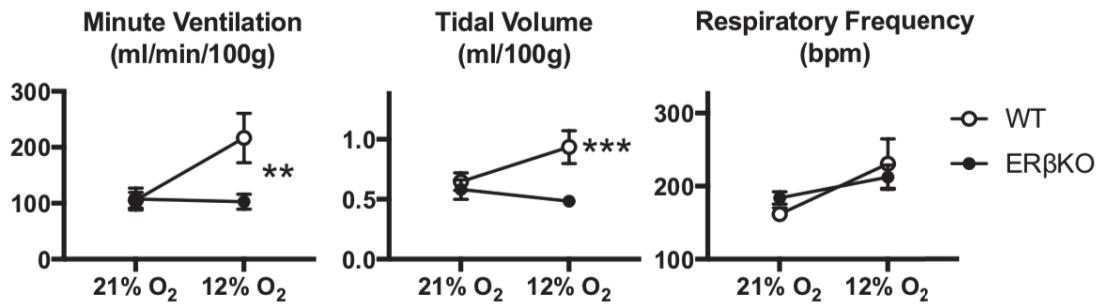


Figure IV.3 : Ventilatory responses to hypoxia (upper panels) and hypercapnia (lower panels) in young (5-6 months) wild-type (WT) and ER β KO female mice.

Old Mice

Hypoxia



Hypercapnia

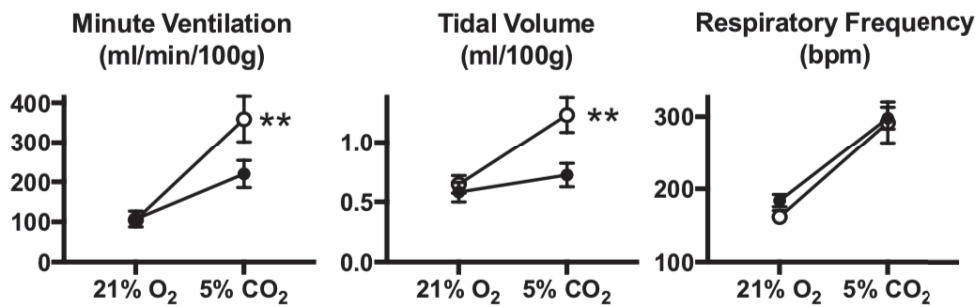


Figure IV.4 : Ventilatory responses to hypoxia (upper panels) and hypercapnia (lower panels) in old (17-18 months) wild-type (WT) and ER β KO female mice.

, *: $p < 0.01$, and $p < 0.001$ ER β KO vs WT.

5.4) Mitochondrial respiration and *in vitro* activity of electron transport chain complexes in young and old WT and ER β KO female mice

Mitochondrial respiration was measured only in old WT and ER β KO mice using permeabilized cortical brain samples. When the respiratory activity was activated by substrates of complex I, the mitochondrial O₂ consumption was lower in ER β KO mice compared to WT control (Figure IV.5). This was not observed with substrates of complex II, and there was no significant difference for the maximum activity of complex IV (cytochrome oxidase) between wild-type and ER β KO mice.

The activity of complex I measured *in vitro* by the disappearance rate of NADH was lower in ER β KO mice compared to WT (Figure IV.5).

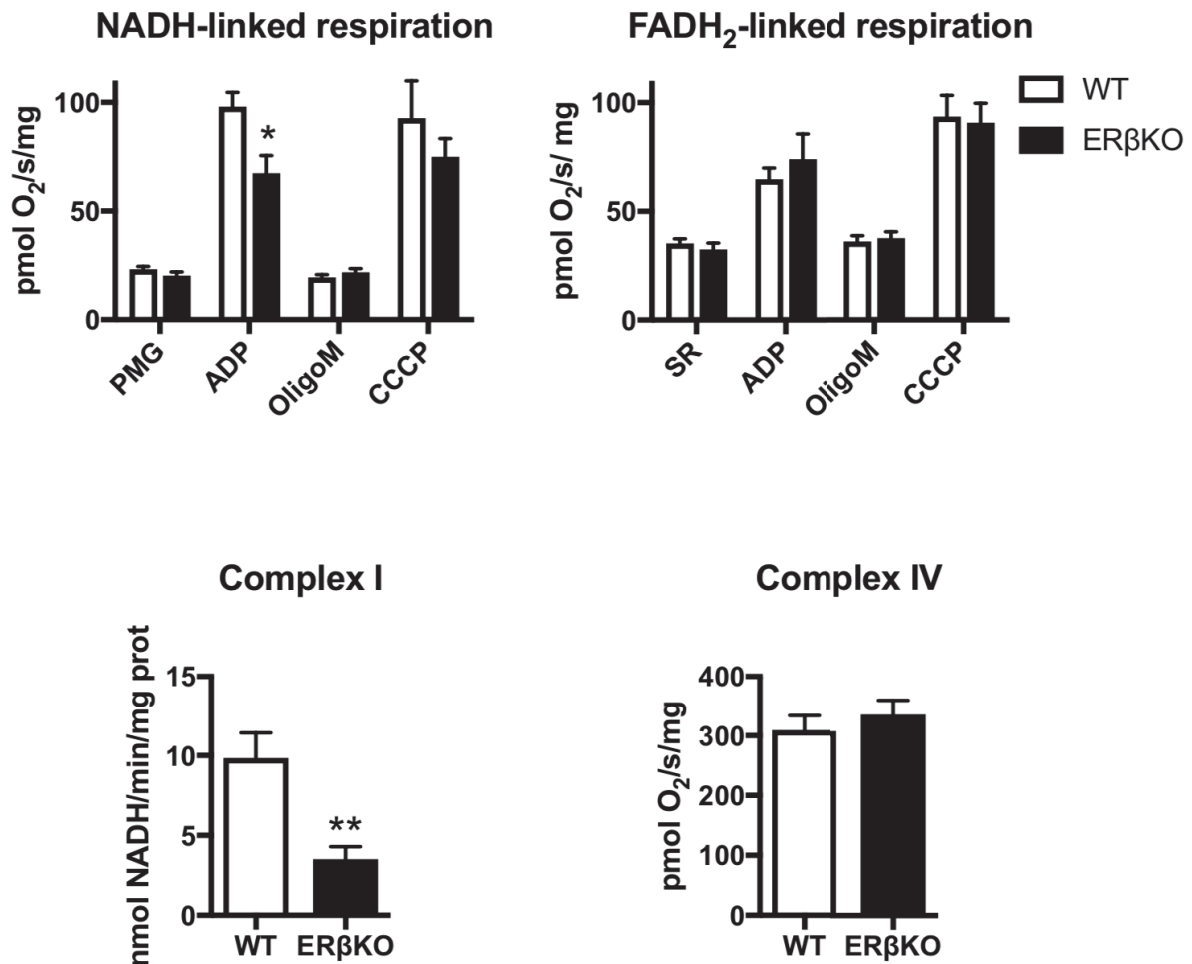


Figure IV. 5 : Mitochondrial function in samples of permeabilized brain cortex in old (17-18 months) WT and ERβKO female mice.

Upper panels: O₂ consumption rate (pmol O₂/second/mg tissue) with substrates of complex I (left – NADH-linked respiration), and substrates of complex II (right – FADH₂- linked respiration). PMG: Pyruvate, malate, glutamate (substrates of complex I), SR: succinate, rotenone (substrate of complex II and blockade of complex I), ADP: adenosine di-phosphate, OligoM: Oligomycin A, CCCP: carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine. See text for further details.

Lower panels: activity of complex I and IV of the electron transport chain (see text).

*, **: p<0.05, and p<0.01 ERβKO vs WT.

6) Discussion

The present studies show that deletion of ERβ in female mice leads to age-specific alterations of the cardio-vascular and respiratory systems. Interestingly, while elevated blood pressure was present in young ERβKO female mice, our results indicate that this effect does not persist in older ERβKO mice. In fact, in old ERβKO mice arterial blood pressure was lower than in old WT. In contrast, alterations in the respiratory pattern and chemoreflex functions appeared in old, but not in young ERβKO female mice. In older mice, our results also show a reduced mitochondrial respiration in brain cortex through alteration of complex I activity.

6.1) Role of ER β on the cardiovascular system in old vs young female mice.

A recent systematic review based on the analysis of 88 studies (mostly on animal models or tissues) provides a comprehensive overview on the role of ER β in the female cardiovascular system (Muka et al., 2016). ER β is expressed in endothelial cells, and has an important role by a direct, vasodilatory action on blood vessels. ER β regulates nitric oxide (NO) bio-availability and inflammatory markers in arterial walls, thus contributing to the regulation of arterial pressure (Muka et al., 2016). Our results showing elevated blood pressure in young female ER β KO mice are in line with previous studies, showing similar results (Zhu et al., 2002). We've been surprised to observe that arterial pressure is reduced in old ER β KO mice compared to their wild-type controls, and we are not aware of previous published report showing this effect. While it has been concluded that ER β plays a vasodilatory role (Muka et al., 2016), some studies have reported that vasodilation mediated by an ER β agonist does not require NO signaling, and that ER β might downregulate ER α - and NO-mediated vasodilation (Cruz et al., 2006). Furthermore, in a mouse model of accelerated senescence, age profoundly impacts the effect of estrogen-mediated regulation of NO and oxidative stress systems. In young females, estrogen increases the expression of endothelial NO synthase (eNOS) and decreases oxidative stress, but in aged mice estradiol treatment does not modulate eNOS expression. In isolated aorta of aged mice estradiol increases the expression of the NADPH oxidase subunit NOX1, and increases generation of superoxide anion (O₂⁻, one of the major reactive oxygen species) by NADPH oxidase (Novensà et al., 2011). Interestingly, such reversal of estrogen action on the vascular system in aged mice was associated to increased expression level of ER β and reduced expression level of ER α , leading to a high ratio of ER β /ER α expression (Novensà et al., 2011). It has been reported that ER β inhibits ER α -dependent gene expression, and might thus opposes the vascular effects of ER α (Matthews and Gustafsson, 2003). Since ER α is a potent modulator of vasodilation and NO synthesis (Traupe et al., 2007), we might therefore hypothesize that in aged ER β KO mice ER α signaling in blood vessels is increased, leading to vasodilation and reduced blood pressure. This scenario remains speculative, but we believe that it helps understanding our results.

6.2) Role of ER β on the respiratory control system in old vs young female mice.

Contrasting with data showing higher blood pressure in young ER β KO mice, there was no evidence of changes of the respiratory control system in these animals. However, compared to their wild-type controls, old ER β KO had several alterations, including higher frequency of

sighs recorded during sleep, but a much lower occurrence of post-sigh and spontaneous apneas, and reduced hypoxic and hypercapnic ventilatory responses. As mentioned in the introduction, ER β mRNA and protein are both expressed in brainstem areas involved in respiratory control (such as the nucleus tractus solitarius, locus coeruleus, parabrachial nucleus), in hypothalamic nuclei (Shughrue et al., 1997; Shughrue and Merchenthaler, 2001), and in peripheral chemoreceptors (Joseph et al., 2006). The fact that ER β is present in the peripheral chemoreceptors and in the nucleus tractus solitarius, the main projection site of the peripheral chemoreceptors in the brainstem (Finley and Katz, 1992), lend support to the hypothesis that ER β modulates responses elicited by activation of the peripheral chemoreceptor, which is in line with the drastically attenuated hypoxic response in ER β KO female mice. Interestingly, the hypercapnic ventilatory response was not completely abolished but reduced by about 50-55% in ER β KO mice compared to wild-type controls. Furthermore, responses to hypoxia and hypercapnia were both reduced owing to a lower tidal volume, and the magnitude of the difference observed between WT and ER β KO for both hypoxic and hypercapnic ventilatory responses were similar. These findings suggest a common mechanism might be responsible for the altered hypoxic and hypercapnic ventilatory responses, possibly involving a reduction of the peripheral chemoreceptor drive in response to hypoxia and hypercapnia. Alternatively, a central inhibition and/or altered integrative processes common to respiratory responses to hypoxia and hypercapnia could also explain these results.

Other interesting aspects of our data are the differences of sigh and apnea frequency in normoxia between WT and ER β KO mice. As reported for alterations of the chemoreflex responses, these effects are observed only in old mice. Sighs are very common, and play an important, but often overlooked, role to regulate the respiratory control system, and could possibly have functions extending well beyond this system (Ramirez, 2014). Because they are readily observable in brainstem slices, sighs are likely an intrinsic property of the respiratory control system, and in most cases, *in vitro* and *in vivo* sighs are followed by a cessation of breathing, referred to as “post-sigh apneas” (Ramirez, 2014). Interestingly, while sigh frequency was increased in ER β KO mice compared to WT controls, the frequency of post-sigh apnea was drastically reduced in ER β KO mice. While we could speculate on the significance of these findings in light of our most recent understanding of sigh functions and underlying neurobiology (Ramirez, 2014), we prefer to remain cautious, and simply report this intriguing phenotype observed in aged ER β KO female mice.

6.3) Role of ER β on mitochondrial respiration in old female mice.

Finally, our data shows that ER β deletion reduces mitochondrial respiratory activity and activity of electron transfer chain complex I in brain cortex samples. These results are intriguing because at the level of the peripheral chemoreceptors recent data support the hypothesis that the mitochondrial activity contributes to oxygen sensing ([Chang, 2017](#); [Fernández-Agüera et al., 2015](#); [McElroy and Chandel, 2017](#)). Therefore, if similar effects of ER β deletion are present in the peripheral chemoreceptors of ER β KO mice, this may likely contribute to the reduced hypoxic ventilatory response in older mice. These data are in line with the effect of estradiol on mitochondrial function, which are mediated by ER α and ER β ([Irwin et al., 2012](#); [A. Razmara et al., 2008](#); [Yang et al., 2004](#)). The modulations of mitochondrial function by E₂ and ERs are thought to contribute to cardio-vascular and neurological protective effects in women before menopause, and to explain the longer life expectancy of women compared to men ([Arnold et al., 2012](#); [Irwin et al., 2012](#); [Nilsen and Brinton, 2004](#); [A. Razmara et al., 2008](#)).

6.4) Conclusion

We conclude that KO mice are a reliable model to assess the role of specific estradiol receptor on respiratory regulation. We started our studies with young ER β KO mice, and because there was no evidence for altered respiratory control system, we decided to keep these animals until they reached an older age. Our data reveal that in 17-18 months-old mice, the deletion of ER β leads to several alterations of the respiratory control system, including reductions of chemoreflex functions. Because this is associated with a lower mitochondrial respiratory activity in the central nervous system, our results show that ER β acts at different levels of the oxygen transport cascade (from pulmonary ventilation to mitochondrial O₂ consumption). This may be relevant in pathological or physiological conditions in which O₂ homeostasis is compromised (sleep apnea, altitude, lung diseases), and research efforts to further understand the role of estradiol and ERs in these conditions should be further developed.

Partie IV

Discussion/Conclusion générale

1) Résumé des principaux résultats obtenus

L'objectif général de cette thèse était d'étudier le rôle protecteur de l'estradiol et des modulateurs sélectifs des récepteurs d'estradiol (SERMs) contre les manifestations systémiques cardio-respiratoires, le stress oxydatif et la dysfonction mitochondriale dans le cerveau dans un modèle animal de SAOS (exposé en hypoxie intermittente).

Dans notre premier chapitre, nous avons rapporté que le traitement avec de l'estradiol chez des ratte ovariectionomisées permet de réduire l'élévation de pression artérielle systémique, le nombre d'apnées, ainsi que la réponse ventilatoire à l'hypoxie qui étaient augmentés par l'exposition à l'HI. De plus, l'HI induit un fort stress oxydatif central et périphérique qui est réduit par le traitement estrogénique.

Le second chapitre révèle que l'HI conduit à une dysfonction de la chaîne respiratoire dans le cortex cérébral, conduisant à une diminution de la respiration mitochondriale durant l'état phosphorylant (état 3) et à une élévation de la production de H₂O₂. Les agonistes des récepteurs de l'estradiol α et β (ER α et ER β) permettent de prévenir cette dysfonction avec un effet plus prononcé avec l'agoniste de ER α .

Le troisième chapitre nous a permis de comprendre le rôle important du récepteur bêta de l'estradiol (ER β) dans les fonctions cardio-respiratoires et mitochondriales. L'absence de ce récepteur chez des souris femelles âgées conduit à une diminution de la pression artérielle systémique et de la réponse ventilatoire à l'hypoxie et à l'hypercapnie. De plus, la respiration mitochondriale est diminuée avec une réduction de l'activité du complexe I.

2) L'estradiol traitement du SAOS ou de ses conséquences systémiques ?

2.1) Estradiol et apnées du sommeil

Le stress oxydatif est l'une des caractéristiques majeures du SAOS chez l'homme ([Barceló et al., 2000](#); [Lavie et al., 2004](#)) et chez les modèles animaux exposés à l'HI ([Prabhakar et al., 2007b, 2015](#), [Peng et al., 2014, 2006](#); [Morgan et al., 2016b](#)). Nos résultats rapportent que le traitement avec de l'estradiol réduit le stress oxydatif en stimulant les défenses antioxydantes (SOD et GPx), en réduisant l'activité de la NOX et en régulant la chaîne respiratoire mitochondriale. Ces résultats sont en accord avec le rôle de l'estradiol comme puissant

antioxydant qui a été trouvé chez l'animal (El Habachi et al., 2014; Moorthy et al., 2005) et chez l'homme (Bellanti et al., 2013; Signorelli et al., 2006). La première hypothèse de cette thèse était de montrer qu'en réduisant le stress oxydatif induit par l'HI, on réduirait les conséquences associées, c'est-à-dire l'augmentation de la réponse ventilatoire à l'hypoxie et l'élévation de la pression artérielle systémique. Notre traitement réduit bien ces deux variables et suggèrent fortement que cet effet dépend de la baisse du stress oxydatif comme déjà mentionné dans plusieurs études utilisant des antioxydants (Del Rio et al., 2010; Peng et al., 2009; Peng and Prabhakar, 2003). Notre traitement réduit également de façon assez drastique la survenue d'apnées (apnées post-soupir et spontanées) qui était augmentée par l'HI. L'augmentation du nombre d'apnées en réponse à un protocole d'HI est un phénomène connu (Edge et al., 2012), l'hyperventilation liée à l'augmentation d'activité des chémorécepteurs périphériques diminue la pression partielle en CO₂ artérielle sous le seuil apnéique, induisant l'apparition d'apnées (Prabhakar, 2001). Il se produit un cercle vicieux, où l'HI qui est utilisée pour mimer les apnées du sommeil provoque une augmentation de la survenue d'apnées du sommeil (**figure V.1A**). L'estradiol permet de réduire l'augmentation des apnées induites par l'HI soit (i) par ses effets antioxydants ou (ii) en tant que stimulant respiratoire.

L'hypothèse la plus probable passe par les effets antioxydants de l'estradiol. En effet, notre première étude rapporte que l'estradiol réduit la réponse ventilatoire à l'hypoxie qui était augmentée par l'exposition à l'HI. De nombreuses preuves suggèrent que l'élévation de la réponse ventilatoire à l'hypoxie conduit à l'augmentation de l'activité sympathique causée par l'élévation du stress oxydatif dans le corps carotidien (Prabhakar et al., 2007b; Prabhakar and Kumar, 2010)

En réduisant l'activité sympathique, probablement par ses effets antioxydants, l'estradiol réduit l'élévation de la pression artérielle systémique et l'apparition des apnées. Par conséquent, l'estradiol est capable de couper le cercle vicieux créé par l'HI (**figure V. 1B**). Les études chez la femme ménopausée rapportent également que les femmes ayant la prévalence de survenue de SAOS la plus élevée sont celles ayant un niveau d'estradiol le plus faible dans le sang (Galvan et al., 2017; Netzer et al., 2003). Ces données soutiennent donc fortement l'hypothèse que la ménopause, par le déclin de l'estradiol, conduit donc bien à une augmentation de la survenue du SAOS qui par la suite aboutit à des conséquences cardiovasculaires, métaboliques et neurologiques (Bixler et al., 2001; Young et al., 2003). Ainsi, l'estradiol peut être une thérapie efficace contre l'apnée du sommeil d'une part et contre les conséquences de l'apnée du sommeil d'autre part.

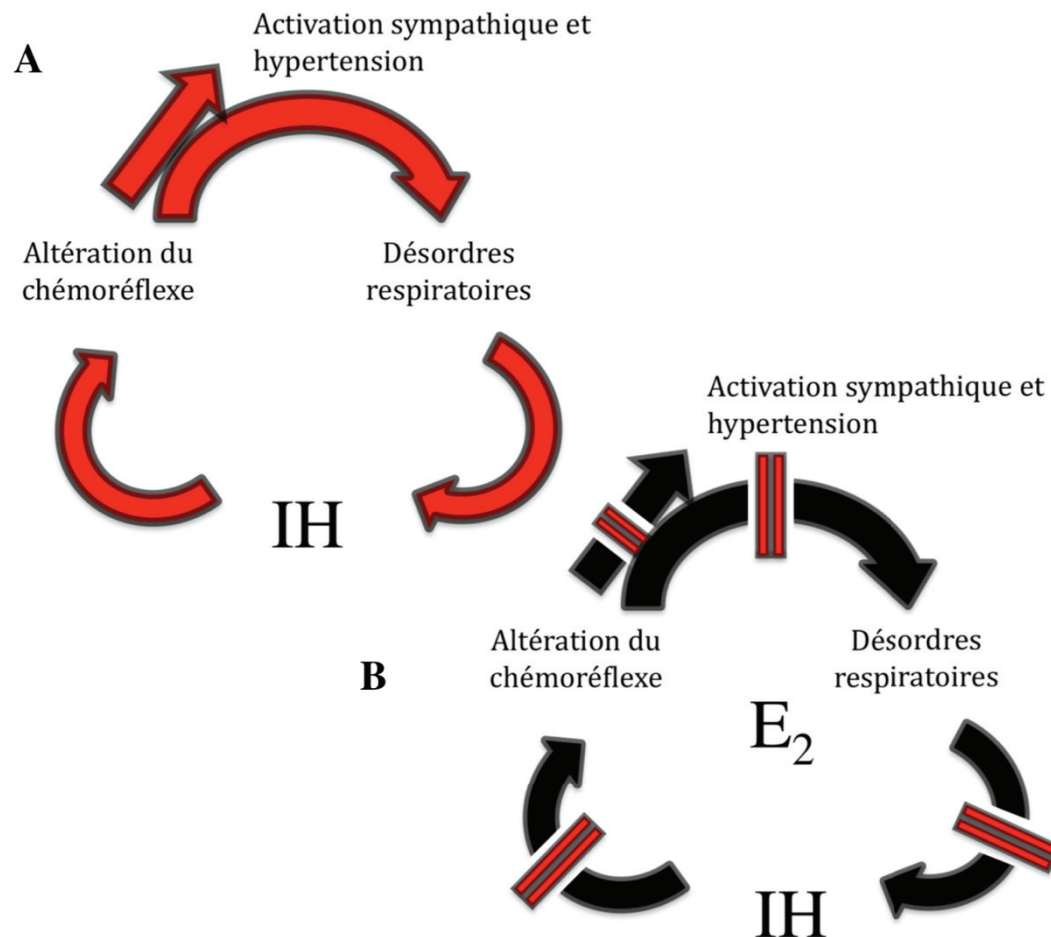


Figure V.1 : Cercle vicieux induit par l'exposition en hypoxie intermittente

L'hypoxie intermittente induit une altération du chémoréflexe qui conduit à l'augmentation de l'activité sympathique, à l'élévation de la pression artérielle et à l'apparition d'apnées (A). Ce cercle vicieux induit par l'HI peut être coupé par le traitement à l'estradiol (B).

2.2) Estradiol et activité sympathique

Toutefois, notre étude n'évalue pas directement l'activité sympathique, mais un reflet de l'activation des chémorécepteurs périphériques avec la réponse ventilatoire à l'hypoxie. Nous ne sommes pas en mesure de dire directement que dans notre modèle, l'augmentation des apnées induite par l'HI est la cause d'une augmentation de l'activité des chémorécepteurs périphériques et que le traitement à l'estradiol réduit l'activité du chémoréflexe et par conséquent les apnées et l'élévation de pression artérielle. La ménopause chez la femme se traduit par une augmentation de l'activité sympathique et de la pression artérielle (Burt et al., 1995). Le traitement estrogénique transdermique pendant 8 semaines réduit l'activité sympathique et l'élévation de pression artérielle (Vongpatanasin et al., 2001). L'association avec de la progestérone ne produit pas une plus grande diminution de la pression artérielle (Seely et al., 1999) suggérant que l'effet protecteur contre l'augmentation de l'activité sympathique est liée seulement à l'estradiol.

Dans le tronc cérébral, des sites sympathoexcitateurs sont localisés dans le bulbe rostral ventrolatéral (RVLM) (Sunderram and Androulakis, 2012). Il a été rapporté que chez le rat, la micro-injection bilatérale d'estradiol dans la RVLM réduit la pression artérielle systémique par une diminution du tonus vasomoteur neurogène sympathique. Cette diminution est médiée par le récepteur de l'estradiol β (ER β) et non α (ER α) (Shih, 2009). L'HI est connue pour augmenter l'activité des zones responsables de la sympathoexcitation localisées dans la RVLM (Greenberg et al., 1999). On peut penser que notre traitement estrogénique réduit totalement ou partiellement l'activité de ces zones sympathoexcitatrices qui se répercute par une diminution de la pression artérielle. Afin de valider cette hypothèse, des expériences évaluant l'activité des régions adrénergiques A1 et C1 de la RVLM pourraient être entreprises.

Le modèle que l'on peut suggérer lors de la ménopause est que le déclin du niveau d'estradiol aboutit à :

- Une augmentation du stress oxydatif, qui augmente la sensibilisation des corps carotidiens, qui se traduit par l'augmentation de l'activité sympathique (élévation de pression artérielle) et l'apparition d'apnées du sommeil.
- Une augmentation de l'activité des zones sympathoexcitatrices dans la RVLM qui conduit également à une augmentation de la pression artérielle.

3) La progestérone : stimulant respiratoire ou antioxydant ?

Bien que la majorité des preuves sont en faveur des effets protecteurs de l'estradiol contre l'apnée du sommeil à travers ses effets antioxydants, on peut penser à un rôle indirect de stimulant respiratoire de la part de l'estradiol. En effet, l'estradiol en se fixant sur ses récepteurs (ERs) est capable de stimuler la synthèse du récepteur nucléaire de la progestérone (nPR) dans le système nerveux central, permettant une meilleure réponse de la progestérone (Bayliss et al., 1990; Behan and Wenninger, 2008). La progestérone, en se fixant sur son récepteur nucléaire, est un stimulant respiratoire capable de diminuer les instabilités respiratoires chez la souris (Marcouiller et al., 2014) et chez le rat (Yamazaki et al., 2005). De plus, la progestérone est capable de stimuler la ventilation en augmentant la fréquence respiratoire et le volume courant, par l'intermédiaire du récepteur nucléaire de la progestérone (Marcouiller et al., 2014). Chez la chatte anesthésiée, l'injection de progestérone directement au niveau du NTS augmente l'activité du nerf phrénique responsable de la contraction du diaphragme (Bayliss and Millhorn, 1992). L'estradiol joue un rôle important dans la réponse ventilatoire provoquée par la progestérone puisque l'injection sous-cutanée d'estradiol et de progestérone augmente trois fois plus l'activité du nerf phrénique que l'injection de progestérone seule chez la chatte (Bayliss et

al., 1990) et chez la ratte (Brodeur et al., 1986). Ces études suggèrent qu'un niveau élevé de progestérone et de ses récepteurs nucléaires sont requis pour stimuler la ventilation.

Cependant, l'hypothèse que les effets protecteurs de l'estradiol contre la survenue des apnées du sommeil passent par la progestérone est peu probable, car notre modèle est ovariectomisé, signifiant que le niveau de progestérone circulante et cérébrale est faible, mais non négligeable, même s'il y a une élévation de la synthèse des récepteurs nucléaires de la progestérone.

Il en demeure néanmoins important de se questionner sur les effets protecteurs de la progestérone dans un modèle d'apnées du sommeil. Nous avons ainsi conduit la même étude qu'au **chapitre I**, en remplaçant l'estradiol des pompes par de la progestérone (4 mg/kg) afin de voir si les effets sur les paramètres systémiques cardio-respiratoires et sur le stress oxydatif obtenus par le traitement par la progestérone sont similaires à ceux obtenus avec l'estradiol.

Les résultats sur les paramètres systémiques (cardio-respiratoires) sont illustrés **figure V.2**.

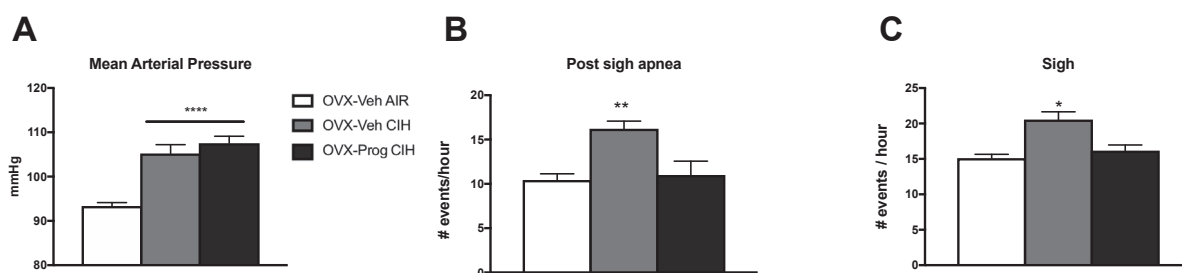


Figure V.2 : Paramètres cardio-respiratoires chez des rattes traitées avec de la progestérone
Pression artérielle (A) apnées post-soupir (B) et soupirs (C) chez des rattes traitées avec du véhicule ou de la progestérone (4 mg/kg) exposées ou non à l'HI. Les valeurs sont exprimées en moyennes $\pm$ SEM, n=6 pour chaque groupe. *, ** et **** représentent respectivement p < 0.05, 0.01 et 0.001 par rapport au groupe OVX-Veh AIR.

Nos résultats montrent que contrairement à ceux obtenus avec l'estradiol, la progestérone ne réduit pas l'élévation de pression artérielle (**figure V.2A**), mais comme l'estradiol, réduit la survenue des soupirs et des apnées post-soupir (**figure V.2B-C**). On remarque que l'estradiol réduit plus fortement les apnées post-soupir que le traitement avec de la progestérone suggérant deux mécanismes distincts entre les deux hormones stéroïdiennes. On peut penser que les effets de la progestérone passent par ses effets de stimulant respiratoire alors que ceux de l'estradiol par ses effets antioxydants. De plus, rien ne montre que la progestérone régule l'activité sympathique ce qui peut expliquer qu'il n'y a pas de changement sur la pression artérielle. Toutefois, la progestérone possède également des effets antioxydants selon nos résultats, ils sont présentés **figure V.3 et V.4**.

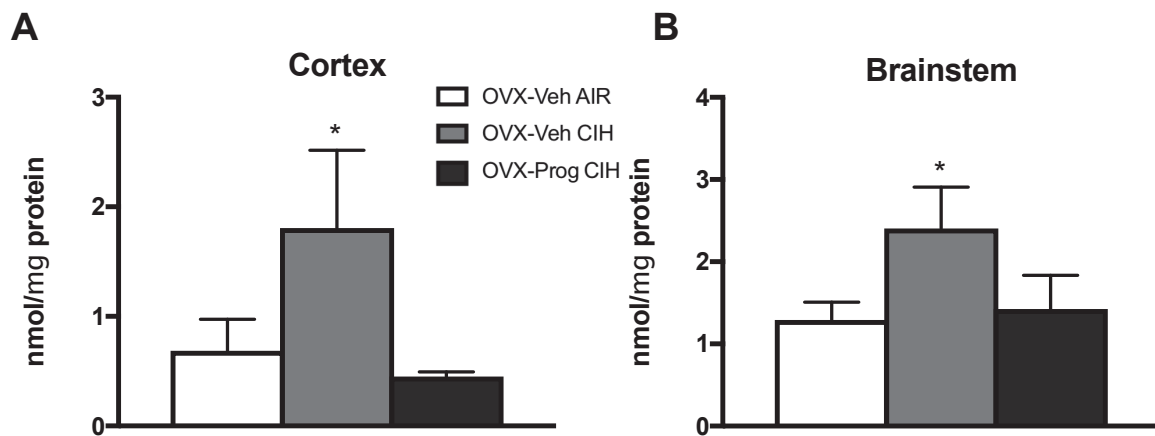


Figure V.3 : Peroxydation lipidique chez des rattes traitées avec de la progestérone

Niveau du MDA(malondialdéhyde) dans le cortex (A) et le tronc cérébral (B) chez des rattes traitées avec du véhicule ou de la progestérone (4 mg/kg) exposées ou non à l'HI. Les valeurs sont exprimées en moyennes $\pm$ SEM, n=6 pour chaque groupe. * représentent $p < 0.05$ par rapport au groupe OVX-Veh AIR.

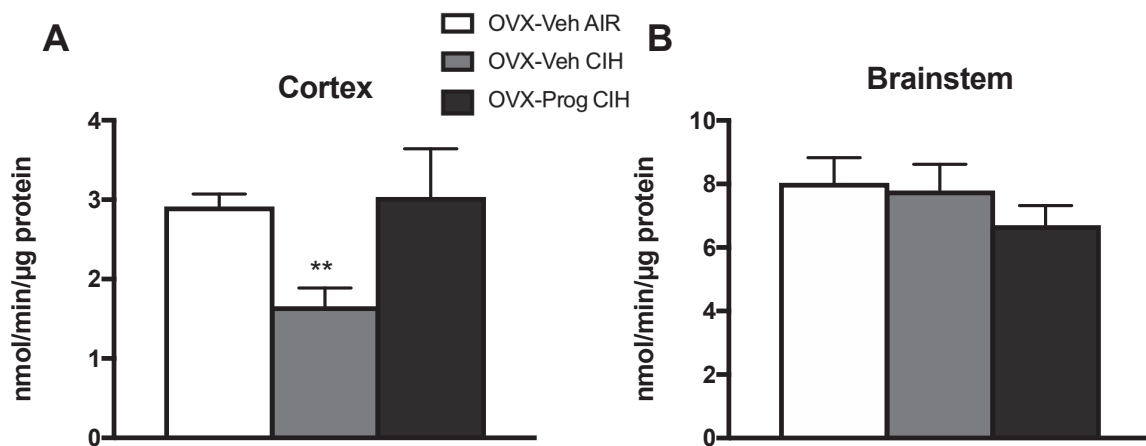


Figure V.4 : Activité de la superoxyde dismutase (SOD) chez des rattes traitées avec de la progestérone

Activité de la superoxyde dismutase cytosolique (SOD_{CuZn}) dans le cortex (A) et le tronc cérébral (B) chez des rattes traitées avec du véhicule ou de la progestérone (4 mg/kg) exposées ou non à l'HI. Les valeurs sont exprimées en moyennes $\pm$ SEM, n=6 pour chaque groupe. ** représentent $p < 0.01$ par rapport au groupe OVX-Veh AIR.

Nos résultats sur les dommages oxydatifs des lipides rapportent que le traitement avec de la progestérone protège contre la peroxydation lipidique induite par l'exposition à l'hypoxie intermittente dans le cortex et le tronc cérébral (**figure V.3A-B**). De même, la progestérone évite la diminution de l'activité de la SOD_{CuZn} induite par l'HI dans le cortex sans modification dans le tronc cérébral (**figure V.4 A-B**). Ces résultats sont en tout point similaires avec ceux obtenus avec l'estradiol, suggérant que la progestérone protège contre le stress oxydatif. En effet, il a été rapporté que chez des rattes ménopausées l'administration d'un combiné estradiol et progestérone augmentent l'activité de la SOD_{CuZn} plus fortement qu'avec de l'estradiol seul

(Moorthy et al., 2005). Cependant, le pouvoir antioxydant de l'estradiol est reconnu comme étant plus fort que celui de la progestérone (Doshi and Agarwal, 2013; Moorthy et al., 2005). Lors de la ménopause, la diminution drastique du niveau d'estradiol est associée au déclin du niveau de la progestérone (Santoro and Randolph, 2011) et peut expliquer l'augmentation des apnées du sommeil. Par exemple, chez les femmes ménopausées, la progestérone est 2,8 fois moins importante chez les femmes subissant des apnées du sommeil (Netzer et al., 2003). L'indice d'apnées du sommeil est 30 % plus faible chez les femmes traitées avec de la progestérone et de l'estradiol, quel que soit l'indice de masse corporelle (Shahar et al., 2003).

4) HIF-1 et HIF-2 : modulateurs des ROS induits par l'hypoxie intermittente.

Nos résultats ont exploré les conséquences systémiques cardio-respiratoires et les mécanismes cellulaires (stress oxydatif) de l'HI en lien avec les effets protecteurs de l'estradiol. Toutefois, les mécanismes moléculaires n'ont pas été étudiés au cours de cette thèse. Un des mécanismes moléculaires expliquant l'augmentation des ROS est la surexpression de HIF-1 α et la dépression de HIF-2 α .

HIF-1 (Hypoxia-inducible factor-1) est un facteur de transcription qui a comme fonction de réguler l'homéostasie de l'oxygène durant l'hypoxie en régulant l'expression de plus de 100 gènes (Semenza, 2002). Les protéines codées jouent un rôle clé dans des processus physiologiques tels que l'angiogenèse/remodelage vasculaire, l'érythropoïèse, le transport du glucose, la glycolyse, le transport du fer et la prolifération/survie cellulaire; une liste non exhaustive est fournie par (Semenza, 2002). HIF-1 est un hétérodimère composé des sous-unités HIF-1 α et HIF-1 β . HIF-1 α est sujet à une rapide ubiquitination et une dégradation par le protéasome, mais ce processus est inhibé en condition hypoxique (Sutter et al., 2000), conduisant à une augmentation du niveau de HIF-1 α et de sa dimérisation avec HIF-1 β lorsque la concentration cellulaire en O₂ est diminuée (**figure V.5**).

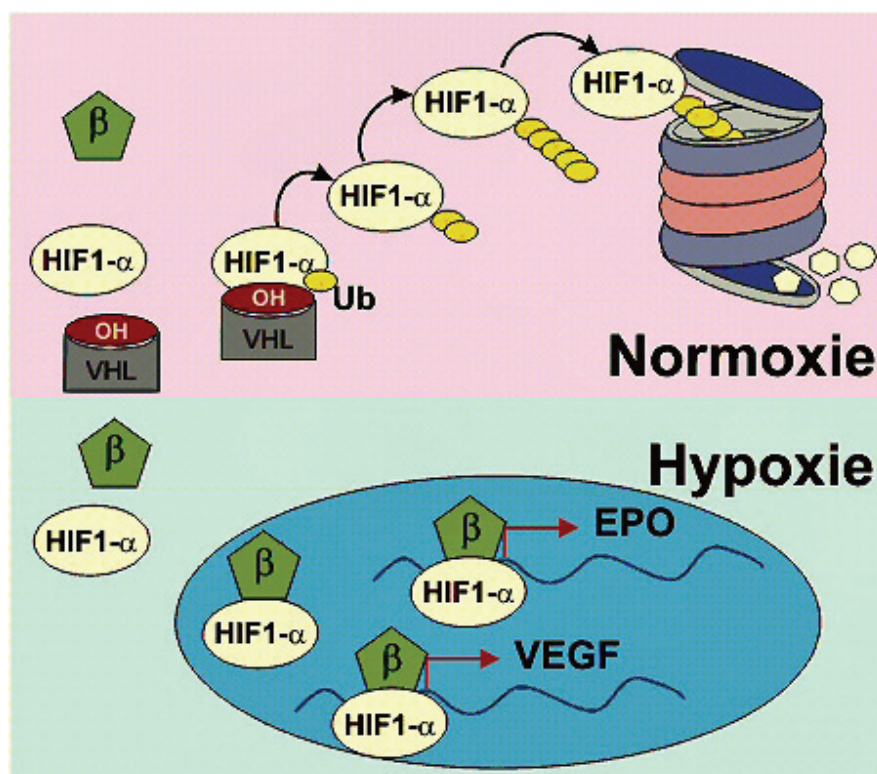


Figure V.5 : Mode d'action de HIF-1

En condition normoxique HIF-1 α est constamment dégradée par le protéasome après avoir subi une série d'ajout d'ubiquitine. En condition hypoxique, HIF-1 α est stabilisée, se dimérise avec HIF-1 β , se transloque dans le noyau pour se fixer sur ses éléments de réponse des promoteurs des gènes responsables du contrôle de l'homéostasie de l'oxygène en hypoxie. D'après gfme.free.fr

Sur des cellules en culture (PC12) exposées à une HI, il est rapporté une augmentation de la protéine HIF-1 α , aussi bien que l'activation transcriptionnelle de HIF-1 ([Yuan et al., 2005](#)). L'exposition à l'IH chez des souris avec un déficit partiel de HIF-1 α montre que par rapport à des souris WT, elles ne développent pas ([Peng et al., 2006](#)) :

1. D'augmentation du niveau des ROS dans les corps carotidiens.
2. D'augmentation de la réponse ventilatoire à l'hypoxie.
3. La facilitation sensorielle à long terme (sLTF).
4. D'augmentation des catécholamines circulantes.
5. D'élévation de la pression artérielle.

HIF-1 est connue pour augmenter la transcription et l'activité de l'enzyme pro-oxydante NADPH oxydase 2 (NOX2) dans le système nerveux central et périphérique en réponse à une HI ([Yuan et al., 2011](#)).

Selon les auteurs, il est probable que l'activation de HIF-1 par l'IH contribue à augmenter la production de ROS dans le corps carotidien en surexprimant NOX2, aboutissant à la sensibilisation des corps carotidiens ([Prabhakar et al., 2015](#)).

Dans notre étude, nous avons rapporté une diminution de la réponse ventilatoire à l'hypoxie par l'estradiol, mais n'avons pas évalué l'expression de HIF-1 α . On peut supposer que l'estradiol réduit le stress oxydatif dans le corps carotidien en diminuant l'activité de la NOX2 comme nous l'avons rapportée dans le tronc cérébral et dans le cortex et comme rapportée dans l'hippocampe (Zhang et al., 2009). Cette diminution de NOX2 par l'estradiol peut également impliquer HIF-1, car il a été rapporté par plusieurs études que l'estradiol est capable d'inhiber l'activité de HIF-1 α en se fixant sur son récepteur β (ER β) (Lim et al., 2011, 2009; Mukundan et al., 2004). Par son effet sur HIF-1 et ses effets antioxydants, l'estradiol réduit la réponse ventilatoire à l'hypoxie et l'élévation de la pression artérielle causées par l'HI.

HIF-2 (Hypoxia-inductible factor-2) est un autre facteur de transcription de la famille de HIF. HIF-2 α partage 50% d'homologie avec HIF-1 α et est capable d'interagir avec HIF-1 β (Prabhakar et al., 2015). L'hypoxie soutenue active à la fois HIF-1 ET HIF-2 afin de réguler plusieurs gènes en commun (Loboda et al., 2010). Nanduri et ses collaborateurs ont rapporté que l'hypoxie intermittente réprime l'expression de la protéine HIF-2 α dans le corps carotidien. La conséquence est une diminution des ARNm de plusieurs enzymes antioxydantes incluant la SOD cytosolique et une augmentation du stress oxydatif (Nanduri et al., 2009). De plus, des souris partiellement déficientes en HIF-2 α exhibent plusieurs réponses phénotypiques similaires à des souris WT exposées à une HI (Peng et al., 2011) incluant une élévation :

- 1- Du stress oxydatif
- 2- De la réponse à l'hypoxie par le corps carotidien
- 3- Du nombre d'apnées
- 4- Des catécholamines circulantes
- 5- De la pression artérielle

Le traitement antioxydant chez ces souris normalise la fonction du corps carotidien et restaure la fonction cardio-respiratoire (Peng et al., 2011). Les résultats que nous avons obtenus avec notre traitement estrogénique sur la fonction cardio-respiratoire ressemblent étroitement à ceux obtenus par Peng et al, suggérant un possible contrôle de HIF-2 α par l'estradiol.

Le déséquilibre entre HIF-1 et HIF-2 apparaît comme l'un des mécanismes moléculaires majeurs responsables des altérations cardio-respiratoires. L'exposition à l'HI augmente également HIF-1 α et diminue HIF-2 α dans le NTS et le RVLM, deux zones importantes dans l'intégration des afférences issues du corps carotidien (Peng et al., 2014).

Bien qu'il soit évident que l'estradiol régule HIF-1 α (Lim et al., 2015, 2011), aucune étude ne rapporte une régulation de HIF-2 α par l'estradiol. Il est important, afin de valider cette

observation, d'évaluer HIF-1 α et HIF-2 α dans le tronc cérébral de nos rats exposés à l'HI et traités avec de l'estradiol.

5) Hypoxie intermittente, dysfonction mitochondriale et adaptation métabolique : rôle des récepteurs ER α et ER β

L'énergie cellulaire (ATP) peut être produite majoritairement par deux voies métaboliques :

- Le métabolisme oxydatif (oxydations phosphorylantes)
- Le métabolisme glycolytique (glycolyse)

La glycolyse et les oxydations phosphorylantes (OXPHOS) sont étroitement couplées. La glycolyse est effectuée dans le cytoplasme et ne produit que 2 ATP. Le pyruvate, produit final de la glycolyse, est un combustible pour les oxydations phosphorylantes. En condition aérobie, le pyruvate pénètre dans les mitochondries pour être oxydé en acétyl CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH) qui, en se combinant avec l'oxaloacétate, permet de démarrer le cycle de Krebs et produire 36 ATP par la chaîne respiratoire. En condition anaérobie, le pyruvate est réduit en lactate par la lactate déshydrogénase dans le cytoplasme, puis le lactate est excrété dans l'espace extracellulaire par des transporteurs de monocarboxylates (Zheng, 2012) (figure V.6). La glycolyse malgré son faible rendement dans la production d'énergie est très importante pour des tissus glucodépendants tels que le cerveau ou les globules rouges, qui utilisent quasi exclusivement le glucose comme substrat énergétique (Radermecker et al., 2008).

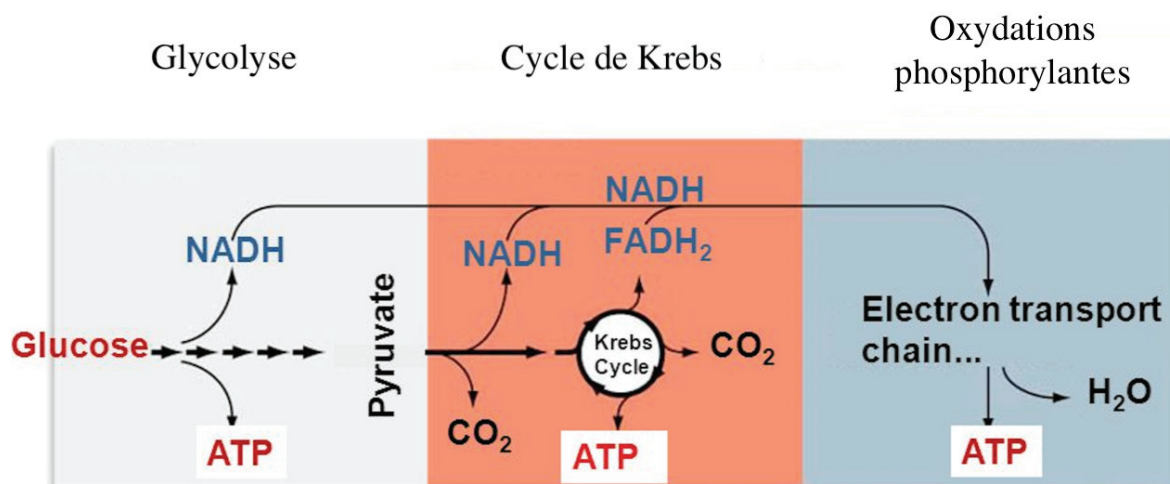


Figure V.6 : La production d'ATP à travers la glycolyse et les oxydations phosphorylantes

Le glucose issu de l'alimentation est dégradé en pyruvate par le processus de glycolyse qui produit 2 ATP. Le pyruvate est transporté dans la mitochondrie pour être converti par la pyruvate déshydrogénase (PDH) et former l'acétyl CoA. En entrant dans le cycle de Krebs, il y a production des équivalents réduits (NADH et FADH₂) consommés par la chaîne respiratoire pour produire 36 ATP.

Pour produire l'ATP, les cellules des mammifères dépendent à la fois de la glycolyse et des OXPHOS. Cependant, le rapport de la contribution de la glycolyse par rapport aux OXPHOS pour le rendement énergétique varie selon les cellules, l'état de croissance et les microenvironnements (Zheng, 2012). Dans des conditions normales, les cellules consomment de l'énergie dont 70 % sont fournies par les OXPHOS alors qu'en hypoxie, la production d'ATP à partir de la glycolyse augmente pour compenser la faiblesse des oxydations phosphorylantes. La glycolyse et les OXPHOS coopèrent afin de maintenir une balance énergétique cellulaire à l'équilibre. Les OXPHOS dans des conditions normales sont capables de réguler l'activité glycolytique par différentes voies pour maintenir l'équilibre énergétique (Pfeiffer et al., 2001). La pyruvate déshydrogénase (PDH) joue un rôle clé dans le changement entre le métabolisme oxydatif et le métabolisme glycolytique (Zhang et al., 2014). Sa localisation mitochondriale la place entre la glycolyse et le cycle de Krebs, qui fournit la majorité des équivalents réduits à la chaîne respiratoire mitochondriale. L'activité de la PDH est finement régulée par la PDH kinase 1 (PDK1) et la PDH phosphatase 1 (PDPC1) (figure V.7). La phosphorylation de la PDH par PDK1 rend l'enzyme inactive alors que sa déphosphorylation par la PDPC1 rend l'enzyme active.

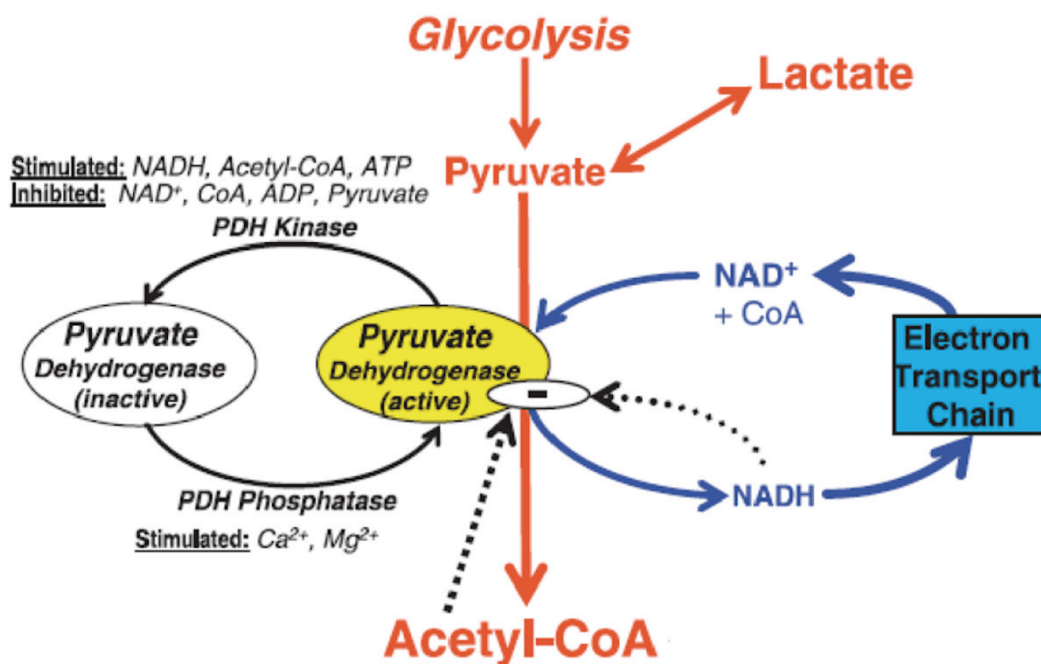


Figure V.7 : Régulation de la pyruvate déshydrogénase

La PDH est une enzyme finement régulée. Elle est inactivée par phosphorylation par PDK1 et activée par déphosphorylation par PDPC1. Cette inactivation/activation permet à la chaîne respiratoire mitochondriale de contrôler finement ses besoins en substrats ou équivalents réduits pour son bon fonctionnement. D'après Stanley et al., 2005.

PDK1 est une cible directe de HIF-1 (Kim et al., 2006). En hypoxie, la diminution de l'oxygène cause une augmentation de la production de ROS au sein du complexe III due à l'inefficacité

de la chaîne respiratoire mitochondriale (Guzy and Schumacker, 2006). La stimulation de PDK1 inactive PDH, conduisant à une diminution du flux à travers le cycle de Krebs et à l'atténuation des OXPHOS. C'est une protection contre la production de ROS par la chaîne respiratoire mitochondriale (Kim et al., 2006). Cependant, peu de choses ont été décrites sur le fonctionnement des voies métaboliques en HI. Dans notre **chapitre I** nous avons rapporté que le métabolisme évalué par calorimétrie indirecte est diminué chez les rats exposés en hypoxie intermittente. Notre **chapitre 2** va plus loin en rapportant une diminution de la respiration mitochondriale avec les substrats du complexe I (pyruvate + malate), mais pas avec le substrat du complexe II (succinate). Le calcul du rapport de contrôle respiratoire (RCR), indicateur du bon fonctionnement mitochondrial, suggère une dysfonction de la mitochondrie du cortex cérébral avec les substrats du complexe I et du complexe I+II, mais pas avec le substrat du complexe II seul, d'où une augmentation de la production de H₂O₂ avec les substrats du complexe I+II. Nos résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par Peng et ses collaborateurs, qui ont rapporté une diminution de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire, entraînant une augmentation de la production de ROS dans le corps carotidien (Peng et al., 2003). La diminution de l'activité de ce complexe est le ralentissement de la chaîne respiratoire provoquent une augmentation de la fuite d'électrons à travers ce complexe (Khan et al., 2011; Yuan et al., 2004). Outre la diminution de la respiration mitochondriale, l'HI diminue l'activité de la pyruvate déshydrogénase (PDH). À notre connaissance, aucune autre étude ne rapporte cette diminution en HI. Deux mécanismes peuvent expliquer la baisse d'activité de la PDH. Le premier est la coopération étroite entre la glycolyse et les OXPHOS. L'HI, en diminuant la respiration mitochondriale, augmente le rapport NADH/NAD⁺. L'augmentation de ce rapport est connu pour inhiber l'activité de la PDH (**figure V.7**), afin d'éviter de produire plus d'équivalents réduits que nécessaire pour les OXPHOS (Christian Moussard, 2006). Le second mécanisme probable est que l'HI augmente la stabilisation et l'activité de HIF-1 α et le fonctionnement de HIF-1 dans le cerveau (Peng et al., 2014). PDK1 étant une cible de HIF-1, alors en phosphorylant la PDH, PDK1 l'inactive (Kim et al., 2006). Par ces deux mécanismes, l'HI réduit l'activité de la PDH et favorise un métabolisme glycolytique. Au contraire de l'hypoxie soutenue, où le changement d'un métabolisme oxydatif vers un métabolisme glycolytique est normal au vu de la baisse de l'O₂, l'HI est un cas pathologique de changement de métabolisme dont la cause principale est la dysfonction de la chaîne respiratoire mitochondriale. Afin de compléter notre étude et de répondre à notre hypothèse que l'HI favorise le métabolisme glycolytique, il est important de vérifier que l'activité de la lactate déshydrogénase est augmentée.

Nos traitements avec les agonistes spécifiques des récepteurs ER α (PPT) et ER β (DPN) permettent de récupérer une respiration mitochondriale normale, une diminution de la production H₂O₂ et une activité de la PDH semblables à celle des rats contrôles. Dans un homogénat de cerveau, il a été rapporté que le traitement avec ces deux agonistes augmente la quantité du complexe IV, du complexe V et de la PDH comparativement à des rattees ovariectomisées. De plus, le rapport de contrôle respiratoire était plus élevé et la peroxydation lipidique diminuée (Irwin et al., 2012). Dans notre étude, le traitement avec l'agoniste β (DPN) induit une plus grande activité de la PDH qu'avec l'agoniste α (PPT). On peut l'expliquer par le fait que la quantité de PDH est plus élevée avec le traitement DPN qu'avec le traitement PPT (Irwin et al., 2012), mais également par le fait que seul le récepteur ER β inhibe HIF-1, mais pas ER α (Lim et al., 2011, 2009). Dans tous les cas, les deux récepteurs nucléaires sont importants et sont capables de moduler le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, ce qui explique que l'invalidation d'un seul récepteur est capable de rendre dysfonctionnelle la mitochondrie comme nous l'avons rapporté dans notre **chapitre 3**.

6) Conclusion générale et perspectives cliniques

La ménopause est une transition dans la vie de la femme qui s'accompagne par une plus forte incidence de troubles variés, dont des désordres respiratoires du sommeil (Krystal et al., 1998). Les remplacements hormonaux avaient rapporté des effets bénéfiques sur la qualité du sommeil (Hays et al., 2003) et les désordres respiratoires associés (Shahar et al., 2003) Toutefois la « Women Health Initiative » rapporte que les bénéfices ne sont pas suffisants par rapport aux effets secondaires pour recommander une thérapie hormonale substitutive chez toutes les femmes (Rossouw et al., 2002). Même si ces conclusions ont été critiquées par la communauté scientifique, rapportant que leurs études contenaient de nombreux biais (Klaiber et al., 2005; van der Mooren and Kenemans, 2004b), les thérapies hormonales substitutives de la ménopause ont été arrêtées.

L'alternative la plus crédible est l'utilisation des SERMs, dont le tamoxifène, le raloxifène et le bazédoxifène (BZA) sont les plus connues (Komm and Mirkin, 2014). Le BZA associé l'estradiol conjugué a été étudié dans 5 essais cliniques randomisés et contrôlés, dénommés SMART pour « Selective estrogens, Menopause, and Response to Therapy » (Parish and Gillespie, 2017). Ces essais ont enrôlé plus de 7500 femmes en santé ménopausées avec ou sans symptômes de la ménopause. La sélection du BZA par rapport aux autres SERMs est basée sur le fait que l'association avec l'estradiol conjugué n'induit pas de stimulation de l'endométriome ou l'apparition de cancers de l'utérus et des ovaires (Pinkerton et al., 2009; Stovall et al., 2007). De plus, la densité mammaire n'est pas affectée par ce traitement au

contraire du traitement estradiol conjugué/médroxyprogestérone (Harvey et al., 2013; Pinkerton et al., 2013).

Concernant le sommeil, le traitement estradiol conjugué/BZA améliore significativement les problèmes de sommeil tels que la somnolence diurne, les ronflements et la qualité du sommeil (Utian et al., 2009). Toutefois, l'indice d'apnées/hypopnées n'a pas été évalué dans cette étude, tout comme les conséquences associées au SAOS.

On peut tout de même suggérer au vu de nos résultats sur les effets protecteurs de l'estradiol dans un modèle animal et l'absence d'effets secondaires rapportés jusqu'à présent de l'estradiol associé au BZA chez les femmes ménopausées que ce traitement peut être une thérapie efficace contre l'apnée du sommeil et ses conséquences chez les femmes ménopausées. Seul l'avenir et des études supplémentaires nous le dira.

Partie V

Bibliographie

A

- Almendros, I., Wang, Y., Gozal, D., 2014. The polymorphic and contradictory aspects of intermittent hypoxia. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 307, L129-140. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00089.2014>
- Antic, N.A., Catcheside, P., Buchan, C., Hensley, M., Naughton, M.T., Rowland, S., Williamson, B., Windler, S., McEvoy, R.D., 2011. The Effect of CPAP in Normalizing Daytime Sleepiness, Quality of Life, and Neurocognitive Function in Patients with Moderate to Severe OSA. *Sleep* 34, 111–119.
- Arnold, S., Victor, M.B., Beyer, C., 2012. Estrogen and the regulation of mitochondrial structure and function in the brain. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 131, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.01.012>
- Asdell, S.A., Doornenbal, H., Joshi, S.R., Sperling, G.A., 1967. The effects of sex steroid hormones upon longevity in rats. *J. Reprod. Fertil.* 14, 113–120.

B

- Bao, G., Metreveli, N., Li, R., Taylor, A., Fletcher, E.C., 1997. Blood pressure response to chronic episodic hypoxia: role of the sympathetic nervous system. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 83, 95–101.
- Barceló, A., Miralles, C., Barbé, F., Vila, M., Pons, S., Agustí, A.G., 2000. Abnormal lipid peroxidation in patients with sleep apnoea. *Eur. Respir. J.* 16, 644–647.
- Bastianini, S., Alvente, S., Berteotti, C., Lo Martire, V., Silvani, A., Swoap, S.J., Valli, A., Zoccoli, G., Cohen, G., 2017. Accurate discrimination of the wake-sleep states of mice using non-invasive whole-body plethysmography. *Sci. Rep.* 7, 41698. <https://doi.org/10.1038/srep41698>
- Bayliss, D.A., Cidlowski, J.A., Millhorn, D.E., 1990. The stimulation of respiration by progesterone in ovariectomized cat is mediated by an estrogen-dependent hypothalamic mechanism requiring gene expression. *Endocrinology* 126, 519–527. <https://doi.org/10.1210/endo-126-1-519>
- Bayliss, D.A., Millhorn, D.E., 1992. Central neural mechanisms of progesterone action: application to the respiratory system. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 73, 393–404.
- Bayliss, D.A., Millhorn, D.E., Gallman, E.A., Cidlowski, J.A., 1987. Progesterone stimulates respiration through a central nervous system steroid receptor-mediated mechanism in cat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 7788–7792.
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1970. A mechanism for the production of ethylene from methional. The generation of the hydroxyl radical by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 245, 4641–4646.
- Bedard, K., Krause, K.-H., 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87, 245–313. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>
- Bednarek-Tupikowska, G., Tupikowski, K., Bidzińska, B., Bohdanowicz-Pawlak, A., Antonowicz-Juchniewicz, J., Kosowska, B., Milewicz, A., 2004. Serum lipid peroxides and total antioxidant status in postmenopausal women on hormone replacement therapy. *Gynecol. Endocrinol.* 19, 57–63. <https://doi.org/10.1080/09513590412331272328>

- Bednarek-Tupikowska, G., Tworowska, U., Jedrychowska, I., Radomska, B., Tupikowski, K., Bidzinska-Speichert, B., Milewicz, A., 2006. Effects of oestradiol and oestrogen on erythrocyte antioxidative enzyme system activity in postmenopausal women. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 64, 463–468. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2006.02494.x>
- Behan, M., Wenninger, J.M., 2008. Sex Steroidal Hormones and Respiratory Control. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 164, 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2008.06.006>
- Behl, C., 2002. Oestrogen as a neuroprotective hormone. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 433–442. <https://doi.org/10.1038/nrn846>
- Bellanti, F., Matteo, M., Rollo, T., De Rosario, F., Greco, P., Vendemiale, G., Serviddio, G., 2013. Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: impact of estrogen therapy. *Redox Biol.* 1, 340–346. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.05.003>
- Beral, V., Million Women Study Collaborators, 2003. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet Lond. Engl.* 362, 419–427.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2002. Oxidative Phosphorylation.
- Bixler, E.O., Vgontzas, A.N., Lin, H.-M., Have, T.T., Leiby, B.E., Vela-Bueno, A., Kales, A., 2000. Association of Hypertension and Sleep-Disordered Breathing. *Arch. Intern. Med.* 160, 2289–2295. <https://doi.org/10.1001/archinte.160.15.2289>
- Bixler, E.O., Vgontzas, A.N., Lin, H.M., Ten Have, T., Rein, J., Vela-Bueno, A., Kales, A., 2001. Prevalence of sleep-disordered breathing in women: effects of gender. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163, 608–613. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.3.9911064>
- Bixler, E.O., Vgontzas, A.N., Ten Have, T., Tyson, K., Kales, A., 1998. Effects of age on sleep apnea in men: I. Prevalence and severity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157, 144–148. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.157.1.9706079>
- Björnström, L., Sjöberg, M., 2005. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 19, 833–842. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0486>
- Block, A.J., Boysen, P.G., Wynne, J.W., Hunt, L.A., 1979. Sleep Apnea, Hypopnea and Oxygen Desaturation in Normal Subjects. *N. Engl. J. Med.* 300, 513–517. <https://doi.org/10.1056/NEJM197903083001001>
- Borrás, C., Gambini, J., López-Grueso, R., Pallardó, F.V., Viña, J., 2010. Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.09.007>
- Borrás, C., Sastre, J., García-Sala, D., Lloret, A., Pallardó, F.V., Viña, J., 2003. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 546–552.
- Boukari, R., Laouafa, S., Ribon-Demars, A., Bairam, A., Joseph, V., 2017. Ovarian steroids act as respiratory stimulant and antioxidant against the causes and consequences of sleep-apnea in women. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 239, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2017.01.013>
- Boukari, R., Marcouiller, F., Joseph, V., 2015. Relative Contribution of Nuclear and Membrane Progesterone Receptors in Respiratory Control. *Adv. Exp. Med. Biol.* 860, 261–267. https://doi.org/10.1007/978-3-319-18440-1_30
- Boukari, R., Rossignol, O., Baldy, C., Marcouiller, F., Bairam, A., Joseph, V., 2016. Membrane progesterone receptor- β , but not $-\alpha$, in dorsal brain stem establishes sex-specific chemoreflex responses and reduces apnea frequency in adult mice. *J. Appl. Physiol.* 121, 781–791. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00397.2016>
- Bowes, G., 1984. Arousal responses to chemical stimuli during sleep. *J. Dev. Physiol.* 6, 207–213.
- Brand, M.D., 2010. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp. Gerontol.* 45, 466–472. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.01.003>
- Brand, M.D., Affourtit, C., Esteves, T.C., Green, K., Lambert, A.J., Miwa, S., Pakay, J.L., Parker, N., 2004. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and

- activation of uncoupling proteins. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 755–767. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.05.034>
- Brand, M.D., Brindle, K.M., Buckingham, J.A., Harper, J.A., Rolfe, D.F., Stuart, J.A., 1999. The significance and mechanism of mitochondrial proton conductance. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* 23 Suppl 6, S4–11.
- Brand, Martin D., Nicholls, D.G., 2011. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J.* 435, 297–312. <https://doi.org/10.1042/BJ20110162>
- Brand, M.D., Pakay, J.L., Ocloo, A., Kokoszka, J., Wallace, D.C., Brookes, P.S., Cornwall, E.J., 2005. The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *Biochem. J.* 392, 353–362. <https://doi.org/10.1042/BJ20050890>
- Brand, M.D., Steverding, D., Kadenbach, B., Stevenson, P.M., Hafner, R.P., 1992. The mechanism of the increase in mitochondrial proton permeability induced by thyroid hormones. *Eur. J. Biochem.* 206, 775–781.
- Brand, M.D., Turner, N., Ocloo, A., Else, P.L., Hulbert, A.J., 2003. Proton conductance and fatty acyl composition of liver mitochondria correlates with body mass in birds. *Biochem. J.* 376, 741–748. <https://doi.org/10.1042/BJ20030984>
- Brannan, T.S., Maker, H.S., Raes, I.P., 1981. Regional distribution of catalase in the adult rat brain. *J. Neurochem.* 36, 307–309.
- Brennan, M., Palaniswami, M., Kamen, P., 2001. Do existing measures of Poincaré plot geometry reflect nonlinear features of heart rate variability? *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 48, 1342–1347. <https://doi.org/10.1109/10.959330>
- Brinton, R.D., Thompson, R.F., Foy, M.R., Baudry, M., Wang, J., Finch, C.E., Morgan, T.E., Pike, C.J., Mack, W.J., Stanczyk, F.Z., Nilsen, J., 2008. Progesterone receptors: form and function in brain. *Front. Neuroendocrinol.* 29, 313–339. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2008.02.001>
- Brinton, R.D., Yao, J., Yin, F., Mack, W.J., Cadenas, E., 2015. Perimenopause as a neurological transition state. *Nat. Rev. Endocrinol.* 11, 393–405. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.82>
- Brodeur, P., Mockus, M., McCullough, R., Moore, L.G., 1986. Progesterone receptors and ventilatory stimulation by progestin. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 60, 590–595. <https://doi.org/10.1152/jappl.1986.60.2.590>
- Brooks, D., Horner, R.L., Kozar, L.F., Render-Teixeira, C.L., Phillipson, E.A., 1997. Obstructive sleep apnea as a cause of systemic hypertension. Evidence from a canine model. *J. Clin. Invest.* 99, 106–109.
- Burger, H., Archer, D., Barlow, D., Birkhäuser, M., Calaf-Alsina, J., Gambacciani, M., Genazzani, A., Hadji, P., Iversen, O.E., Kuhl, H., Lobo, R.A., Maudelonde, T., E, M.C., Notelovitz, M., Palacios, S., Paszkowski, T., Peer, E., Pines, A., Samsioe, G., Stevenson, J., Skouby, S., Sturdee, D., De, T.V., Whitehead, M., Ylikorkala, O., 2004. Practical recommendations for hormone replacement therapy in the peri- and postmenopause. *Climacteric J. Int. Menopause Soc.* 7, 210–216. <https://doi.org/10.1080/1369713042000255688>
- Burt, V.L., Whelton, P., Roccella, E.J., Brown, C., Cutler, J.A., Higgins, M., Horan, M.J., Labarthe, D., 1995. Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1991. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 25, 305–313.
- Burwell, C.S., Robin, E.D., Whaley, R.D., Bickelmann, A.G., 1994. Extreme obesity associated with alveolar hypoventilation--a Pickwickian Syndrome. 1956. *Obes. Res.* 2, 390–397.
- Butera, P.C., 2010. Estradiol and the control of food intake. *Physiol. Behav.* 99, 175–180. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.06.010>

C

- Cadenas, E., Davies, K.J., 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 222–230.
- Cadet, J., Bellon, S., Berger, M., Bourdat, A.-G., Douki, T., Duarte, V., Frelon, S., Gasparutto, D., Muller, E., Ravanat, J.-L., Sauvaigo, S., 2002. Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biol. Chem.* 383, 933–943. <https://doi.org/10.1515/BC.2002.100>
- Cai, Z., Yan, L.-J., 2013. Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health. *J. Biochem. Pharmacol. Res.* 1, 15–26.
- Can, M., Açıkgöz, S., Mungan, G., Bayraktaroğlu, T., Koçak, E., Güven, B., Demirtas, S., 2006. Serum cardiovascular risk factors in obstructive sleep apnea. *Chest* 129, 233–237. <https://doi.org/10.1378/chest.129.2.233>
- Cannon, B., Nedergaard, J., 2004. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* 84, 277–359. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2003>
- Cantu, D., Schaack, J., Patel, M., 2009. Oxidative Inactivation of Mitochondrial Aconitase Results in Iron and H₂O₂-Mediated Neurotoxicity in Rat Primary Mesencephalic Cultures. *PLoS ONE* 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007095>
- Carpagnano, G.E., Kharitonov, S.A., Resta, O., Foschino-Barbaro, M.P., Gramiccioni, E., Barnes, P.J., 2003. 8-Isoprostane, a marker of oxidative stress, is increased in exhaled breath condensate of patients with obstructive sleep apnea after night and is reduced by continuous positive airway pressure therapy. *Chest* 124, 1386–1392.
- Carreras, A., Zhang, S.X.L., Almendros, I., Wang, Y., Peris, E., Qiao, Z., Gozal, D., 2015. Resveratrol attenuates intermittent hypoxia-induced macrophage migration to visceral white adipose tissue and insulin resistance in male mice. *Endocrinology* 156, 437–443. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1706>
- Casse, J.-P., 2014. Le syndrome d'apnées du sommeil de l'adulte et sa prise en charge. Université de Bordeaux.
- Castellani, R., Hirai, K., Aliev, G., Drew, K.L., Nunomura, A., Takeda, A., Cash, A.D., Obrenovich, M.E., Perry, G., Smith, M.A., 2002. Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 70, 357–360. <https://doi.org/10.1002/jnr.10389>
- Chaïnier, F., Roussel, D., Georges, B., Meister, R., Rouanet, J.-L., Duchamp, C., Barre, H., 2000. Cold acclimation or grapeseed oil feeding affects phospholipid composition and mitochondrial function in duckling skeletal muscle. *Lipids* 35, 1099–1106. <https://doi.org/10.1007/s11745-000-0625-8>
- Chang, A.J., 2017. Acute oxygen sensing by the carotid body: from mitochondria to plasma membrane. *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 1985 123, 1335–1343. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00398.2017>
- Chen, J.-Q., Yager, J.D., Russo, J., 2005. Regulation of mitochondrial respiratory chain structure and function by estrogens/estrogen receptors and potential physiological/pathophysiological implications. *Biochim. Biophys. Acta* 1746, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2005.08.001>
- Chlebowski, R.T., Hendrix, S.L., Langer, R.D., Stefanick, M.L., Gass, M., Lane, D., Rodabough, R.J., Gilligan, M.A., Cyr, M.G., Thomson, C.A., Khandekar, J., Petrovitch, H., McTiernan, A., WHI Investigators, 2003. Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. *JAMA* 289, 3243–3253. <https://doi.org/10.1001/jama.289.24.3243>
- Christian Moussard, 2006. Biochimie structurale et métabolique, De Boeck Supérieur. ed.
- Christou, K., Moulas, A.N., Pastaka, C., Gourgoulanis, K.I., 2003. Antioxidant capacity in obstructive sleep apnea patients. *Sleep Med.* 4, 225–228.

- Cistulli, P.A., Barnes, D.J., Grunstein, R.R., Sullivan, C.E., 1994. Effect of short-term hormone replacement in the treatment of obstructive sleep apnoea in postmenopausal women. *Thorax* 49, 699–702.
- Cohen, I., 2004. Endometrial pathologies associated with postmenopausal tamoxifen treatment. *Gynecol. Oncol.* 94, 256–266. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2004.03.048>
- Colt, H.G., Haas, H., Rich, G.B., 1991. Hypoxemia vs sleep fragmentation as cause of excessive daytime sleepiness in obstructive sleep apnea. *Chest* 100, 1542–1548.
- Comhaire, F.H., Depypere, H.T., 2015. Hormones, herbal preparations and nutraceuticals for a better life after the menopause: part I. *Climacteric J. Int. Menopause Soc.* 18, 358–363. <https://doi.org/10.3109/13697137.2014.985645>
- Connor, J.R., Benkovic, S.A., 1992. Iron regulation in the brain: histochemical, biochemical, and molecular considerations. *Ann. Neurol.* 32 Suppl, S51-61.
- Cruz, M.N., Douglas, G., Gustafsson, J.-A., Poston, L., Kublickiene, K., 2006. Dilatory responses to estrogenic compounds in small femoral arteries of male and female estrogen receptor-beta knockout mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290, H823-829. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00815.2005>

D

- Dauvilliers, Y., Arnulf, I., d'Ortho, M.-P., Coste, A., Ducluzeau, P., Grillet, Y., Jondeau, G., Kessler, R., Moncely, L., Philip, P., Philippe, C., Weitzenblum, E., Pépin, J.-L., 2010. Quelle évaluation préthérapeutique d'un patient avec SAHOS nouvellement diagnostiqué ? *Rev. Mal. Respir.* 27, S124–S136. [https://doi.org/10.1016/S0761-8425\(10\)70018-8](https://doi.org/10.1016/S0761-8425(10)70018-8)
- Davis, K.E., D Neinast, M., Sun, K., M Skiles, W., D Bills, J., A Zehr, J., Zeve, D., D Hahner, L., W Cox, D., M Gent, L., Xu, Y., V Wang, Z., A Khan, S., Clegg, D.J., 2013. The sexually dimorphic role of adipose and adipocyte estrogen receptors in modulating adipose tissue expansion, inflammation, and fibrosis. *Mol. Metab.* 2, 227–242. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2013.05.006>
- Del Rio, R., Andrade, D.C., Lucero, C., Arias, P., Iturriaga, R., 2016. Carotid Body Ablation Abrogates Hypertension and Autonomic Alterations Induced by Intermittent Hypoxia in Rats. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 68, 436–445. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07255>
- Del Rio, R., Moya, E.A., Iturriaga, R., 2010. Carotid body and cardiorespiratory alterations in intermittent hypoxia: the oxidative link. *Eur. Respir. J.* 36, 143–150. <https://doi.org/10.1183/09031936.00158109>
- Demonacos, C.V., Karayanni, N., Hatzoglou, E., Tsiriyiotis, C., Spandidos, D.A., Sekeris, C.E., 1996. Mitochondrial genes as sites of primary action of steroid hormones. *Steroids* 61, 226–232.
- Dewan, N.A., Nieto, F.J., Somers, V.K., 2015. Intermittent hypoxemia and OSA: implications for comorbidities. *Chest* 147, 266–274. <https://doi.org/10.1378/chest.14-0500>
- Diplock, A.T., Charleux, J.L., Crozier-Willi, G., Kok, F.J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W., Viña-Ribes, J., 1998. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br. J. Nutr.* 80 Suppl 1, S77-112.
- Dluzen, D.E., McDermott, J.L., 2000. Gender differences in neurotoxicity of the nigrostriatal dopaminergic system: implications for Parkinson's disease. *J. Gend.-Specif. Med. JGSM Off. J. Partnersh. Womens Health Columbia* 3, 36–42.
- Doshi, S.B., Agarwal, A., 2013. The role of oxidative stress in menopause. *J. -Life Health* 4, 140–146. <https://doi.org/10.4103/0976-7800.118990>
- Douglas, R.M., Ryu, J., Kanaan, A., Del Carmen Rivero, M., Dugan, L.L., Haddad, G.G., Ali, S.S., 2010. Neuronal death during combined intermittent hypoxia/hypercapnia is due to mitochondrial dysfunction. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298, C1594-1602. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00298.2009>

- Drachman, D.B., Gumnit, R.J., 1962. Periodic alteration of consciousness in the “pickwickian” syndrome. *Arch. Neurol.* 6, 471–477.
- Drager, L.F., Jun, J.C., Polotsky, V.Y., 2010. Metabolic consequences of intermittent hypoxia: relevance to obstructive sleep apnea. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 24, 843–851. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2010.08.011>
- Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
- Dumitrascu, R., Heitmann, J., Seeger, W., Weissmann, N., Schulz, R., 2013. Obstructive Sleep Apnea, Oxidative Stress and Cardiovascular Disease: Lessons from Animal Studies [WWW Document]. *Oxid. Med. Cell. Longev.* <https://doi.org/10.1155/2013/234631>

E

- Echtay, K.S., Roussel, D., St-Pierre, J., Jekabsons, M.B., Cadenas, S., Stuart, J.A., Harper, J.A., Roebuck, S.J., Morrison, A., Pickering, S., Clapham, J.C., Brand, M.D., 2002. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 415, 96–99. <https://doi.org/10.1038/415096a>
- Eckel, L.A., 2011. The ovarian hormone estradiol plays a crucial role in the control of food intake in females. *Physiol. Behav.* 104, 517–524. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.04.014>
- Edge, D., Bradford, A., O’Halloran, K.D., 2012. Chronic intermittent hypoxia increases apnoea index in sleeping rats. *Adv. Exp. Med. Biol.* 758, 359–363. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4584-1_48
- Eisele, H.-J., Markart, P., Schulz, R., 2015. Obstructive Sleep Apnea, Oxidative Stress, and Cardiovascular Disease: Evidence from Human Studies [WWW Document]. *Oxid. Med. Cell. Longev.* <https://doi.org/10.1155/2015/608438>
- El Habachi, N.M., Maklad, H.M., Sharara, G.M., Allam, E.A., Fawzy, E.M., 2014. A comparative study between the effect of 17- β estradiol and antioxidants combination on some menopausal changes in oophorectomised rats. *Middle East Fertil. Soc. J.* 19, 303–313. <https://doi.org/10.1016/j.mefs.2014.02.003>
- El Solh, A.A., Saliba, R., Bosinski, T., Grant, B.J.B., Berbary, E., Miller, N., 2006. Allopurinol improves endothelial function in sleep apnoea: a randomised controlled study. *Eur. Respir. J.* 27, 997–1002. <https://doi.org/10.1183/09031936.06.00101005>
- Escourrou, P., Meslier, N., Raffestin, B., Clavel, R., Gomes, J., Hazouard, E., Paquereau, J., Simon, I., Orvoen Frija, E., 2010. Quelle approche clinique et quelle procédure diagnostique pour le SAHOS ? *Rev. Mal. Respir.* 27, S115–S123. [https://doi.org/10.1016/S0761-8425\(10\)70017-6](https://doi.org/10.1016/S0761-8425(10)70017-6)
- Esterbauer, H., Cheeseman, K.H., 1990. [42] Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal, in: *Methods in Enzymology, Oxygen Radicals in Biological Systems Part B: Oxygen Radicals and Antioxidants*. Academic Press, pp. 407–421. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86134-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86134-H)
- Evans, P., Halliwell, B., 1999. Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 884, 19–40.

F

- Fabre, E., Monserrat, J., Herrero, A., Barja, G., Leret, M.L., 1999. Effect of MPTP on brain mitochondrial H₂O₂ and ATP production and on dopamine and DOPAC in the striatum. *J. Physiol. Biochem.* 55, 325–331.
- Feng, M., Whitesall, S., Zhang, Y., Beibel, M., D’Alecy, L., DiPetrillo, K., 2008. Validation of volume-pressure recording tail-cuff blood pressure measurements. *Am. J. Hypertens.* 21, 1288–1291. <https://doi.org/10.1038/ajh.2008.301>

- Fenton, H.J.H., 1894. LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc. Trans.* 65, 899–910. <https://doi.org/10.1039/CT8946500899>
- Fernández-Agüera, M.C., Gao, L., González-Rodríguez, P., Pintado, C.O., Arias-Mayenco, I., García-Flores, P., García-Pergañeda, A., Pascual, A., Ortega-Sáenz, P., López-Barneo, J., 2015. Oxygen Sensing by Arterial Chemoreceptors Depends on Mitochondrial Complex I Signaling. *Cell Metab.* 22, 825–837. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.004>
- Fernández-Checa, J.C., García-Ruiz, C., Colell, A., Morales, A., Marí, M., Miranda, M., Ardite, E., 1998. Oxidative stress: role of mitochondria and protection by glutathione. *BioFactors Oxf. Engl.* 8, 7–11.
- Ferreira, C.B., Schoorlemmer, G.H., Rossi, M.V., Takakura, A.C., Barna, B.F., Moreira, T.S., Cravo, S.L., 2015. Brainstem areas activated by intermittent apnea in awake unrestrained rats. *Neuroscience* 297, 262–271. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.04.007>
- Finley, J.C.W., Katz, D.M., 1992. The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. *Brain Res.* 572, 108–116. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90458-L](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90458-L)
- Fletcher, E.C., 2001. Invited review: Physiological consequences of intermittent hypoxia: systemic blood pressure. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 90, 1600–1605.
- Fletcher, E.C., Lesske, J., Behm, R., Miller, C.C., Stauss, H., Unger, T., 1992a. Carotid chemoreceptors, systemic blood pressure, and chronic episodic hypoxia mimicking sleep apnea. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 72, 1978–1984. <https://doi.org/10.1152/jappl.1992.72.5.1978>
- Fletcher, E.C., Lesske, J., Culman, J., Miller, C.C., Unger, T., 1992b. Sympathetic denervation blocks blood pressure elevation in episodic hypoxia. *Hypertension* 20, 612–619.
- Fletcher, E.C., Lesske, J., Qian, W., Miller, C.C., Unger, T., 1992c. Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats. *Hypertension* 19, 555–561. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.19.6.555>
- Fongy, A., 2013. Implication potentielle des protéines de fusion mitochondriale dans l'ontogénèse des processus bioénergétiques musculaires chez l'oiseau.

G

- Galvan, T., Camuso, J., Sullivan, K., Kim, S., White, D., Redline, S., Joffe, H., 2017. Association of estradiol with sleep apnea in depressed perimenopausal and postmenopausal women: a preliminary study. *Menopause N. Y. N* 24, 112–117. <https://doi.org/10.1097/GME.0000000000000737>
- Gastaut, H., Tassinari, C.A., Duron, B., 1965. [Polygraphic study of diurnal and nocturnal (hypnic and respiratory) episodal manifestations of Pickwick syndrome]. *Rev. Neurol. (Paris)* 112, 568–579.
- Gileles-Hillel, A., Kheirandish-Gozal, L., Gozal, D., 2016. Biological plausibility linking sleep apnoea and metabolic dysfunction. *Nat. Rev. Endocrinol.* 12, 290–298. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.22>
- Göttlicher, M., Heck, S., Herrlich, P., 1998. Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 76, 480–489.
- Gottlieb, D.J., DeStefano, A.L., Foley, D.J., Mignot, E., Redline, S., Givelber, R.J., Young, T., 2004. APOE epsilon4 is associated with obstructive sleep apnea/hypopnea: the Sleep Heart Health Study. *Neurology* 63, 664–668.
- Gottlieb, D.J., Whitney, C.W., Bonekat, W.H., Iber, C., James, G.D., Lebowitz, M., Nieto, F.J., Rosenberg, C.E., 1999. Relation of sleepiness to respiratory disturbance index: the Sleep Heart Health Study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159, 502–507. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.159.2.9804051>

- Gozal, D., 1998. Sleep-Disordered Breathing and School Performance in Children. *Pediatrics* 102, 616–620. <https://doi.org/10.1542/peds.102.3.616>
- Gozal, D., Daniel, J.M., Dohanich, G.P., 2001. Behavioral and anatomical correlates of chronic episodic hypoxia during sleep in the rat. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 2442–2450.
- Grebe, M., Eisele, H.J., Weissmann, N., Schaefer, C., Tillmanns, H., Seeger, W., Schulz, R., 2006. Antioxidant vitamin C improves endothelial function in obstructive sleep apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173, 897–901. <https://doi.org/10.1164/rccm.200508-1223OC>
- Greenberg, H.E., Sica, A.L., Scharf, S.M., Ruggiero, D.A., 1999. Expression of c-fos in the rat brainstem after chronic intermittent hypoxia. *Brain Res.* 816, 638–645.
- Guilleminault, A Tilkian, Dement, and W.C., 1976. The Sleep Apnea Syndromes. *Annu. Rev. Med.* 27, 465–484. <https://doi.org/10.1146/annurev.me.27.020176.002341>
- Gutteridge, J.M., 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* 41, 1819–1828.
- Guzy, R.D., Schumacker, P.T., 2006. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp. Physiol.* 91, 807–819. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2006.033506>

H

- Haas, D.C., Foster, G.L., Nieto, F.J., Redline, S., Resnick, H.E., Robbins, J.A., Young, T., Pickering, T.G., 2005. Age-dependent associations between sleep-disordered breathing and hypertension: importance of discriminating between systolic/diastolic hypertension and isolated systolic hypertension in the Sleep Heart Health Study. *Circulation* 111, 614–621. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000154540.62381.CF>
- Haffner, S.M., Miettinen, H., 1997. Insulin resistance implications for type II diabetes mellitus and coronary heart disease. *Am. J. Med.* 103, 152–162.
- Halliwell, B., 2006a. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem.* 97, 1634–1658. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x>
- Halliwell, B., 2006b. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol.* 141, 312–322. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077073>
- Halliwell B, 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18, 685–716.
- Halliwell, B., 1994. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev.* 52, 253–265.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219, 1–14.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press.
- Harman, D., 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298–300.
- Harris, H.A., 2007. Estrogen receptor-beta: recent lessons from in vivo studies. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 21, 1–13. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0459>
- Harsch, I.A., Schahin, S.P., Radespiel-Tröger, M., Weintz, O., Jahreiss, H., Fuchs, F.S., Wiest, G.H., Hahn, E.G., Lohmann, T., Konturek, P.C., Ficker, J.H., 2004. Continuous positive airway pressure treatment rapidly improves insulin sensitivity in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 169, 156–162. <https://doi.org/10.1164/rccm.200302-206OC>
- Harvey, J.A., Pinkerton, J.V., Baracat, E.C., Shi, H., Chines, A.A., Mirkin, S., 2013. Breast density changes in a randomized controlled trial evaluating bazedoxifene/conjugated estrogens. *Menopause N. Y. N* 20, 138–145. <https://doi.org/10.1097/gme.0b013e318271f5e7>

- Hays, J., Ockene, J.K., Brunner, R.L., Kotchen, J.M., Manson, J.E., Patterson, R.E., Aragaki, A.K., Shumaker, S.A., Brzyski, R.G., LaCroix, A.Z., Granek, I.A., Valanis, B.G., Women's Health Initiative Investigators, 2003. Effects of estrogen plus progestin on health-related quality of life. *N. Engl. J. Med.* 348, 1839–1854. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030311>
- Heinzer, R., Vat, S., Marques-Vidal, P., Marti-Soler, H., Andries, D., Tobback, N., Mooser, V., Preisig, M., Malhotra, A., Waeber, G., Vollenweider, P., Tafti, M., Haba-Rubio, J., 2015. Prevalence of sleep-disordered breathing in the general population: the HypnoLaus study. *Lancet Respir. Med.* 3, 310–318. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00043-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00043-0)
- Herbst, E.A.F., Holloway, G.P., 2015. Permeabilization of brain tissue in situ enables multiregion analysis of mitochondrial function in a single mouse brain. *J. Physiol.* 593, 787–801. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.285379>
- Hinojosa-Laborde, C., Mifflin, S.W., 2005. Sex differences in blood pressure response to intermittent hypoxia in rats. *Hypertension* 46, 1016–1021. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000175477.33816.f3>

I

- Ip, M.S.M., Lam, B., Ng, M.M.T., Lam, W.K., Tsang, K.W.T., Lam, K.S.L., 2002. Obstructive sleep apnea is independently associated with insulin resistance. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165, 670–676. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.165.5.2103001>
- Irwin, R.W., Yao, J., Hamilton, R.T., Cadenas, E., Brinton, R.D., Nilsen, J., 2008. Progesterone and estrogen regulate oxidative metabolism in brain mitochondria., Progesterone and Estrogen Regulate Oxidative Metabolism in Brain Mitochondria. *Endocrinol.* 149, 3167, 3167–3175. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1227>
- Irwin, R.W., Yao, J., To, J., Hamilton, R.T., Cadenas, E., Brinton, R.D., 2012. Selective oestrogen receptor modulators differentially potentiate brain mitochondrial function. *J. Neuroendocrinol.* 24, 236–248. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02251.x>
- Iturriaga, R., Moya, E.A., Del Rio, R., 2015. Inflammation and oxidative stress during intermittent hypoxia: the impact on chemoreception. *Exp. Physiol.* 100, 149–155. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2014.079525>

J

- Jastroch, M., Divakaruni, A.S., Mookerjee, S., Treberg, J.R., Brand, M.D., 2010. Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem.* 47, 53–67. <https://doi.org/10.1042/bse0470053>
- Jenkinson, C., Davies, R.J., Mullins, R., Stradling, J.R., 1999. Comparison of therapeutic and subtherapeutic nasal continuous positive airway pressure for obstructive sleep apnoea: a randomised prospective parallel trial. *Lancet Lond. Engl.* 353, 2100–2105. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)10532-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)10532-9)
- Jochmans-Lemoine, A., Shahare, M., Soliz, J., Joseph, V., 2016. HIF1 α and physiological responses to hypoxia are correlated in mice but not in rats. *J. Exp. Biol.* 219, 3952–3961. <https://doi.org/10.1242/jeb.142869>
- Johns, M.W., 2000. Sensitivity and specificity of the multiple sleep latency test (MSLT), the maintenance of wakefulness test and the epworth sleepiness scale: failure of the MSLT as a gold standard. *J. Sleep Res.* 9, 5–11.
- Johns, M.W., 1991. A New Method for Measuring Daytime Sleepiness: The Epworth Sleepiness Scale. *Sleep* 14, 540–545. <https://doi.org/10.1093/sleep/14.6.540>

- Joseph, V., Behan, M., Kinkead, R., 2013. Sex, hormones, and stress: how they impact development and function of the carotid bodies and related reflexes. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 185, 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2012.07.001>
- Joseph, V., Doan, V.D., Morency, C.-E., Lajeunesse, Y., Bairam, A., 2006. Expression of sex-steroid receptors and steroidogenic enzymes in the carotid body of adult and newborn male rats. *Brain Res.* 1073–1074, 71–82. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.12.075>

K

- Kaehler, J., Sill, B., Koester, R., Mittmann, C., Orzechowski, H.-D., Muenzel, T., Meinertz, T., 2002. Endothelin-1 mRNA and protein in vascular wall cells is increased by reactive oxygen species. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 103 Suppl 48, 176S–178S. <https://doi.org/10.1042/CS103S176S>
- Kanagy, N.L., Walker, B.R., Nelin, L.D., 2001. Role of endothelin in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 37, 511–515.
- Kapsimalis, F., Kryger, M., 2009. Sleep breathing disorders in the U.S. female population. *J. Womens Health* 2002 18, 1211–1219. <https://doi.org/10.1089/jwh.2008.1054>
- Kapur, V.K., Baldwin, C.M., Resnick, H.E., Gottlieb, D.J., Nieto, F.J., 2005. Sleepiness in patients with moderate to severe sleep-disordered breathing. *Sleep* 28, 472–477.
- Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., Metzger, D., Chambon, P., 1995. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270, 1491–1494.
- Kenchappa, R.S., Diwakar, L., Annepu, J., Ravindranath, V., 2004. Estrogen and neuroprotection: higher constitutive expression of glutaredoxin in female mice offers protection against MPTP-mediated neurodegeneration. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 18, 1102–1104. <https://doi.org/10.1096/fj.03-1075fje>
- Khan, S.A., Nanduri, J., Yuan, G., Kinsman, B., Kumar, G.K., Joseph, J., Kalyanaraman, B., Prabhakar, N.R., 2011. NADPH Oxidase 2 Mediates Intermittent Hypoxia-Induced Mitochondrial Complex I Inhibition: Relevance to Blood Pressure Changes in Rats. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 533–542. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3213>
- Kim, J., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., Dang, C.V., 2006. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 3, 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.02.002>
- Kimoff, R.J., 1996. Sleep fragmentation in obstructive sleep apnea. *Sleep* 19, S61–66.
- Klaiber, E.L., Vogel, W., Rako, S., 2005. A critique of the Women's Health Initiative hormone therapy study. *Fertil. Steril.* 84, 1589–1601. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.08.010>
- Kobayashi, M., Massiello, A., Karimov, J.H., Van Wagoner, D.R., Fukamachi, K., 2013. Cardiac autonomic nerve stimulation in the treatment of heart failure. *Ann. Thorac. Surg.* 96, 339–345. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2012.12.060>
- Komm, B.S., Mirkin, S., 2014. An overview of current and emerging SERMs. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 143, 207–222. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.03.003>
- Kösel, S., Hofhaus, G., Maassen, A., Vieregge, P., Graeber, M.B., 1999. Role of mitochondria in Parkinson disease. *Biol. Chem.* 380, 865–870. <https://doi.org/10.1515/BC.1999.106>
- Krege, J.H., Hodgkin, J.B., Couse, J.F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J.F., Sar, M., Korach, K.S., Gustafsson, J.A., Smithies, O., 1998. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15677–15682.
- Krumschnabel, G., Fontana-Ayoub, M., Sumbalova, Z., Heidler, J., Gauper, K., Fasching, M., Gnaiger, E., 2015. Simultaneous high-resolution measurement of mitochondrial respiration and hydrogen peroxide production. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1264, 245–261. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2257-4_22

- Krystal, A.D., Edinger, J., Wohlgemuth, W., Marsh, G.R., 1998. Sleep in peri-menopausal and post-menopausal women. *Sleep Med. Rev.* 2, 243–253.
- Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., Gustafsson, J.A., 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 5925–5930.
- Kumar, G.K., Rai, V., Sharma, S.D., Ramakrishnan, D.P., Peng, Y.-J., Souvannakitti, D., Prabhakar, N.R., 2006. Chronic intermittent hypoxia induces hypoxia-evoked catecholamine efflux in adult rat adrenal medulla via oxidative stress. *J. Physiol.* 575, 229–239. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.112524>

L

- Lacraz, G., 2009. Relation entre Stress Oxydant et Homéostasie Glucidique au cours du Diabète de Type 2 : Adaptation de la Cellule β Pancréatique.
- Lagranha, C.J., Silva, T.L.A., Silva, S.C.A., Braz, G.R.F., da Silva, A.I., Fernandes, M.P., Sellitti, D.F., 2018. Protective effects of estrogen against cardiovascular disease mediated via oxidative stress in the brain. *Life Sci.* 192, 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.11.043>
- Lam, J.C.M., Lam, B., Yao, T.J., Lai, A.Y.K., Ooi, C.G., Tam, S., Lam, K.S.L., Ip, M.S.M., 2010. A randomised controlled trial of nasal continuous positive airway pressure on insulin sensitivity in obstructive sleep apnoea. *Eur. Respir. J.* 35, 138–145. <https://doi.org/10.1183/09031936.00047709>
- Lam, S.-Y., Liu, Y., Ng, K.-M., Lau, C.-F., Liong, E.C., Tipoe, G.L., Fung, M.-L., 2012. Chronic intermittent hypoxia induces local inflammation of the rat carotid body via functional upregulation of proinflammatory cytokine pathways. *Histochem. Cell Biol.* 137, 303–317. <https://doi.org/10.1007/s00418-011-0900-5>
- Lambeth, J.D., 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 181–189. <https://doi.org/10.1038/nri1312>
- Laouafa, S., Bairam, A., Soliz, J., Roussel, D., Joseph, V., 2017a. Estradiol Receptor Agonists α and β Protect Against Brain Mitochondrial Dysfunction in a Model of Sleep Apnea. *FASEB J.* 31, 696.6–696.6. https://doi.org/10.1096/fasebj.31.1_supplement.696.6
- Laouafa, S., Ribon-Demars, A., Marcouiller, F., Roussel, D., Bairam, A., Pialoux, V., Joseph, V., 2017b. Estradiol Protects Against Cardiorespiratory Dysfunctions and Oxidative Stress in Intermittent Hypoxia. *Sleep* 40. <https://doi.org/10.1093/sleep/zsx104>
- Larsen, S., Nielsen, J., Hansen, C.N., Nielsen, L.B., Wibrand, F., Stride, N., Schroder, H.D., Boushel, R., Helge, J.W., Dela, F., Hey-Mogensen, M., 2012. Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *J. Physiol.* 590, 3349–3360. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.230185>
- Lassègue, B., Griendling, K.K., 2004. Reactive oxygen species in hypertension; An update. *Am. J. Hypertens.* 17, 852–860. <https://doi.org/10.1016/j.amjhyper.2004.02.004>
- Lavie, L., 2015. Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia – Revisited – The bad ugly and good: Implications to the heart and brain. *Sleep Med. Rev.* 20, 27–45. <https://doi.org/10.1016/j.smr.2014.07.003>
- Lavie, L., Vishnevsky, A., Lavie, P., 2004. Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. *Sleep* 27, 123–128.
- Lavie, P., 2008. Who was the first to use the term Pickwickian in connection with sleepy patients? History of sleep apnoea syndrome. *Sleep Med. Rev.* 12, 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.smr.2007.07.008>
- Lavie, P., 1984. Nothing new under the moon. Historical accounts of sleep apnea syndrome. *Arch. Intern. Med.* 144, 2025–2028.
- Le Saux, M., 2007. Études des mécanismes d'action de l'estradiol au cerveau de ratte ovariectomisées.

- Leal Hernández, M., Abellán Alemán, J., Carbonell Meseguer, L.F., Díaz Fernández, J., García Sánchez, F.A., Martínez Selva, J.M., 2000. [Influence of the presence of hot flashes during menopause on the metabolism of nitric oxide. Effects of hormonal replacement treatment]. *Med. Clin. (Barc.)* 114, 41–45.
- Lebovitz, R.M., Zhang, H., Vogel, H., Cartwright, J., Dionne, L., Lu, N., Huang, S., Matzuk, M.M., 1996. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9782–9787.
- Lee, J., Eklund, E.E., Lambert-Messerlian, G., Palomaki, G.E., Butterfield, K., Curran, P., Bourjeily, G., 2017. Serum Progesterone Levels in Pregnant Women with Obstructive Sleep Apnea: A Case Control Study. *J. Womens Health* 2002 26, 259–265. <https://doi.org/10.1089/jwh.2016.5917>
- Lefter, R., Doan, V.D., Joseph, V., 2008. Contrasting effects of estradiol and progesterone on respiratory pattern and hypoxic ventilatory response in newborn male rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 164, 312–318. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2008.07.026>
- Lesske, J., Fletcher, E.C., Bao, G., Unger, T., 1997. Hypertension caused by chronic intermittent hypoxia--influence of chemoreceptors and sympathetic nervous system. *J. Hypertens.* 15, 1593–1603.
- Lim, D.C., Brady, D.C., Po, P., Chuang, L.P., Marcondes, L., Kim, E.Y., Keenan, B.T., Guo, X., Maislin, G., Galante, R.J., Pack, A.I., 2015. Simulating obstructive sleep apnea patients' oxygenation characteristics into a mouse model of cyclical intermittent hypoxia. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 118, 544–557. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00629.2014>
- Lim, W., Cho, J., Kwon, H., Park, Y., Rhyu, M.-R., Lee, Y., 2009. Hypoxia-inducible factor 1 alpha activates and is inhibited by unoccupied estrogen receptor beta. *FEBS Lett.* 583, 1314–1318. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.028>
- Lim, W., Park, Y., Cho, J., Park, C., Park, J., Park, Y.-K., Park, H., Lee, Y., 2011. Estrogen receptor beta inhibits transcriptional activity of hypoxia inducible factor-1 through the downregulation of arylhydrocarbon receptor nuclear translocator. *Breast Cancer Res. BCR* 13, R32. <https://doi.org/10.1186/bcr2854>
- Liochev, S.L., 1996. The role of iron-sulfur clusters in in vivo hydroxyl radical production. *Free Radic. Res.* 25, 369–384.
- Liu, Y.-H., Huang, Y., Shao, X., 2009. Effects of estrogen on genioglossal muscle contractile properties and fiber-type distribution in chronic intermittent hypoxia rats. *Eur. J. Oral Sci.* 117, 685–690. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2009.00681.x>
- Lobo, R.A., Pickar, J.H., Stevenson, J.C., Mack, W.J., Hodis, H.N., 2016. Back to the future: Hormone replacement therapy as part of a prevention strategy for women at the onset of menopause. *Atherosclerosis* 254, 282–290. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.10.005>
- Loboda, A., Jozkowicz, A., Dulak, J., 2010. HIF-1 and HIF-2 transcription factors — Similar but not identical. *Mol. Cells* 29, 435–442. <https://doi.org/10.1007/s10059-010-0067-2>
- Long, L.H., Halliwell, B., 2000. Coffee drinking increases levels of urinary hydrogen peroxide detected in healthy human volunteers. *Free Radic. Res.* 32, 463–467.
- Lopez-Torres, M., Perez-Campo, R., Rojas, C., Cadenas, S., Barja, G., 1993. Maximum life span in vertebrates: relationship with liver antioxidant enzymes, glutathione system, ascorbate, urate, sensitivity to peroxidation, true malondialdehyde, in vivo H₂O₂, and basal and maximum aerobic capacity. *Mech. Ageing Dev.* 70, 177–199.

M

- Maffei, S., Mercuri, A., Prontera, C., Zucchelli, G.C., Vassalle, C., 2006. Vasoactive biomarkers and oxidative stress in healthy recently postmenopausal women treated with

- hormone replacement therapy. *Climacteric J. Int. Menopause Soc.* 9, 452–458. <https://doi.org/10.1080/13697130601014752>
- Mallampalli, M.P., Carter, C.L., 2014. Exploring sex and gender differences in sleep health: a Society for Women's Health Research Report. *J. Womens Health* 2002 23, 553–562. <https://doi.org/10.1089/jwh.2014.4816>
- Mancuso, M., Bonanni, E., LoGerfo, A., Orsucci, D., Maestri, M., Chico, L., DiCoscio, E., Fabbrini, M., Siciliano, G., Murri, L., 2012. Oxidative stress biomarkers in patients with untreated obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep Med.* 13, 632–636. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2011.10.030>
- Marcouiller, F., Boukari, R., Laouafa, S., Lavoie, R., Joseph, V., 2014. The nuclear progesterone receptor reduces post-sigh apneas during sleep and increases the ventilatory response to hypercapnia in adult female mice. *PloS One* 9, e100421. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100421>
- Marrocco, J., McEwen, B.S., 2016. Sex in the brain: hormones and sex differences. *Dialogues Clin. Neurosci.* 18, 373–383.
- Martikainen, K., Hasan, J., Urponen, H., Vuori, I., Partinen, M., 1992. Daytime sleepiness: a risk factor in community life. *Acta Neurol. Scand.* 86, 337–341.
- Matthews, J., Gustafsson, J.-A., 2003. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol. Interv.* 3, 281–292. <https://doi.org/10.1124/mi.3.5.281>
- McElroy, G.S., Chandel, N.S., 2017. Mitochondria control acute and chronic responses to hypoxia. *Exp. Cell Res.* 356, 217–222. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.034>
- McKinlay, S.M., Brambilla, D.J., Posner, J.G., 1992. The normal menopause transition. *Maturitas* 14, 103–115.
- Mellon, S.H., Griffin, L.D., 2002. Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol. Metab.* 13, 35–43.
- Melov, S., Coskun, P., Patel, M., Tuinstra, R., Cottrell, B., Jun, A.S., Zastawny, T.H., Dizdaroglu, M., Goodman, S.I., Huang, T.T., Mizziorko, H., Epstein, C.J., Wallace, D.C., 1999. Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 846–851.
- Micevych, P.E., Wong, A.M., Mittelman-Smith, M.A., 2015. Estradiol Membrane-Initiated Signaling and Female Reproduction. *Compr. Physiol.* 5, 1211–1222. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140056>
- Miquel, J., Ramírez-Boscá, A., Ramírez-Bosca, J.V., Alperi, J.D., 2006. Menopause: a review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 42, 289–306. <https://doi.org/10.1016/j.archger.2005.08.005>
- Mirkin, S., Pickar, J.H., 2015. Selective estrogen receptor modulators (SERMs): a review of clinical data. *Maturitas* 80, 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2014.10.010>
- Mitchell, P., 1977. Vectorial chemiosmotic processes. *Annu. Rev. Biochem.* 46, 996–1005. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.46.070177.005024>
- Miyamoto, M., Miyamoto, T., Iwata, K., Hirata, K., 2002. Diurnal variation in daytime sleepiness of patients with sleep apnea syndrome. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 56, 319–320. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1819.2002.00970.x>
- Møller, D.S., Lind, P., Strunge, B., Pedersen, E.B., 2003. Abnormal vasoactive hormones and 24-hour blood pressure in obstructive sleep apnea. *Am. J. Hypertens.* 16, 274–280.
- Moorthy, K., Sharma, D., Basir, S.F., Baquer, N.Z., 2005. Administration of estradiol and progesterone modulate the activities of antioxidant enzyme and aminotransferases in naturally menopausal rats. *Exp. Gerontol.* 40, 295–302. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.01.004>
- Morán, M., Moreno-Lastres, D., Marín-Buera, L., Arenas, J., Martín, M.A., Ugalde, C., 2012. Mitochondrial respiratory chain dysfunction: implications in neurodegeneration. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 595–609. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.009>

- Morgan, B.J., Adrian, R., Wang, Z.-Y., Bates, M.L., Dopp, J.M., 2016a. Chronic intermittent hypoxia alters ventilatory and metabolic responses to acute hypoxia in rats. *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 1985 120, 1186–1195. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00015.2016>
- Morgan, B.J., Bates, M.L., Rio, R.D., Wang, Z., Dopp, J.M., 2016b. Oxidative stress augments chemoreflex sensitivity in rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 234, 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2016.09.001>
- Muka, T., Vargas, K.G., Jaspers, L., Wen, K., Dhana, K., Vitezova, A., Nano, J., Brahimaj, A., Colpani, V., Bano, A., Kraja, B., Zaciragic, A., Bramer, W.M., van Dijk, G.M., Kavousi, M., Franco, O.H., 2016. Estrogen receptor β actions in the female cardiovascular system: A systematic review of animal and human studies. *Maturitas* 86, 28–43. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2016.01.009>
- Mukundan, H., Kanagy, N.L., Resta, T.C., 2004a. 17- β Estradiol Attenuates Hypoxic Induction of HIF-1 α and Erythropoietin in Hep3B Cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 44, 93.
- Murphy, M.P., 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>

N

- Nair, D., Dayyat, E.A., Zhang, S.X., Wang, Y., Gozal, D., 2011. Intermittent Hypoxia-Induced Cognitive Deficits Are Mediated by NADPH Oxidase Activity in a Murine Model of Sleep Apnea. *PLOS ONE* 6, e19847. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019847>
- Nanduri, J., Vaddi, D.R., Khan, S.A., Wang, N., Makerenko, V., Prabhakar, N.R., 2013. Xanthine Oxidase Mediates Hypoxia-Inducible Factor-2 α Degradation by Intermittent Hypoxia. *PLoS ONE* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075838>
- Nanduri, J., Wang, N., Yuan, G., Khan, S.A., Souvannakitti, D., Peng, Y.-J., Kumar, G.K., Garcia, J.A., Prabhakar, N.R., 2009. Intermittent hypoxia degrades HIF-2 α via calpains resulting in oxidative stress: Implications for recurrent apnea-induced morbidities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 1199–1204. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811018106>
- Narkiewicz, K., van de Borne, P.J., Pesek, C.A., Dyken, M.E., Montano, N., Somers, V.K., 1999. Selective potentiation of peripheral chemoreflex sensitivity in obstructive sleep apnea. *Circulation* 99, 1183–1189.
- Nattie, E., Li, A., 2012. Central Chemoreceptors: Locations and Functions. *Compr. Physiol.* 2, 221–254. <https://doi.org/10.1002/cphy.c100083>
- Navarrete-Opazo, A., Mitchell, G.S., 2014. Therapeutic potential of intermittent hypoxia: a matter of dose. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 307, R1181–1197. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00208.2014>
- Netzer, N.C., Eliasson, A.H., Strohl, K.P., 2003. Women with sleep apnea have lower levels of sex hormones. *Sleep Breath. Schlaf Atm.* 7, 25–29. <https://doi.org/10.1007/s11325-003-0025-8>
- Netzer, N.C., Stoohs, R.A., Netzer, C.M., Clark, K., Strohl, K.P., 1999. Using the Berlin Questionnaire to identify patients at risk for the sleep apnea syndrome. *Ann. Intern. Med.* 131, 485–491.
- Neubauer, J.A., 2001. Invited review: Physiological and pathophysiological responses to intermittent hypoxia. *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 1985 90, 1593–1599. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.90.4.1593>
- Nicklas, W.J., Vyas, I., Heikkila, R.E., 1985. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci.* 36, 2503–2508.
- Nieto, F.J., Young, T.B., Lind, B.K., Shahar, E., Samet, J.M., Redline, S., D'Agostino, R.B., Newman, A.B., Lebowitz, M.D., Pickering, T.G., 2000. Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. *Sleep Heart Health Study. JAMA* 283, 1829–1836.

- Nilsen, J., Brinton, R.D., 2004. Mitochondria as therapeutic targets of estrogen action in the central nervous system. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* 3, 297–313.
- Novensà, L., Novella, S., Medina, P., Segarra, G., Castillo, N., Heras, M., Hermenegildo, C., Dantas, A.P., 2011. Aging negatively affects estrogens-mediated effects on nitric oxide bioavailability by shifting ER α /ER β balance in female mice. *PloS One* 6, e25335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025335>

O

- Ohlsson, C., Hellberg, N., Parini, P., Vidal, O., Bohlooly-Y, M., Bohlooly, M., Rudling, M., Lindberg, M.K., Warner, M., Angelin, B., Gustafsson, J.A., 2000. Obesity and disturbed lipoprotein profile in estrogen receptor-alpha-deficient male mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278, 640–645. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3827>
- Olea, E., Agapito, M.T., Gallego-Martin, T., Rocher, A., Gomez-Niño, A., Obeso, A., Gonzalez, C., Yubero, S., 2014. Intermittent hypoxia and diet-induced obesity: effects on oxidative status, sympathetic tone, plasma glucose and insulin levels, and arterial pressure. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 117, 706–719. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00454.2014>

P

- Pack, A.I., 2006. Advances in Sleep-disordered Breathing. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173, 7–15. <https://doi.org/10.1164/rccm.200509-1478OE>
- Paglia, D.E., Valentine, W.N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70, 158–169.
- Parish, S.J., Gillespie, J.A., 2017. The evolving role of oral hormonal therapies and review of conjugated estrogens/bazedoxifene for the management of menopausal symptoms. *Postgrad. Med.* 129, 340–351. <https://doi.org/10.1080/00325481.2017.1281083>
- Paul, T., 2000. Effect of a prolonged superoxide flux on transferrin and ferritin. *Arch. Biochem. Biophys.* 382, 253–261. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2027>
- Peers, C., Wyatt, C.N., Evans, A.M., 2010. Mechanisms for acute oxygen sensing in the carotid body. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 174, 292–298. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2010.08.010>
- Peng, Y.-J., Nanduri, J., Khan, S.A., Yuan, G., Wang, N., Kinsman, B., Vaddi, D.R., Kumar, G.K., Garcia, J.A., Semenza, G.L., Prabhakar, N.R., 2011. Hypoxia-inducible factor 2 α (HIF-2 α) heterozygous-null mice exhibit exaggerated carotid body sensitivity to hypoxia, breathing instability, and hypertension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 3065–3070. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100064108>
- Peng, Y.-J., Nanduri, J., Raghuraman, G., Wang, N., Kumar, G.K., Prabhakar, N.R., 2013. Role of oxidative stress-induced endothelin-converting enzyme activity in the alteration of carotid body function by chronic intermittent hypoxia. *Exp. Physiol.* 98, 1620–1630. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.073700>
- Peng, Y.-J., Nanduri, J., Yuan, G., Wang, N., Deneris, E., Pendyala, S., Natarajan, V., Kumar, G.K., Prabhakar, N.R., 2009. NADPH oxidase is required for the Sensory Plasticity of the Carotid body by Chronic Intermittent Hypoxia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 4903–4910. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4768-08.2009>
- Peng, Y.-J., Overholt, J.L., Kline, D., Kumar, G.K., Prabhakar, N.R., 2003. Induction of sensory long-term facilitation in the carotid body by intermittent hypoxia: implications for recurrent apneas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10073–10078. <https://doi.org/10.1073/pnas.1734109100>
- Peng, Y.-J., Prabhakar, N.R., 2004. Effect of two paradigms of chronic intermittent hypoxia on carotid body sensory activity. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 96, 1236–1242; discussion 1196. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00820.2003>

- Peng, Y.-J., Prabhakar, N.R., 2003. Reactive oxygen species in the plasticity of respiratory behavior elicited by chronic intermittent hypoxia. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 94, 2342–2349. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00613.2002>
- Peng, Y.-J., Yuan, G., Khan, S., Nanduri, J., Makarenko, V.V., Reddy, V.D., Vasavda, C., Kumar, G.K., Semenza, G.L., Prabhakar, N.R., 2014. Regulation of hypoxia-inducible factor- α isoforms and redox state by carotid body neural activity in rats. *J. Physiol.* 592, 3841–3858. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.273789>
- Peng, Y.-J., Yuan, G., Ramakrishnan, D., Sharma, S.D., Bosch-Marce, M., Kumar, G.K., Semenza, G.L., Prabhakar, N.R., 2006. Heterozygous HIF-1 α deficiency impairs carotid body-mediated systemic responses and reactive oxygen species generation in mice exposed to intermittent hypoxia: HIF-1 and intermittent hypoxia. *J. Physiol.* 577, 705–716. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.114033>
- Pépin, J.-L., Viot-Blanc, V., Escourrou, P., Racineux, J.-L., Sapene, M., Lévy, P., Dervaux, B., Lenne, X., Mallart, A., 2009. Prevalence of residual excessive sleepiness in CPAP-treated sleep apnoea patients: the French multicentre study. *Eur. Respir. J.* 33, 1062–1067. <https://doi.org/10.1183/09031936.00016808>
- Peppard, P.E., Young, T., Palta, M., Dempsey, J., Skatrud, J., 2000a. Longitudinal study of moderate weight change and sleep-disordered breathing. *JAMA* 284, 3015–3021.
- Peppard, P.E., Young, T., Palta, M., Skatrud, J., 2000b. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N. Engl. J. Med.* 342, 1378–1384. <https://doi.org/10.1056/NEJM200005113421901>
- Pepperell, J.C.T., Ramdassingh-Dow, S., Crosthwaite, N., Mullins, R., Jenkinson, C., Stradling, J.R., Davies, R.J.O., 2002. Ambulatory blood pressure after therapeutic and subtherapeutic nasal continuous positive airway pressure for obstructive sleep apnoea: a randomised parallel trial. *Lancet Lond. Engl.* 359, 204–210. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)07445-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)07445-7)
- Pfeiffer, T., Schuster, S., Bonhoeffer, S., 2001. Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science* 292, 504–507. <https://doi.org/10.1126/science.1058079>
- Pialoux, V., Foster, G.E., Ahmed, S.B., Beaudin, A.E., Hanly, P.J., Poulin, M.J., 2011. Losartan abolishes oxidative stress induced by intermittent hypoxia in humans. *J. Physiol.* 589, 5529–5537. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.218156>
- Pialoux, V., Hanly, P.J., Foster, G.E., Brugniaux, J.V., Beaudin, A.E., Hartmann, S.E., Pun, M., Duggan, C.T., Poulin, M.J., 2009. Effects of exposure to intermittent hypoxia on oxidative stress and acute hypoxic ventilatory response in humans. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180, 1002–1009. <https://doi.org/10.1164/rccm.200905-0671OC>
- Pialoux, V., Mounier, R., Ponsot, E., Rock, E., Mazur, A., Dufour, S., Richard, R., Richalet, J.-P., Coudert, J., Fellmann, N., 2006. Effects of exercise and training in hypoxia on antioxidant/pro-oxidant balance. *Eur. J. Clin. Nutr.* 60, 1345–1354. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602462>
- Pickett, C.K., Regensteiner, J.G., Woodard, W.D., Hagerman, D.D., Weil, J.V., Moore, L.G., 1989. Progestin and estrogen reduce sleep-disordered breathing in postmenopausal women. *J. Appl. Physiol.* 66, 1656–1661. <https://doi.org/10.1152/jappl.1989.66.4.1656>
- Pinkerton, J.V., Archer, D.F., Utian, W.H., Menegoci, J.C., Levine, A.B., Chines, A.A., Constantine, G.D., 2009. Bazedoxifene effects on the reproductive tract in postmenopausal women at risk for osteoporosis. *Menopause* 16, 1102–1108. <https://doi.org/10.1097/gme.0b013e3181a816be>
- Pinkerton, J.V., Harvey, J.A., Pan, K., Thompson, J.R., Ryan, K.A., Chines, A.A., Mirkin, S., 2013. Breast effects of bazedoxifene-conjugated estrogens: a randomized controlled trial. *Obstet. Gynecol.* 121, 959–968. <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e31828c5974>

- Prabhakar, N.R., 2001. Oxygen sensing during intermittent hypoxia: cellular and molecular mechanisms. *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 1985 90, 1986–1994. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.90.5.1986>
- Prabhakar, N.R., 2000. Oxygen sensing by the carotid body chemoreceptors. *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 1985 88, 2287–2295.
- Prabhakar, N.R., Dick, T.E., Nanduri, J., Kumar, G.K., 2007a. Systemic, cellular and molecular analysis of chemoreflex-mediated sympathoexcitation by chronic intermittent hypoxia. *Exp. Physiol.* 92, 39–44. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2006.036434>
- Prabhakar, N.R., Kumar, G.K., 2010. Mechanisms of sympathetic activation and blood pressure elevation by intermittent hypoxia. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 174, 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2010.08.021>
- Prabhakar, N.R., Kumar, G.K., Nanduri, J., Semenza, G.L., 2007b. ROS signaling in systemic and cellular responses to chronic intermittent hypoxia. *Antioxid. Redox Signal.* 9, 1397–1403. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1732>
- Prabhakar, N.R., Kumar, G.K., Peng, Y.-J., 2012. Sympatho-adrenal activation by chronic intermittent hypoxia. *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 1985 113, 1304–1310. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00444.2012>
- Prabhakar, N.R., Peers, C., 2014. Gasotransmitter Regulation of Ion Channels: A Key Step in O₂ Sensing By the Carotid Body. *Physiology* 29, 49–57. <https://doi.org/10.1152/physiol.00034.2013>
- Prabhakar, N.R., Peng, Y.-J., Jacono, F.J., Kumar, G.K., Dick, T.E., 2005. Cardiovascular alterations by chronic intermittent hypoxia: importance of carotid body chemoreflexes. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 32, 447–449. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2005.04209.x>
- Prabhakar, N.R., Peng, Y.-J., Kumar, G.K., Nanduri, J., 2015. Peripheral chemoreception and arterial pressure responses to intermittent hypoxia. *Compr. Physiol.* 5, 561–577. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140039>
- Prossnitz, E.R., Barton, M., 2011. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 7, 715–726. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.122>
- Punjabi, N.M., Shahar, E., Redline, S., Gottlieb, D.J., Givelber, R., Resnick, H.E., Sleep Heart Health Study Investigators, 2004. Sleep-disordered breathing, glucose intolerance, and insulin resistance: the Sleep Heart Health Study. *Am. J. Epidemiol.* 160, 521–530. <https://doi.org/10.1093/aje/kwh261>

R

- Radermecker, R.R., Philips, J.C., Jandrain, B.J., Paquot, N., Lefèbvre, P.J., Scheen, A.J., 2008. [Brain, a gluco-dependent organ: toxic effects of hypoglycaemia and hyperglycaemia]. *Rev. Med. Liege* 63, 280–286.
- Rakel, R.E., 2009. Clinical and Societal Consequences of Obstructive Sleep Apnea and Excessive Daytime Sleepiness. *Postgrad. Med.* 121, 86–95. <https://doi.org/10.3810/pgm.2009.01.1957>
- Ramirez, J.-M., 2014. The integrative role of the sigh in psychology, physiology, pathology, and neurobiology. *Prog. Brain Res.* 209, 91–129. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63274-6.00006-0>
- Rapp, S.R., Espeland, M.A., Shumaker, S.A., Henderson, V.W., Brunner, R.L., Manson, J.E., Gass, M.L.S., Stefanick, M.L., Lane, D.S., Hays, J., Johnson, K.C., Coker, L.H., Dailey, M., Bowen, D., WHIMS Investigators, 2003. Effect of estrogen plus progestin on global cognitive function in postmenopausal women: the Women’s Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. *JAMA* 289, 2663–2672. <https://doi.org/10.1001/jama.289.20.2663>

- Razmara, A., Duckles, S.P., Krause, D.N., Procaccio, V., 2007. Estrogen suppresses brain mitochondrial oxidative stress in female and male rats. *Brain Res.* 1176, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.08.036>
- Razmara, Ali, Sunday, L., Stirone, C., Wang, X.B., Krause, D.N., Duckles, S.P., Procaccio, V., 2008. Mitochondrial effects of estrogen are mediated by estrogen receptor alpha in brain endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 325, 782–790. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.134072>
- Razmara, A., Sunday, L., Stirone, C., Wang, X.B., Krause, D.N., Duckles, S.P., Procaccio, V., 2008. Mitochondrial Effects of Estrogen Are Mediated by Estrogen Receptor in Brain Endothelial Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 325, 782–790. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.134072>
- Reaven, G.M., 1988. Role of Insulin Resistance in Human Disease. *Diabetes* 37, 1595–1607. <https://doi.org/10.2337/diab.37.12.1595>
- Reddy, N.M., Qureshi, W., Potteti, H., Kalvakolanu, D.V., Reddy, S.P., 2014. Regulation of Mitochondrial Functions by Transcription Factor NRF2, in: *Mitochondrial Function in Lung Health and Disease, Respiratory Medicine*. Humana Press, New York, NY, pp. 27–50. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0829-5_2
- Redline, S., Kump, K., Tishler, P.V., Browner, I., Ferrette, V., 1994. Gender differences in sleep disordered breathing in a community-based sample. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 149, 722–726. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.149.3.8118642>
- Reichmuth, K.J., Austin, D., Skatrud, J.B., Young, T., 2005. Association of sleep apnea and type II diabetes: a population-based study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172, 1590–1595. <https://doi.org/10.1164/rccm.200504-637OC>
- Rey, S., Rio, R.D., Alcayaga, J., Iturriaga, R., 2004. Chronic intermittent hypoxia enhances cat chemosensory and ventilatory responses to hypoxia. *J. Physiol.* 560, 577–586. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.072033>
- Rossouw, J.E., Anderson, G.L., Prentice, R.L., LaCroix, A.Z., Kooperberg, C., Stefanick, M.L., Jackson, R.D., Beresford, S.A.A., Howard, B.V., Johnson, K.C., Kotchen, J.M., Ockene, J., Writing Group for the Women’s Health Initiative Investigators, 2002. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women’s Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288, 321–333.
- Row, B.W., Liu, R., Xu, W., Kheirandish, L., Gozal, D., 2003. Intermittent hypoxia is associated with oxidative stress and spatial learning deficits in the rat. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167, 1548–1553. <https://doi.org/10.1164/rccm.200209-1050OC>
- Ryan, K.J., 1982. Biochemistry of aromatase: significance to female reproductive physiology. *Cancer Res.* 42, 3342s–3344s.

S

- Saaresranta, T., Anttalainen, U., Polo, O., 2015. Sleep disordered breathing: is it different for females? *ERJ Open Res.* 1. <https://doi.org/10.1183/23120541.00063-2015>
- Sales, L.V., de Bruin, V.M.S., D’Almeida, V., Pompéia, S., Bueno, O.F.A., Tufik, S., Bittencourt, L., 2013. Cognition and biomarkers of oxidative stress in obstructive sleep apnea. *Clinics* 68, 449–455. [https://doi.org/10.6061/clinics/2013\(04\)03](https://doi.org/10.6061/clinics/2013(04)03)
- Sandhir, R., Sethi, N., Aggarwal, A., Khera, A., 2014. Coenzyme Q10 treatment ameliorates cognitive deficits by modulating mitochondrial functions in surgically induced menopause. *Neurochem. Int.* 74, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.04.011>
- Santoro, N., Randolph, J.F., 2011. Reproductive Hormones and the Menopause Transition. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* 38, 455–466. <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2011.05.004>
- Schieber, M., Chandel, N.S., 2014. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr. Biol.* 24, R453–R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>

- Schoorlemmer, G.H.M., Rossi, M.V., Tufik, S., Cravo, S.L., 2011. A new method to produce obstructive sleep apnoea in conscious unrestrained rats. *Exp. Physiol.* 96, 1010–1018. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2011.059014>
- Seely, E.W., Walsh, B.W., Gerhard, M.D., Williams, G.H., 1999. Estradiol with or without progesterone and ambulatory blood pressure in postmenopausal women. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 33, 1190–1194.
- Seidlova-Wuttke, D., Nguyen, B.T., Wuttke, W., 2012. Long-term effects of ovariectomy on osteoporosis and obesity in estrogen-receptor- β -deleted mice. *Comp. Med.* 62, 8–13.
- Semenza, G., 2002. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Pharmacol.* 64, 993–998.
- Semenza, G.L., Prabhakar, N.R., 2015. Neural regulation of hypoxia-inducible factors and redox state drives the pathogenesis of hypertension in a rodent model of sleep apnea. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 119, 1152–1156. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00162.2015>
- Sena, L.A., Chandel, N.S., 2012. Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Mol. Cell* 48, 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.025>
- Serratrice, J., Verschueren, A., Serratrice, G., 2012. Système nerveux autonome. *Datatraitesne* 17-60767.
- Sevanian, A., Hochstein, P., 1985. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annu. Rev. Nutr.* 5, 365–390. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.05.070185.002053>
- Shahar, E., Redline, S., Young, T., Boland, L.L., Baldwin, C.M., Nieto, F.J., O'Connor, G.T., Rapoport, D.M., Robbins, J.A., 2003. Hormone Replacement Therapy and Sleep-disordered Breathing. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167, 1186–1192. <https://doi.org/10.1164/rccm.200210-1238OC>
- Shan, X., Chi, L., Ke, Y., Luo, C., Qian, S., Gozal, D., Liu, R., 2007. Manganese superoxide dismutase protects mouse cortical neurons from chronic intermittent hypoxia-mediated oxidative damage. *Neurobiol. Dis.* 28, 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.07.013>
- Shapiro, C.M., Catterall, J.R., Oswald, I., Flenley, D.C., 1981. Where are the British sleep apnoea patients? *Lancet Lond. Engl.* 2, 523.
- Shih, C.-D., 2009. Activation of estrogen receptor β -dependent nitric oxide signaling mediates the hypotensive effects of estrogen in the rostral ventrolateral medulla of anesthetized rats. *J. Biomed. Sci.* 16, 60. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-16-60>
- Shughrue, P.J., Lane, M.V., Merchenthaler, I., 1997. Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 388, 507–525.
- Shughrue, P.J., Merchenthaler, I., 2001. Distribution of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 436, 64–81.
- Signorelli, S.S., Neri, S., Sciacchitano, S., Pino, L.D., Costa, M.P., Marchese, G., Celotta, G., Cassibba, N., Pennisi, G., Caschetto, S., 2006. Behaviour of some indicators of oxidative stress in postmenopausal and fertile women. *Maturitas* 53, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2005.03.001>
- Skulachev, V.P., 1998. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett.* 423, 275–280.
- Slater, G., Steier, J., 2012. Excessive daytime sleepiness in sleep disorders. *J. Thorac. Dis.* 4, 608–616. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2012.10.07>
- Somers, V.K., Abboud, F.M., 1993. Chemoreflexes--responses, interactions and implications for sleep apnea. *Sleep* 16, S30-33; discussion S33-34.
- Somers, V.K., Dyken, M.E., Clary, M.P., Abboud, F.M., 1995. Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep apnea. *J. Clin. Invest.* 96, 1897–1904.

- Souza, G.M.P.R., Bonagamba, L.G.H., Amorim, M.R., Moraes, D.J.A., Machado, B.H., 2015. Cardiovascular and respiratory responses to chronic intermittent hypoxia in adult female rats. *Exp. Physiol.* 100, 249–258. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2014.082990>
- Stovall, D.W., Utian, W.H., Gass, M.L.S., Qu, Y., Muram, D., Wong, M., Plouffe, L., 2007. The effects of combined raloxifene and oral estrogen on vasomotor symptoms and endometrial safety. *Menopause N. Y. N* 14, 510–517. <https://doi.org/10.1097/GME.0b013e318031a83d>
- St-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roebuck, S.J., Brand, M.D., 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* 277, 44784–44790. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207217200>
- Sullivan, C.E., Issa, F.G., Berthon-Jones, M., Eves, L., 1981. Reversal of obstructive sleep apnoea by continuous positive airway pressure applied through the nares. *Lancet Lond. Engl.* 1, 862–865.
- Sunderram, J., Androulakis, I.P., 2012. Molecular mechanisms of chronic intermittent hypoxia and hypertension. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 40, 265–278.
- Sutter, C.H., Laughner, E., Semenza, G.L., 2000. Hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 4748–4753. <https://doi.org/10.1073/pnas.080072497>

T

- Tamisier, R., Pépin, J.L., Rémy, J., Baguet, J.P., Taylor, J.A., Weiss, J.W., Lévy, P., 2011. 14 nights of intermittent hypoxia elevate daytime blood pressure and sympathetic activity in healthy humans. *Eur. Respir. J.* 37, 119–128. <https://doi.org/10.1183/09031936.00204209>
- Traupe, T., Stettler, C.D., Li, H., Haas, E., Bhattacharya, I., Minotti, R., Barton, M., 2007. Distinct roles of estrogen receptors alpha and beta mediating acute vasodilation of epicardial coronary arteries. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 49, 1364–1370. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.106.081554>
- Troncoso Brindeiro, C.M., da Silva, A.Q., Allahdadi, K.J., Youngblood, V., Kanagy, N.L., 2007. Reactive oxygen species contribute to sleep apnea-induced hypertension in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293, H2971–2976. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00219.2007>
- Turens, J.F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552, 335–344. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>

U

- Ulfberg, J., Carter, N., Talbäck, M., Edling, C., 1996. Excessive daytime sleepiness at work and subjective work performance in the general population and among heavy snorers and patients with obstructive sleep apnea. *Chest* 110, 659–663.
- Utian, W., Yu, H., Bobula, J., Mirkin, S., Olivier, S., Pickar, J.H., 2009. Bazedoxifene/conjugated estrogens and quality of life in postmenopausal women. *Maturitas* 63, 329–335. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2009.06.006>

V

- van der Mooren, M.J., Kenemans, P., 2004a. The Million Women Study: a licence to kill other investigations? *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 113, 3–5. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2003.12.001>
- van der Mooren, M.J., Kenemans, P., 2004b. The Million Women Study: a licence to kill other investigations? *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 113, 3–5. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2003.12.001>

- Vardhan, V., Shanmuganandan, K., 2012. Hypertension and catecholamine levels in sleep apnoea. *Med. J. Armed Forces India* 68, 33–38. [https://doi.org/10.1016/S0377-1237\(11\)60128-7](https://doi.org/10.1016/S0377-1237(11)60128-7)
- Veasey, S.C., Davis, C.W., Fenik, P., Zhan, G., Hsu, Y.-J., Pratico, D., Gow, A., 2004a. Long-term intermittent hypoxia in mice: protracted hypersomnolence with oxidative injury to sleep-wake brain regions. *Sleep* 27, 194–201.
- Veasey, S.C., Yeou-Jey, H., Thayer, P., Fenik, P., 2004b. Murine Multiple Sleep Latency Test: phenotyping sleep propensity in mice. *Sleep* 27, 388–393.
- Vongpatanasin, W., Tuncel, M., Mansour, Y., Arbique, D., Victor, R.G., 2001. Transdermal Estrogen Replacement Therapy Decreases Sympathetic Activity in Postmenopausal Women. *Circulation* 103, 2903–2908. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.103.24.2903>

W

- Wang, Y., Zhang, S.X.L., Gozal, D., 2010. Reactive oxygen species and the brain in sleep apnea. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 174, 307–316. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2010.09.001>
- West, S.D., Nicoll, D.J., Wallace, T.M., Matthews, D.R., Stradling, J.R., 2007. Effect of CPAP on insulin resistance and HbA1c in men with obstructive sleep apnoea and type 2 diabetes. *Thorax* 62, 969–974. <https://doi.org/10.1136/thx.2006.074351>
- Wilson, A.C., Cann, R.L., Carr, S.M., George, M., Gyllenstein, U.B., Helm-Bychowski, K.M., Higuchi, R.G., Palumbi, S.R., Prager, E.M., Sage, R.D., Stoneking, M., 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc.* 26, 375–400. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1985.tb02048.x>
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A.T., Zingraff, J., Jungers, P., Descamps-Latscha, B., 1996. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 49, 1304–1313.

Y

- Yamauchi, M., Nakano, H., Maekawa, J., Okamoto, Y., Ohnishi, Y., Suzuki, T., Kimura, H., 2005. Oxidative stress in obstructive sleep apnea. *Chest* 127, 1674–1679. <https://doi.org/10.1378/chest.127.5.1674>
- Yamazaki, H., Haji, A., Ohi, Y., Takeda, R., 2005. Effects of progesterone on apneic events during behaviorally defined sleep in male rats. *Life Sci.* 78, 383–388. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.04.062>
- Yang, S.-H., Liu, R., Perez, E.J., Wen, Y., Stevens, S.M., Valencia, T., Brun-Zinkernagel, A.-M., Prokai, L., Will, Y., Dykens, J., Koulen, P., Simpkins, J.W., 2004. Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4130–4135. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306948101>
- Young, T., Blustein, J., Finn, L., Palta, M., 1997a. Sleep-disordered breathing and motor vehicle accidents in a population-based sample of employed adults. *Sleep* 20, 608–613.
- Young, T., Evans, L., Finn, L., Palta, M., 1997b. Estimation of the clinically diagnosed proportion of sleep apnea syndrome in middle-aged men and women. *Sleep* 20, 705–706.
- Young, T., Finn, L., Austin, D., Peterson, A., 2003. Menopausal status and sleep-disordered breathing in the Wisconsin Sleep Cohort Study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167, 1181–1185. <https://doi.org/10.1164/rccm.200209-1055OC>
- Young, T., Palta, M., Dempsey, J., Skatrud, J., Weber, S., Badr, S., 1993. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N. Engl. J. Med.* 328, 1230–1235. <https://doi.org/10.1056/NEJM199304293281704>
- Young, T., Peppard, P.E., Gottlieb, D.J., 2002a. Epidemiology of Obstructive Sleep Apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165, 1217–1239. <https://doi.org/10.1164/rccm.2109080>

- Young, T., Shahar, E., Nieto, F.J., Redline, S., Newman, A.B., Gottlieb, D.J., Walsleben, J.A., Finn, L., Enright, P., Samet, J.M., Sleep Heart Health Study Research Group, 2002b. Predictors of sleep-disordered breathing in community-dwelling adults: the Sleep Heart Health Study. *Arch. Intern. Med.* 162, 893–900.
- Young, T., Skatrud, J., Peppard, P.E., 2004. Risk Factors for Obstructive Sleep Apnea in Adults. *JAMA* 291, 2013–2016. <https://doi.org/10.1001/jama.291.16.2013>
- Yuan, G., Adhikary, G., McCormick, A.A., Holcroft, J.J., Kumar, G.K., Prabhakar, N.R., 2004. Role of oxidative stress in intermittent hypoxia-induced immediate early gene activation in rat PC12 cells. *J. Physiol.* 557, 773–783. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.058503>
- Yuan, G., Khan, S.A., Luo, W., Nanduri, J., Semenza, G.L., Prabhakar, N.R., 2011. Hypoxia-Inducible Factor 1 Mediates Increased Expression of NADPH Oxidase-2 in Response to Intermittent Hypoxia. *J. Cell. Physiol.* 226, 2925–2933. <https://doi.org/10.1002/jcp.22640>
- Yuan, G., Nanduri, J., Bhasker, C.R., Semenza, G.L., Prabhakar, N.R., 2005. Ca²⁺/calmodulin kinase-dependent activation of hypoxia inducible factor 1 transcriptional activity in cells subjected to intermittent hypoxia. *J. Biol. Chem.* 280, 4321–4328. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407706200>

Z

- Zapantis, G., Santoro, N., 2003. The menopausal transition: characteristics and management. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 17, 33–52.
- Zhan, G., Serrano, F., Fenik, P., Hsu, R., Kong, L., Pratico, D., Klann, E., Veasey, S.C., 2005. NADPH Oxidase Mediates Hypersomnolence and Brain Oxidative Injury in a Murine Model of Sleep Apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172, 921–929. <https://doi.org/10.1164/rccm.200504-581OC>
- Zhang, Q.-G., Raz, L., Wang, R., Han, D., Sevilla, L.D., Yang, F., Vadlamudi, R.K., Brann, D.W., 2009. Estrogen Attenuates Ischemic Oxidative Damage via an Estrogen Receptor α -Mediated Inhibition of NADPH Oxidase Activation. *J. Neurosci.* 29, 13823–13836. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3574-09.2009>
- Zhang, S., Hulver, M.W., McMillan, R.P., Cline, M.A., Gilbert, E.R., 2014. The pivotal role of pyruvate dehydrogenase kinases in metabolic flexibility. *Nutr. Metab.* 11, 10. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-11-10>
- Zhang, W., Mifflin, S.W., 1993. Excitatory amino acid receptors within NTS mediate arterial chemoreceptor reflexes in rats. *Am. J. Physiol.* 265, H770-773.
- Zheng, J., 2012. Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review). *Oncol. Lett.* 4, 1151–1157. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.928>
- Zhu, Y., Bian, Z., Lu, P., Karas, R.H., Bao, L., Cox, D., Hodgin, J., Shaul, P.W., Thoren, P., Smithies, O., Gustafsson, J.-A., Mendelsohn, M.E., 2002. Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta. *Science* 295, 505–508. <https://doi.org/10.1126/science.1065250>

Partie VI

Annexe

Depuis que j'ai intégré le Laboratoire du professeur Vincent Joseph pour mon stage de Master 2 en 2014, j'ai pris part à différents projets qui m'ont permis d'être auteur principal ou coauteur de plusieurs publications révisées par un comité de pair.

Collaboration avec le laboratoire du Dr Jorge Soliz

J'ai également beaucoup collaboré avec le laboratoire du Dr Jorge Soliz. Son sujet de recherche traite sur le rôle de l'EPO dans le contrôle respiratoire. Je le remercie grandement de m'avoir intégré dans son laboratoire aussi bien que la fait Vincent Joseph dans le sien. Avec lui j'ai mené plusieurs projets traitant du lien entre EPO et réponse ventilatoire à l'hypercapnie.

Nous avons rapporté que la surexpression D'EPO chez des souris transgéniques diminue la réponse ventilatoire à l'hypercapnie due surtout à une diminution du métabolisme. Ces observations nous permettent de mieux comprendre les désordres respiratoires en haute altitude. Cette étude a été publiée dans « l'american journal of physiology-regulatory, integrative and comparative physiology » et j'en suis le premier auteur.

Dans une seconde étude, en collaboration avec un laboratoire parisien, celui du Dr Nicolas Voituron, nous avons rapporté sur des préparations de tronc cérébral en Bloc (permettant de mesurer une respiration fictive) que la surexpression et la déficience d'EPO cérébrale n'impacte pas la respiration fictive en hypercapnie. Toutefois, lorsque pharmacologiquement nous bloquons les voies de signalisation de l'EPO, nous avons une diminution de la réponse ventilatoire fictive en hypercapnie. Cette étude a été publiée dans le journal « Respiratory Physiology and Neurobiology » et j'en suis le premier auteur.

Enfin, le Dr Jorge Soliz, m'a fait confiance en me demandant de superviser une de ses stagiaires sur un projet qui traite de l'effet protecteur de l'EPO cérébrale, chez des souris exposées en hypoxie intermittente. Nous avons montré que les souris qui surexpriment l'EPO cérébrale sont protégées contre la dysfonction cardio-respiratoire et le stress oxydatif cérébral induits par l'hypoxie intermittente. Ce papier a été récemment accepté dans le journal « SLEEP » et j'en suis coauteur principal.

Liste Publications :

1. MARCOUILLER F., BOUKARI R*, **LAOUAFA S***, LAVOIE R et JOSEPH V. The nuclear progesterone receptor reduces post-sigh apneas during sleep and increases the ventilatory response to hypercapnia in adult female mice (2014). **PlosOne**. 9(6):e100421
* Equivalent contribution of authors.
2. BALLOT O., **LAOUAFA S.**, ELLIOT-PORTAL E., TAM R., VOITURON N., JOSEPH V et SOLIZ J. The central chemosensitivity is not altered by cerebral erythropoietin. **Neurosci. Lett.** (2015). doi:10.1016/j.neulet.2015.10.026.
3. **LAOUAFA S.**, ELLIOT-PORTAL E., TAM R., VOITURON N., JOSEPH V et SOLIZ J. Hypercapnic ventilatory response is decreased in a mouse model of excessive erythrocytosis. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** (2016) doi:10.1152/ajpregu.00226.2016
4. BOUKARI R., **LAOUAFA S.**, RIBON-DEMARS A., BAIRAM A., et JOSEPH V. Ovarian steroids act a respiratory stimulant and antioxidant against the causes and consequences of sleep apnea in women. (2017) **Respir. Physiol. Neurobiol.** doi: 10.1016/j.resp.2017.01.013
5. **LAOUAFA S.**, RIBON A, MARCOUILLER F., ROUSSEL D., BAIRAM A., PIALOUX V and JOSEPH V. Estradiol protects against cardio-respiratory dysfunctions and oxidative stress in intermittent hypoxia. (2017) **SLEEP** dx.doi.org/10.1093/sleep/zsx104.
6. **LAOUAFA S.**, PERRIN-TERRIN A.N., JETON F, ELLIOT-PORTAL E., TAM R., BEAUDINAU L., VOITURON N, and SOLIZ J. Pharmacological but not genetically alteration of neural Epo modifies the CO₂/H⁺central chemosensitivity in postnatal mice at birth (2017) **Respir physiол Neurobiol**. doi: 10.1016/j.resp.2017.04.003.
7. **LAOUAFA S.**, MARCOUILLER F., ROUSSEL D., SOLIZ J., BAIRAM and JOSEPH V. Rôle of Estradiol Receptor Beta (ERβ) on Arterial Pressure, Respiratory Chemoreflex and Mitochondrial Function in Young and Aged Female Mice (2018). Accepted to **advance in experimental medicine and biology (In press)**.
8. LEMOINE A., REVOLLO S., VILLALPANDO G., VALVERDE I., GONZALES M., **LAOUAFA S.**, SOLIZ J AND JOSEPH V. Alteration of lung tissue in rats at high altitude despite elevated mitochondrial anti-oxidant enzyme activities: a species and age specific response (2018). Accepted to **Frontiers Physiology (In press)**.
9. ELLIOT-PORTAL E*, **LAOUAFA S***, ARIAS C., JANES T., JOSEPH V et SOLIZ J Brain-derived erythropoietin protects from intermittent hypoxia-induced cardio-

respiratory dysfunction and oxidative stress in mice (2018). Accepted to **SLEEP (In press)**. *Equivalent contribution of authors.

Liste des conférences nationales et internationales :

1. **LAOUAFA S**, BAIRAM A, SOLIZ J, ROUSSEL D, and JOSEPH V. **Biennale de pneumologie**, 12-14 octobre 2017, Québec (Canada). Estradiol receptor agonists α and β Protect against brain mitochondrial dysfunction in a model of sleep apnea.
2. DOUCET-BEAUPRÉ H, **LAOUAFA S**, SOLIZ J, V and JOSEPH V, VOISIN A, TRUDEAU L-E and LÉVESQUE M. **11th Annual Canadian Neuroscience Meeting**, 28-31 May 2017, Montreal (Canada). Modulation of mitochondrial function using overexpression of transcription factors as neuroprotective therapy for Parkinson's disease. **(Poster)**.
3. **LAOUAFA S**, BAIRAM A, SOLIZ J, ROUSSEL D, and JOSEPH V. **Experimental biology 2017**, 22-26 april 2017, Chicago (USA). Estradiol receptor agonists α and β Protect against brain mitochondrial dysfunction in a model of sleep apnea **(Poster-IECP Award and Tum Suden award)**.
4. **LAOUAFA S**, PERRIN-TERRIN A.N, JETON F, ELLIOT-PORTAL E, TAM R, BEAUDINAU L, VOITURON N, and SOLIZ J. **Experimental biology 2017**, 22-26 april 2017, Chicago (USA). _Pharmacological but not genetically alteration of neural Epo modifies the CO₂/H⁺central chemosensitivity in postnatal mice at birth **(Poster)**.
5. Rousseau J-P*, **LAOUAFA S***, TREMBLAY M-E, JOSEPH V, KINKEAD R. **Experimental biology 2017**, 22-26 april 2017, Chicago (USA). Defective microglia alters respiratory control and mitochondrial function in mice **(talk)**. *Equivalent contribution of authors
6. **LAOUAFA S**. **International congress, Société Legallois pour l'Étude du Contrôle Respiratoire (SLECR)**, 10-12 february 2017, Jouvence (Canada). Estradiol receptor agonists α and β Protect against brain mitochondrial dysfunction in a model of sleep apnea. **(Talk)**.
7. **LAOUAFA S**, RIBON A, MARCOUILLER F, ROUSSEL D, BAIRAM A, and JOSEPH V. **Congrès Québécois en Santé Respiratoire (CQSR)**, 4-5 november 2016, Montréal. Estradiol Prevents Brain Oxidative Stress Induced by Chronic Intermittent Hypoxia in Female Rats **(Talk)**.
8. **LAOUAFA S**, PERRIN-TERRIN A.N, JETON F, ELLIOT-PORTAL E, TAM R, BEAUDINAU L, VOITURON N, and SOLIZ J. **Congrès Québécois en Santé**

Respiratoire (CQSR), 4-5 november 2016, Montréal(Canada). Pharmacological but not genetically alteration of neural Epo modifies the CO₂/H⁺central chemosensitivity in postnatal mice at birth **(Poster, 1st Prize)**.

9. **LAOUAFA S, RIBON A, MARCOUILLER F, ROUSSEL D, BAIRAM A, and JOSEPH V** The **15th world congress on Menopause, 28september-1october 2016, Prague (Czech Republic)**. Estradiol Prevents Brain Oxidative Stress Induced by Chronic Intermittent Hypoxia in Female Rats **(Talks)**.
10. **RIBON A, LAOUAFA S, PIALOUX V, JOSEPH V and BAIRAM A** The **15th world congress on Menopause, 28september-1october 2016, Prague (Czech Republic)**. Estradiol prevents endothelial dysfunction in an animal model model of sleep apnea **(Talk)**.
11. **LAOUAFA S, RIBON A, MARCOUILLER F, BAIRAM A, and JOSEPH V.** **Journée de la recherché en santé de la faculté de médecine de l'Université Laval, 25-26 may 2016, Québec (Canada)**. L'Estradiol évite la dysfonction cardio-respiratoires et le stress oxydant chez des rates soumises à une hypoxie intermittente chronique **(Poster)**.
12. **ELLIOT-PORTAL E, LAOUAFA S, TAM R, and SOLIZ J.** **Journée de la recherché en santé de la faculté de médecine de l'Université Laval, 25-26 may 2016, Québec (Canada)**. L'Erythropoïétine cérébral évite la dysfonction cardio-respiratoire induite par l'hypoxie intermittente chronique **(Poster)**.
13. **LAOUAFA S, RIBON A, MARCOUILLER F, ROUSSEL D, BAIRAM A, and JOSEPH V** **American Thoracic Society (ATS), 13-18 may 2016, San Francisco (USA)**. Estradiol Prevents Brain Oxidative Stress Induced by Chronic Intermittent Hypoxia in Female Rats **(Poster Discussion-Conference Paper)**.
14. **LAOUAFA S, MARCOUILLER F, ROUSSEL D, BAIRAM A, and JOSEPH V.** **APS Conference, Cardiovascular, renal and metabolic diseases: Physiology and gender, 17-20 November 2015, Annapolis (USA)**. Estradiol prevents cardio-respiratory dysfunctions induced by chronic intermittent-hypoxia in female rats **(Poster)**.
15. **LAOUAFA S, MARCOUILLER F and JOSEPH V.** **APS Conference, Cardiovascular, renal and metabolic diseases: Physiology and gender, 17-20 November 2015, Annapolis (USA)**. Contribution of the nuclear progesterone receptor (nPR) to breathing stability during sleep and hypercapnic ventilatory response in adult male mice. **(Talk-Abstract-based Travel Awards)**.
16. **LAOUAFA S, ELLIOT-PORTAL E, TAM R, and SOLIZ J.** **9^{eme} Journée de la recherché en neurosciences de l'université Laval. 9 November 2015, Québec**

(Canada) Hypercapnic ventilatory response is decreased in a transgenic mouse strain that mimics chronic mountain sickness's excessive erythrocytosis. **(Poster)**.

17. ELLIOT-PORTAL E, LAOUAFA S, TAM R, and SOLIZ J. **9^{eme} Journée de la recherché en neurosciences de l'université Laval**. 9 November 2015, Québec (Canada). Cerebral erythropoietin prevents cardio-respiratory dysfunctions induced by chronic intermittent-hypoxia in female rats. **(Poster)**.
18. LAOUAFA S, MARCOUILLER F, ROUSSEL D, BAIRAM A, and JOSEPH V. **14th international on Sleep and breathing**, 25-28 October 2015, Portho de Galé hinas (Brazil). Estradiol prevents cardio-respiratory dysfunctions induced by chronic intermittent-hypoxia in female rats **(Talk)**.
19. LAOUAFA S, MARCOUILLER F, ROUSSEL D, BAIRAM A, and JOSEPH V. **20^{eme} edition de la journée de l'EDISS**, 15 October 2015, Lyon (France). Effet protecteur de l'Estradiol sur les fonctions cardio-respiratoires: Une implication mitochondriale **(Talk)**.
20. LAOUAFA S. Student seminar, axis "Recherche, Santé de la Mère à l'Enfant" (RSME), 20 may 2015, Québec (Canada). Protective role of estradiol during chronic intermittent hypoxia (CIH): The mitochondrial dysfunction hypothesis. **(Talk- 1st Prize)**.
21. LAOUAFA S. **International congress, Société Legallois pour l'Étude du Controle Respiratoire (SLECR)**, 7-9 february 2015, Jouvence (Canada). Chronic intermittent hypoxia (CIH) and mitochondrial dysfunction: Link and protective role of ovarian steroids. **(Talk)**.
22. LAOUAFA S, BOUKARI R, MARCOUILLER F and JOSEPH V. **17th international symposium on arterial chemoreflex (ISAC)**, 29 june-3 July 2014, Leeds (UK). Contribution of the nuclear progesterone receptor (nPR) to breathing stability during sleep and hypercapnic ventilatory response in adult male mice. **(Poster)**.