



HAL
open science

Rôle de l'hypoxie intermittente dans la maladie ischémique cardiaque associée au Syndrome d'Apnées Obstructives du Sommeil

Guillaume Bourdier

► **To cite this version:**

Guillaume Bourdier. Rôle de l'hypoxie intermittente dans la maladie ischémique cardiaque associée au Syndrome d'Apnées Obstructives du Sommeil. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. NNT : 2017GREAS049 . tel-01958618

HAL Id: tel-01958618

<https://theses.hal.science/tel-01958618>

Submitted on 18 Dec 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : MCA - Mouvement et Comportement pour la santé et l'Autonomie

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

GUILLAUME BOURDIER

Thèse dirigée par **Jean-Louis PEPIN (EDISCE)**, UJF
et codirigée par **Claire ARNAUD**, INSERM
préparée au sein du **Laboratoire Hypoxie et Physiopathologie
cardiovasculaire et respiratoire**
dans l'**École Doctorale Ingénierie pour la santé la Cognition et
l'Environnement**

Rôle de l'hypoxie intermittente dans la maladie ischémique cardiaque associée au Syndrome d'Apnées Obstrucives du Sommeil

Role of intermittent hypoxia in ischemic disease associated with Obstructive Sleep Apnea Syndrome

Thèse soutenue publiquement le **18 décembre 2017**,
devant le jury composé de :

Monsieur JEAN-LOUIS PEPIN

PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., CHU GRENOBLE
ALPES, Directeur de thèse

Madame MARIE-PIA D'ORTHO

PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., UNIVERSITE PARIS 7,
Rapporteur

Monsieur CYRIL REBOUL

MAITRE DE CONFERENCES, UNIVERSITE D'AVIGNON PAYS DE
VAUCLUSE, Rapporteur

Madame CLAIRE ARNAUD

CHARGE DE RECHERCHE, INSERM DELEGATION ALPES, Co-
directeur de thèse

Madame DELPHINE BAETZ

MAITRE DE CONFERENCES, UNIVERSITE LYON 1, Examinateur

Monsieur GILLES BARONNE-ROCHETTE

PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., CHU GRENOBLE
ALPES, Président

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier sincèrement les membres de mon jury de thèse:

Madame le professeur **Marie-Pia d'Ortho** et Monsieur le docteur **Cyril Reboul**, pour avoir accepté d'être rapporteurs et de juger mon travail de thèse. Les remarques et les critiques que vous m'avez adressées ont été constructives et m'ont permis d'améliorer ce travail. Merci également pour le temps accordé à l'évaluation de ce travail. Je vous adresse ma profonde considération.

Madame le docteur **Delphine Baetz** et Monsieur le professeur **Gilles Barone-Rochette**, pour avoir accepté de juger ce travail et pour avoir accepté de participer au jury de thèse. Je remercie également le professeur Gilles Barone-Rochette pour avoir accepté de présider ce jury lors de la soutenance. Je vous adresse également ma profonde considération.

Monsieur le professeur **Jean-Louis Pépin**, d'avoir accepté de me représenter en tant que directeur de thèse et sans qui je n'aurais sans doute pas pu prolonger cette aventure débutée en master. Merci.

Madame le docteur **Claire Arnaud**, avec qui j'ai eu le privilège de travailler pendant 5 ans. Merci pour la confiance que tu m'as accordée durant toutes ces années. En master 1 déjà, durant lequel j'ai passé des heures assis devant un spectrophotomètre, à une époque où j'étais encore loin d'imaginer poursuivre en thèse! En master 2 aussi, où j'ai réellement pris goût pour ce travail et durant lequel tu m'as fait part de ton souhait de me voir prolonger l'aventure. Merci également pour le soutien que tu m'as apporté durant toutes ces années, pour la motivation que tu m'as transmise. Ton investissement, tes connaissances scientifiques et la qualité de ton travail m'ont toujours impressionné et m'ont donné l'envie de m'améliorer. Ça a été un réel plaisir de travailler à tes côtés. Au plaisir de te recroiser à l'avenir sur Grenoble ou sur Marseille !

Je remercie également :

Elise Belaidi-Corsat, pour m'avoir accompagné durant toute la durée de cette thèse. Tu es indissociable de mon travail au laboratoire, sur le stress du RE et sur HIF-1 (finalement !), et c'est d'ailleurs avec toi que j'ai fait mes premières manip de biomoléculaires que tu me détaillais déjà à l'aide de (beaucoup !!) de schémas. Tu t'es beaucoup investie dans mon travail et tu à toujours pris le temps de m'aider au cours des nombreuses réunions que nous avons eu ou lorsque j'ai fait appel à toi. Le travail que j'ai réalisé n'aurait pas été possible sans toi. Un grand merci !

Stéphane Doutreleau, qui m'a tout appris sur l'échocardiographie. Merci pour ton aide précieuse et pour ta disponibilité. Ça a été un réel plaisir de te connaître.

Patrice Flore, dit « La Pate » ! Je me rappelle quand tu venais m'aider à faire courir les rats dès le matin alors que tu avais des millions de choses à faire. Merci de m'avoir amené à Nantes en voiture pour participer à un congrès et pour m'avoir donné l'opportunité d'y présenter mon travail. Merci pour ta gentillesse. Brésil ou pas ... je bois une Murphy's à ta santé !

Hervé Sanchez que j'ai croisé à mon arrivée au laboratoire. C'est grâce à tes connaissances sur l'exercice que nous nous sommes intéressés à cette thématique, ce qui m'a notamment permis de publier mon premier article scientifique.

Merci à l'ensemble de l'équipe fondamentale du laboratoire HP2, que j'ai côtoyé tout au long de ces années : aux Pr. Diane Godin-Ribuot et Christophe Ribuot, qui ont successivement pris la direction de l'équipe fondamentale, à Éric Estève, à Anne Briançon-Marjollet avec qui j'ai fait des TP passionnants et pour ta gentillesse, à Gilles Faury, à Audrey que j'ai souvent embêté pour une commande ou une réservation à la dernière minute, à Emeline pour ta gentillesse et pour le travail que tu as réalisé en RT-qPCR et pour les prélèvements durant lesquels ton aide a été précieuse, à Sandrine pour ta bienveillance et pour ton travail en histologie qui a demandé beaucoup de patience, à Thierry pour ton sourire et pour ton aide à la plateforme d'histologie (en plus tu écoutes de la bonne musique!), à

Sophie et Brigitte avec lesquelles j'ai également éprouvé un réel plaisir de partager toutes ces années.

Je voudrais également remercier les co-thésards, que j'ai seulement croisé ou avec lesquelles j'ai partagé plusieurs années au sein du laboratoire. J'en garde un très bon souvenir. Je vais donc essayer de n'oublier personne :

A Manue. Tu as été la première à partir, je garde un excellent souvenir du temps passé au labo avec toi. C'est toujours avec beaucoup de plaisir que je te revoie lorsque tu redescends sur Grenoble.

A Marioule. Rien que pour avoir goûté le cassoulet de chez Emile, ça valait le cout de te connaître !! Au plaisir de te revoir sur Annecy ou à Marseille afin d'avoir un peu de soleil pour une fois !

A Amandine, qui est partie à l'autre bout du monde. Qui sait tu auras peut être ton étoile sur Hollywood Boulevard !

A Sylvain et Mélanie, qui sont toujours présents et qui font preuve d'une abnégation sans faille. Bon courage pour la suite, en espérant que vous allez réussir !

A Sophie, l'autre Ardéchoise du labo, tu es maintenant seule à défendre les couleurs de notre beau pays. Bon courage, la fin approche !

A Zeinab, je t'ai croisé quelques fois lorsque tu venais faire des manip à Grenoble. Tu n'oubliais jamais de nous ramener ces petits gâteaux libanais qui ne passaient pas la journée, une tuerie !

A Yann, le pompier breton au sommeil profond ! A toutes les soirées finies « à pas d'heures » ou tu t'endormais sur mon canapé. Quand je devais venir au labo le week-end pas motivé au moins j'étais sûr de tomber sur toi, avec la pêche et tu es toujours partant pour un café. Bon courage, la fin approche. Yerc'h mad!

A Maximin, le dernier arrivé. Je suis vraiment content que tu aies pu continuer en thèse sur la même thématique que moi, on a pu partager nos expériences et ça a été très constructif. J'ai appris à te connaître au cours de ces deux ans, tu es quelqu'un que j'apprécie, même si tu n'étais franchement pas terrible en course à pied, j'étais toujours obligé de t'attendre !! On a partagé le même bureau avec Yann et j'ai passé de très bons moments en votre compagnie. Je te souhaite bon courage également.

Je remercie également l'ensemble des stagiaires en licence et en Master passés au laboratoire durant ces 5 années, la liste est longue !

Je suis infiniment reconnaissant envers mes parents, qui ont toujours été là pour moi et qui m'ont toujours poussé à suivre mes envies. En remontant quelques années en arrière, je n'aurais jamais imaginé écrire ces quelques lignes mais votre soutien m'a permis de faire les bons choix et je vous en remercie. Je remercie également Nicolas, mon frère, avec qui j'ai partagé de très nombreuses années à Grenoble. Même si nos chemins se séparent aujourd'hui je garderai tant de bons souvenirs passés à tes côtés.

Merci à mes amis de toujours, qui sont indissociable de mon parcours et que j'ai toujours tant de plaisir à croiser aux quatre coins de la France depuis tant d'années déjà. A bientôt !

Finalement, je remercie Jessica, qui aura été la meilleure chose qui me soit arrivée durant toutes ces années passées au laboratoire. Merci pour ton soutien sans faille durant les dernières semaines, ça n'a pas été facile tous les jours ; on est quittes maintenant ! Je propose qu'on s'arrête là, une thèse chacun c'est largement suffisant. De nouvelles aventures s'offrent à nous aujourd'hui, je suis très heureux que tu m'accompagnes pour qu'on puisse les vivre ensemble.

RESUMÉ

Rôle de l'hypoxie intermittente dans la maladie ischémique cardiaque associée au Syndrome d'Apnées Obstructives du Sommeil.

Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) est un problème de santé publique majeur affectant 6-13% de la population d'âge moyen. Des études épidémiologiques et l'accumulation de données cliniques ont montré que le SAOS joue un rôle important dans l'initiation et la progression des pathologies cardiovasculaires (CV) comme l'infarctus du myocarde (IM). Les patients hospitalisés post-IM présentent une prévalence pour le SAOS de l'ordre de 50%. De plus, le SAOS augmente la vulnérabilité du cœur à l'infarctus, ce qui se traduit par une taille d'IM plus grande, une ischémie myocardique prolongée, et une aggravation des événements CVs au long-terme, prédisposant les patients apnéiques à des infarctus surnuméraires, à l'insuffisance cardiaque (IC) et au décès. Il semble donc important de comprendre précisément les mécanismes impliqués dans cette susceptibilité accrue à l'ischémie myocardique afin de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques et améliorer la prise en charge du risque CV chez les patients apnéiques. L'hypoxie intermittente chronique (HI) est le substrat physiopathologique majeur des complications CV du SAOS via l'activation de mécanismes physiopathologiques variés, tels que l'inflammation, le stress oxydant ou encore l'activation sympathique. Ce travail de thèse avait pour but de 1) caractériser la réponse aiguë et chronique à l'IM chez des animaux exposés à l'HI, 2) de disséquer les mécanismes cellulaires impliqués dans la susceptibilité accrue à l'IM chez ces mêmes animaux.

Nos travaux ont confirmé que l'HI induit une majoration de la taille d'infarctus suite à un événement ischémique aiguë et aggrave le remodelage cardiaque et la dysfonction contractile dans un modèle de cardiopathie ischémique chronique chez le rat. Nous avons également mis en évidence que l'HI induisait dans ce contexte une hyperactivation sympathique persistante, un stress du RE proapoptotique et l'activation du facteur de transcription HIF-1 contribuant à l'augmentation de la vulnérabilité du cœur à l'infarctus et à l'aggravation post-IM des complications cardiaques au long-terme. Ces différents facteurs pourraient représenter des biomarqueurs intéressants pour prédire le risque CV chez les patients apnéiques sévères et pourraient être considérés comme des pistes thérapeutiques potentielles pour améliorer la prise en charge des patients SAOS à haut risque CV.

Mots-clés : syndrome d'apnées obstructives du sommeil, hypoxie intermittente, infarctus du myocarde, cardiomyopathie ischémique, stress du réticulum endoplasmique, HIF-1, activation sympathique

ABSTRACT

Role of intermittent hypoxia in ischemic disease associated with Obstructive Sleep Apnea Syndrome

Obstructive sleep apnea syndrome (OSA) is a common disease that affects 6-13% of the middle-aged population. Epidemiological and clinical data support the notion that OSA has a role in the initiation or progression of several cardiovascular (CV) diseases, including myocardial infarction (MI). Indeed, patients hospitalized with acute MI present high prevalence for OSA. Furthermore, OSA is known to major infarct size in patients that persists over time and aggravates long-term adverse events post-MI, as reinfarction, heart failure (HF) and death. OSA is characterized by intermittent hypoxia (IH) which results in desaturation-reoxygenation sequences and appears to be the major consequence of OSA in term of CV alterations associated with apneas. However, the mechanisms remain unclear. Therefore, the understanding of pathophysiologic mechanisms involved in cardiac disorders is a research priority for OSA in order to develop new therapeutic targets and improve the management of CV risk in apneic patients. There are growing evidences suggesting a major role of endoplasmic reticulum (ER) stress and HIF-1 activation in the vulnerability to acute ischemic events and in long-term adverse complications associated with prolonged MI. Furthermore, the progression of ischemic cardiomyopathy following MI is also associated with activation of the sympathetic nervous system which substantially contributes to cardiac alterations. Furthermore, these are three mechanisms known to be activated with IH. This project aimed 1) to assess the IH-induced acute and chronic cardiac alterations following MI, 2) to study the implication of cellular mechanisms involved in the adverse ischemic events related to OSA. We have shown that IH increases infarct size following acute MI and aggravates cardiac remodeling and contractile dysfunction in a rat model of chronic ischemic cardiomyopathy. In these contexts, IH is associated with a sympathetic overactivity, a proapoptotic ER stress and the activation of HIF-1, which substantially contribute to increased heart vulnerability to infarction and worsening of long-term cardiac complications post-MI. These different factors may represent interesting biomarkers for predicting CV risk in severe apneic patients and may be considered as potential therapeutic targets to improve the management of OSA patients with high CV risks.

Key words: obstructive sleep apnea syndrome, intermittent hypoxia, myocardial infarction, ischemic cardiomyopathy, endoplasmic reticulum stress, HIF-1, sympathetic activity

Table des matières

RESUMÉ.....	1
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	5
LISTE DES FIGURES.....	7
LISTE DES TABLEAUX.....	9
Première partie : contexte bibliographique.....	11
Introduction Générale.....	13
1. La pathologie ischémique : de l'infarctus aigu du myocarde à l'insuffisance cardiaque.....	17
1.1. L'infarctus aigu du myocarde.....	19
1.2. Conséquences cellulaires de l'IM.....	20
1.3. Conséquences fonctionnelles.....	23
1.4. Conséquences physiopathologiques chroniques de l'infarctus du myocarde.....	24
1.4.1. Remodelage ventriculaire gauche.....	24
1.4.2. Dysfonction contractile.....	29
2. Le Syndrome d'Apnées Obstructives du Sommeil ou SAOS.....	37
2.1. Généralités sur le SAOS.....	39
2.1.1. Prévalence/épidémiologie.....	39
2.1.2. Physiopathologie.....	41
2.1.3. Diagnostic.....	42
2.2. Traitements actuels du SAOS.....	44
2.2.1. Perte de poids.....	44
2.2.2. Traitements chirurgicaux et mécaniques.....	44
2.2.3. Pression positive continue ou PPC.....	45
2.3. Conséquences des obstructions des voies aériennes par le SAOS.....	46
2.3.1. Variations de pressions intrathoraciques.....	46
2.3.2. Fragmentation du sommeil.....	46
2.3.3. Hypoxie intermittente.....	46
2.4. Modèles expérimentaux d'hypoxie intermittente.....	47
2.5. Conséquences cardiovasculaires du SAOS : rôle de l'hypoxie intermittente.....	48
2.5.1. Dysfonctions vasculaires.....	48
2.5.2. Dysfonctions cardiaques.....	49
2.6. Mécanismes impliqués dans les complications cardiaques du SAOS.....	51
2.7. Le stress du réticulum endoplasmique (RE).....	58

2.7.1.	Présentation générale	58
2.7.2.	Stress du RE et altérations myocardiques	61
2.7.3.	Stress du RE et hypoxie intermittente.....	63
3.	Rôle de l'exercice dans le traitement de la pathologie ischémique associée au SAOS.....	65
3.1.	Exercice et cardioprotection	67
3.2.	Les différentes modalités d'exercice.....	69
3.3.	Exercice et SAOS.....	71
	Deuxième partie : travaux de thèse.....	73
1.	Matériels et méthodes	77
2.	Résultats	91
1.1.	Article n°1 : « ER stress as a novel inducer of HIF-1 activity : its role in the susceptibility to myocardial ischemia-reperfusion induced by chronic IH »	93
1.2.	Article n°2 : « High-intensity training reduces IH-induced ER stress and myocardial infarct size »	109
1.3.	Article n°3 : « Characterisation of IH-induced cardiac remodeling and contractile dysfunction in a post-ischemic rat model »	125
1.4.	Résultats complémentaires	151
	Troisième partie : Discussion	157
1.	SAOS, hypoxie intermittente et complications cardiovasculaires.....	161
2.	Mécanismes moléculaires et cellulaires.....	167
2.1.	Activation sympathique.....	169
2.2.	Activation de HIF-1	171
2.3.	Stress du réticulum endoplasmique	172
3.	Conclusions.....	175
	BIBLIOGRAPHIE.....	179

LISTE DES ABBREVIATIONS

A	adrénaline	ERO	espèces réactives de l'oxygène
AC	adénylate-cyclase	FE(VG)	fraction d'éjection du ventricule gauche
ACCF/	<i>l'American College of Cardiology</i>		
AHA	<i>Foundation/American Heart Association</i>	FIO ₂	fraction inspirée en dioxygène
AMP	adenosine monophosphate	FV	fibrillation ventriculaire
AMPC	AMP cyclique	GADD34	<i>growth arrest and DNA damage-inducible 34</i>
ANF	facteur natriurétique auriculaire	GRP78/Bip	<i>binding protein/glucose regulated protein</i>
ATF4	<i>activating transcription factor 4</i>		
ATF6	<i>activating transcription factor 6</i>	G _i	protéine G inhibitrice
ATP	adénosine triphosphate	GRK	<i>GPCR kinase family</i>
β-AR	récepteur β-adrénergique	G _s	protéine G stimulatrice
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i>	GTP	guanosine triphosphate
Bax	<i>Bcl-2-associated X</i>	HE	hématoxyline-éosine
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>	HI	hypoxie intermittente
Bim	<i>Bcl-2-like protein 11</i>	HIF-1	<i>hypoxia inducible factor-1</i>
BNP	peptide natriurétique de type B	HRE	<i>hypoxia response element</i>
Ca ²⁺	calcium	Hsp (70)	<i>heat shock protein (70)</i>
CHOP	CEBP/homologous protein	HTA	hypertension artérielle
CS	citrate synthase	HVG	hypertrophie ventriculaire gauche
CV	cardiovasculaire	IAH	indexe apnée/hypopnée
dP/dT	dérivé première de la courbe pression/temps	IC	insuffisance cardiaque
CEC	couplage excitation-contraction	ICAM	<i>interCellular adhesion molecule</i>
ECM	exercice continu modéré	IL	interleukine
EII	exercice intermittent intense	i.p.	intra péritonéale
eIF2α	facteur d'initiation de la traduction eucaryote 2	LTCC	canaux calciques de type L
EEG	électroencéphalogramme	IM	infarctus aigu du myocarde
EMG	électromyogramme	IMC	indice de masse corporelle
EPO	érythropoïétine	I/R	ischémie/reperfusion
ERAD	<i>ER-associated degradation</i>	IRE1	<i>inositol requirement enzyme 1</i>
ERSE	<i>ER stress response element</i>	mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MEC	matrice extracellulaire	MCP	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
		RyR	récepteurs à la ryanodyne

MLC	chaîne légère de myosine	S1/2P	luminal site 1/2 protéase
MHC	chaîne lourde de myosine	SaO ₂	saturation artérielle en oxygène
α/β-MHC	l'isoforme α/β de la MHC	SACS	syndrome d'apnées centrales
N	normoxie		du sommeil
NA	noradrénaline	SAOS	syndrome d'apnées obstructives
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide		du sommeil
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate	SERCA2	sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase
NCE	échangeur Na ⁺ /Ca ²⁺	SOD	superoxyde dismutase
NFκB	<i>nuclear factor-kappa</i>	SNS	système nerveux sympathique
NHE	échangeur Na ⁺ /H ⁺	TGF-β1	facteur de croissance
NOS	oxyde nitrique synthase		transformant bêta de type 1
NOX	NADPH oxydase	TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
OMS	organisation mondiale de la santé	TRS	troubles respiratoires du sommeil
O ₂ ⁻	anion superoxyde	TV	tachycardie ventriculaire
PBA	<i>phenylbutyric acid</i>	UPR	<i>unfolded protein response</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>	VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
PERK	<i>protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase</i>	VAS	voies aériennes supérieures
PHD	prolyl-hydroxylases	VD	ventricule droit
PKA	protéine kinase A-AMPC dépendante	VG	ventricule gauche
PLB	phospholamban	VMA	vitesse maximale aérobie
PLC	phospholipase C	VO _{2max}	consommation maximale d'oxygène
PLM	phospholemman	XBP1	<i>x-box binding protein-1</i>
PKC	protéine kinase C	XO	xanthine oxydase
PPC	pression positive continue	ZAR	zone à risque
PTDVG	pression télédiastolique du ventricule gauche	ZI	zone infarctée
RCPG	récepteurs couplés aux protéines G		
RE	réticulum endoplasmique		
RS	réticulum sarcoplasmique		
RT-qPCR	PCR quantitative en temps réel		

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Classification des IM de type 1 et de type 2 selon les atteintes de l'artère coronaire.

Figure 2. Conséquences métaboliques de l'ischémie myocardique.

Figure 3. Schéma illustrant les mécanismes conduisant à une surcharge calcique dans les cardiomyocytes pendant l'ischémie myocardique.

Figure 4. Evolution du phénomène de « wavefront » de nécrose. Coupes transversales de cœurs soumis à une ischémie de durées variables.

Figure 5. Représentation schématique du remodelage ventriculaire gauche post-IM.

Figure 6. Flux calciques dans le cardiomyocyte lors du couplage excitation-contraction.

Figure 7. La stimulation sympathique cardiaque améliore la fonction cardiaque.

Figure 8. Mécanisme physiopathologique d'activation de la signalisation β -adrénergique conduisant au phénomène de désensibilisation cardiaque.

Figure 9. Prévalence du syndrome d'apnées obstructives du sommeil.

Figure 10. Représentation des différents stades de sévérités des événements respiratoires selon la collapsibilité pharyngée, le flux oronasal, la pression œsophagienne représentant les efforts respiratoires et la désaturation artérielle nocturne.

Figure 11. Tracé d'enregistrement polysomnographique illustrant la fragmentation du sommeil, la fluctuation de la saturation en O_2 (SaO_2), l'augmentation des efforts respiratoires thoraco-abdominaux et les modifications de la pression artérielle à chaque épisode d'apnée.

Figure 12. Schéma illustrant les différentes voies de signalisations intervenant dans l'activation de HIF-1 en réponse à l'HI.

Figure 13. Régulation de l'activité du facteur de transcription HIF-1

Figure 14. Rôle majeur de l'HI dans le développement des pathologies cardiovasculaires associées au SAOS.

Figure 15. Activation de la voie UPR en réponse à un stress du RE.

Figure 16. Représentation schématique des principaux médiateurs de la cardioprotection induite par l'exercice.

Figure 17. Dispositif d'exposition à l'HI de la plate-forme d'hypoxie du laboratoire HP2.

Figure 18. Résultats complémentaires 1 : signalisation sympathique et glande surrénales

Figure 19. Résultats complémentaires 2 : désensibilisation β -adrénergique cardiaque

Figure 20. Mécanismes cellulaires activés par l'HI et impliqués dans le développement et la progression des pathologies ischémiques cardiaques associés au SAOS.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Critères de diagnostic du SAOS

Tableau 2. Liste des anticorps utilisés pour l'étude du stress du RE et la signalisation sympathique par western blot et dilutions utilisées pour chacun d'eux.

Tableau 3. Récapitulatif des différentes amorces utilisées pour les RT-PCR et des températures d'hybridations correspondantes à chaque couple d'amorces.

Première partie : contexte bibliographique

Introduction Générale

La cardiopathie ischémique représente la plus grande cause de mortalité à travers le monde [1]. Au cours des 30 dernières années, le développement des soins coronariens avancés, la mise en œuvre de stratégies de reperfusions précoces et l'introduction de nouvelles approches pharmacologiques ont contribué à une réduction de 60% de la mortalité au cours des 30 premiers jours après **l'infarctus aigu du myocarde (IM)**. Cependant, son incidence demeure élevée avec 120 000 cas par an en France. Selon les données de l'organisation mondiale de la santé (OMS), sur 50 millions de décès annuels dans le monde, les cardiomyopathies ischémiques représentent la première cause de mortalité avec 7,2 millions de décès d'origine coronaire. En France, son pronostic reste grave puisque l'IM est responsable de 10 à 12% de la mortalité totale annuelle chez l'adulte. De plus, l'incidence de **l'insuffisance cardiaque (IC)**, complication majeure post-IM, a considérablement augmentée. L'IC est un syndrome clinique complexe qui peut être défini comme une anomalie de la structure et/ou de la fonction cardiaque, conduisant à une défaillance du myocarde qui devient incapable de fournir l'oxygène à un débit suffisant par rapport aux exigences du métabolisme tissulaire [2]. La prévalence de l'IC dans la population générale est de l'ordre de 1 à 2 %, et devient supérieur à 10% après 70 ans [3]. Son diagnostic peut être difficile, surtout dans les premiers stades de la pathologie car beaucoup de symptômes ne sont pas spécifiques d'une dysfonction cardiaque et, par conséquent, ne facilitent pas la distinction entre l'IC et d'autres morbidités. L'IC est associée à une augmentation du risque de décès et à une survie médiane de 4 ans post-IM. Ainsi, malgré l'amélioration de la prise en charge des patients, il semble indispensable d'identifier et de traiter précocement les différentes conditions physiopathologiques qui pourraient favoriser la progression de l'IC post-infarctus.

Parmi les conditions physiopathologiques responsables d'une augmentation de la morbi-mortalité cardiovasculaire (CV), le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) qui touche 5 à 20% de la population générale dans les pays industrialisés, est un facteur aggravant, puisque la sévérité du SAOS est un facteur indépendant de mortalité chez le patient après un IM. De plus, les patients apnéiques présentent une augmentation de la taille de l'infarctus, mais aussi de la charge de travail du myocarde augmentée après l'IM, comparé aux patients non apnéiques [4, 5].

Le SAOS se caractérise par des épisodes répétés de collapsus pharyngés au cours du sommeil qui entraînent une fragmentation du sommeil, une augmentation des efforts respiratoires et une hypoxie intermittente (HI), l'HI étant considérée comme la plus délétère au niveau CV et responsable de l'activation de nombreux mécanismes physiopathologiques responsables des complications cardiaques associées au SAOS [6]. Ainsi, des travaux antérieurs menés au sein du laboratoire ont mis en évidence des perturbations de l'activité sympathique, de l'inflammation et du stress oxydatif par l'HI mais aussi l'activation d'un facteur de transcription *hypoxia inducible factor-1* (HIF-1) qui sont impliqués dans les complications CVs. En revanche, peu d'études se sont intéressées au rôle d'une

autre voie de signalisation, le stress du réticulum endoplasmique (RE) au cours du SAOS, malgré son rôle dans la progression de la maladie ischémique.

L'objectif principal de cette thèse a été de caractériser le rôle de l'HI lors de la maladie ischémique, à la fois suite à un accident aigu (IM), mais aussi dans la progression de la pathologie vers le stade IC. Parallèlement, nous avons étudié l'implication de plusieurs mécanismes physiopathologiques, l'activation sympathique, HIF-1 et le stress du RE dans la progression des complications cardiaques induites par l'HI qui pourraient représenter des biomarqueurs prometteurs chez des patients SAOS à haut risque CV.

Le manuscrit débute par une partie bibliographique divisée en trois sous-ensembles : le premier consacré à la description de la maladie ischémique et aux conséquences physiopathologiques conduisant à l'IC ; le second au SAOS, ses complications CVs et aux mécanismes physiopathologiques impliqués ; et le troisième consacré à l'efficacité de différentes stratégies thérapeutiques envisagées afin de lutter contre les complications cardiaques associées au SAOS.

La seconde partie présente les travaux de thèse sous la forme de trois articles scientifiques originaux qui se sont intéressés au rôle de l'HI dans les complications cardiaques ischémiques associées au SAOS et à différentes stratégies thérapeutiques envisagées.

Enfin, la troisième et dernière partie de ce manuscrit est une analyse critique sous forme de discussion générale des résultats obtenus au cours de la thèse, qui ouvre sur conclusion générale et sur les retombées thérapeutiques potentielles de ces travaux.

1. La pathologie ischémique : de l'infarctus aigu du myocarde à l'insuffisance cardiaque

1.1. L'infarctus aigu du myocarde

En 2000, la première Task Force Globale a défini l'IM comme une mort cellulaire (cardiomyocytes) qui induit une nécrose suite à un stress ischémique [7]. L'ischémie est classiquement définie par une réduction ou par l'interruption du débit sanguin dans un territoire vasculaire donné, responsable d'une inadéquation entre, d'une part, les apports en oxygène et en substrats énergétiques et, d'autre part, les besoins de la cellule pour son fonctionnement et sa survie. Dans la grande majorité des cas, elle résulte d'une pathologie athéromateuse entraînant un rétrécissement luminal couplée d'un thrombus coronaire ischémique. L'ischémie myocardique est la conséquence de la rupture de la plaque athéromateuse qui expose le noyau nécrotique à la circulation artérielle. L'évolution des connaissances sur la pathologie et les outils diagnostics ont permis d'améliorer la définition de l'IM pour progressivement considérer les différentes conditions physiopathologiques qui pourraient conduire à l'infarctus, puis intégrer les techniques d'imagerie et/ou la reconnaissance de marqueurs biochimiques circulants permettant de détecter de très faibles quantités de blessures ou de nécrose myocardique [8]. L'association de différents symptômes est variable selon le type de pathologie ischémique et l'IM est ainsi classifié en plusieurs types selon l'origine de la pathologie, les marqueurs diagnostics détectés et les stratégies thérapeutiques envisagées. Ainsi, il existe :

Le type 1 dit spontané qui se caractérise par l'apparition d'un thrombus coronaire suite à une rupture de plaque athéromateuse par exemple. La réduction du flux sanguin myocardique entraîne alors une ischémie myocardique à l'origine de la nécrose myocytaire (Figure 1).

Le type 2. Lorsque l'artère coronaire n'est pas obstruée, certaines conditions peuvent diminuer l'apport en oxygène du myocarde et entraîner un déséquilibre entre l'apport et la demande qui va également conduire à la nécrose. On parle alors d'un IM secondaire à un déséquilibre ischémique. Nous retrouvons dans cette catégorie la dysfonction endothéliale, le vasospasme, la présence de plaques qui réduisent la lumière coronaire ou encore la présence de marqueurs circulants endogènes ou exogènes toxiques à l'origine d'une hypertension artérielle par exemple (catécholamines) (Figure 1). Les différents niveaux d'IM ainsi classifiés regroupent l'ensemble des causes connues pour être à l'origine d'une perte de viabilité myocardique [8].

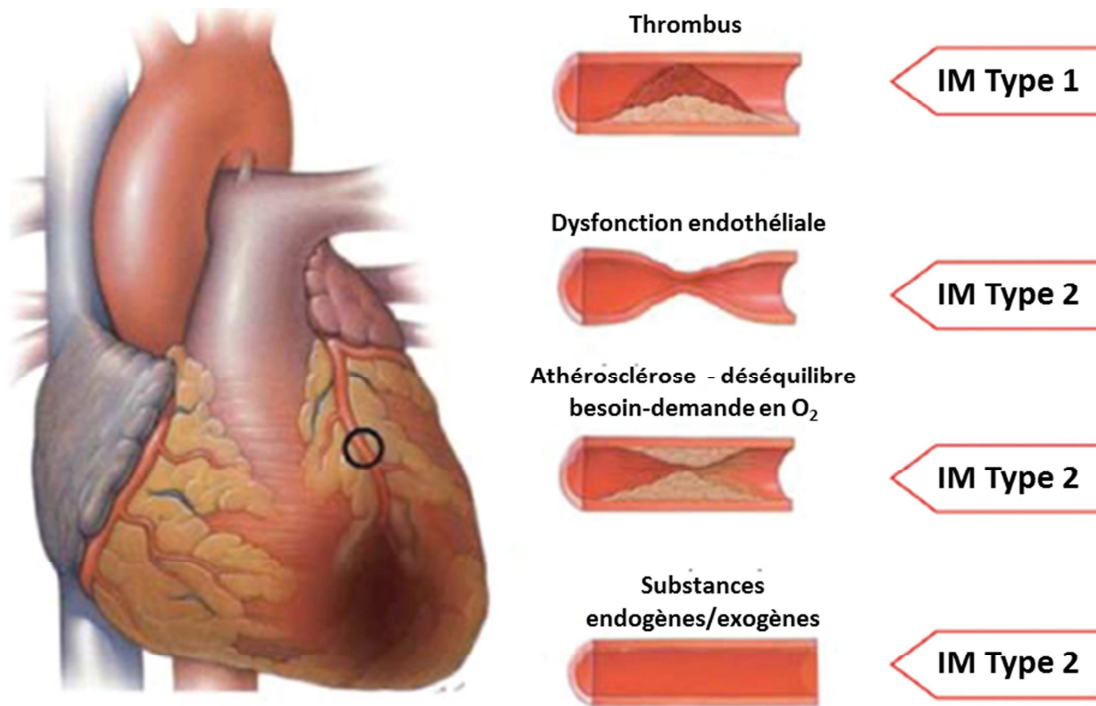


Figure 1. Classification des IM de type 1 et de type 2 selon les atteintes de l'artère coronaire (cercle noir). D'après Thygesen *et al.* 2012

1.2. Conséquences cellulaires de l'IM

La diminution (ischémie modérée) ou l'arrêt (ischémie sévère) d'apport en oxygène et en nutriment va entraîner d'importantes modifications métaboliques dans le myocarde. En effet, le cœur est l'organe qui a les plus grands besoins énergétiques et il est dépendant de la phosphorylation oxydative pour subvenir à ses besoins en adénosine triphosphate (ATP). L'ischémie va, par manque de substrat, conduire à l'activation de la glycolyse anaérobie qui, en plus d'être moins rentable énergétiquement, va être responsable de l'accumulation de CO₂, de lactates, de protons et de nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) conduisant ainsi à une diminution du pH intracellulaire [9, 10] (figure 2). Cet acidose intracellulaire inhibe la liaison du calcium (Ca²⁺) aux protéines contractiles par compétition entre les ions H⁺ (protons) et Ca²⁺ et altère la contractilité myocardique à l'origine d'une dysfonction systolique ischémique [11].

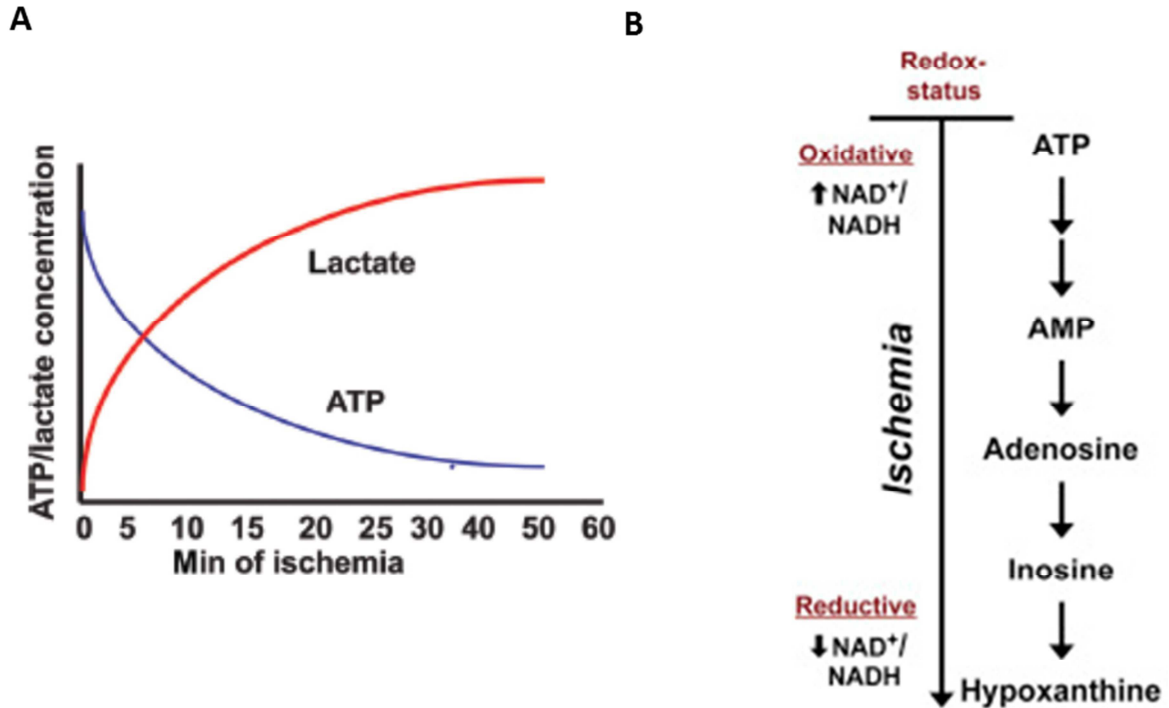


Figure 2. Conséquences métaboliques de l'ischémie myocardique.

A : La diminution rapide de la concentration myocardique d'ATP dans le myocarde ischémié est associée à une accumulation de lactate par glycolyse anaérobie. L'adénylate kinase convertie alors l'ADP en ATP et AMP. **B :** L'ATP est utilisée alors que l'AMP est progressivement convertie en hypoxanthine. La diminution croissante des niveaux d'ATP cardiomyocytaire entraîne l'apparition de lésions cellulaires irréversibles. Adapté de Frangogiannis *et al.* 2015

Afin de lutter contre l'acidification intracellulaire, les cardiomyocytes vont expulser les protons accumulés dans le cytosol grâce à l'échangeur Na^+/H^+ (NHE) qui, en échange de la sortie d'un ion H^+ , fait entrer un ion sodium (Na^+) [12]. La restauration du pH cytosolique passe également par l'activation du co-transporteur $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ [13]. Ces deux mécanismes vont être à l'origine d'une augmentation de la concentration intracellulaire de sodium. Dans un contexte ischémiq, le manque d'ATP va altérer le fonctionnement de la pompe Na^+/K^+ -ATPase, qui permet normalement la sortie de 3 ions Na^+ en échange de l'entrée de 2 ions potassium (K^+), et entraîner une surcharge sodique. Afin de réduire la concentration intracellulaire en sodium, l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCE) va fonctionner en mode inverse. Dans ce mode, 3 ions Na^+ sortent de la cellule en échange avec un ion Ca^{2+} conduisant à une surcharge calcique cytosolique. La diminution de la disponibilité en ATP va également participer à la surcharge calcique en réduisant l'expulsion du Ca^{2+} par des transporteurs membranaires ATP-dépendants ainsi qu'en diminuant sa recapture par la pompe sarco/endoplasmic

reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA2) du réticulum sarcoplasmique (RS). Ces mécanismes sont illustrés dans la figure 3 [14].

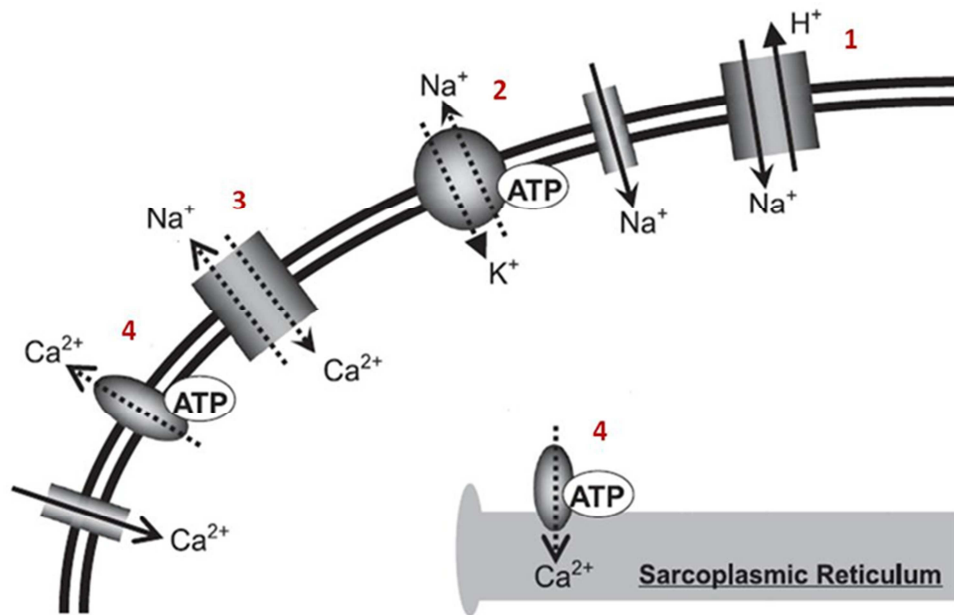


Figure 3. Schéma illustrant les mécanismes conduisant à une surcharge calcique dans les cardiomyocytes pendant l'ischémie myocardique.

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

L'interruption de flux sanguin coronaire est également responsable d'un stress oxydant. Dès la 3ème minute d'ischémie, et malgré l'arrêt de l'apport d'oxygène, il y a une production d'une espèce réactive à l'oxygène (ERO), l'anion superoxyde (O_2^-), à partir de l'oxygène provenant de la myoglobine [15]. Les EROs sont des espèces moléculaires oxygénées possédant des électrons libres les rendant hautement réactives, qui réagissent avec les acides nucléiques, les lipides et les protéines et sont à l'origine d'importants dommages cellulaires [16]. Bien que très faibles, ces quantités d'oxygène résiduelles sont à l'origine d'EROs [17] responsables d'altérations structurales mitochondriales [18] et de la perméabilisation membranaire qui va majorer la production d' O_2^- .

1.3. Conséquences fonctionnelles

Actuellement, la principale option thérapeutique suite à l'ischémie consiste à restaurer le flux sanguin le plus rapidement possible. Les conséquences fonctionnelles d'un arrêt de la perfusion myocardique varient selon la durée de l'ischémie. Durant les 4 à 5 premières minutes post-ischémie, une restauration du flux coronaire abolit complètement les dysfonctions précoces induites par l'IM. Lors d'ischémies prolongées (10 à 20 minutes), la reperfusion de la zone occluse provoque un état de « sidération myocardique » responsable de dysfonctions contractiles transitoires qui peuvent durer jusqu'à 24h post-reperfusion avant récupération complète [19]. Au-delà, les cardiomyocytes seront endommagés de manière irréversible, même après reperfusion. L'étendue des lésions va dépendre de la zone à risque et de la durée de l'ischémie. En effet, plus l'occlusion de l'artère coronaire aura lieu sur une partie proximale du vaisseau, plus la zone à risque, soit la zone normalement vascularisée en aval de l'occlusion, sera grande [20]. De la même manière, plus l'ischémie est longue plus la taille de l'infarctus est importante [21]. La mort des tissus va s'étendre progressivement de l'endocarde vers l'épicarde par un phénomène appelé « wavefront » (Figure 4) [22]. Il met en évidence l'hétérogénéité transmurale du myocarde avec une région endocardique plus sensible au stress ischémique que l'épicarde. Cependant, ce phénomène est variable selon les espèces et semble principalement dépendre du réseau de collatérales présent au sein du myocarde et qui va influencer la distribution de l'infarctus suite à l'ischémie [23].



Figure 4. Evolution du phénomène de « wavefront » de nécrose. Coupes transversales de cœurs soumis à une ischémie de durées variables. I: infarctus. D'après Frangogiannis *et al.* 2015

L'ischémie myocardique est donc un processus dynamique, dont les conséquences dépendent de la durée et de l'importance du territoire ischémié. Dans les premières secondes après le début de l'ischémie, une diminution importante de l'activité contractile du myocarde est observée et est associée à des dommages cellulaires réversibles ou irréversibles. Les lésions irréversibles qui sont

caractérisées par une nécrose du tissu privé d'oxygène, progressent de l'endocarde vers l'épicarde et vont participer à l'apparition de troubles fonctionnels post-infarctus. L'atteinte ventriculaire, qui est un élément pronostic majeur fortement corrélée à la mortalité post-infarctus, peut être régionale ou globale et se traduit par un défaut de contractilité, liée notamment à la perte de la masse contractile (nécrose). Des mécanismes adaptatifs sont alors mis en place pour maintenir un débit cardiaque suffisant.

1.4. Conséquences physiopathologiques chroniques de l'infarctus du myocarde

L'insuffisance cardiaque est une maladie progressive dont le développement a été classé en 4 phases A, B, C et D distinctes par l'*American College of Cardiology Foundation/American Heart Association* (ACC/AHA) [24]. La phase A réfère aux conditions cliniques qui prédisposent au développement de l'IC (hypertension, maladies coronariennes). La phase B correspond à l'apparition de modifications structurelles cardiaques non associées à des manifestations cliniques de l'IC. Elle est retrouvée chez les patients ayant déjà subi un IM par exemple. Elle est asymptomatique contrairement à la phase C qui devient symptomatique de l'IC (fatigue, faible tolérance à l'effort). Enfin, au stade le plus avancé de la pathologie ou phase D, les patients sont réfractaires aux traitements conventionnels et nécessitent une intervention chirurgicale. Indépendamment de l'étiologie de la pathologie menant à la phase B, le remodelage cardiaque induit une modification qualitative des cellules présentes avec une augmentation progressive du nombre de fibroblastes, associé à une hypertrophie des cardiomyocytes et à diminution du nombre de ces cellules par apoptose. Ce remodelage ventriculaire joue un rôle majeur dans l'évolution de l'IC post-infarctus. On s'intéressera exclusivement de cette forme d'IC dans la suite du manuscrit.

1.4.1. Remodelage ventriculaire gauche

Le concept de remodelage ventriculaire fait référence à des modifications de l'architecture ventriculaire à l'origine de changement de poids, de volumes et de forme, de compositions tissulaires et de variables hémodynamiques associés à des altérations métaboliques. En 1985, Pfeffer et al. ont étudié le remodelage ventriculaire gauche suite à un IM induit par ligature coronaire gauche chez le rat [25], et ont mis en évidence la relation entre taille d'infarctus et degré de remodelage [26]. L'IM est à l'origine d'une dilatation ventriculaire et est associée à la progression de la dysfonction systolique, à une augmentation de la mortalité et de la survenue de l'IC, à une augmentation du risque de survenue d'arythmies et une dégradation du pronostic chez les patients présentant un IM [27]. En effet, le remodelage ventriculaire post-IM n'est pas seulement le fait de la zone infarctée (ZI)

mais implique aussi la zone non-infarctée du myocarde et la sévérité des altérations observées est dépendante de la taille de l'infarctus [28].

- Expansion de la ZI

Post-IM, la phase initiale du remodelage ventriculaire se situe au sein même de la zone nécrosée qui devient cicatricielle par la prolifération de fibroblastes et un dépôt de collagène. Ils permettent la formation d'une cicatrice parallèlement à une extension et un amincissement de la région infarctée. Toutefois, ce processus décrit pour la première fois en 1978 [29], ne correspond pas à une augmentation progressive de la taille d'infarctus par nécrose additionnelle de cardiomyocytes hors de la ZI [30]. Il est la conséquence d'une dégradation des faisceaux musculaires et d'une diminution du nombre de cardiomyocytes dans la ZI par nécrose, qui relarguent des protéines intracellulaires à l'origine d'une réponse inflammatoire. Les cellules de l'inflammation, à savoir les neutrophiles, monocytes, macrophages et lymphocytes intègrent alors le tissu et participent à l'élimination des myocytes morts. Secondairement, les fibroblastes prolifèrent et se convertissent en leur forme activée, souvent appelées myofibroblastes, qui sécrètent des niveaux élevés de protéines de la matrice extracellulaire (MEC) et favorisent un environnement profibrotique [31]. Cette conversion est influencée par la production de cytokines profibrotiques tel que le facteur de croissance transformant bêta de type 1 (TGF- β 1), par les myocytes nécrotiques et les macrophages, qui contribue à la transformation phénotypique des fibroblastes interstitiels [32]. Les myofibroblastes cardiaques vont alors produire du collagène de type I et de type III qui sont les composants majeurs de la MEC cardiaque et contribue au développement d'une cicatrice fibreuse résistante à l'étirement et à la rupture [33]. Ce phénomène d'expansion apparaît préférentiellement au niveau de l'apex, partie distale du myocarde où les contraintes appliquées sur la paroi sont importantes (figure 5A) [34].

Ce phénomène d'expansion est responsable de l'augmentation du volume de la cavité à l'origine de l'augmentation du volume sanguin. Ceci est considérée comme une réponse adaptative, puisqu'elle permet le maintien du volume d'éjection et du débit cardiaque [35]. Néanmoins, après cette phase adaptative précoce, le remodelage ventriculaire se caractérise par l'hypertrophie des cardiomyocytes dans la zone non-ischémisée.

- Hypertrophie

En situation physiologique, tel que l'entraînement intensif, il existe une hypertrophie durant laquelle le myocarde croît de manière uniforme. Cette hypertrophie se caractérise par une augmentation de la taille de la chambre ventriculaire et de l'épaisseur pariétale parallèlement à l'épaississement et à l'allongement des myocytes. Elle est réversible et ne prédispose pas au développement de

pathologies. De plus, elle semble activer des mécanismes cellulaires anti-apoptotiques cardioprotecteurs malgré l'augmentation de taille du VG [36].

En revanche, l'hypertrophie cardiaque qui fait suite à l'IM est pathologique. Après la cicatrisation et l'expansion de la ZI, la partie non cicatricielle du VG se remodelle progressivement de manière chronique et irréversible [37]. On parle alors d'hypertrophie excentrique en réponse à une surcharge volumique dans le VG. Les cardiomyocytes présentent une forme allongée induite par une addition de sarcomère en série (figure 5B) [38]. L'apparition de ce type d'hypertrophie permet de maintenir temporairement la fonction cardiaque et de réduire les contraintes pariétales, mais elle est reconnue au long terme comme prédictive d'arythmies, de mort subite, de cardiopathies dilatées ou encore d'IC [39-41].

Le sarcomère correspond à l'unité contractile du cardiomyocyte. Il comporte plusieurs protéines telles que les chaînes lourde et légère de myosine (MHC et MLC), le complexe de troponine ou encore l'actine, qui ont des isoformes multiples dont l'expression est contrôlée de manière spécifique au tissu. Dans l'hypertrophie pathologique post-IM, certains des gènes codant pour ces protéines contractiles sont activés de façon sélective, au niveau de l'épissage alternatif et de la transcription [42]. Cette réponse se caractérise par la ré-expression des isoformes de protéines qui sont habituellement exprimées dans le cœur embryonnaire, mais pas dans le cœur adulte [43, 44]. Ainsi, le stimulus hypertrophique à l'origine de l'augmentation de taille des cardiomyocytes induit une reprogrammation de gènes fœtaux comme l'isoforme β de la chaîne lourde de myosine (β -MHC) et l'actine α du muscle squelettique alors que l'expression des formes adultes est réprimée. Il existe également un shift de l'isoforme α -MHC vers l'isoforme β -MHC à cause d'une diminution d'expression de la myosine-ATPase Ca^{2+} dépendante. Cela entraîne une diminution de la vitesse initiale de raccourcissement des sarcomères mais permet d'en améliorer la contractilité pour une somme de travail donné [42], ce qui suggère une adaptation par le muscle cardiaque suite à l'IM. La réexpression lors de l'hypertrophie ne se limite pas aux protéines procontractiles. Le facteur natriurétique auriculaire (ANF) et le peptide natriurétique de type B (BNP) qui possèdent des propriétés natriurétiques, diurétiques et vasodilatatrices permettant de faire diminuer la pression artérielle [45] sont largement réexprimés en réponse à une surcharge hémodynamique ce qui suggère également une adaptation du myocarde suite à l'IM pour diminuer le stress pariétal [46].

Suite à l'IM, l'hypertrophie des cardiomyocytes entraîne une augmentation de la masse ventriculaire et une dilatation de VG à l'origine d'une modification de sa forme qui devient sphérique (figure 5A) [47, 48]. On parle alors de remodelage ventriculaire excentrique par surcharge volumique. Ces modifications sont associées à une accumulation de collagène au sein même de la zone non-infarctée.

- Fibrose interstitielle

Physiologiquement, une accumulation de collagène interstitiel produit par les fibroblastes du tissu conjonctif apparaît lors du vieillissement du tissu cardiaque [49] mais des conditions pathologiques, tel que l'hypertrophie, sont également à l'origine d'une accumulation interstitielle précoce de collagène dans les zones non infarctées (figure 5A) [50] par l'activation de fibroblastes présents dans le tissu interstitiel. Ce processus fibrotique conduit à une augmentation de la rigidité ventriculaire associée à une dysfonction diastolique [51, 52]. De plus, l'excès de collagène compromet le couplage mécano-électrique des cardiomyocytes, réduisant ainsi la contraction cardiaque et augmentant le risque d'arythmies et de mortalité [53, 54]. En outre, l'inflammation et la fibrose dans les régions périvasculaires peuvent diminuer la disponibilité des tissus à l'oxygène et aux nutriments et augmenter la réponse au remodelage pathologique [55]. La fibrose cardiaque provoque donc des changements pathologiques qui aboutissent eux aussi à la dilatation de la chambre ventriculaire, à l'hypertrophie des cardiomyocytes et à l'apoptose/nécrose, et contribuent au développement d'une IC [56-58].

- Apoptose

Finalement, le remodelage ventriculaire est caractérisé par un déclin progressif du nombre de cardiomyocytes présent dans le myocarde hors de la ZI [59], qui semblent très sensibles à l'apoptose [60]. De nombreuses études ont mis en évidence une augmentation graduelle du niveau d'apoptose plusieurs semaines post-IM [61, 62] qui semble prédictive de la sévérité du remodelage pathologique (augmentation de la dilatation, amincissement des parois) et de l'apparition de l'IC [63]. Aux stades les plus sévères du remodelage post-IM, une dilatation et une apoptose du VD sont également observées et sont associées à un mauvais pronostic. On parle alors d'un remodelage bi-ventriculaire [64]. Les mécanismes cellulaires à l'origine d'un signal pro-apoptotique dans les cardiomyocytes sains ne sont pas clairs. De nombreuses études ont mis en évidence une augmentation de l'expression de la caspase-3 lors du remodelage ventriculaire [65-67]. C'est une protéase à cystéine de la famille des caspases impliquée dans la perte de contractilité des cardiomyocytes par clivage de protéines du sarcomère et dans la mort cellulaire par fragmentation de l'ADN. L'apoptose se différencie des autres types de morts cellulaires dites « accidentelles » en réponse à des toxines ou à l'ischémie par exemple, qui sont souvent classifiées sous le terme de nécrose cellulaire [68]. Alors que l'apoptose est le fait d'une fragmentation de l'ADN suite à une activation de caspases ou un clivage protéique, la nécrose est le fait d'une rupture membranaire à l'origine d'une libération du contenu cytoplasmique dans l'espace intercellulaire. Cette rupture membranaire est due à une perte du gradient transmembranaire ou à une déplétion en ATP [69]. Ainsi, il faut distinguer la nécrose de la ZI à

l'origine de l'IM et l'apoptose des zones non-ischémisées qui vont contribuer au remodelage ventriculaire et à la progression de l'IC.

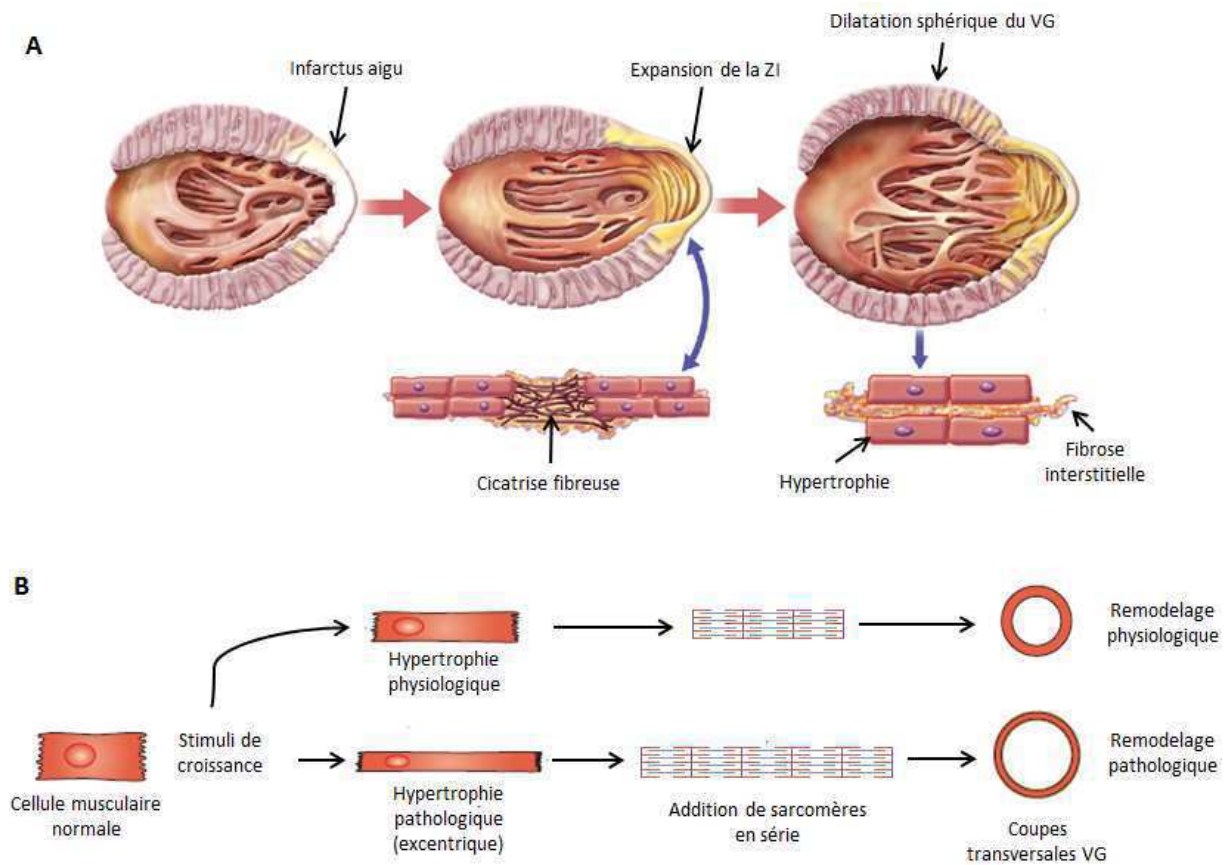


Figure 5. Représentation schématique du remodelage ventriculaire post-IM.

A : La phase précoce est caractérisée par l'amincissement et l'expansion de la cicatrice fibreuse. La dilatation ultérieure induit une modification architecturale du VG associée à une hypertrophie cardiomyocytaire et une fibrose interstitielle. **B :** L'IM est responsable d'une modification phénotypique des cardiomyocytes qui s'hypertrophient (augmentation de longueur) par une addition en série de sarcomères à l'origine d'une augmentation des dimensions de la chambre ventriculaire visible sur une coupe transversale du VG. ZI : zone infarctée ; VG : ventricule gauche. D'après Konstam *et al.* 2011 et Hartupée *et al.* 2016

Associé au remodelage ventriculaire, des altérations de la contraction et de la relaxation cardiaques apparaissent et sont générées par des modifications de nombreuses voies de signalisations cellulaires, des modifications des flux ioniques intracellulaires ou encore de l'activité de protéines contractiles. Ces altérations représentent la première cause à l'origine d'une dysfonction cardiaque suite à l'ischémie myocardique et participent à la progression de l'IC. Nous nous intéresserons ici aux mécanismes responsables de la dysfonction contractile cardiaque post-IM : l'altération du couplage excitation-contraction (CEC) et de la signalisation sympathique cardiaque.

1.4.2. Dysfonction contractile

- Couplage excitation-contraction

Le couplage excitation-contraction (CEC) intervient dans les cardiomyocytes suite à la dépolarisation membranaire. Il correspond à une libération massive de Ca^{2+} du RS vers le cytosol par les récepteurs à la ryanodine (RyRs) qui va permettre la contraction par liaison du Ca^{2+} à la troponine. En condition physiologique, la dépolarisation membranaire active les canaux calciques de type L (LTCC) qui entraîne l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule et qui active à son tour les RyRs. Suite à la systole, le Ca^{2+} cytosolique est éliminé du cytosol pour permettre la relaxation des cardiomyocytes. Ce processus de recapture se fait à l'aide de 4 transporteurs calciques : 1) la pompe calcique ATP-dépendante du RS SERCA2 qui recapte jusqu'à 70% du Ca^{2+} cytosolique, 2) l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCE) qui excrète environ 30 % du Ca^{2+} cytosolique, 3) la pompe $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPase}$ membranaire et 4) le transporteur de Ca^{2+} mitochondrial (environ 1% du Ca^{2+} recapté) (figure 6) [70]. Ainsi, la recapture du calcium cytosolique est largement dépendante de SERCA2 et de NCE.

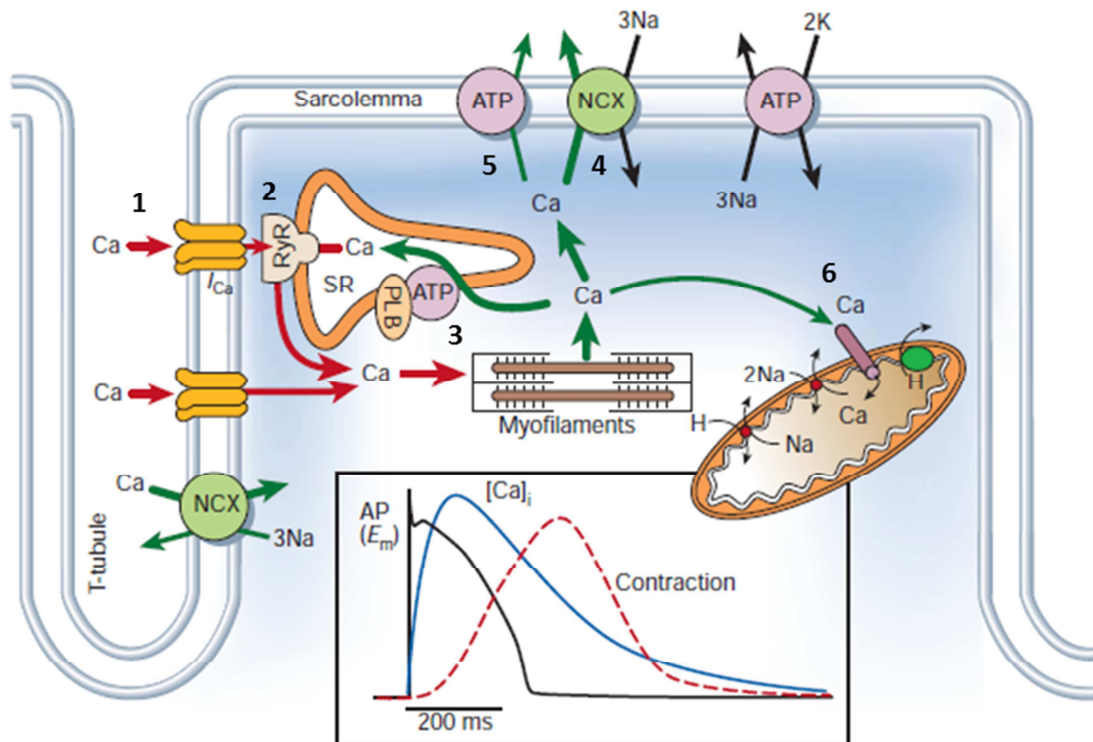


Figure 6. Flux calciques dans le cardiomyocyte lors du couplage excitation-contraction (CEC).

1 : Entrée du Ca^{2+} dans la cellule cardiaque via les LTCC suite à la dépolarisation membranaire. **2 :** libération massive de Ca^{2+} sarcoplasmique par le RyRs par un phénomène appelé « libération de Ca^{2+} par le Ca^{2+} » ou « Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release ». Suite à la systole, le Ca^{2+} se dissocie de la troponine C pour ensuite être recapturé par 4 transporteurs. **3 :** SERCA2 à la membrane du RS, **4 :** NCE, **5 :** la pompe $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPase}$ membranaire et **6 :** le transporteur de Ca^{2+} mitochondrial. D'après Bers *et al.* 2002

Post-IM, le CEC est altéré, conduisant à des dysfonctions diastoliques et systoliques. En effet, l'expression ou l'activité de SERCA2 diminue alors que celle de NCE reste stable ou augmente selon le modèle étudié [71, 72]. Il existe alors un défaut de recapture du Ca^{2+} cytosolique par le RS, induisant ainsi une surcharge calcique dans le cytosol et une altération de la relaxation [71]. Le CEC peut également être perturbé par une diminution de l'expression ou de la phosphorylation des LTCC membranaires [73]. Enfin, la phosphorylation des RyRs est augmentée post-IM et est responsable de leurs ouvertures et d'une fuite du Ca^{2+} sarcoplasmique, favorisant également la surcharge calcique cytosolique et la dysfonction diastolique [74]. De plus, la dérégulation du CEC est également responsable d'une dysfonction systolique. En effet, la concentration cytosolique de Ca^{2+} nécessaire à la contraction (transitoire calcique) augmente moins rapidement qu'en condition physiologique et diminue ainsi la fonction systolique. Ces facteurs, associés à l'incapacité d'augmenter le contenu sarcoplasmique en Ca^{2+} à une fréquence cardiaque plus élevée contribue à une relation force-fréquence négative caractéristique de l'IC [75].

Le CEC est modulé par de nombreux facteurs responsables d'une activation des voies de signalisations intracellulaires. Ainsi, les concentrations cytosoliques de Ca^{2+} sont largement dépendantes de la stimulation sympathique cardiaque. En effet, le système nerveux sympathique (SNS) possède de nombreuses fonctions au niveau cardiaque, telles que l'augmentation de la fréquence cardiaque et de la contractilité. Il est le médiateur principal des réponses chronotropes et inotropes positives à un stress et permet ainsi de maintenir un débit cardiaque constant pour répondre aux besoins de l'organisme. Ce processus implique la stimulation des récepteurs adrénergiques de type bêta (RA- β s).

- Activité sympathique cardiaque

L'activation du SNS dans le système CV se traduit par la libération de 2 catécholamines qui régulent ces effets : la noradrénaline (NA) et l'adrénaline (A). La NA libérée par les terminaisons nerveuses sympathiques cardiaques est à l'origine d'une tachycardie et d'une augmentation de la contractilité myocardique. La libération d'A, qui est synthétisée au niveau médullaire de la glande surrénale et est libérée dans la circulation, permet également de stimuler le système CV [76]. Ces catécholamines vont alors se lier à aux RA- β s au niveau cardiaque qui appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).

Les RA- β s sont divisés en 3 sous-types différents : les récepteurs β 1 (RA- β 1), β 2 (RA- β 2) et β 3 (RA- β 3) qui sont exprimés de manière variable au niveau cardiaque. La stimulation des récepteurs β 1 et β 2 augmente la contractilité myocardique (effet inotrope positif), la fréquence cardiaque (effet chronotrope positif) et la vitesse de relaxation cardiaque (effet lusitrope positif) [77]. Le RA- β 1 est le plus exprimé et constitue 75 à 80% des RA- β cardiaques [78]. De plus, il possède une affinité 10 à 30

fois supérieure à la NA par rapport au RA- β 2, et sa localisation dans le sarcolemme des cardiomyocytes à proximité des terminaisons nerveuses sympathiques lui permet d'être exposé à des concentrations catécholaminergiques supérieures [79]. Ainsi, lors d'une fonction cardiaque normale, le RA- β 1 a des effets supérieurs au RA- β 2. Finalement, le RA- β 3 est principalement exprimé dans le tissu adipeux et son action au niveau cardiaque est mal connue. Il est inactif dans des conditions physiologiques normales et semble avoir un effet inotrope négatif lors de stimulations adrénérgiques intenses [80].

L'activation des récepteurs β 1 et β 2 au niveau cardiaque représente le mécanisme physiologique prioritaire d'amélioration de la fonction cardiaque en réponse aux besoins métaboliques et énergétiques de l'organisme. L'activation sympathique est alors amplifiée grâce à la libération de catécholamines qui permettent d'augmenter la fréquence cardiaque et la contractilité myocardique (figure 7) [77] par la stimulation β -adrénérgique, et l'activation de la voie « classique » de stimulation adrénérgique via le couplage du récepteur à une protéine G. C'est une protéine hétérotrimérique ubiquitaire pourvue de 3 sous-unités α , β et γ qui vont réguler l'activation des RA- β s à ses effecteurs membranaires. Le récepteur β 1 est couplé à la protéine G « stimulatrice » (G_s) et est à l'origine de la plupart des effets physiologiques médiés par les RA- β dans le cœur, alors que le RA- β 2 peut se coupler à la fois à G_s et à G « inhibitrice » (G_i) suivant l'état physiopathologique de la cellule [81].

Lors de l'activation des RA- β s, la sous-unité α , qui possède une grande affinité pour la guanosine triphosphate (GTP), un coenzyme donneur de phosphates, se lie à la GTP et se dissocie des sous-unités β et γ . La sous-unité α stimulatrice ($G_{\alpha s}$) active ainsi une enzyme effectrice, l'adénylate-cyclase (AC), qui est responsable de la production d'un second messager : l'AMP cyclique (AMPC) à partir d'ATP. L'AMPC produit est capable à son tour d'activer des protéines à activité tyrosine kinase comme la protéine kinase A-AMPC dépendante (PKA) qui va initier un grand nombre de voies de signalisations cellulaires par phosphorylations, participant ainsi à la signalisation calcique. La PKA ainsi activé va phosphoryler le PLB et la Troponine I, qui vont avoir des effets inotropes et lusitropes positifs (figure 7) [82-84]. La sous-unité α inhibitrice ($G_{\alpha i}$), quant à elle, à une fonction opposée réduisant l'activité de l'AC, atténuant la production d'AMPC et l'activation de la PKA [81, 85].

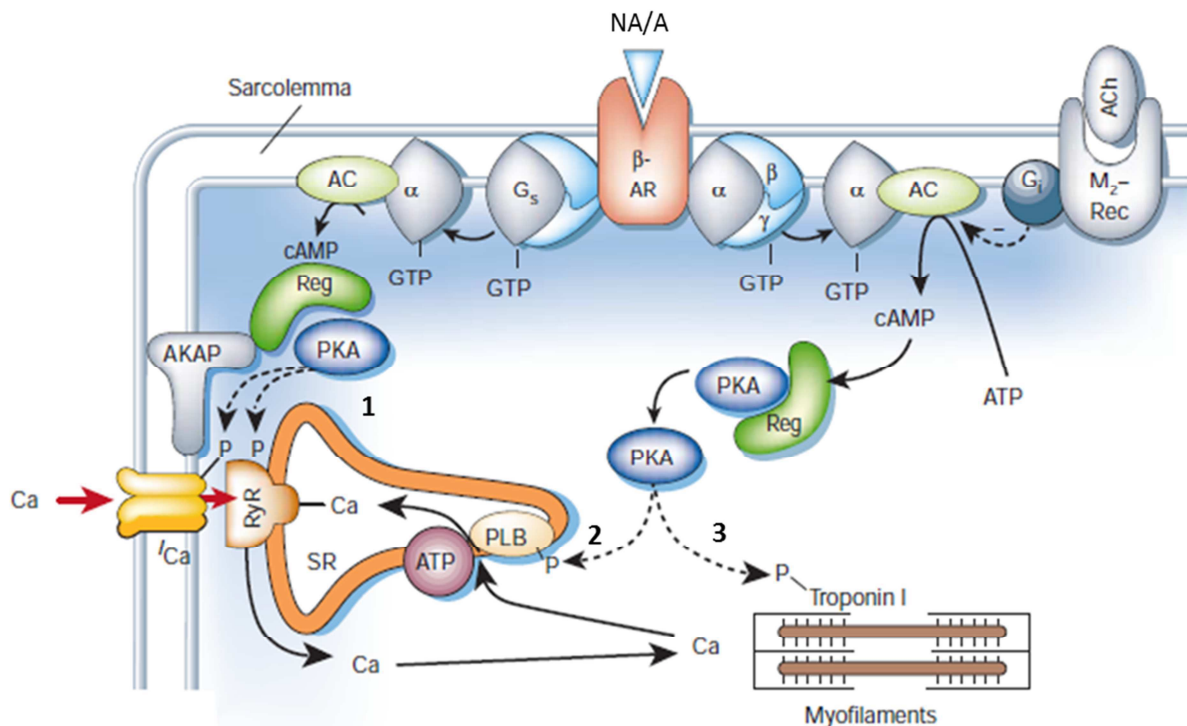


Figure 7. La stimulation sympathique cardiaque améliore la fonction cardiaque.

L'AMPc active la PKA qui initie un grand nombre de voies de signalisations cellulaires par phosphorylation **1** : des LTCC et des RyRs qui vont conduire à l'accumulation de Ca^{2+} intracellulaire. **2** : du phospholamban (PLB) qui permet d'augmenter la recapture de Ca^{2+} par le RE grâce à SERCA2 et améliorer la relaxation cardiaque. **3** : de la troponine I et de MHC, qui réduit la sensibilité des myofilaments au Ca^{2+} et accélère la myorelaxation ou encore du phospholemman (PLM), une sous-unité de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$, diminuant ainsi son influence. D'après Bers *et al.* 2002

- Rôle de GRK2 dans le lien entre fonction contractile et métabolisme cardiaque

En conditions physiologiques, un des mécanismes adaptatifs important des RCPG est leur capacité de désensibilisation afin d'être disponibles pour une stimulation ultérieure. Ainsi, la PKA peut phosphoryler les RA- β s, ce qui entraîne une désensibilisation partielle des récepteurs par découplage avec les protéines G [86]. Les RA- β s peuvent aussi être régulé négativement par une diminution de l'expression génique et protéique à l'origine d'une diminution du nombre de récepteurs dans la cellule. Enfin, cette désensibilisation peut faire intervenir des kinases de la famille des RCPG, les GRKs (*GPCR kinase family*). Ce sont des protéines cytosoliques qui sont transloquées aux RA- β s lorsqu'elles sont activées. L'isoforme prédominante des GRK au niveau cardiaque est GRK2 qui est localisé dans les membranes des sarcolemmes pour interagir avec les RA- β s [87]. Elle possède une activité sérine/thréonine kinase qui reconnaît le RCPG sous sa forme activée par un ligand (catécholamine), le phosphoryle et déclenche le processus de désensibilisation marqué par la perte d'affinité du RCPG avec la protéine G [88]. Après phosphorylation par GRK2, une protéine cytosolique, la β -arrestine se

lie au récepteur phosphorylé et participe au phénomène de désensibilisation par découplage des RA- β s avec la protéine G [89]. De plus, les récepteurs membranaires liés à la β -arrestine sont internalisés et dégradés, participant également au phénomène de désensibilisation [90].

Post-IM, l'activation du SNS qui permet de préserver un débit cardiaque normal via l'augmentation de la contractilité myocardique participe à la dysfonction systolique. Ce mécanisme compensatoire initialement adaptatif entraîne alors des modifications morphologiques et fonctionnelles. L'expression génique et protéique de RA- β 1 est diminuée. Sa densité au niveau membranaire est également réduite de l'ordre de 50% alors que celle de RA- β 2 n'est pas modifiée. Ainsi, le ratio RA- β 1/ β 2 évolue de 80:20 dans un cœur sain à environ 60:40 dans un cœur IC. Cette régulation négative de RA- β 1 s'accompagne d'une diminution de la signalisation RA- β 2- $G_{\alpha s}$ au profit de RA- β 2- $G_{\alpha i}$ [91]. Parallèlement, l'expression de GRK2 est augmentée précocement post-IM dans le cœur hypertrophique et semble précéder les altérations de la signalisation β -adrénergique et les altérations fonctionnelles [92]. Ainsi, bien que le mécanisme de désensibilisation via GRK2 soit adaptatif dans un premier temps afin de compenser la stimulation accrue de catécholamines, la stimulation prolongée du SNS est à l'origine d'un excès de GRK2 qui provoque une dérégulation du système β -adrénergique, entraînant la perte de la réserve inotrope cardiaque et contribuant ainsi à l'IC [93]. Ces mécanismes sont décrits dans la figure 8.

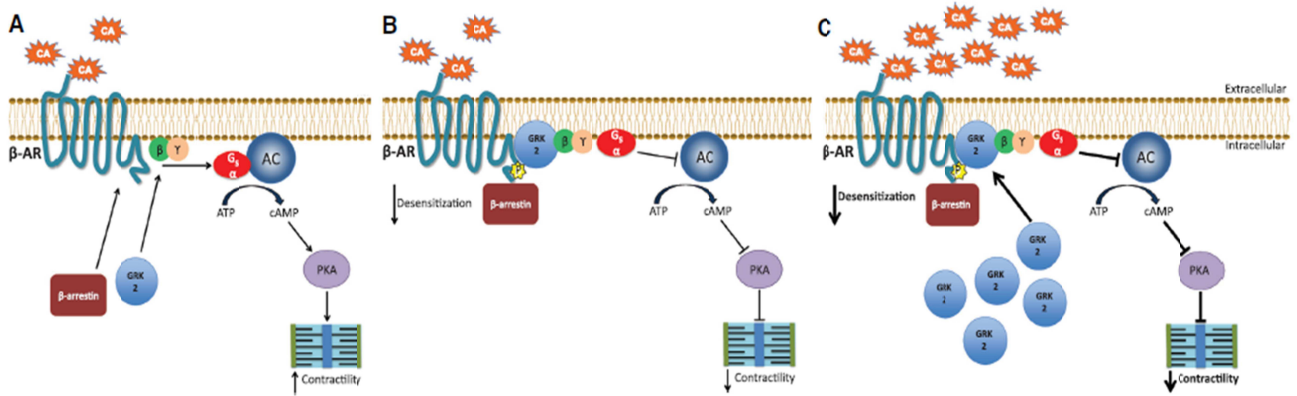


Figure 8. Mécanisme physiopathologique d'activation de la signalisation β -adrénergique conduisant au phénomène de désensibilisation cardiaque.

A. En condition physiologique, la stimulation du RA- β par les catécholamines active un certain nombre d'effecteurs intracellulaire tels que G_{as} qui améliore la contractilité myocardique via l'activation de l'AC et de la PKA. **B.** Parallèlement, l'activation β -adrénergique induit la translocation de GRK2 cytosolique à la membrane. GRK2 se lie alors aux sous-unités $G_{\beta\gamma}$ et phosphoryle le RA- β , ce qui entraîne le découplage du récepteur avec la protéine G. La phosphorylation du récepteur est également responsable du recrutement de la β -arrestine qui provoque l'internalisation et la dégradation du récepteur. **C.** En situation pathologique, les concentrations cytosoliques de GRK2 sont augmentées en réponse à l'activation prolongée des RA- β s par une production accrue de catécholamines. Initialement, cette surexpression de GRK2 sert à prévenir d'une sur-stimulation adrénergique mais elle conduit à terme à une activation chronique du processus de désensibilisation responsable de la progression de l'insuffisance cardiaque. Woodal *et al.* 2014

La pathologie ischémique est donc un processus physiopathologique complexe responsable de l'activation d'un grand nombre de mécanismes cellulaires et moléculaires compensatoires nécessaires au maintien d'une fonction cardiaque normale, parmi lesquelles le remodelage ventriculaire et l'activation sympathique qui assurent une perfusion tissulaire périphérique homogène. Le développement de l'IC est graduel et résulte d'une altération de ces mécanismes qui évoluent progressivement d'un phénotype compensatoire vers un phénotype pathologique difficile à diagnostiquer. La compréhension de ces mécanismes physiopathologiques dans le développement de l'IC demeure un domaine de recherche de premier ordre, non seulement en raison de leurs complexités, mais également en raison de son importance clinique pour la compréhension de nouvelles approches thérapeutiques.

Ainsi, malgré des avancées considérables dans la compréhension et le traitement de la pathologie ischémique, elle reste la maladie la plus fréquente dans les pays industrialisés et les projections prévoient une progression de la prévalence de 18% d'ici 2030 [5]. Outre la prise en charge des facteurs de risque traditionnels, il apparaît également nécessaire de considérer l'ensemble des comorbidités qui pourraient contribuer au développement et à la progression de l'ischémie myocardique telles que l'obésité, le diabète, l'hypertension artérielle, le tabagisme, l'âge ou encore la présence de troubles respiratoires du sommeil (TRS) sachant que l'addition de plusieurs de ces facteurs de risque potentialise le risque de survenue d'IM. Les TRS semblent jouer un rôle majeur durant la phase précoce post-IM lorsque le myocarde est dans un état vulnérable et semblent notamment responsables de dysfonctions endothéliales et de désaturations artérielles responsables d'apports en oxygène myocardique insuffisants [94]. Ils sont caractérisés par une altération de la respiration lors du sommeil à l'origine d'évènements respiratoires variables, allant du simple ronflement à la survenue d'apnées répétées et sont régulièrement associés à la pathologie ischémique. Ainsi, 2 types majeurs de TRS sont retrouvés chez les patients atteints d'ischémie myocardique : le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) et le syndrome d'apnées centrales du sommeil (SACS) [95]. Ces 2 pathologies se caractérisent par des apnées nocturnes à l'origine d'une fragmentation du sommeil et d'une hypoxémie ou d'une HI. Contrairement au SAOS, le SACS n'entraîne pas d'obstruction des voies aériennes supérieures et d'efforts respiratoires durant le sommeil. En revanche, ces deux pathologies sont reconnues comme des facteurs de risques CVs indépendants, responsables d'une augmentation du nombre d'évènements CVs et de leur sévérité [5]. Dans la suite de ce manuscrit je m'intéresserai uniquement au SAOS et je détaillerai son rôle dans les conséquences CVs et les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la progression de la maladie ischémique.

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

Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) représente 84% des diagnostics d'apnées du sommeil et, en 2007, l'organisation mondiale de la santé (OMS) estimait à plus de 100 millions le nombre d'adultes touchés [96]. Il est considéré comme un problème majeur de santé publique à cause de sa prévalence élevée et des effets délétères sur la santé qui incluent notamment une somnolence diurne, des déficiences cognitives et une augmentation de la morbi-mortalité CV.

2.1. Généralités sur le SAOS

2.1.1. Prévalence/épidémiologie

La prévalence du SAOS reste très largement sous-évaluée. Les personnes diagnostiquées sont en général celles présentant un SAOS sévère avec d'importants symptômes. De manière générale, la prévalence du SAOS est de 13% chez les hommes et de 6% chez les femmes âgés de 30 à 70 ans [97]. Cette prévalence augmente linéairement avec l'âge et peut atteindre 55% selon le groupe étudié (figure 9). C'est une pathologie avec une répercussion mondiale qui est influencée par de nombreux facteurs environnementaux :

L'âge. Le SAOS peut se déclarer à tous les âges mais l'âge moyen de diagnostic se situe entre 40 et 50 ans [98]. L'âge influe sur la prévalence du SAOS comme vu précédemment jusqu'à atteindre un plateau aux alentours de 65 ans.

Le genre. Il existe une forte prédominance du SAOS chez les hommes qui sont environ 2 fois plus affectés par le SAOS que les femmes avant ménopause [99]. Cette disparité n'est pas complètement élucidée, cependant elle semble due aux influences hormonales sur le contrôle de la respiration et l'activation des muscles des VAS durant le sommeil, et la distribution des graisses spécifique au sexe. Post-ménopause, la prévalence du SAOS augmente chez les femmes, principalement par une redistribution des graisses dans la partie haute du corps, incluant le cou [100].

L'obésité. C'est le principal facteur de risque de développer un SAOS. Son incidence augmente progressivement avec l'augmentation de l'indice de masse corporelle (IMC) et de l'accumulation de graisse autour du cou qui entraîne une diminution du diamètre des voies aériennes supérieures (VAS). D'après cette relation de causalité, le plus grand pourcentage de SAOS est trouvé dans les pays présentant une prévalence de l'obésité élevée (Brésil, USA) [4].

Tabac et consommation d'alcool. Des études épidémiologiques ont mis en évidence une association entre consommation de cigarettes et prévalence du SAOS. La fumée de cigarette est à l'origine d'une inflammation des VAS et augmente la collapsibilité pharyngée pendant le sommeil. L'ingestion

d'alcool est également responsable d'une augmentation de la collapsibilité des VAS qui augmente le risque de survenue d'apnées durant le sommeil et aggrave celles déjà présentes [101].

Phénomène de « Fluide shift ». Bien que l'obésité soit un facteur de risque pour le SAOS, 60% des patients SAOS ne sont pas obèses. Des études observationnelles chez ces patients ont ainsi montré une augmentation de la prévalence du SAOS chez les populations présentant des œdèmes, tels que les insuffisants cardiaques ou rénaux malgré un poids normal [102]. Ainsi, la rétention hydrosodée semble augmenter le risque de développer un SAOS. Lors du passage de la position allongée à la position verticale, la pression hydrostatique dans les capillaires des jambes dépasse celle du compartiment interstitiel en raison des effets gravitationnels et cela provoque une filtration de liquide des capillaires vers l'espace interstitiel. Il existe ainsi un mouvement de fluide des espaces intravasculaires vers les espaces extravasculaires des jambes à l'origine d'œdèmes des membres inférieurs. Lors du retour en position couché, la pression hydrostatique dans les jambes diminue et le liquide interstitiel retourne dans l'espace intravasculaire et est redistribué rostralement. Il en résulte une diminution du volume de liquide interstitiel des jambes et une augmentation correspondante du volume plasmatique. Ce mouvement de « fluide shift » se produit rapidement, entre 30 et 60 minutes de sommeil suivi d'une décroissance exponentielle. Chez les patients SAOS, cette redistribution rostrale de fluide est associée à une augmentation de la circonférence du cou allant jusqu'à 1 cm, ce qui indique une accumulation de liquide autour du cou responsable d'une diminution du diamètre des VAS [103].

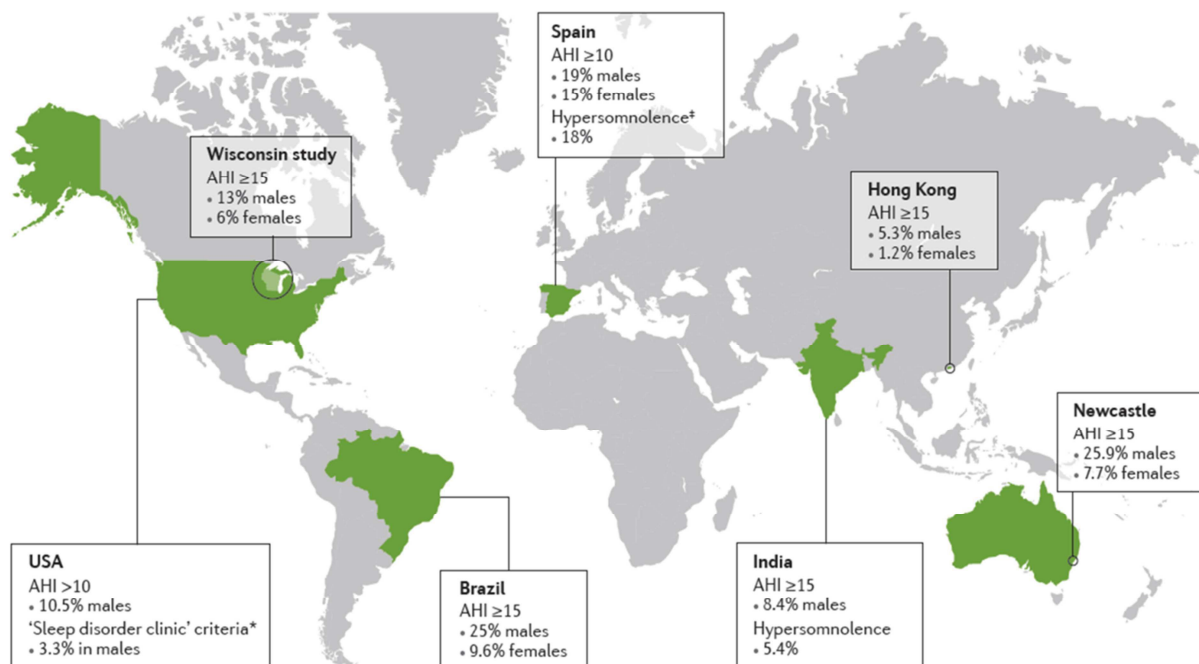


Figure 9. Prévalence du syndrome d'apnées obstructives du sommeil. Lévy *et al.* 2015 [4]

Certaines pathologies sont également responsables d'une augmentation du risque de développer un SAOS comme l'hypothyroïdie ou le syndrome des ovaires polykystiques [4, 101]. Finalement, la multiplication de ces facteurs et l'augmentation de la prévalence de certains d'entre eux tels que le surpoids et l'obésité semblent responsable d'une augmentation de la prévalence du SAOS de 14% à 55% durant les 20 dernières années [4].

2.1.2. Physiopathologie

Le SAOS se caractérise par la survenue répétitive, au cours du sommeil, de collapsus pharyngés. La physiopathologie du SAOS est multifactorielle et de nombreux paramètres morphologiques, anatomiques, neurologiques et hormonaux sont responsables de la diminution des dimensions des VAS [4]. Ces collapsus pharyngés sont à l'origine d'un arrêt (apnée) ou d'une diminution (hypopnée) de la ventilation. L'apnée obstructive est définie par une obstruction de plus de 90% du débit aérien durant au moins 10 secondes avec des mouvements respiratoires persistants. L'hypopnée est caractérisée par une réduction d'au moins 30% du débit aérien accompagnée d'une désaturation en oxygène de plus de 3% (figure 10) [4].

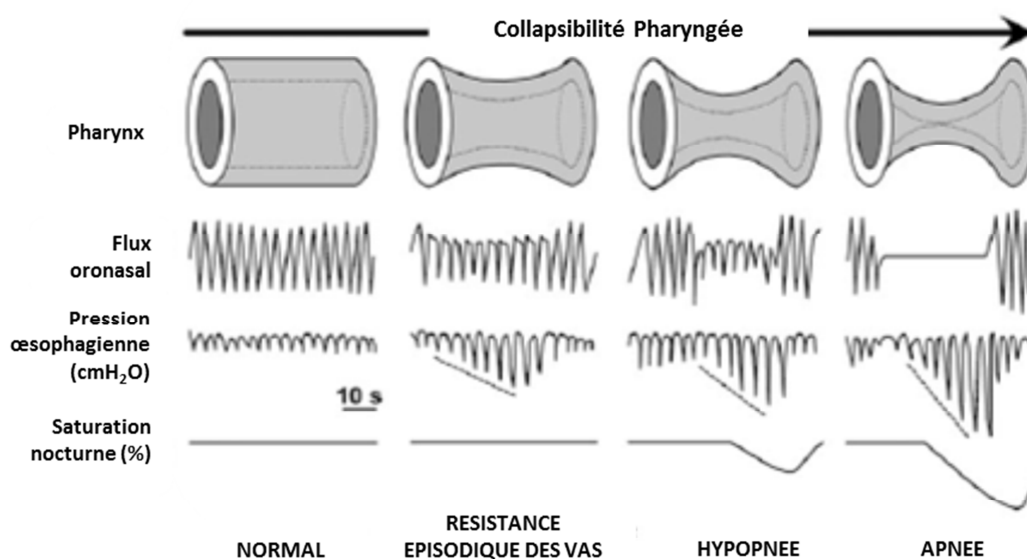


Figure 10. Représentation des différents stades de sévérités des évènements respiratoires selon la collapsibilité pharyngée, le flux oronasal, la pression œsophagienne représentant les efforts respiratoires et la désaturation artérielle nocturne. VAS : voies aériennes supérieures. D'après Dematteis *et al.* 2009

2.1.3.Diagnostic

La principale manifestation clinique du SAOS est la somnolence diurne excessive liée à la perturbation du sommeil induite par les apnées répétées. Cette somnolence peut être associée à d'autres symptômes comme les ronflements, causés par l'augmentation de la résistance des VAS, les céphalées au réveil, une asthénie chronique, des troubles de la mémoire et de la concentration, une baisse des performances intellectuelles, physiques et sexuelles, des troubles de l'humeur et du comportement, ou encore la présence de pathologies CVs et/ou métaboliques associées.

Ainsi, la multiplication des symptômes et leurs possibles associations à des comorbidités font du SAOS une pathologie difficile à diagnostiquer. L'examen diagnostique de référence lorsqu'un SAOS est suspecté est la polysomnographie qui permet de valider la survenue d'apnées ou d'hypopnées pendant le sommeil. De nombreux paramètres sont enregistrés lors de cet examen : l'électroencéphalogramme (EEG), l'électromyogramme (EMG) des jambes et du menton, la saturation artérielle en oxygène, les mouvements respiratoires grâce à des ceintures d'impédance (thorax et abdomen), la fréquence cardiaque et la pression artérielle. Comme on peut le voir sur la figure 11, chaque apnée s'accompagne d'un signe d'éveil (EEG) à la reprise de la ventilation responsable d'une fragmentation du sommeil ; de mouvements (EMG) ; de cycles de désaturation-resaturation artérielle en oxygène qui traduisent une HI ; d'une amplification des mouvements respiratoires pour lutter contre l'obstruction responsable de variations des pressions intrathoraciques ; de ronflements et d'une élévation de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle (figure 11) [104].

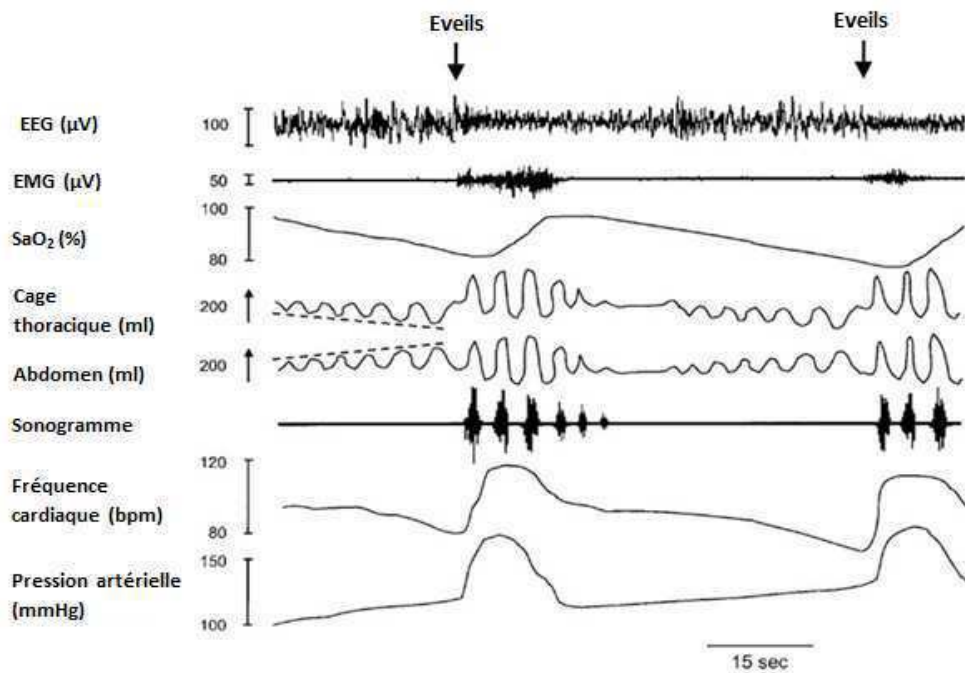


Figure 11. Tracé d'enregistrement polysomnographique illustrant la fragmentation du sommeil, la fluctuation de la saturation en O₂ (SaO₂), l'augmentation des efforts respiratoires thoraco-abdominaux et les modifications de la pression artérielle à chaque épisode d'apnée. EEG : électroencéphalogramme, EMG : électromyogramme. D'après Thomson *et al.* 2001

Le SAOS se définit par l'association de signes cliniques et d'anomalies respiratoires nocturnes en nombre supérieur à 5 par heure de sommeil (Tableau 1). Ainsi le diagnostic du SAOS est posé lorsque le critère A et/ou le critère B sont présents en association avec le critère C. Quant à sa sévérité, elle dépend du nombre d'apnées par heure de sommeil répertoriées selon l'index d'apnées hypopnées (IAH). Selon la valeur de l'IAH, le SAOS est considérée comme léger (IAH<15/h), modéré (15<IAH<30/h) ou sévère (IAH>30/h) (Tableau 1).

Diagnostic du SAOS : Présence des critères A ou B et du critère C

- A. Somnolence diurne excessive non expliquée par d'autres facteurs
 - B. Deux au moins des critères suivants non expliqués par d'autres facteurs
 - ronflements sévères et quotidiens
 - sensations d'étouffement ou de suffocation pendant le sommeil
 - sommeil non réparateur
 - fatigue diurne
 - difficultés de concentration,
 - nycturie (plus d'unemiction par nuit)
 - C. Critères polysomnographiques: plus de 5 évènements obstructifs (apnées + hypopnées) par heure de sommeil (index d'apnées hypopnées [IAH] > 5)
-

Tableau 1. Critères de diagnostic du SAOS, d'après la Revue des Maladies Respiratoires, 2010

2.2. Traitements actuels du SAOS

Le traitement du SAOS permet d'atténuer les symptômes et d'améliorer la qualité de vie des patients traités. Ainsi, le type de traitement proposé aux patients SAOS doit être adapté à la sévérité de la pathologie et des co-morbidités associées. La modification des règles hygiéno-diététiques reste le moyen le plus sûr de prévenir ou de réduire un SAOS : perte de poids, arrêt de la consommation de tabac et d'alcool, exercice. Il existe également des traitements alternatifs comme la chirurgie qui est recommandée chez les sujets jeunes non obèses présentant des anomalies craniofaciales. Cependant, le traitement de référence reste l'application d'une pression positive continue (PPC).

2.2.1. Perte de poids

Comme énoncé précédemment, l'obésité est un facteur augmentant le risque de survenue de SAOS et de sa prévalence [105]. De récentes études ont montré qu'une amélioration du mode de vie (régime alimentaire et/ou exercice physique) réduit d'une part l'obésité mais également la sévérité du SAOS en diminuant l'IAH [106]. Plusieurs travaux ont montré une réduction substantielle du SAOS suite à une réduction importante de poids [107, 108] et l'association à la PPC va accroître la diminution de la pression artérielle, de la résistance à l'insuline et du taux de triglycérides [109]. Cependant cette approche thérapeutique reste limitée aux seuls patients apnéiques présentant un surpoids ou une obésité et est soumise à une tolérance limitée à cause de régimes difficiles à mettre en œuvre. De plus, peu de données montrent l'efficacité des stratégies de réduction de poids pour réduire le SAOS sur le long terme.

2.2.2. Traitements chirurgicaux et mécaniques

La chirurgie la plus couramment utilisée est l'uvulo-palato-pharyngoplastie qui consiste en la résection des tissus mous de la gorge tels que la luette, les amygdales et d'une partie du palais élargissant ainsi le diamètre des VAS au niveau du pharynx [110]. Cette procédure chirurgicale est réservée aux patients SAOS présentant un rétrécissement rétropalatal. Cependant son efficacité semble décroître dans le temps et il existe d'importants biais de sélection des patients candidats à cette chirurgie [111]. Il existe également une chirurgie maxillofaciale pour les patients présentant une dysmorphie craniofaciale qui permet de réduire significativement les IAH, principalement chez les sujets jeunes, non-obèses et avec un avancement maxillofacial marqué [112]. Elle n'en demeure pas moins une chirurgie complexe qui peut causer des paralysies faciales [4].

Le traitement mécanique de référence est l'orthèse d'avancée mandibulaire qui est une prothèse permettant d'avancer la mandibule et de retenir la langue afin de maintenir l'ouverture des VAS. Ce

traitement s'avère efficace pour les SAOS légers à modérés et permet de réduire l'IAH chez les utilisateurs. La compliance de ce traitement est importante à court terme, cependant sa tolérance à long terme est mal connue et son efficacité sur la correction des évènements respiratoires et la fragmentation du sommeil reste moins bonne que la PPC [113].

2.2.3. Pression positive continue ou PPC

Le traitement de référence du SAOS est l'application d'une PPC qui diminue de manière substantielle le nombre et la sévérité des évènements respiratoires au cours du sommeil. Brièvement, l'appareil de PPC est constitué de 3 parties : un masque qui recouvre soit le nez, soit le nez et la bouche, un système de tuyaux à basse résistance reliant le masque à une machine générant des flux d'airs permettant de maintenir les VAS ouvertes. La PPC réduit voire supprime les anomalies respiratoires et normalise les valeurs de saturation en oxygène. Des études randomisées ont permis de mettre en évidence son rôle dans l'amélioration du sommeil et des performances cognitives [110]. Concernant le risque CV associé au SAOS, des études montrent que la PPC permet de diminuer la pression artérielle des patients [114, 115] et que cette diminution ne dépend pas de la sévérité du SAOS. Cependant, une méta-analyse d'essais randomisés atteste de la diminution de la pression artérielle mais ne montre aucun effet significatif de la PPC sur le risque d'évènements CVs et de mortalité [116]. De même, la récente étude internationale SAVE, incluant plus de 2700 patients, a montré que la PPC ne permettait pas de prévenir la survenue d'évènements CVs associés au SAOS [117]. Cependant, l'observance au traitement n'était que de 3,3h/nuit dans cette étude, ce qui pourrait expliquer les résultats négatifs. En effet, l'efficacité de la PPC semble étroitement liée à son observance. Les patients sont considérés comme compliant au traitement dès lors qu'ils l'utilisent au moins 5 fois par semaine et ce pendant une durée minimum de 4h par nuit. Pour des raisons de mauvaise tolérance (assèchement de la muqueuse oropharyngée, bruit, irritation locale liée au port du masque) et de par l'aspect contraignant lié au port du masque, de nombreuses études ont relevé une mauvaise compliance et une utilisation irrégulière de la PPC au long terme [118, 119].

Des stratégies incluant l'association de la PPC avec un humidificateur d'air ou la prescription de décongestionnants permettent aujourd'hui de limiter la sécheresse et l'irritation du nez ou de la gorge et ainsi améliorer l'adhérence des patients au traitement. Il apparaît également nécessaire aujourd'hui de combiner la PPC à d'autres stratégies thérapeutiques (perte de poids, hypotenseurs, sevrage tabagique) afin de potentialiser les effets de ce traitement sur la santé CV et métabolique associés au SAOS [4].

Ainsi, le SAOS est une pathologie multifactorielle complexe associée à des degrés de gravité (i.e. le nombre et le type d'évènements par heure, la longueur et la profondeur des hypoxies) qui diffèrent

considérablement entre chaque patient apnéique et dont les conséquences varient selon la susceptibilité individuelle. La mise en évidence des mécanismes impliqués dans l'obstruction des voies aériennes induites par le SAOS, à savoir l'HI, la variation des pressions intrathoraciques et la fragmentation du sommeil apparaît essentielle pour proposer de nouvelles cibles thérapeutiques et améliorer la prise en charge des patients apnéiques.

2.3. Conséquences des obstructions des voies aériennes par le SAOS

2.3.1. Variations de pressions intrathoraciques

Durant les apnées obstructives, il persiste une activité respiratoire, et les efforts respiratoires induits par l'occlusion sont à l'origine d'une diminution de la pression intrathoracique. Elle entraîne une augmentation de la pression transmurale (i.e. pression intracardiaque – pression intrathoracique) du ventricule gauche (VG), ainsi qu'une augmentation de la précharge du ventricule droit (VD) induite par l'augmentation du retour veineux et responsable de la distension du VD. Les efforts respiratoires sont également responsables d'un déplacement du VG, gênant le remplissage et diminuant la précharge. Le volume d'éjection systolique et le débit cardiaque sont ainsi diminués. Ces contraintes mécaniques vont être particulièrement lourdes de conséquences chez des patients IC souffrant de SAOS [120].

2.3.2. Fragmentation du sommeil

La fragmentation du sommeil, causée par les micro-éveils survenant à chaque reprise de la ventilation, va être à l'origine d'une diminution de la qualité de vie des patients. En effet, la fatigue excessive engendrée va réduire la vigilance diurne des patients augmentant le risque d'accidents et semble également à l'origine de conséquences métaboliques délétères [121]. Il a également été démontré que les micro-éveils pouvaient à eux seuls entraîner une augmentation des pressions systoliques et diastoliques à chaque survenue [122].

2.3.3. Hypoxie intermittente

Enfin, les cycles de désaturations-resaturations artérielles en O₂, appelés hypoxie intermittente (HI) jouent un rôle majeur dans le développement des complications CVs associées au SAOS. Cette répétition d'évènements d'hypoxies-réoxygénations peut intervenir jusqu'à 60 fois par heure et semble à l'origine des principales conséquences CVs du SAOS [123, 124].

2.4. Modèles expérimentaux d'hypoxie intermittente

Afin d'étudier les mécanismes physiopathologiques activés par l'HI en s'affranchissant des facteurs confondants présents chez les patients SAOS, de nombreux modèles ont été développés [125]. Ils permettent d'étudier les effets de différentes sévérités de désaturation, de faire varier la fréquence des cycles d'hypoxie-réoxygénation ou les temps d'exposition selon le modèle d'étude.

Historiquement, il existe des modèles dits « spontanés » d'études de l'apnée du sommeil tels que le bouledogue anglais et des modèles de porcs obèses miniatures. Il existe également des modèles expérimentaux d'apnées du sommeil dits « induits » qui permettent de contrôler plus finement le nombre et la sévérité des apnées. L'évolution des connaissances et des technologies ont permis d'améliorer les stimulus d'HI tout en limitant le stress chez les modèles d'études. Ainsi, le stimulus le plus couramment utilisé chez les rongeurs permet d'exposer les animaux à des variations cycliques de la fraction inspirée en oxygène (FiO_2) par l'alternance de flux d'airs et d'azote. Ce stimulus est non invasif et permet d'exposer les rats et souris dans leurs propres cages de stabulation, limitant ainsi le stress durant les cycles d'HI. Le stimulus est généralement appliqué de jour, durant la période de sommeil des rongeurs avec des durées d'expositions allant de 4h/jour [126] à 12 ou 24 h selon les études [127, 128], et les variations de FiO_2 sont à l'origine de différentes saturations artérielles en dioxygène (SaO_2). Selon la littérature, les cycles de 30s d'hypoxie avec une FiO_2 de 2 à 5% sont responsables d'une SaO_2 de 60 à 80% chez les rats et souris [129, 130], qui correspond à des stades de désaturation mimant une forme sévère de la pathologie humaine. Il correspond au modèle utilisé au laboratoire. Il existe également des modèles de tentes permettant d'exposer des humains ou des gros animaux à l'HI [131]. Enfin, de nombreux modèles cellulaires ont également été développés mais présentent une grande hétérogénéité dans la durée des cycles et ne reproduisent pas de manière physiologique les cycles d'HI, la difficulté étant de faire varier rapidement la concentration en dioxygène dans les milieux de culture. Le laboratoire a récemment développé un nouveau modèle permettant d'exposer les cellules à des cycles d'HI similaires aux cycles retrouvés chez les patients SAOS [132].

Ainsi, les modèles d'HI permettent de comprendre la physiopathologie du SAOS et de développer des traitements susceptibles d'être associés à la PPC afin d'améliorer la prise en charge des patients. Ils ont notamment permis d'évaluer l'implication de divers mécanismes physiopathologiques dans la progression des pathologies associées au SAOS, sur le plan CV notamment.

2.5. Conséquences cardiovasculaires du SAOS : rôle de l'hypoxie intermittente

Durant de nombreuses années, l'implication du SAOS dans l'étiologie et la progression des pathologies CVs était indirectement associée, notamment parce que la présence d'un SAOS n'était pas recherchée dans les études épidémiologiques. De plus, les patients apnéiques présentent régulièrement des comorbidités associées tels que l'obésité, l'hypertension artérielle ou des dérégulations métaboliques qui sont des pathologies à haut risque CV pouvant masquer les effets propres au SAOS. La réalisation d'études longitudinales sur l'incidence de pathologies CVs et l'étude des effets du traitement par PPC ont permis de renforcer le lien entre le SAOS et la progression de ces pathologies. La compréhension des mécanismes intermédiaires impliqués dans la physiopathologie du SAOS et le développement de modèles ont également permis de montrer que le SAOS est un facteur indépendant de risque CV. En 2005, une étude prospective conduite sur 10 ans a montré une augmentation de la morbi-mortalité CV chez les patients apnéiques sévères (IAH>30) non traités pour le SAOS, indépendamment d'autres facteurs confondants, tels que l'obésité [133]. Il existe donc une relation de causalité entre la sévérité du SAOS et la prévalence des événements CVs. Après un bref rappel des dysfonctions vasculaires induites par le SAOS, nous nous intéresserons particulièrement aux conséquences cardiaques qui font partie intégrante de ce travail de thèse.

2.5.1. Dysfonctions vasculaires

- Dysfonction endothéliale

L'endothélium vasculaire est le régulateur majeur de l'homéostasie vasculaire et maintient l'équilibre entre vasodilatation et vasoconstriction. La dysfonction endothéliale résulte d'un déséquilibre de cette balance causé entre autres par une détérioration de la vasodilatation endothélium-dépendant. Elle est considérée comme un marqueur précoce de l'athérosclérose [134] et son altération peut conduire à un vieillissement artériel et à une hypertension artérielle. Ainsi, la dysfonction endothéliale est souvent décrite comme un mécanisme précoce à l'origine des atteintes CVs du SAOS et de l'HI [135, 136].

- Hypertension artérielle

Il existe une relation entre SAOS et HTA et ce indépendamment des nombreux facteurs confondants tels que l'âge, la consommation d'alcool et/ou de tabac et l'IMC [137]. Ainsi, d'après l'étude prospective menée sur la cohorte *Wisconsin Sleep Cohort Study* de 709 sujets non traités pour leurs anomalies respiratoires pendant 4 à 8 ans, il existe un risque relatif de développer une HTA 3 fois plus élevé chez les sujets avec un IAH>15 [137]. Le traitement par PPC, permet de réduire significativement la pression artérielle chez les patients SAOS hypertendus, d'autant plus lorsque le

SAOS est sévère [138]. De nombreux modèles animaux ont confirmé l'augmentation de la pression artérielle lors d'exposition à des durées variables d'HI [125, 139].

- Athérosclérose

Au long terme, la dysfonction endothéliale qui apparaît au cours du SAOS participe au remodelage vasculaire pré-athérogène observé chez les patients apnéiques. De plus, il apparaît que l'augmentation de l'épaisseur intima-média (EIM) carotidienne, marqueur précoce d'athérosclérose, est positivement corrélée à la sévérité de la désaturation nocturne [140, 141]. De nombreux travaux ont montré une augmentation de la prévalence de plaques athéromateuses carotidiennes chez les patients SAOS [142, 143], indépendamment de facteurs confondants tels que l'obésité [141]. Le traitement par PPC permet de réduire significativement l'EIM qui s'accompagne d'une réduction de l'inflammation et de l'activité sympathique sans modification du poids et des lipides plasmatiques [144]. Ces données suggèrent que le SAOS semble être un facteur de risque indépendant pour le développement de l'athérosclérose. Des données du laboratoire ont confirmé l'épaississement de l'EIM chez des souris exposées durant 14 jours à l'HI [129] et ont également montré une augmentation des lésions athéromateuses induites par ce stimulus [145].

2.5.2. Dysfonctions cardiaques

- Ischémie myocardique

L'hypertension artérielle et la dysfonction endothéliale associées au SAOS contribuent à la progression de la maladie ischémique. Lors d'un IM, les patients apnéiques présentent une coronaropathie plus sévère, une ischémie myocardique plus longue, une moins bonne récupération myocardique et une altération du remodelage du VG et du VD comparativement à des patients non-apnéiques [5]. A 3 mois post-IM, les patients avec un SAOS sévère non traité ont une moins bonne récupération myocardique, une taille d'infarctus plus grande et une fraction d'éjection du VG plus faible que des patients non apnéiques [146]. A 18 mois post-IM, cette moins bonne récupération se traduit par un moins bon pronostic avec une augmentation de la survenue d'évènements CVs parfois fatals [147]. Une étude réalisée sur un suivi d'environ 6 ans a montré que les patients SAOS traités par PPC présentaient un moindre risque de survenue d'un nouvel IM comparativement aux patients non traités. Elle a également mis en évidence que chez ces patients, la survenue d'un nouvel évènement était plus fréquente la nuit [148]. Les modèles de souris et rats exposés confirment le rôle de l'HI dans l'augmentation de la susceptibilité myocardique à l'ischémie-reperfusion pour différentes durées d'expositions [149-152].

- Arythmies ventriculaires

Les patients SAOS sévères présentent un risque d'arythmies pendant la nuit 2 à 4 fois plus élevé que les patients non apnéiques [153] et un risque de mort subite accrue, préférentiellement pendant le sommeil [154]. L'IM est l'une des causes majeures de la mort subite de par la génération d'arythmies ventriculaires telles que la tachycardie ventriculaire (TV) soutenue ou irréversible et/ou la fibrillation ventriculaire (FV) dont l'issue peut être fatale. La physiopathologie des arythmies ventriculaires consécutives à une ischémie myocardique est complexe. Elles sont la conséquence d'anomalies causées par les lésions tissulaires, des modifications du système nerveux autonome et des altérations du statut métabolique [155]. En accord avec le risque accru de mort subite pendant la nuit, l'incidence d'IM durant la nuit est plus importante chez les patients apnéiques (32%) que chez les patients non apnéiques (7%) et 91% des patients victimes d'IM pendant la nuit présentent un SAOS [156]. Il existe très peu de modèles expérimentaux mettant en évidence l'implication de l'HI dans la prévalence des arythmies. Un modèle d'exposition aiguë à l'HI durant 1 heure a montré une augmentation de la vulnérabilité du cœur de chien à la fibrillation atriale [157].

- Hypertrophie ventriculaire gauche

L'hypertension semble être le facteur majeur à l'origine de l'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG) indépendamment de la présence d'apnées [158]. Néanmoins la prévalence d'une HVG est augmentée lors d'un SAOS, même après ajustement de la pression artérielle, est dépendante de sa sévérité [159, 160]. De nombreux mécanismes pathologiques liés au SAOS sont susceptibles de participer au remodelage cardiaque des patients apnéiques : hypertension, augmentation du tonus sympathique ou encore augmentation de la post-charge ventriculaire gauche due à l'augmentation de la rigidité artérielle. Les modèles animaux ont permis de confirmer l'apparition d'une HVG lors d'une exposition prolongée à l'HI et de mettre en évidence l'apparition d'une dysfonction ventriculaire gauche lors de l'HVG. Ainsi, l'HI induit une augmentation de la masse du VG associée à une hypertrophie cardiomyocytaire, une fibrose interstitielle et une augmentation de la pression artérielle [161, 162] qui sont associées à une diminution de la fraction d'éjection [161, 163].

- Insuffisance cardiaque

D'après les données de la cohorte de la *Sleep Heart and Health Study*, il apparaît qu'un SAOS avec un AHI>11 est indépendamment associé au risque de développer une IC [164]. De plus, plusieurs études ont analysé les tracés polysomnographiques de patients IC et ont permis de mettre en évidence une augmentation de la prévalence du SAOS (12 à 53%) par rapport à la population générale [165, 166]. En 2014, Wang et al. ont montré chez les patients IC qu'un SAOS sévère non traité par PPC augmente la mortalité par rapport aux contrôles non apnéiques ou présentant un SAOS modéré [167]. Au

même titre que l'activation sympathique, l'hypertension artérielle diurne présente chez les patients apnéiques est un des facteurs prédictifs de l'IC, notamment pour son rôle dans le développement de l'HVG et la dysfonction ventriculaire gauche évoqués précédemment. Le traitement par PPC des patients IC porteurs d'un SAOS semble induire des effets bénéfiques, notamment une amélioration, modeste, de la fraction d'éjection [168]. Très peu d'études se sont intéressées au rôle de l'HI dans le développement de IC. En 2015, Li et collaborateurs ont montré une diminution de la fraction d'éjection chez des rats exposés à 4 semaines d'HI. Un modèle de souris transgénique développant spontanément une IC a quant à lui mis en évidence une amélioration de la contractilité après 4 semaines d'HI [169, 170].

2.6. Mécanismes impliqués dans les complications cardiaques du SAOS

Nous avons vu précédemment que l'HI est le principal stimulus responsable des complications CVs associées au SAOS. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons aux mécanismes intermédiaires influencés par l'HI responsables des complications cardiaques.

- Activation sympathique

Le système nerveux autonome est impliqué dans un grand nombre de fonctions non soumises au contrôle volontaire au sein de l'organisme et notamment la régulation du système CV. Il est constitué de voies effectrices aux fonctions antagonistes : le système nerveux orthosympathique ou sympathique avec une action « cardio-accélétratrice » et le système nerveux parasympathique « cardio-modérateur ». Durant le sommeil, l'activité sympathique diminue au profit d'une augmentation de l'activité parasympathique. Chez les patients SAOS, une activation sympathique a été décrite à chaque évènement obstructif [171] et est associée à des concentrations plasmatiques de catécholamines majorées [172]. Les épisodes d'hypoxies nocturnes semblent être responsables d'une activation des chémorécepteurs périphériques situés au niveau des corps carotidiens et de la crosse aortique sensibles à la désaturation artérielle en O₂. Ils induisent une augmentation de l'activité sympathique, responsable d'une augmentation de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle, normalisés lors d'un retour à la normoxie le jour [131, 173]. Cependant, la répétition des épisodes hypoxiques chez les patients SAOS amplifie la réponse sympathique, altère la régulation du système nerveux autonome et est responsable d'une augmentation de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle de manière chronique [174]. L'exposition de volontaires sains à des épisodes d'HI pendant 1 ou 2 semaines a permis de reproduire l'augmentation de l'activité nerveuse sympathique et de la pression artérielle pendant la journée [175]. Les modèles animaux d'exposition à l'HI ont également permis de confirmer le rôle de l'HI dans l'hyperactivité sympathique [176]. De

plus, l'HI, via un stress oxydant entraîne une augmentation de la synthèse et de la sécrétion de catécholamines par les glandes surrénales [177, 178]. Ainsi, cette réponse sympathique qui s'exerce à la fois au niveau vasculaire et cardiaque contribue à l'augmentation de la morbi-mortalité CV chez le patient apnéique [179] et à une mortalité augmentée chez les patients IC [179, 180].

- Inflammation

Le SAOS est considéré comme une pathologie inflammatoire de bas grade. Il induit un état inflammatoire chronique évoluant à bas bruit, au même titre que de nombreuses pathologies qui lui sont associées comme l'obésité, le diabète de type 2 ou encore l'athérosclérose. Ce concept repose sur le fait que les phénomènes inflammatoires observés chez les patients apnéiques sont modérés, mais leur chronicité induit des conséquences CVs et métaboliques délétères. L'inflammation est un médiateur important de la progression des pathologies CVs, particulièrement des maladies ischémiques et de l'IC [181].

Cette inflammation de bas grade chez les patients SAOS se caractérise par une augmentation des niveaux plasmatiques de *tumor necrosis factor alpha* (TNF α), une cytokine pro-inflammatoire, qui semble associée à la sévérité du SAOS indépendamment de facteurs confondants comme l'IMC, l'âge ou les taux de lipides circulants [182, 183]. Le SAOS est également associé à une majoration de l'expression d'autres marqueurs pro-inflammatoires (l'interleukine (IL)-8, l'*InterCellular Adhesion Molecule* (ICAM)-1 ou la *Monocyte Chemoattractant Protein* (MCP)-1) et l'augmentation des taux circulants de ces marqueurs est positivement corrélée à la désaturation artérielle en O₂ [184]. Dans différents modèles expérimentaux, l'HI, seule, est également capable d'induire une inflammation systémique et vasculaire de bas grade, caractérisée par l'activation du facteur de transcription pro-inflammatoire *nuclear factor-kappa* (NF κ B) [184]. C'est un médiateur clé de la réponse inflammatoire car il régule l'expression de facteurs pro-inflammatoires (IL-6, IL-8), de molécules d'adhérence (ICAM-1) et d'enzymes pro-inflammatoires (cyclooxygénase 2). Elle est associée à une augmentation de l'expression de médiateurs pro-inflammatoires : des chémokines pro-inflammatoires dans la rate, une augmentation des capacités migratoires et prolifératives des lymphocytes T [185], ce qui confirme le rôle de l'HI dans l'apparition du statut inflammatoire observé chez le patient SAOS.

Le rôle de l'inflammation systémique, induite par le SAOS, au niveau cardiaque est mal connu. Elle est impliquée dans la fibrillation atriale qui est marquée par des concentrations plasmatiques de marqueurs pro-inflammatoires augmentées. Sachant que les patients SAOS présentent un risque d'arythmies plus élevé que les patients non apnéiques, l'inflammation systémique induite par le SAOS pourrait avoir un rôle majeur dans la persistance d'un phénotype pro-arythmogène [186].

- Stress oxydatif

Les épisodes d'hypoxie-réoxygénation décrits précédemment lors de l'HI sont responsables d'importants troubles oxydatifs. Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre dans la balance pro et antioxydante et joue un rôle central dans les complications CVs induites par le SAOS et l'HI. Les épisodes d'hypoxie sont responsables d'une diminution de la disponibilité en O₂. Lors de la reprise de la respiration, la réoxygénation augmente brutalement l'apport en O₂ au niveau tissulaire et est responsable d'une production massive d'EROs dont la source majeure dans l'organisme est la mitochondrie. A ce jour, les plus gros producteurs d'EROs sont la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase (NOX), la xanthine oxydase (XO) et le découplage de l'oxyde nitrique synthase (NOS) [187]. En conditions normales, la mitochondrie produit des EROs qui vont servir de messagers pour différentes voies de signalisation et assurer l'intégrité mitochondriale. Chez les patients SAOS, il existe une distribution anormale des mitochondries au niveau du palais associée à une activité oxydative altérée [188], une augmentation de la production d'O₂⁻ plasmatique par la NOX abolie par la PPC [189], et une augmentation de l'expression endothéliale de la NOS découplée [190]. Il existe également une relation linéaire entre sévérité du SAOS et stress oxydatif [191] avec une diminution significative du statut antioxydant associée à une production maximal d'EROs chez les patients SAOS les plus sévères [192].

Les modèles animaux d'exposition à l'HI confirment l'activation d'un stress oxydatif dans les tissus CVs. Ils présentent les mêmes altérations du statut antioxydant que les patients SAOS, se traduisant notamment par une expression de la NOX augmentée [136]. L'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale dans le corps carotidien est significativement diminuée en faveur d'une production d'O₂⁻ augmentée [193] et l'HI est responsable d'un découplage de la NOS associée à une diminution de la biodisponibilité en NO au niveau vasculaire et cardiaque [194, 195]. L'exposition à l'HI induit aussi une augmentation de l'expression de la NOX et de la production d'O₂⁻ au niveau cardiaque après 14 jours [150], et est à l'origine d'un important stress oxydatif dans les tissus CVs [150, 196], responsable d'une augmentation de la sensibilité du cœur à l'infarctus ou d'une hypertension artérielle [136, 150]. Enfin, l'exposition de cellules à l'HI induit une production de XO augmentée [197].

Stress oxydatif et HIF-1. Parmi les conséquences du stress oxydatif induit par l'HI, les EROs sont notamment connu pour activer la phospholipase C (PLC) une enzyme membranaire qui clive et active deux seconds messagers : l'inositol tri-phosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG). L'IP3 ainsi activé se lie à des canaux calciques de la membrane du RE (R-IP3) intervenants dans l'efflux de Ca²⁺ alors que le DAG active la protéine kinase C (PKC). L'augmentation de Ca²⁺ cytosolique induit par IP3 active la CaM kinase (CaMK) et participe à l'activation de la PKC à son tour responsable de l'activation la

kinase *mammalian target of rapamycin* (mTOR) impliquée dans de nombreux mécanismes cellulaires. CamK et mTOR ainsi activés sont 2 médiateurs responsables de l'augmentation de l'activité du facteur de transcription *hypoxia Inducible Factor-1* (HIF-1) (figure 12) [198].

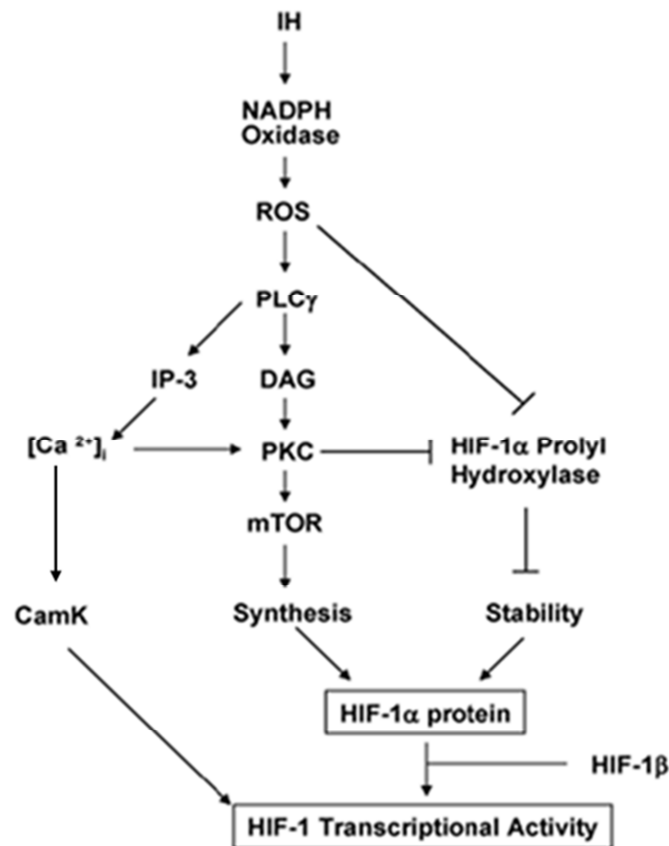


Figure 12. Schéma illustrant les différentes voies de signalisations intervenant dans l'activation de HIF-1 en réponse à l'HI.

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

Le facteur de transcription HIF-1 est un complexe protéique qui accroît l'expression de gènes spécifiques en présence de faibles concentrations d'oxygène. C'est un hétérodimère constitué d'une sous-unité β exprimée de façon constitutive et d'une sous-unité α spécifique de HIF-1 [199]. La régulation de l'activité de HIF-1 est dépendante de la présence d'O₂ via une région de HIF-1α sensible à l'O₂ appelée « domaine de dégradation oxygène-dépendante » (DDOD). En condition normoxique, des enzymes appelées prolyl-4-hydroxylases (PHD) hydroxylent le domaine DDOD de HIF-1α et sont responsables de la fixation du complexe Von Hippel-Lindau (VHL). VHL ainsi complexé à HIF-1α induit son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. En condition hypoxique, les PHDs sont inhibées, entraînant la stabilisation de HIF-1α qui est transloquée au noyau et se dimérise avec la

sous-unité β . L'hétérodimère ainsi formé va se fixer sur la région promotrice ou *Hypoxia Response Element* (HRE), de nombreux gènes cibles tels que l'EPO, VEGF, iNOS, eNOS et l'endothéline 1 (ET-1) et exercer son activité transcriptionnelle (figure 13) [200].

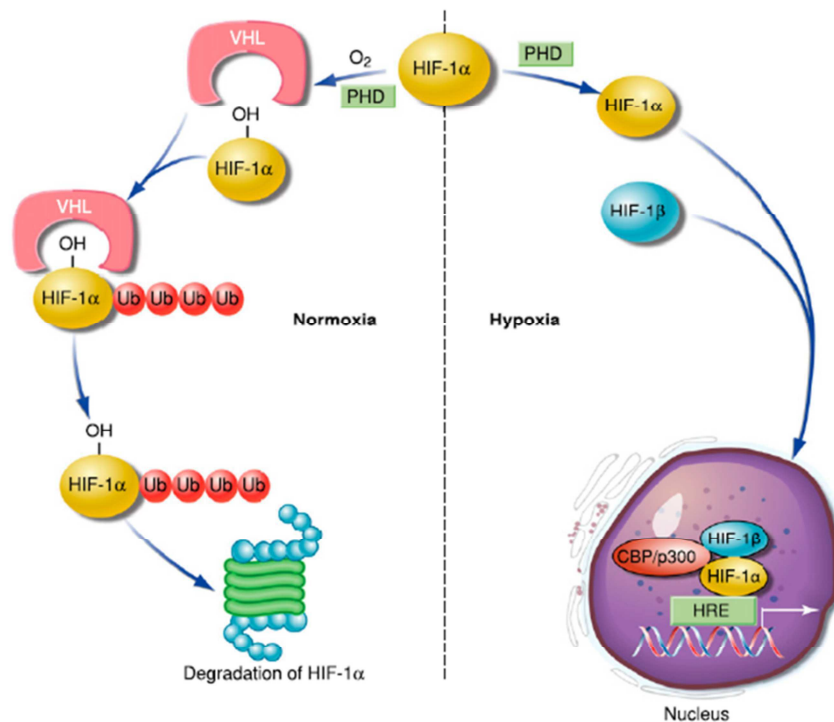


Figure 13. Régulation de l'activité du facteur de transcription HIF-1. Shimoda *et al.* 2011

HIF-1 a été mis en évidence grâce à l'étude de la région promotrice du gène de l'érythropoïétine (EPO) exprimé en réponse à l'hypoxie [201]. Sur des cellules, il a été montré une augmentation très importante de l'activité de HIF-1 à partir d'une teneur en O_2 de l'air inférieure à 6% [202], celle-ci étant maximale à 0,5% d' O_2 , alors qu'une réoxygénation à 20% d' O_2 entraîne une rapide diminution de l'activité de HIF-1 [202].

Le potentiel impact de l'HI sur l'activité de HIF-1 a été soulevé en 2003 grâce à l'utilisation de souris partiellement invalidées pour la sous-unité HIF-1 α (HIF-1 $\alpha^{+/-}$) dont les cœurs étaient protégés contre les lésions ischémiques [203]. In vitro, l'exposition de cellules PC12 (cellules originaires d'un phéochromocytome de la médullosurrénale de rat) à des cycles de 30 secondes d'hypoxie (1,5%) suivies de 4 minutes de normoxie (20%), répétés 10, 30, 60 et 120 fois, a mis en évidence une augmentation de l'expression de HIF-1 α dans le noyau ainsi que de son activité transcriptionnelle. Cette augmentation est d'autant plus importante que le nombre de cycles augmente. L'activité de HIF-1 est ainsi 2,5 fois plus importante après 120 cycles d'HI qu'à l'issue d'une heure d'hypoxie continue [204]. Alors que HIF-1 α est rapidement dégradée à la réoxygénation ($t_{1/2} < 5\text{min}$) suite à une

hypoxie continue, il reste élevé suite à une HI en partie grâce à l'activation de mTOR [205]. Ainsi, l'HI, contrairement à l'hypoxie continue, induit une activation persistante de HIF-1.

HIF-1 et SAOS/IH. Chez les patients apnéiques, une augmentation de l'expression de gènes cibles de HIF-1 a été observée. En effet, ils présentent des concentrations plasmatiques d'EPO plus importantes que des sujets sains et cette augmentation est corrigée par le traitement par PPC [206]. Les taux de VEGF et d'ET-1 circulants sont également accrus et le sont d'autant plus que la sévérité du SAOS augmente [207, 208]. Enfin, l'expression génique du HIF-1 et de ses gènes cibles est augmentée dans des biopsies de peau de patients SAOS sévères [209]. Expérimentalement, l'exposition chronique à l'HI est à l'origine d'une activation soutenue de HIF-1 dans le cœur [152, 210], les vaisseaux [211], le cerveau [212] ou le foie [213]. Il a été démontré que cette activation soutenue et persistante de HIF-1 était impliquée dans les conséquences CVs délétères de l'HI. Dès 5 jours d'exposition à l'HI, les animaux présentent des pressions artérielles élevées associées à des taux plasmatiques d'ET-1 significativement augmentés qui pourrait dépendre de l'activation de HIF-1 [214]. En effet, des travaux du laboratoire ont montré chez le rat que l'exposition à l'HI chronique induisait la fixation de HIF-1 sur le HRE du gène codant pour l'ET-1, se traduisant par une augmentation de l'expression d'ET-1 au niveau cardiaque et une augmentation de la taille d'infarctus [152]. De plus, une augmentation de l'expression d'ET-1 est associée à une dysfonction endothéliale chez les animaux HI [215], et nous avons montré chez des souris HIF-1 $\alpha^{+/-}$ ou par l'utilisation d'un inhibiteur des récepteurs à l'ET-1 que l'activation de l'axe HIF-1/ET-1 était responsable du remodelage vasculaire induit par l'HI [211]. De la même manière, la transcription du gène ET-1 induite par l'activation de HIF-1 est responsable de l'augmentation de la pression artérielle et de la taille de l'infarctus suite à une exposition chronique à l'HI [152].

En 2006, l'utilisation de souris HIF-1 $\alpha^{+/-}$ a permis de prévenir l'augmentation des concentrations plasmatiques de catécholamines à l'HI, et a ainsi mis en évidence un lien direct entre HIF-1 et activation sympathique induite par l'HI [216]. Un lien semblable semble également exister entre activation de HIF-1 et inflammation puisque le remodelage vasculaire inflammatoire induit par l'HI est abolit chez la souris HIF-1 $\alpha^{+/-}$ [211, 217].

Il semble donc exister une activité synergique forte entre activité sympathique, inflammation et stress oxydatif dans la progression des pathologies CVs induites par l'HI, notamment via l'activation du facteur de transcription HIF-1 (figure 14) [200].

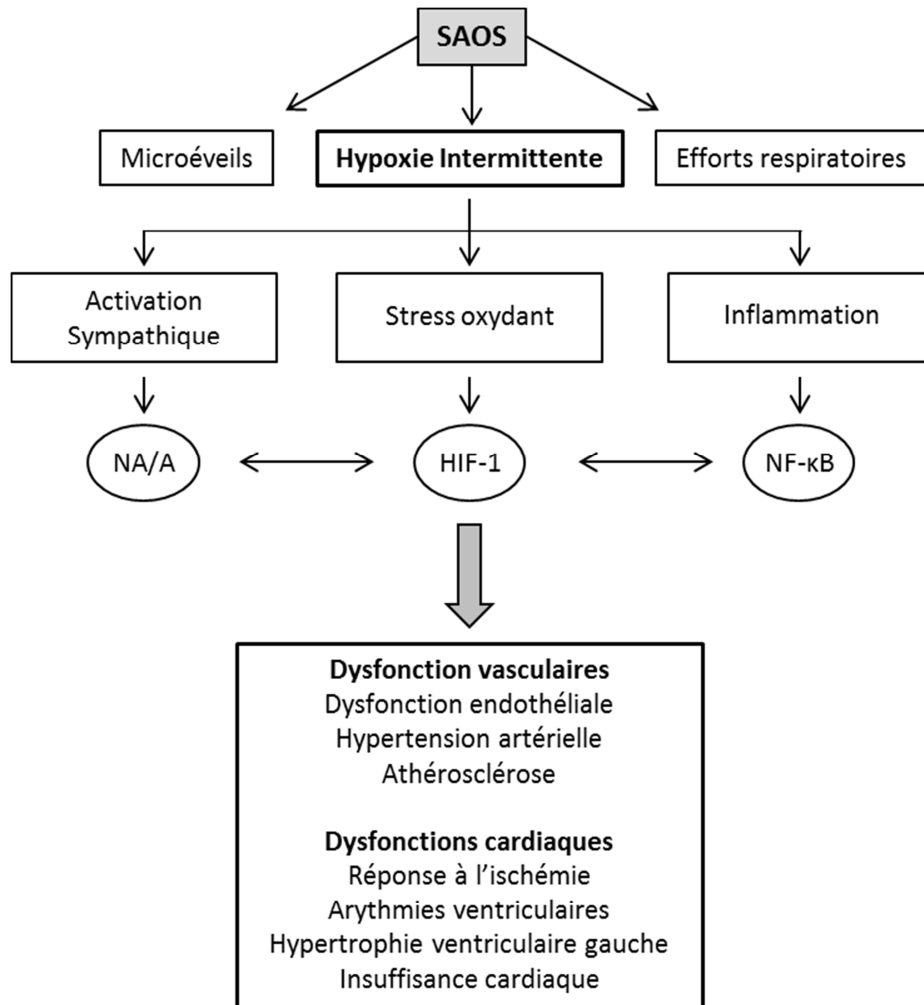


Figure 14. Rôle majeur de l’HI dans le développement des pathologies CVs associées au SAOS. L’HI est identifié comme responsable d’une activation sympathique persistante, d’un stress oxydant et d’une inflammation de bas-grade qui contribuent au développement des atteintes cardiovasculaires via l’activation de voies de signalisation qui agissent de manière synergique. SAOS : syndrome d’apnées obstructives du sommeil ; NA : noradrénaline ; A : adrénaline ; HIF-1 : hypoxia inducible factor-1 ; NFκB : nuclear factor kappa B.

Ainsi, les atteintes CVs du SAOS sont nombreuses et variées et dépendent de l’activation de mécanismes intermédiaires qui peuvent agir de manière synergique et potentialiser ses conséquences CVs délétères (figure 14). En outre, de nombreux travaux sur l’HI ont également mis en évidence le rôle d’une autre voie de signalisation, le stress du réticulum endoplasmique (RE) dans le développement des pathologies associées au SAOS.

2.7. Le stress du réticulum endoplasmique (RE)

2.7.1. Présentation générale

Dans les cellules eucaryotes, la majorité des protéines nouvellement synthétisées se replient et mûrissent dans la lumière du RE. Le RE est une organelle organisée en réseau de membranes internes interconnectées en tubules et sacs issues de membranes nucléaires. Il est responsable de fonctions essentielles extrêmement variées comme la synthèse et le repliement protéique, les modifications post-traductionnelles, le transport des protéines, la synthèse lipidique ou encore le stockage et la libération de Ca^{2+} intracellulaire [218, 219]. Les protéines pénètrent dans le RE en tant que chaînes polypeptidiques dépliées. Leur flux dans le RE est variable car il peut changer rapidement en réponse aux programmes de différenciation cellulaire, aux conditions environnementales et à l'état physiologique de la cellule. Pour gérer cette situation dynamique, les cellules ajustent la capacité de repliement des protéines du RE en fonction de leurs besoins, assurant ainsi la bonne conformation des protéines sécrétées [220].

Le repliement protéique est un processus permettant de conformer une chaîne polypeptidique en une structure 3D unique (conformation native) fonctionnelle. L'homéostasie et la fonction cellulaire nécessitent donc un contrôle du repliement protéique qui s'effectue par l'action de voies de transduction et qui nécessite la présence de protéines chaperonnes. Celles-ci se lient aux régions hydrophobes de protéines incomplètement repliées pour faciliter le repliement approprié mais, plus important encore, pour empêcher l'accumulation de protéines mal conformées en agrégats toxiques. En effet, les cellules sont soumises à un ensemble de stress environnementaux qui peuvent conduire à des perturbations de l'une ou plusieurs fonctions du RE tels que la synthèse ou le repliement protéique et des perturbations de l'homéostasie calcique qui sont responsables de conformations protéiques aberrantes [218]. L'accumulation de protéines mal conformées au sein de la lumière du RE stimule des voies de signalisations intracellulaires qui contrôlent cette régulation et qui sont regroupées sous le terme de *unfolded protein response* (UPR).

Lors d'un déséquilibre entre l'accumulation de protéines mal conformées au sein de la lumière du RE et la capacité de la machinerie cellulaire à gérer cette surcharge, une réponse en trois temps est observée. Tout d'abord, la quantité de protéines entrant dans le RE est réduite grâce à une diminution de la synthèse protéique et de la translocation dans le RE. Deuxièmement, les capacités du RE à gérer les protéines dépliées sont augmentées grâce à une activation transcriptionnelle des gènes cibles de l'UPR qui vont participer au repliement protéique ou à leur élimination. Enfin, si l'homéostasie ne peut être rétablie lorsque les capacités du RE sont dépassées, l'activation prolongée de l'UPR est capable d'activer un signal proapoptotique afin de protéger l'organisme de l'accumulation de protéines mal conformées.

Trois classes protéiques différentes ont été identifiées lors de la réponse UPR. Elles agissent en parallèle et chaque branche est définie par une classe de protéines transmembranaires présentes à la membrane du RE : *inositol requirement enzyme 1* (IRE1), *activating transcription factor 6* (ATF6) et *protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase* (PERK) (figure 15) [218]. L'activation de ces protéines transmembranaires fait suite à la liaison directe de protéines mal repliées au niveau du domaine transmembranaire intraluminal ou à la perte de liaison avec une protéine chaperonne intraluminaire : *binding protein/glucose regulated protein* (GRP78 /BiP) [221]. C'est un homologue de la protéine chaperonne *heat shock protein 70* (Hsp70) impliquée dans de nombreux processus cellulaires incluant la translocation de chaînes polypeptidiques à travers la membrane du RE et la maturation protéique. Lors d'un stress du RE, GRP78 est libérée de sa liaison avec les médiateurs de la réponse UPR (IRE1, PERK et ATF6) conduisant à l'activation des voies de signalisations associées.

IRE1 est la branche la plus conservée de l'UPR chez les eucaryotes [222]. Le gène IRE1 code pour une protéine transmembranaire qui possède une portion cytosolique présentant un domaine à protéine kinase. En réponse à une accumulation de protéines mal conformées, IRE1 s'oligomérisse à la membrane pour s'auto-phosphoryler au niveau des domaines à protéines kinase. L'activation d'IRE1 par auto-phosphorylation va activer sa fonction effectrice qui, selon un mécanisme mal connu, provoque l'épissage de l'ARNm d'un facteur de transcription appelé *X-box binding protein-1* (XBP1) [223]. Ainsi IRE1 est une enzyme possédant une double action, à la fois protéine kinase et endoribonucléase spécifique régulée par l'activité kinase intrinsèque. L'épissage de XBP1 permet d'activer les gènes cibles de la réponse UPR par liaison sur des séquences *ER stress response element* (ERSE) qui sont présentes dans les promoteurs de gènes codant des protéines majeures du RE comme la chaperonne BiP/GRP78. IRE1 participe également à la régulation des protéines mal conformées par l'activation d'enzymes impliqués dans la voie de dégradation *ER-associated degradation* (ERAD) qui permet l'export des protéines vers le cytoplasme où elles sont dégradées par la voie du protéasome [218].

ATF6 est un facteur de transcription présent à la membrane du RE qui possède un large domaine intra-luminal lié à GRP78. Lors de l'accumulation de protéines mal repliées, GRP78 se détache d'ATF6 qui va alors être transloqué à la membrane de l'appareil de Golgi par transport vésiculaire. Deux clivages successifs par des protéases *luminal site 1* et *site 2 proteases* (S1P et S2P) à la membrane vont permettre de libérer le fragment N-terminal de ATF6 qui est transloqué jusqu'au noyau pour se fixer sur des séquences ERSE. Ainsi, l'activation d'ATF6 permet d'accroître les capacités de repliement des protéines dans le RE (figure 15).

PERK est le troisième type de protéine transmembranaire activée par l'UPR. Lors d'un stress du RE, GRP78 se décroche aussi du domaine luminal de PERK qui s'oligomérisse et s'autophosphoryle à la membrane par son activité protéine kinase. Phospho-PERK activé vient phosphoryler la sous-unité α

du facteur d'initiation de la traduction eucaryote 2 (eIF2 α) et inhibe son activité. Phospho-eIF2 α limite alors l'entrée de chaînes polypeptidiques au sein de la lumière du RE et empêche la formation de complexes de pré-initiation de la traduction, réduisant ainsi la quantité de protéines nouvellement synthétisées. La répression de l'activité d'eIF2 α lors de sa phosphorylation entraîne l'activation d'un facteur de transcription, activating transcription factor 4 (ATF4). Lorsque le stress est prolongé ou trop intense, le niveau de phosphorylation de eIF2 α augmente et l'expression continue d'ATF4 va alors entraîner l'activation d'une voie de signalisation proapoptotique via l'activation d'un facteur de transcription *transcription factor C/EBP homologous protein* (CHOP) [224]. CHOP régule l'activité de nombreux gènes proapoptotiques : son activation réprime l'activité d'une protéine antiapoptotique *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2), ce qui permet la transcription et la translocation à la membrane de *Bcl-2-like protein 11* (Bim), une protéine proapoptotique de la famille de Bcl-2. L'activation de CHOP entraîne également un changement conformationnel des protéines *Bcl-2-associated X* (Bax) et *Bcl-2 homologous antagonist killer* (Bak) proapoptotiques qui provoquent un efflux de Ca²⁺ dans le cytosol [225, 226]. Le Ca²⁺ ainsi libéré active une protéase dépendante du Ca²⁺, la m-calpaïne qui à son tour clive et active la procaspase 12 localisée à la membrane du RE [227]. La caspase-12 activée clive la pro-caspase-9 en caspase-9 clivée active, qui va à son tour cliver et activer la caspase-3, effecteur final de cette voie proapoptotique [228].

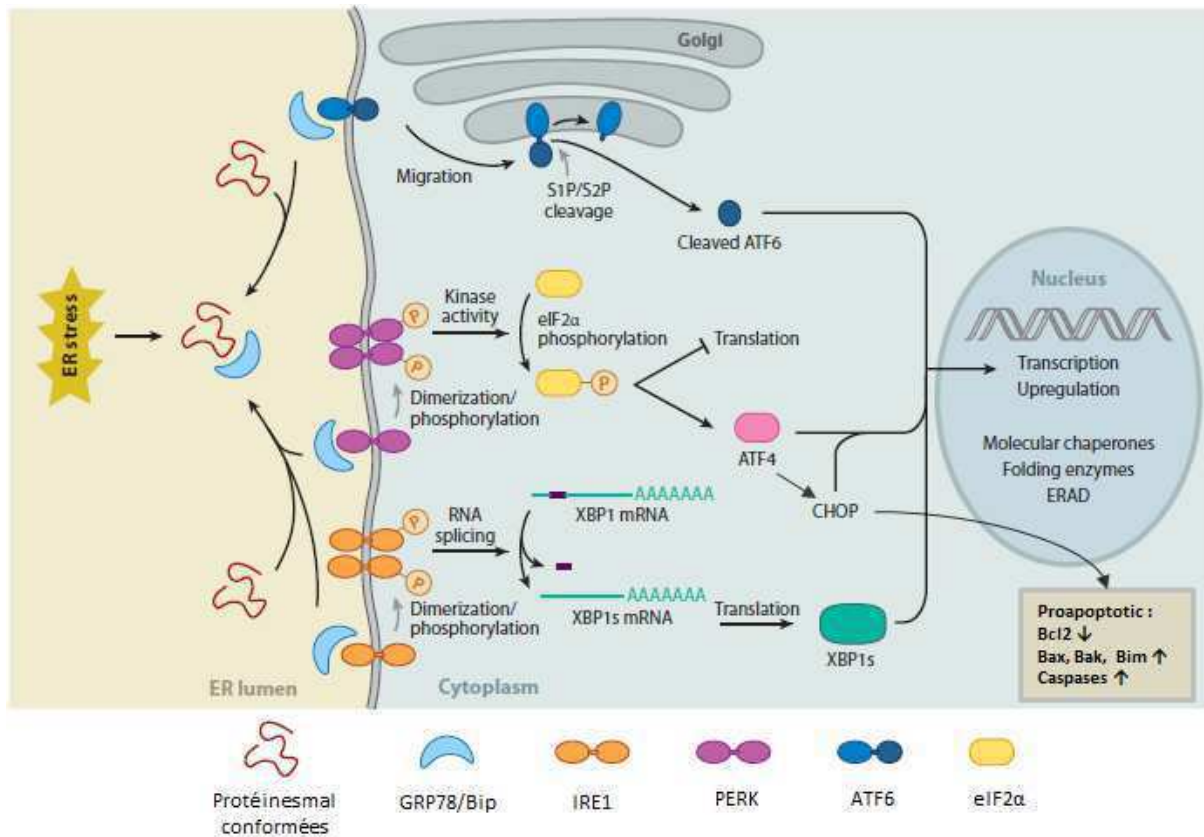


Figure 15. Activation de la voie UPR en réponse à un stress du RE.

L'accumulation de protéines mal conformées au sein de la lumière du RE entraîne un recrutement de la protéine chaperonne GRP78/BiP qui se détache des trois effecteurs membranaires de la réponse UPR : IRE1, ATF6 et PERK. L'activation des voies de signalisation médiées par ces protéines permet de restaurer l'homéostasie du RE par une régulation des protéines mal conformées. Lorsque les capacités du RE sont dépassées, une activation d'un facteur de transcription proapoptotique, CHOP, active un ensemble de voies de signalisation responsables d'une apoptose de la cellule. D'après Groenendyk *et al.* 2013.

2.7.2. Stress du RE et altérations myocardiques

De nombreuses études ont corrélées l'activation d'un stress du RE avec l'évolution des pathologies cardiaques. L'IM induit de nombreuses altérations associées à l'hypoxie lors de l'ischémie, qui sont à l'origine d'une dérégulation de l'homéostasie du RE et responsables d'un stress. Le stress du RE peut donc être activé par l'ischémie et dans certaines études par l'ischémie/reperfusion (I/R). Cependant son rôle cardioprotecteur ou délétère n'est pas clair et semble dépendre du stimulus.

Certaines études ont mis en évidence une augmentation de l'expression de GRP78 et de ATF6 durant l'ischémie qui sont atténuées lors de la reperfusion [229, 230]. Un traitement par un inhibiteur d'ATF6 induit une diminution de la fonction cardiaque et une augmentation de la mortalité suite à

l'infarctus [231], ce qui suggère un rôle cardioprotecteur de l'UPR lors de l'ischémie. De plus, des expériences sur cardiomyocytes de rats néonataux soumis à l'hypoxie ont révélées un épissage augmenté de XBP1 associé à l'augmentation de l'expression de GRP78 [229] et l'inhibition de XBP1 induit une apoptose suite à un épisode d'hypoxie/réoxygénation, suggérant un possible rôle cardioprotecteur de XBP1 lors de dommages hypoxiques présents au cours de l'ischémie. Enfin, des expériences de préconditionnement ou de postconditionnement ischémique réduisent les dommages cellulaires et sont associés à une activation myocardique de l'UPR [232, 233]. De brefs épisodes d'ischémies suivies de reperfusions semblent donc favoriser une activation protectrice du stress du RE.

Contrairement aux études citées précédemment, d'autres travaux ont montré que le stress du RE était associé à des dysfonctions, comme des perturbations de l'homéostasie calcique et une mort cellulaire par apoptose. Ainsi, lors d'épisodes d'hypoxie-réoxygénation, des cardiomyocytes isolés présentent une augmentation de l'expression des protéines PERK et eIF2 α , associées à une dérégulation de la protéine de recapture SERCA2 et à une augmentation de l'expression de la protéine proapoptotique Bax [234]. Un préconditionnement permet de limiter les concentrations cytoplasmiques de Ca²⁺ et réduit le stress du RE [235]. Ainsi, une dérégulation calcique conduit à un stress du RE proapoptotique qui pourrait être impliqué dans les dommages myocardiques provoqués par l'ischémie.

Il est possible que la transition entre un stress du RE protecteur ou délétère lors de l'ischémie puisse être influencée par d'autres facteurs, comme la présence de comorbidités ou de stress additionnels. Lors de l'IC, l'accumulation de mécanismes délétères semble pouvoir potentialiser le stress du RE. Chez les patients IC, il existe une augmentation de l'épissage de XBP1 associé à une expression augmentée de GRP78 [236, 237]. Fu et al. ont également montré une augmentation de l'expression des ARNm de ATF4 et CHOP chez ces patients [238] qui est associée à une dysfonction du protéasome menant à l'accumulation de protéines mal conformées [239]. Les modèles animaux d'IC confirment l'activation du stress du RE avec une augmentation précoce de l'expression de GRP78 et plus tardive, au stade IC, de CHOP [237]. Le stress du RE est également associé au développement de la fibrose et de l'apoptose myocardique par injection d'isoprotérénol, avec une surexpression de phospho-eIF2 α , ATF4 et CHOP myocardiques, qui est prévenue lors de l'atténuation de la fibrose par l'utilisation d'anti-inflammatoires et de chaperonnes de synthèse [240, 241]. Enfin, l'utilisation de souris CHOP KO atténue l'hypertrophie et la dysfonction contractile dans un modèle de constriction aortique et est associé à une augmentation de la phosphorylation de eIF2 α [238]. Ces résultats mettent en évidence un rôle du stress du RE et de l'apoptose induite par CHOP dans le développement du remodelage cardiaque et de l'IC.

2.7.3. Stress du RE et hypoxie intermittente

Dès 2009, une revue de la littérature faisait déjà référence à l'activation du stress du RE dans le cerveau d'animaux privés de sommeil [242]. De récentes études chez le rongeur exposé à l'HI font état de son activation dans le cerveau [243-245], les poumons [246], les reins [247], ou de son implication dans diverses dérégulations métaboliques induites par l'HI [248, 249]. L'implication du stress du RE dans de nombreuses pathologies CV et son activation par l'HI montrent qu'il pourrait jouer un rôle dans les altérations cardiaques associées au SAOS et à l'HI. Certains travaux ont ainsi étudié son activation myocardique. Ils ont montré une activation du stress du RE au niveau cardiaque après une exposition à l'HI qui est associée à une dysfonction contractile. Ces études ont également mis en évidence que son inhibition est associée à une diminution de la mort cellulaire cardiaque chez les animaux exposés à l'HI et à une restauration de la fonction [250, 251]. Ainsi, l'HI pourrait également induire un stress du RE systémique qui pourrait jouer un rôle dans les complications CVs associés au SAOS.

3. Rôle de l'exercice dans le traitement de la pathologie ischémique associée au SAOS

Comme énoncé précédemment, le traitement de référence du SAOS consiste en l'application d'une PPC afin d'éviter l'obstruction des VAS et de normaliser la respiration durant le sommeil. Cependant, son aspect contraignant et son efficacité relative notamment chez les patients atteints de SAOS sévères présentant des comorbidités CVs conduisent au développement d'alternatives thérapeutiques. Dans cette partie je m'intéresserai particulièrement à une mesure hygiéno-diététique : l'exercice, qui est recommandé chez les patients apnéiques obèses afin de faciliter la perte de poids et ainsi réduire la sévérité du SAOS [252], les effets de l'exercice physique sur les paramètres cardiaques de patients SAOS restants indéterminés.

3.1. Exercice et cardioprotection

De nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence l'importance d'un exercice régulier sur la réduction de la mortalité suite à l'I/R chez l'Homme [253], et suggèrent qu'une intensité modérée d'exercice est suffisante pour diminuer le risque CV [254]. L'utilisation de modèles animaux a permis de confirmer le rôle direct de l'exercice dans la diminution de la taille d'infarctus [255] et a été observé dans des études ex vivo et in vivo suite à des protocoles d'I/R [256, 257]. Ce phénomène de cardioprotection se déroule en deux phases distinctes. Une première phase précoce, qui commence environ 30 min après une brève durée d'exercice mais qui dure seulement 3h, et qui active des mécanismes précoces de cardioprotection qui restent mal connus. Elle semble notamment entraîner la production d'une enzyme antioxydante endogène, la superoxyde dismutase (SOD) [258, 259]. La deuxième phase est plus tardive, nécessite au moins 3 à 5 sessions d'entraînements et intervient seulement 24h après la dernière session. Cependant, la cardioprotection induite peut persister durant 9 jours [260]. Dans de nombreux modèles animaux, ce type d'exercice permet notamment de diminuer l'apparition d'arythmies de reperfusion [261], de protéger de la sidération myocardique [262] et de diminuer la taille d'infarctus suite à des protocoles d'I/R comparés à des animaux sédentaires [263, 264]. Au niveau cellulaire, l'exercice permet d'améliorer la fraction de raccourcissement des cardiomyocytes isolés de rats et souris entraînés de 40%-50% [265, 266], et la relaxation de 20%-40% [267].

- Mécanismes moléculaires impliqués dans la cardioprotection par l'exercice

Les mécanismes de cardioprotection activés par l'exercice sont très variés. En théorie, cette cardioprotection pourrait être réalisée par l'ensemble des adaptations physiologiques qui vont limiter voire inhiber les conséquences délétères qui surviennent lors d'évènements CVs. Dans cette partie, je m'intéresserai donc aux principaux mécanismes moléculaires de cardioprotection connus à ce jour, principalement ceux intervenant pour limiter les dommages liés à l'ischémie myocardique.

La survie du myocarde est dépendante du statut énergétique de la cellule. Comme vu précédemment en partie 1.2., l'IM est responsable d'une activation de la glycolyse anaérobie et d'une accumulation de produits de dégradation menant à l'acidification cellulaire. Des stratégies de pré-conditionnement chez le rat par l'application de séances régulières d'exercice ont ainsi mis en évidence une diminution de la glycolyse durant l'ischémie associée à une diminution de la taille d'infarctus [268].

L'exercice est également connu pour augmenter la phosphorylation de la NOS endothéliale (eNOS) à la fois chez l'homme et l'animal, qui est associée à une biodisponibilité de NO augmentée qui protège le myocarde des lésions liées à l'I/R [269]. Une autre cible potentielle du pré-conditionnement par l'exercice concerne le relargage transitoire d'EROs. En effet, il a été prouvé que l'administration d'antioxydant durant l'exercice avant ischémie inhibe les effets cardioprotecteurs via la répression de l'activité de la NOX [268]. Son activité est augmentée à l'exercice et cette faible production d'EROs semble avoir un rôle majeur dans la désensibilisation du cœur à l'ischémie car elle pourrait augmenter les propriétés tampons antioxydantes. Enfin, les effets bénéfiques de l'exercice sur l'activation du stress du RE associé aux pathologies CVs sont mal connus mais semblent dépendre de la modalité et de la durée du protocole d'entraînement. L'application de 5 jours d'exercice chez le rat montre une absence de modifications d'expression de GRP78 suite à l'exercice et avant un protocole d'I/R. Néanmoins, dans un modèle de rats IC post-infarctus, 8 semaines d'exercice améliorent la contractilité cardiaque et sont associées à une diminution de l'expression de GRP78 et de CHOP [270].

Il existe également d'autres médiateurs activés par l'exercice qui pourraient représenter des mécanismes potentiellement cardioprotecteurs. Ainsi, l'exercice est connu pour augmenter la circulation coronaire et le réseau de collatérales ; l'expression de protéines chaperonnes (HSP72) connue pour améliorer les capacités antioxydantes et prévenir l'apoptose ; ou encore l'expression de COX2, un médiateur majeur de la cardioprotection par pré-conditionnement. Cependant, ces mécanismes ne semblent pas activés lors de brèves séances d'exercice et/ou leurs effets sur la cardioprotection par pré-conditionnement par l'exercice restent mal connus (figure 16). [268].

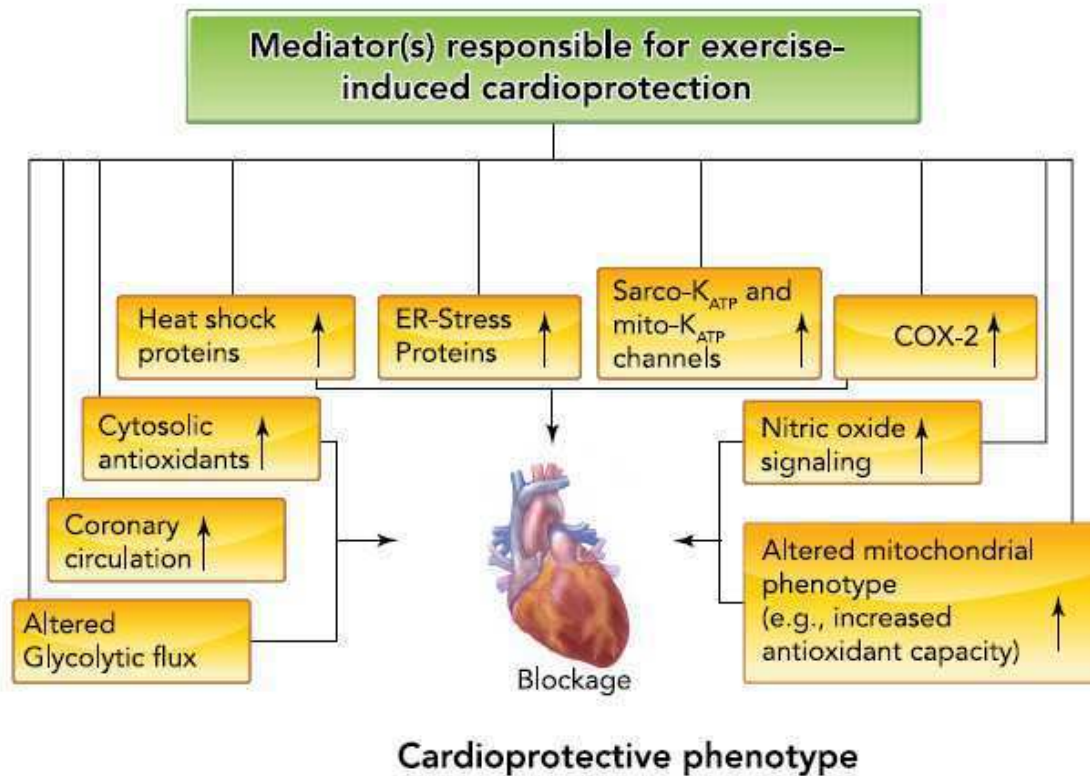


Figure 16. Représentation schématique des principaux médiateurs de la cardioprotection induite par l'exercice. Powers *et al.* 2014

3.2. Les différentes modalités d'exercice

- L'intensité

En 2011, l'OMS recommandait une pratique régulière d'activités à intensité modérée pour ses bénéfices reconnus sur la santé CV [271]. Cependant, peu de travaux s'étaient intéressés aux différentes modalités d'entraînement, tel que l'intensité. Pourtant, dès 2002, Tanaescu et al. étudiaient les effets de différentes intensités d'exercices sur le risque de survenue de maladie coronarienne chez l'homme et montraient une diminution de ce risque proportionnelle à l'intensité de l'activité [272].

L'exercice continu d'intensité modéré (ECM) traditionnellement recommandé pour ses effets sur la santé CV correspond à des séances continues pendant 150 à 180 minutes par semaine à une intensité de 50-70% de la consommation maximale en oxygène (VO_{2max}) [273]. En revanche, plus récemment, de nombreuses études cliniques ont montré les effets bénéfiques de l'exercice intermittent intense (EII) comme alternative potentielle à l'ECM pour améliorer la santé diminuer le risque CV. L'EII réfère à un protocole qui se caractérise par des durées d'activité relativement brèves réalisées à haute intensité, entrecoupées de périodes de repos ou d'exercices à faible intensité, et semble être à l'origine d'adaptations physiologiques similaires voire supérieures à l'ECM pour des

volumes et des durées d'exercices inférieures. En plus de proposer des effets bénéfiques similaires voire supérieurs à l'ECM, les patients pratiquant des EII présentent également une observance supérieure.

Au niveau CV, l'EII entraîne une diminution des pressions artérielles diastolique (PAD) [274] et systolique (PAS) [275] de manière similaire voire supérieure à l'ECM après 12 semaines d'entraînement, chez des patients présentant des dysfonctions vasculaires. Selon une méta-analyse datant de 2015, l'EII améliore également les capacités respiratoires par l'augmentation significative de la VO_{2max} de 14% à 46% selon les études, encore présente 6 mois post-entraînement chez les patients post-IM [276], alors que l'ECM présente une augmentation de 5% à 16% seulement [277]. Chez les patients IC, 4 semaines d'EII permettent également d'augmenter la VO_{2max} alors que l'ECM n'a pas d'effets [278]. Le remodelage ventriculaire pathologique, qui est associé à une augmentation de la morbi-mortalité CV, est également diminué de manière plus importante par l'EII comparé à l'ECM avec une réduction significative des volumes télédiastoliques et télésystoliques associé à une élévation significative de la fonction cardiaque chez des patients IC post-IM. [274].

L'utilisation de modèles expérimentaux ont permis de confirmer l'amélioration de la VO_{2max} par l'EII [279]. Ils ont également confirmé son rôle dans la diminution du remodelage ventriculaire pathologique induit par l'IM (diminution de l'hypertrophie cardiomyocytaire) [280], et dans l'amélioration de la fonction cardiaque (augmentation de la contractilité) [281], notamment via une restauration de l'homéostasie calcique (normalisation des transitoires calciques et de l'expression de la pompe SERCA2) [267, 280].

- La durée et/ou fréquence

Comme pour l'intensité, il semblerait exister une relation dose-réponse concernant la durée d'exercice [272]. Néanmoins, il a également été démontré que pour une dépense énergétique similaire entre les différents protocoles d'entraînements, les bénéfices sur la santé CV sont identiques malgré des durées de protocoles différentes [282]. Notamment, Wisloff et collaborateurs ont montré dans une étude prospective sur 16 ans qu'une seule session d'exercice de haute intensité par semaine permet de diminuer la mortalité CV de 39% chez les hommes et de 51% chez les femmes, alors que l'augmentation de la fréquence ou de la durée des sessions d'entraînements n'apportent pas de bénéfices supplémentaires [283]. Une pratique excessive peut même s'avérer délétère pour la santé CV. Par exemple, des études réalisées sur des athlètes de haut niveau pratiquant des disciplines d'endurance montrent une augmentation de la fibrose [284] l'apparition d'un remodelage ventriculaire pathologique [285] et une prévalence augmentée pour les arythmies [286]. Post-IM, alors que la pratique d'un exercice est fortement conseillée pour diminuer la mortalité CV, la pratique excessive de l'exercice (>7.1 km/jour de course ou >10.7 km/jour de marche

rapide) est associée à une à une augmentation de la mortalité liée aux maladies CVs [287]. Des études animales confirment l'apparition d'effets délétères lors d'entraînements intenses prolongés. Ainsi, 16 semaines d'exercice à haute intensité sont responsables d'une augmentation de la fibrose interstitielle chez des rats entraînés [288], et de l'apparition d'une dysfonction diastolique associée à un phénotype cardiaque pro-arythmogène [289].

Ainsi, les bénéfices de l'exercice sur la santé CV ont largement été démontrés et semblent dépendre de l'exercice lui-même, des modalités d'exercice ou encore du contexte physiopathologique. L'utilisation de l'EII semble très prometteuse dans la prévention / la gestion de toutes ces pathologies cardiaques, avec des effets similaires ou, dans de nombreux cas, supérieurs à l'EIM en ce qui concerne l'amélioration de la capacité aérobie, de la fonction ventriculaire et des pressions artérielles. De telles améliorations pourront avoir d'importantes implications cliniques pour l'amélioration de la santé, du bien-être et de la qualité de vie, ainsi que pour la diminution de la morbidité et de la mortalité dans les populations présentant à haut risque CV.

3.3. Exercice et SAOS

L'application de protocoles d'exercice chez les patients apnéiques permet de diminuer la prévalence du SAOS [290] et de diminuer sa sévérité par la réduction du phénomène de *fluide shift* chez les patients souffrants de coronaropathie [291]. De plus, la pratique d'une activité physique régulière permet d'améliorer la VO_{2max} chez les patients SAOS (de 18% à 25%) [292]. Enfin, l'exercice est connu pour améliorer de manière significative la qualité de vie des patients apnéiques (questionnaire *MOS SF-36*), via l'amélioration du sommeil notamment (de 6-8 % selon l'*Epworth Sleepiness Scale*), mais également par la diminution des symptômes dépressifs, de la fatigue et une augmentation de la vitalité [293].

Bien que les effets de l'exercice restent marginaux par rapport à ceux de la PPC, il représente un traitement complémentaire intéressant dans la prise en charge des symptômes associé au SAOS, notamment pour ses effets sur l'amélioration du sommeil et la diminution de la fatigue diurne.

Très peu d'études animales se sont intéressées aux effets cardioprotecteurs de l'exercice dans le contexte de l'HI. Toutefois, de récents travaux menés chez le rat ont mis en évidence un rôle majeur dans l'amélioration de la fonction cardiaque et des capacités antioxydantes ainsi que dans la diminution de l'inflammation, du stress oxydant et de l'apoptose myocardique induits par l'HI [294-296].

Ainsi, les effets cardioprotecteurs propres à l'exercice ont largement été démontrés et semblent étroitement associés aux mécanismes physiopathologiques impliqués dans les conséquences CVs du SAOS et de l'HI. Cependant, l'activation de ces mécanismes semblent dépendante des modalités

d'exercices qui peuvent varier selon la fréquence, la durée ou l'intensité et qui vont avoir un impact direct sur l'efficacité de la cardioprotection.

Deuxième partie : travaux de thèse

Le SAOS est considéré comme un facteur indépendant de risques CVs, responsable d'une augmentation du risque de survenue d'évènements et de leurs sévérités, augmentant significativement la morbi-mortalité CV chez les patients apnéiques. De plus, la prévalence du SAOS est largement sous-diagnostiquée et le coût médical lié aux apnées non traitées est estimé aux Etats-Unis à plusieurs milliards de dollars. Enfin, ces complications ne sont que partiellement prévenues par le traitement de référence, la PPC. Le SAOS représente donc un problème majeur de santé publique. Il nécessite une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans la pathologie, afin de développer des outils diagnostiques innovants et des thérapeutiques complémentaires qui permettraient d'améliorer la prise en charge du SAOS et de proposer aux patients apnéiques des traitements plus efficaces au niveau CV.

Je me suis intéressé durant cette thèse aux complications cardiaques associées au SAOS et plus particulièrement aux complications liées à la maladie ischémique cardiaque. Les objectifs de ces travaux ont été d'étudier chez des rongeurs l'impact de l'HI, conséquence majeure du SAOS en terme de complications cardiaques, sur la vulnérabilité du cœur à l'infarctus et sur le développement de la cardiomyopathie ischémique vers l'IC. J'ai étudié le rôle de 3 mécanismes cellulaires, l'activité sympathique, l'activation du facteur de transcription HIF-1 et le stress du RE qui sont activés par l'HI et qui pourraient avoir un rôle majeur dans le développement et la progression de la maladie ischémique médiée par le SAOS et l'HI.

Ce travail s'articule autour de trois articles originaux (2 publiés, 1 en cours de rédaction) présent dans ce manuscrit. Dans un premier temps, j'ai étudié l'activation de ces mécanismes par l'HI et leurs rôles dans l'augmentation de la vulnérabilité du cœur à l'infarctus (publication n°1 et publication n°2). Ensuite, je me suis intéressé au rôle de l'HI dans la progression de la cardiomyopathie ischémique vers l'IC (publication n°3), son impact sur le remodelage et la fonction ventriculaire et l'implication de ces trois mécanismes cellulaires dans les dysfonctions cardiaques observées.

La finalité de ce travail est d'améliorer la compréhension des conséquences physiopathologiques du SAOS impliquées dans le développement et la progression des maladies ischémiques, afin de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques ou de nouveaux marqueurs diagnostiques ou pronostiques chez des patients SAOS à haut risque CV.

1. Matériels et méthodes

Animaux

Les études présentées dans ce manuscrit ont été menées conformément aux pratiques recommandées par le guide national des instituts de santé pour la prise en charge et l'utilisation des animaux de laboratoire : *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH Pub.No. 85-23, Revised 1996).

Des rats Wistar mâles et des souris C57BL/6J adultes de l'élevage Janvier Labs (Le-Genest-Saint-Isle, France) sont utilisés dans ces travaux. Une partie des souris sont traitées durant 10 jours, à raison de 5 injection par semaine, avec de l'acide tauroursodeoxycholic (TUDCA, 75 mg.kg⁻¹). Nous avons également utilisé des souris HIF-1 α ^{+/-} élevées à la plateforme de haute technologie animale du Bâtiment Jean Rojet. Les projets sont approuvés par le comité d'éthique sur l'expérimentation animale de l'université Grenoble Alpes (n° d'autorisation 184_UHTA_U10428CA_03). Les animaux sont hébergés dans l'animalerie conventionnelle du laboratoire HP2 (n° d'autorisation A38 516 10006) avec des cycles jour-nuit de 12h/12h à une température de 20-22°C et disposent de nourriture et d'eau *ad libitum*.

Protocole d'exposition à l'hypoxie intermittente

Le dispositif d'exposition à l'hypoxie intermittente (HI) présent au laboratoire permet de mimer, chez le rat et la souris, les épisodes d'hypoxie-réoxygénations observés lors d'un SAOS. Afin de reproduire les épisodes de désaturation-resaturation en oxygène causés par l'HI, le dispositif soumet les animaux à des variations de la fraction inspirée en oxygène (FiO₂). Pour diminuer cette FiO₂, de l'azote, extrait de l'air, est envoyé dans les cages grâce à un système d'électrovannes. L'ouverture et la fermeture de ces dernières sont entièrement automatisées grâce à un système de pilotage informatisé programmable. Ce système permet d'exposer les animaux dans leurs propres cages, en groupe, et limite ainsi le stress induit par l'isolation.

Après une semaine de stabulation, les animaux sont exposés à l'HI à raison de 8h par jour durant leur période de sommeil. Les cycles d'HI durent 1 minute avec alternativement 30 secondes d'hypoxie (FiO₂=5%) et 30 secondes de normoxie (FiO₂=21%) à une fréquence de 60 cycles/heure (figure 17). La désaturation induite par les hypoxies correspond à des apnées sévères chez l'Homme, avec une saturation artérielle en O₂ d'environ 60%. Parallèlement aux cycles hypoxiques, des animaux « contrôles » sont exposés à la normoxie (N) dans des cages ventilées par des flux d'air à 21% de FiO₂ afin de les soumettre au même stress que les animaux exposés à l'HI. L'exposition des rats dans le dispositif se déroule de 14h30 à 22h30.

Dans l'article n°1, les rats ont été exposés à 21 jours d'HI ou de normoxie. L'article n°2 a nécessité des expositions de souris durant 14 jours alors que dans l'article n°3 les rats ont été exposés 1 semaine, 4 semaines et 12 semaines.

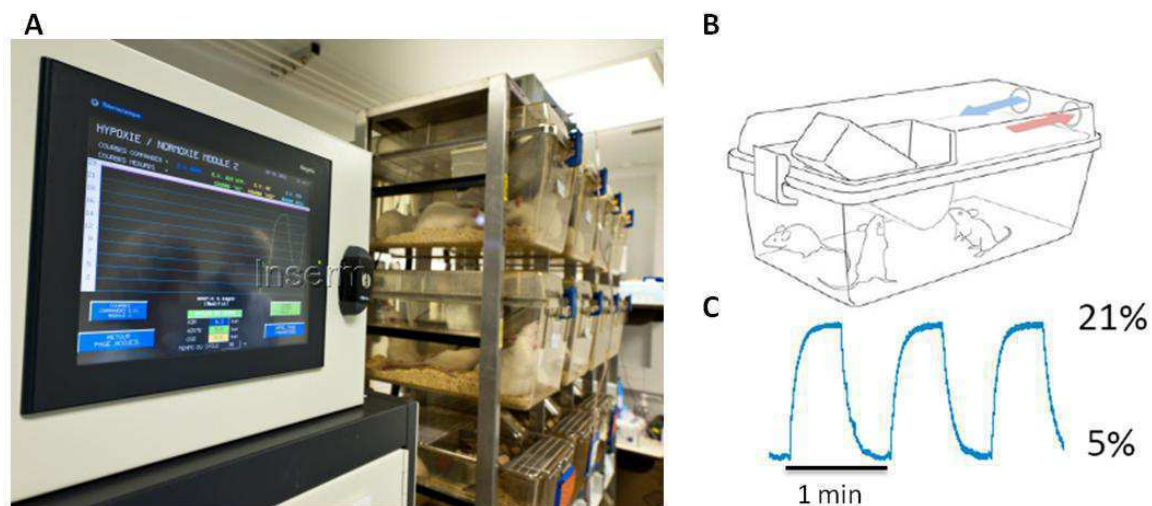


Figure 17. Dispositif d'exposition à l'HI de la plate-forme d'hypoxie du laboratoire HP2.

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

Procédures expérimentales sur animaux

- **Protocole d'infarctus aigu du myocarde : ischémie-reperfusion myocardique *in-vivo* (article n°1)**

Après exposition à l'HI, les souris sont anesthésiées par injection i.p. de pentobarbital sodique (70mg/kg), intubées et ventilées (volume courant : 0,2 ml et fréquence respiratoire : 160 respirations par minute). La température corporelle est maintenue constante à 37°C à l'aide d'une sonde rectale. Une thoracotomie antérieure gauche est réalisée, le péricarde retiré, et l'artère coronaire antérieure gauche est ligaturée de manière transitoire à l'aide d'un fil en soie tressé non résorbable (7-0). Après 45 min d'ischémie, la ligature est retirée afin de restaurer le flux coronaire durant 90 minutes.

- **Protocole d'infarctus aigu du myocarde : ischémie-reperfusion myocardique *ex-vivo* (article n°2)**

Après anesthésie [pentobarbital sodique (60mg/kg)] et administration d'héparine (500U/kg), le cœur est rapidement prélevé et perfusé de manière rétrograde selon la technique de Langendorff à pression constante (75 mmHg) par canulation de l'aorte. Le liquide de perfusion est un tampon Krebs-Henseleit (en mM : 118,0 NaCl, 25,2 NaHCO₃, 1,2 KH₂PO₄, 1,2 MgSO₄, 4,7 KCl, 11,0 glucose, 2,5

CaCl₂), oxygéné par un mélange oxygène-dioxyde de carbone (carbogène) [297]. La température du cœur est mesurée par une sonde thermique et maintenue à 37°C tout au long de l'expérimentation. Un ballonnet en latex rempli d'eau, couplé à un capteur de pression est inséré dans le ventricule gauche via l'oreillette gauche. La pression ventriculaire gauche en fin de diastole est ajustée à environ 7 mmHg. Le cœur est stabilisé pendant 20 minutes. C'est une étape importante pour l'homogénéité et la reproductibilité des résultats de l'ischémie/reperfusion (I/R). En effet, le myocarde est soumis à des contraintes en début de perfusion, principalement dépendantes du temps de montage du cœur après prélèvement, qui peuvent altérer de manière transitoire certains paramètres fonctionnels (débit cardiaque, fréquence cardiaque, présence d'arythmies). L'étape de stabilisation permet de normaliser ces paramètres ou d'exclure les cœurs jugés instables selon des critères d'exclusion préalablement déterminés [297]. Une ischémie globale est induite par un arrêt total de la perfusion rétrograde durant 30 minutes. Le maintien de la température est essentielle lors de cette étape car une diminution de la température myocardique ou hypothermie atténuée les lésions ischémiques [298]. Ensuite, le cœur est reperfusé durant 120 minutes. La nécrose myocardique est un processus dynamique qui intervient à la fois pendant l'ischémie mais aussi lors de la reperfusion et qui influence la taille d'infarctus. Le temps de reperfusion est variable selon les espèces. Chez le rat, la durée moyenne de reperfusion lors de l'étude de la taille d'infarctus est traditionnellement de 120 min. Des études ont également montré que 60 min de reperfusion seulement suffisent à obtenir des tailles d'infarctus identiques [299]. Les variables hémodynamiques sont enregistrées durant toute la durée du protocole [pression télédiastolique du ventricule gauche (PTDVG), pression développée du VG, contractilité (dP/dT) et fréquence cardiaque]. Ce protocole permet d'étudier la susceptibilité du cœur à l'ischémie/reperfusion par analyse de la taille d'infarctus.

- **Détermination de la zone à risque (article n°1)**

A la fin de la reperfusion, l'artère coronaire est brièvement ré-occluse, et 1ml de bleu Unisperse est injecté en intraveineux afin de délimiter la zone saine et la zone infarctée.

- **Détermination de la taille d'infarctus (article n°2)**

A la fin du protocole d'ischémie/reperfusion (I/R), les oreillettes sont retirées et le cœur est congelé puis coupé transversalement en tranches d'environ 2 mm d'épaisseur de l'apex à la base (6 à 7 tranches/cœur). Les tranches sont ensuite incubées 20 minutes à 37°C dans un tampon phosphate contenant 1% de chlorure de triphényltétrazolium (pH 7,4). Elles sont ensuite fixées dans du formaldéhyde 10% afin d'augmenter le contraste entre les zones viables colorées des zones

nécrosées restées blanches. Après 24h de fixation, les tranches sont photographiées et la taille de l'infarctus du ventricule gauche est déterminée à l'aide du logiciel Image J (NIH) et exprimée en pourcentage de la surface du ventricule gauche.

- **Exercice aérobie de haute intensité (EHI)**

L'entraînement des animaux est réalisé sur un tapis roulant motorisé. Les rats sont habitués au tapis à une vitesse maximale de 15m/min (pente 0%) durant 4 jours la semaine précédant le début du protocole. L'exercice aérobie de haute intensité (EHI) est effectué conjointement à l'exposition à l'HI, à raison de 5 entraînements par semaine et correspond à 2 sessions de 24 minutes entrecoupées d'une période de récupération de 30 minutes. Durant chacune des sessions, l'intensité de l'entraînement est augmentée par paliers. La vitesse initiale du tapis a été fixée à 15m/min pour le premier palier d'échauffement de 6 minutes. Ensuite, 6 paliers de 3 minutes sont réalisés pour augmenter progressivement l'intensité de l'exercice jusqu'à une vitesse de 30m/min. Les animaux sont entraînés durant 10 jours, à raison de 5 entraînements par semaine. Ce protocole a été développé en collaboration avec Hervé Sanchez (Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Operational Environments, Brétigny/Orge, France) pour être réalisé conjointement à l'exposition à l'HI, pour permettre une habitude rapide des animaux et pour avoir des effets bénéfiques observables dès 10 jours d'entraînements seulement. Nous avons vu en introduction que les exercices de haute intensité induisent des effets bénéfiques cardiovasculaires ou métaboliques similaires voir supérieurs aux exercices traditionnels en endurance. Nous avons donc comparé les effets d'un exercice en endurance et de l'EHI sur la biogénèse mitochondriale et les performances de course chez les rats afin de valider l'efficacité de l'EHI (Article n°1).

- **Vitesse maximale aérobie et endurance**

La vitesse maximale aérobie (VMA) peut être utilisée comme un indicateur de performance, d'après la relation linéaire entre la consommation en O₂ et l'intensité d'exercice. La VMA a été déterminée individuellement par l'utilisation d'un exercice incrémental se caractérisant par un échauffement de 6 minutes à 13 m/min suivi d'une accélération de la vitesse de 3 m/min toutes les 2 minutes jusqu'à essoufflement (0° de pente, Bioseb). La VMA correspond à la vitesse du dernier palier entièrement complété par le rat.

Dans cette étude, l'endurance a été définie comme le temps de course à 75% de la VMA avant essoufflement. Après 6 minutes d'échauffement à 15m/min, la vitesse est augmentée

progressivement jusqu'à atteindre 75% de la VMA. L'exercice est arrêté lorsque les rats ne sont plus capables de courir.

- **Protocole d'ischémie myocardique chronique : ligature permanente de la coronaire gauche *in-vivo* (article n°3)**

Les rats sont profondément anesthésiés [ketamine (100 mg/kg i.p. et xylazine (4 mg/kg i.p.)], intubés et ventilés avec un mélange 50% O₂ - 50% air à l'aide d'un respirateur contrôlant la fréquence respiratoire, le volume courant et le CO₂ expiré. L'anesthésie est maintenue avec 0,5% d'isoflurane. La température corporelle est également surveillée et maintenue à 37°C. Une thoracotomie antérieure gauche est réalisée, le péricarde retiré, et l'artère coronaire antérieure gauche est ligaturée de manière permanente à l'aide d'un fil en soie tressé non résorbable (6-0). La cage thoracique est ensuite refermée et la plaie suturée [300]. Les animaux Sham sont soumis aux mêmes procédures chirurgicales exceptée la ligature coronaire. Une échographie 2D est réalisée 3 jours après la ligature afin de valider la chirurgie cardiaque et d'exclure les animaux avec un infarctus trop petit ou sans akinésie transmurale de la paroi antérieure du VG [301]. Après validation de la chirurgie par échographie les animaux sont exposés à l'HI ou à la normoxie.

Le délai entre la chirurgie et le début de l'exposition à l'HI a été déterminé pour répondre à plusieurs problématiques. Tout d'abord il doit être suffisant pour observer des infarctus « stables », avec une extension de la zone nécrosée à l'ensemble des couches tissulaires myocardique (concept de « wavefront » de nécrose décrit en introduction). L'échographie permet également de sortir de l'étude les animaux avec un infarctus trop petit. Ensuite, l'exposition des animaux à l'HI est une procédure expérimentale classée modérée par le comité d'éthique (184_UHTA_U10428CA_03) qui induit une diminution de la prise alimentaire les premiers jours. Il est donc nécessaire de laisser aux rats un délai de récupération suffisant post-chirurgie avant le début des expositions. Cependant, ce délai doit être le plus court possible car le design de l'étude nécessite d'exposer les animaux rapidement après la ligature afin d'étudier l'impact de l'HI sur le remodelage ventriculaire qui intervient très précocement post-infarctus [26].

Il existe très peu d'études associant HI et insuffisance cardiaque [169], et aucune ne s'intéresse à l'impact de l'HI sur l'évolution de la pathologie ischémique. Nous avons donc imaginé ce protocole en tenant compte des paramètres énumérés ci-dessus et nous avons décidé d'exposer les animaux 3 jours post-chirurgie.

- **Echographie cardiaque**

Un suivi échographique hebdomadaire est réalisé chez les rats exposés 1 et 4 semaines et une fois toutes les 2 semaines pour les rats exposés 12 semaines. Les animaux sont anesthésiés par induction à l'isoflurane 4% (50% O₂ - 50% air) et maintenus à 2% isoflurane. A l'aide d'une sonde ultra-haute fréquence (MS250 13-24MHz, VisualSonics), les dimensions du ventricule gauche (VG) sont mesurées après un examen échographique parasternal en M-Mode selon le grand axe du myocarde. Les dimensions diastoliques et systoliques sont calculées comme la moyenne des mesures de 3 cycles cardiaques réalisés en M-Mode selon le grand axe du VG. L'échographie 2D est une technique non-invasive de référence pour l'étude de remodelage ventriculaire post-infarctus. Elle permet notamment de rendre compte de la dilatation de la cavité ventriculaire, renseigne sur la dysfonction contractile et sur les anomalies fonctionnelles induites par l'infarctus [301].

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

A la fin de la période d'exposition à l'HI ou la N, l'ECG et la pression artérielle sont enregistrés durant 10 minutes, sur les animaux anesthésiés [ketamine (100 mg/kg i.p. et xylazine (4 mg/kg i.p.)]. Des périodes de 5 minutes d'enregistrement sont traitées par un logiciel d'analyse spectrale spécifique pour petit animal (Nevrokard SA-BPV) de façon à obtenir les spectres fréquentiels de la variabilité de la fréquence cardiaque et des pressions artérielles systolique, diastolique, moyenne et différentielle. Après fenêtrage de Hanning (1024 points, 50% de chevauchement, résolution de 0,0195 Hz), le spectre de chaque segment est calculé selon la transformée de Fourier. Les bandes spectrales d'intérêt (basse fréquence, LF : 0,20-0,75 Hz, haute fréquence, HF : 0,75-3,00 Hz) sont sélectionnées selon les recommandations spécifiques du rat. Les composantes LF et HF des spectres de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle sont considérées comme des marqueurs de l'activité des systèmes nerveux sympathique ou parasympathique, respectivement. Le rapport LF/HF, correspondant à la balance sympatho-vagale est également calculée [302].

- **Cathétérisme intracardiaque**

A la fin des expositions, les rats sont profondément anesthésiés [ketamine (100 mg/kg i.p. et xylazine (4 mg/kg i.p.)], intubés et ventilés avec un mélange 50% O₂ - 50% air et maintenus avec 1% d'isoflurane durant la procédure. Un cathéter à capteurs pression-volume (SPR-869, Millar) est inséré dans la carotide droite pour un enregistrement de la pression artérielle basale (10 min, analyse spectrale) avant insertion rétrograde dans le VG pour enregistrer les paramètres hémodynamiques systoliques et diastoliques basals. Ils renseignent de manière instantanée sur la relation entre

pressions et volumes intraventriculaires lors d'un cycle cardiaque et sont représentés sous la forme d'une boucle pression-volume. L'enregistrement simultané des pressions et volumes permet de calculer de nombreux paramètres fonctionnels, tels que le volume d'éjection systolique, la relation pression-volume en fin de diastole (indice de relaxation ou effet lusitrope cardiaque) ou encore la relation pression-volume en fin de systole (indice de contractilité ou inotropisme cardiaque) [303]. Contrairement à l'échographie, le cathétérisme cardiaque est une technique invasive qui apporte des informations sur les performances ventriculaires lors des cycles cardiaques. Ainsi, l'association de ces deux techniques permet d'obtenir une représentation précise de l'évolution de la pathologie ischémique.

- **Détermination de la taille d'infarctus**

A la fin de la procédure de cathétérisme intracardiaque, le cœur est prélevé, les oreillettes sont retirées et les ventricules (VD et VG) sont pesés indépendamment. Le VG est ensuite ouvert de la base à l'apex et photographié. Les surfaces des zones infarctées et saine sont déterminées à l'aide du logiciel de traitement d'image Image J. Les tissus sont ensuite rapidement congelés pour les futures expériences de biologie moléculaire.

Approches biomoléculaires

Afin d'étudier les voies de signalisation potentiellement activées par l'HI et impliquées dans l'évolution de la maladie ischémique, nous utilisons diverses techniques de biochimie et de biologie moléculaires. Nous avons analysé l'activation du stress du RE, l'activation sympathique et l'expression du facteur de transcription HIF-1 α par western blot et transcription inverse de l'ARNm associée à une PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR).

- **Western blot**

Les tissus (cœur et surrénales) congelés sont homogénéisés à l'aide d'un mortier puis lysés (Precellys) dans un tampon dédié (5 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 20 mM NaF, 1 mM DTT et un inhibiteur de protéases). La concentration protéique est déterminée par la méthode de Bradford. Le western blot permet de séparer les protéines d'un échantillon par électrophorèse en fonction de leur poids moléculaire. Les lysats protéiques (30 à 50 μ g) sont chargés sur gel de polyacrylamide (8 à 12%) puis transférés sur membranes de PVDF par transfert semi sec de haute performance (Trans-Blot turbo) qui permet un transfert protéique en 3 à 7 minutes. Les membranes sont saturées pour limiter le signal non-spécifique. Des anticorps spécifiques, listés dans le tableau 2, sont ensuite utilisés pour

détecter les protéines d'intérêts. Un anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire et couplé à une peroxydase (HRP), est incubé en présence de l'anticorps primaire et s'y fixe. Un substrat chimio-luminescent tel que le ECL réagit avec l'anticorps secondaire couplé à la HRP et produit un signal visible sur film. Le résultat permet de déterminer la quantité relative de la protéine recherchée.

Anticorps	Distributeur	Dilution
ATF6	Santa Cruz Biotechnology	1:500
ATF4		
HIF-1 α		
GRP78		1:1000
Phospho PERK		
PERK		
Caspase 12		
CHOP		
GRK2		
Arrestine β 1/2		
TBP		
Tubuline		1:2000
Phospho eIF2 α		Cell Signaling Technology
EIF2 α		
Caspase 3	1:500	
Caspase 3 <i>clivée</i>		
β -actine	Sigma-Aldrich	1:2000

Tableau 2. Liste des anticorps utilisés pour l'étude du stress du RE et la signalisation sympathique par western blot et dilutions utilisées pour chacun d'eux.

- **PCR en temps réel couplée à une transcription inverse (RT-qPCR)**

La RT-qPCR est une association de techniques qui permet de faire une PCR (réaction en chaîne par polymérase) à partir d'un échantillon d'ARN. Les tissus (cœur et surrénales,) congelés sont homogénéisés à l'aide d'un mortier puis lysés (20 à 25 mg, Precellys). L'ARNm total est extrait à l'aide d'un kit d'extraction sur colonne (Nucleospin RNA Plus). L'ARN total (0,5µg) est tout d'abord rétro-transcrit pour obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc) à l'aide d'un kit contenant une enzyme ADN polymérase ARN dépendante ou transcriptase inverse (iScript, Biorad).

La qPCR en temps réel permet de quantifier en temps réel le nombre d'amplicons (portions d'ADN définies par un couple d'amorces) présent dans un échantillon grâce à un marqueur fluorescent qui se fixe sur l'ADN double brin (SYBR Green) lors de la réaction d'amplification. L'obtention de la cinétique complète de la réaction de polymérisation permet d'obtenir une quantification absolue de la quantité initiale d'ADN cible. Les couples d'amorces utilisés, qui permettent de définir les fragments d'ADN cible et leur conditions d'hybridation, sont listés dans le tableau 3.

Gènes	Paires d'amorces utilisées	T°
Cyca (rat)	Sens: 5'-TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG-3' Antisens: 5'-CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC-3'	60°C
Rplp0 (rat, souris)	Sens: 5'-CCCTGCACTCTCGTTTCTGGA-3' Antisens: 5'-AGGGGCAGCAGCCGCAAATG-3'	58°C
HPRT1 (rat)	Sens: 5'-GGGGGACATAAAAAGTTATTGGTGGGA-3' Antisens: 5'-GGTCCTTTTACCAGCAAGCTTG-3'	60°C
Nppa (rat, souris)	Sens: 5'-AGGCCATATTGGAGCAAATC-3' Antisens: 5'-CTCCTCCAGGTGGTCTAGCA-3'	60°C
Nppb (rat)	Sens: 5'-AACAACTCAGCCCCTCAC-3' Antisens: 5'-AGGCCATATTGGAGCAAATC-3'	62°C
Acta-1 (rat, souris)	Sens: 5'-GGCTCCCAGCACCATGAAGA-3' Antisens: 5'-CAGCACGATTGTCGATTGTCG-3'	63°C
MHC-1β (rat)	Sens: 5'-TTGCTCTACCCAACCCTAAGGATG-3' Antisens: 5'-TTGTGTTTCTGCCTGAAGGTGC-3'	60°C
TGF-1β (rat, souris, humain)	Sens: 5'-GCTGCTGACCCCACTGAT-3' Antisens: 5'-GCCACTGCCGGACAACCTC-3'	60°C
Collagène I (rat, souris, humain)	Sens: 5'-GCGAAGGCAACAGTCGATTC-3' Antisens: 5'-CCCAAGTCCGGTGTGACTC-3'	60°C
Collagène III (rat, souris, humain)	Sens: 5'-CAGCTGGCCTTCTCAGACTT-3' Antisens: 5'-GCTGTTTTTGCAGTGGTATGTAATG-3'	60°C
β1-AR (rat, souris, humain)	Sens: 5'-GCTGCGATTTTCGTACCAAC-3' Antisens: 5'-GTACACGAAGGCCATGATG-3'	60°C
β2-AR (rat, souris)	Sens: 5'-ACGACATCACTCAGGAACGG-3' Antisens: 5'-TAGATCAGCACACGCCAAGG-3'	60°C
GRK2 (rat, souris)	Sens: 5'-CCCTCTACCATCTCTGAGCA-3' Antisens: 5'-CGGTTGGGGAACAAGTAGAA-3'	58°C
Arrestine β1 (rat, souris)	Sens: 5'-CCTGTTTGTGGCTAACGTGC-3' Antisens: 5'-GTTTGGCGGGATCTCAAAGG-3'	60°C
Xbp1 <i>épissé</i> (rat)	Sens: 5'-GAGTCCGACGAGGTG-3' Antisens: 5'-GCGTCAGAATCCATGGGA-3'	58°C
CHOP (rat, souris, humain)	Sens: 5'-CTGGAAGCCTGGTATGAGGA-3' Antisens: 5'-CTCTGACTGGAATCTGGAGA-3'	58°C
HIF-1α (rat, souris)	Sens: 5'-TCTTTGCTGACCTGCTGGATTACAT-3' Antisens: 5'-CCAGGGAAAGCAAAGTTTGCATT-3'	60°C

Tableau 3. Récapitulatif des différentes amorces utilisées pour les RT-PCR et des températures d'hybridations correspondantes à chaque couple d'amorces.

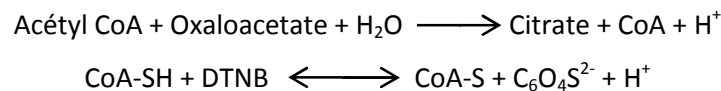
- **Dosage des catécholamines circulantes**

ELISA Catécholamines : La méthode immuno-enzymatique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) est utilisée pour étudier l'activation sympathique par le dosage des catécholamines circulantes (plasma). Cette technique permet de visualiser une réaction antigène-anticorps. L'anticorps est couplé à une enzyme catalysant la formation d'un produit coloré. La réaction peut ainsi être quantifiée par spectroscopie à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec des

concentrations connues d'antigène. La vitesse de la réaction enzymatique étant assimilée à la quantité d'enzyme, il est possible de parler de concentration d'activité catalytique en unités internationales par litre (UI/L)

- **Dosage de l'activité citrate synthase**

La citrate synthase est une enzyme du cycle de Krebs impliquée dans la biogénèse mitochondriale et présente dans les muscles squelettiques sollicités par l'exercice. L'activité enzymatique est évaluée à partir de la mesure de l'apparition de l'ion mercaptide ($C_6O_4S^{2-}$) qui absorbe à une longueur d'onde de 412 nm. Cette mesure est réalisée à partir du couplage des deux réactions suivantes :



Une première série de mesures pendant 3 minutes à 30°C est réalisée dans les cuves de 1,5 mL contenant 940 µL de tampon de mesure (810 µL d'eau ultrapure, 100 µL de DTNB Ellman's [5.5'-dithiobis- (2-Nitrobenzoic acide)] à 10 mM dans du Tris-HCl à 1 M, et 30 µL d'acétyl-CoA à 10mM) et 10 µL d'échantillon dilué (1/4). Pour chaque série de mesures, le blanc du spectrophotomètre est réalisé dans une cuve contenant 1 mL de tampon d'extraction. Cette série de mesures sans réactif permet d'obtenir l'état initial de la réaction (pente 1). La réaction est suivie par spectroscopie afin de suivre l'évolution de l'absorbance lors de l'ajout du substrat. L'ajout de 50 µL d'oxaloacetate (10 mM) initie la réaction et l'apparition de $C_6O_4S^{2-}$ est évaluée pendant 3 min à 30°C. L'évolution de l'absorbance permet de déterminer la pente 2. L'activité de la CS est calculée selon la loi de Beer-Lambert :

$$CS (UI.g^{-1}) = \frac{(\text{pente 2} - \text{pente 1}) \cdot 10^6}{\Sigma \times A \times B \times C}$$

Avec : $\Sigma = 13600 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

A = dilution de l'extrait dosé

B = dilution lors du dosage = 10^{-2}

C = concentration massique de l'échantillon = 50 mg.mL^{-1}

Cette activité enzymatique correspond à la quantité d'enzyme nécessaire à la transformation d'une quantité connue de substrat par unité de temps. Elle est rapportée au poids de muscle frais ($UI.g^{-1}$ poids frais)

- **Activité de HIF-1**

Une extraction nucléaire est réalisée sur les tissus homogénéisés. Les lysats sont ensuite déposés dans des puits avec des oligonucléotides contenant un HRE de HIF-1 afin de déterminer son activité spécifique. Ensuite, une technique classique d'ELISA à l'aide d'un kit avec une double incubation d'anticorps est utilisée (Abcam). L'anticorps secondaire est couplé à une enzyme (*horseradish peroxidase*) catalysant la formation d'un produit coloré. La réaction peut ainsi être quantifiée par spectroscopie à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec des concentrations connues d'antigène.

- **Histologie**

Le remodelage du myocarde et des surrénales est évalué par histologie. Les tissus sont fixés dans du paraformaldéhyde 4% (PFA 4%) avant d'être inclus dans la paraffine. Les tissus inclus sont ensuite coupés en sections transverses de 5 µm d'épaisseur (RM2255 Fully Automated Rotary Microtome, Leica). Les coupes sont déparaffinées au toluène et réhydratées par des bains successifs à des concentrations décroissantes d'éthanol.

Coloration Hématoxyline-éosine : La coloration hématoxyline éosine (HE) est une coloration bichromatique qui se compose d'un colorant nucléaire, l'hématoxyline, et d'un colorant cytoplasmique, l'éosine. L'hématoxyline est un colorant cationique qui a une affinité pour les éléments cellulaires chargés négativement (= anioniques ou acides). Il colore notamment les noyaux en bleu/violet, en se fixant sur les acides nucléiques. A contrario, l'éosine est un colorant anionique qui a une affinité pour les éléments cellulaires chargés positivement (= cationiques ou basiques) dits éosinophiles. Il colore le cytoplasme en rose et les autres éléments cellulaires basiques en rose/rouge plus ou moins vifs selon leur acidophilie.

Coloration Rouge Sirius : Le rouge Sirius est un colorant acide hydrophile qui colore en rouge les fibres de collagène, en microscopie optique. Le principe est basé sur la liaison forte entre les groupements acides sulfoniques du colorant et les groupements basiques des différents types de fibres de collagène :

- Les fibres de collagène de type I très abondantes dans l'organisme
- Les fibres de collagène de type III constitutives des fibres de réticuline

L'acide picrique, colorant jaune anionique faiblement hydrophobe, facilite la coloration (contraste).

2. Résultats

1.1. Article n°1 :

Impact d'une exposition à l'hypoxie intermittente sur la susceptibilité du cœur à l'ischémie-reperfusion *in-vivo* et étude de l'implication de l'axe stress du réticulum endoplasmique / HIF-1 myocardique.

Une précédente étude du laboratoire a montré que l'HI induisait une activation soutenue du facteur de transcription HIF-1, et que celle-ci était associée à une augmentation significative de la taille de l'infarctus suite à un protocole d'ischémie-reperfusion [152]. Des données suggèrent qu'en plus du stress hypoxique, d'autres stimuli, et en particulier le stress du réticulum endoplasmique (RE), pourraient activer HIF-1 [304]. L'activation de ce stress du RE semble également avoir rôle central dans la physiopathologie de la maladie ischémique [218].

Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une exposition chronique à l'HI (14 jours) induit un stress du RE myocardique qui contribue à l'activation de HIF-1 et qui prédispose le cœur à une susceptibilité accrue à l'ischémie-reperfusion.

Des souris C57Bl6/J et HIF-1 $\alpha^{+/-}$ ont été exposées à raison de 8h/jour à l'HI ou à la N pendant 14 jours. A la fin de l'exposition, les tissus ont été prélevés afin d'étudier l'activité de HIF-1 par ELISA et le stress du RE par Western-Blot. Les tailles d'infarctus ont été mesurées à la suite d'un protocole d'I/R *in-vivo*. Dans un groupe additionnel, une injection intrapéritonéale journalière de TUDCA, un inhibiteur du stress du RE, a été réalisée durant toute la durée de l'exposition afin d'étudier l'impact du stress sur la susceptibilité du cœur à l'I/R et sur l'activité de HIF-1.

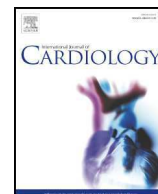
Les résultats obtenus confirment le rôle de l'HI dans l'augmentation de la taille d'infarctus et l'implication directe de l'axe stress du RE/HIF-1. Ainsi, le dépistage de ces voies de signalisation pourrait représenter un outil diagnostique intéressant pour la prise en charge des patients SAOS à haut risque de complications cardiovasculaires. De plus, les effets bénéfiques de l'inhibition du stress du RE lors de l'exposition à l'HI suggèrent une nouvelle approche thérapeutique potentielle afin d'améliorer le pronostic post-IAM chez les patients SAOS (i.e. réduire la taille d'infarctus et les complications associées).

Publication n°1

“Endoplasmic reticulum stress as a novel inducer of hypoxia inducible factor-1 activity: its role in the susceptibility to myocardial ischemia-reperfusion induced by chronic intermittent hypoxia “

Elise Belaidi, Guillaume Bourdier, Amandine Thomas, Sophie Moulin, Emeline Lemarié, Patrick Levy, Jean-Louis Pépin, Irina Korichneva, Diane Godin-Ribuot and Claire Arnaud

International Journal of Cardiology 2016; 45-53



Endoplasmic reticulum stress as a novel inducer of hypoxia inducible factor-1 activity: its role in the susceptibility to myocardial ischemia-reperfusion induced by chronic intermittent hypoxia☆☆☆☆☆☆



Elise Belaidi ^{a,b,*}, Amandine Thomas ^{a,b,1}, Guillaume Bourdier ^{a,b,1}, Sophie Moulin ^{a,b}, Emeline Lemarié ^{a,b}, Patrick Levy ^{a,b}, Jean-Louis Pépin ^{a,b}, Irina Korichneva ^c, Diane Godin-Ribuot ^{a,b,2}, Claire Arnaud ^{a,b,2}

^a Université Grenoble Alpes, Laboratoire HP2, Grenoble F-38042, France

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

^c Université Picardie, Laboratoire de biologie cellulaire moléculaire, Amiens 80000, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 January 2016

Received in revised form 9 February 2016

Accepted 14 February 2016

Available online 17 February 2016

Keywords:

Intermittent hypoxia

Myocardium

Endoplasmic reticulum stress

Hypoxia inducible factor-1

ABSTRACT

Background: Obstructive sleep apnea (OSA) is a highly prevalent disease and a risk factor for myocardial infarction expansion in humans. Intermittent hypoxia (IH) is known to be the most important OSA feature in terms of cardiovascular morbi-mortality.

Since ER stress and HIF-1 are known to be involved in cardiomyocyte life or death, this study investigates the role of ER stress on HIF-1 activation in myocardial susceptibility to ischemia-reperfusion (I/R) induced by IH.

Methods: C57Bl6J, HIF-1 $\alpha^{+/-}$ and their respective control mice were exposed to 14 days of IH (21–5% FiO₂, 60 s cycle, 8 h/day). Myocardial inter-organelle calcium exchanges, ER stress and HIF-1 activity were investigated and *in vivo* I/R was performed to measure infarct size. In additional groups, tauroursodeoxycholic acid (TUDCA, 75 mg·kg⁻¹), an ER stress inhibitor, was administered daily during exposure.

Results: In C57Bl6J mice, chronic IH induced an increase in ER-Ca²⁺ content, ER stress markers and HIF-1 activity, associated with an enhanced infarct size (33.7 ± 9.4 vs. 61.0 ± 5.6% in N and IH, respectively, $p < 0.05$). IH failed to increase infarct size in HIF-1 α deficient mice (42.4 ± 2.7 and 24.7 ± 3.4% N and IH, respectively). Finally, TUDCA totally abolished the IH-induced increase in HIF-1 activity (1.3 ± 0.04 vs. 0.14 ± 0.02 fold increase in IH vs. IH-TUDCA respectively, $p < 0.0001$) and in infarct size (55.5 ± 7.6 vs. 49.9 ± 3.0 in N-TUDCA and IH-TUDCA, respectively).

Conclusion: This novel regulatory mechanism of HIF-1 activity by ER stress should be considered as a potential diagnostic tool for cardiovascular complications in OSA patients as well as a therapeutic target to limit myocardial ischemic damage.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Obstructive sleep apnea (OSA) is a highly prevalent disease characterized by repetitive upper airway collapses during sleep leading to chronic intermittent hypoxia (IH) [1]. In 2008, the American Heart Association and American College of Cardiology jointly reported that OSA is

independently associated with increased risk of hypertension, coronary heart disease, arrhythmias, heart failure and death [2,3]. Buchner et al., demonstrated recently that co-existing OSA promotes myocardial infarct size expansion and less myocardial salvage after acute myocardial infarction [4].

Among the different consequences of OSA, nocturnal hypoxemia seems to strongly predict the risk of sudden cardiac death [5]. Since mechanistic studies are difficult to perform in OSA patients with data interpretation limited by numerous confounders, animal models of OSA have been developed and have shown that, among the different stimuli induced by OSA, chronic IH appears to be the most detrimental for the cardiovascular system [6]. In particular, in the context of deleterious hypoxemia mimicking, we and others have shown that chronic IH induces atherosclerosis [7,8], arterial hypertension [9], an increased susceptibility to myocardial infarction [9,10], and early heart failure [11] in rodents, likely through oxidative stress [12,13] and activation of the hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) [9,14]. HIF-1 is a transcription factor

☆ All authors take responsibility for all aspects of the reliability and freedom from bias of the data presented and their discussed interpretation.

☆☆ Grant support: This study was supported by grants from Fonds de dotation "Agir pour les maladies chroniques", Fondation de France (2014 00047989) and Université Joseph Fourier (INP-AGIR) (AG113CSV03).

☆☆☆ None of the authors has a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject and financial support of this manuscript.

* Corresponding author at: Laboratoire HP2, Institut Jean Roget, Facultés de Médecine-Pharmacie, BP 170/38042, Grenoble Cedex 9, France.

E-mail address: elise.belaidi-corsat@ujf-grenoble.fr (E. Belaidi).

¹ These authors contributed equally to this work.

² Co-senior authors.

composed of 2 subunits, the constitutive nuclear HIF-1 β subunit and the O₂-regulated cytosolic HIF-1 α subunit. In normoxic conditions, HIF-1 α hydroxylation by prolyl hydroxylase enzymes leads to its proteasomal degradation. In hypoxic conditions, HIF-1 α is stabilized and translocated to the nucleus where it dimerizes with HIF-1 β to activate the transcription of various genes [15]. Depending on the intensity and duration of the hypoxic stimulus, HIF-1 triggers the transcription of genes that are involved in either adaptive (*i.e.* inducible nitric oxide synthase) or detrimental (*i.e.* ET-1) responses. Although HIF-1 is involved in myocardial pre- and post-conditioning [16–18] it also triggers cardiovascular deleterious response to chronic IH [14]. For example, we have previously demonstrated that HIF-1 binding on the ET-1 gene increases the susceptibility of the myocardium to ischemia–reperfusion (I/R) injury [9]. Although hypoxia is a potent determinant of HIF-1 activity, recent data suggest that HIF-1 could also be activated by other stress. In particular, Werno et al. have demonstrated an increase in HIF-1 α mRNA content following an endoplasmic reticulum (ER) stress [19] and Lopez-Hernandez et al. have recently suggested that HIF-1 α level is regulated by ER stress in the context of chemical hypoxic neuronal death [20].

ER stress occurs in both physiological and pathological conditions (*i.e.* oxidative stress, ischemia, hypoxia, Ca²⁺ disturbances...). Especially, it is involved in various OSA-associated pathologies such as atherosclerosis, diabetes, and ischemic heart disease [21,22]. Calcium homeostasis disturbances and/or unfolded proteins accumulation in the ER triggers the unfolded protein response (UPR). UPR is initiated by the release of glucose-regulated protein 78 kDa (Grp78) from transmembrane ER sensors to resolve ER stress. Briefly, UPR leads to activation of 3 pathways characterized by (i) double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase (PERK), (ii) activating transcription factor 6 (ATF6), (iii) inositol required enzyme 1 (IRE-1), resulting in ER homeostasis recovery. However, when ER stress is excessive and prolonged, the UPR promotes cell death especially through activation of the pro-apoptotic transcription factor C/EBP homologous protein (CHOP). The role of ER stress in cardiovascular diseases is well recognized [23]. In particular, intense ER stress plays a pivotal role in the cell death induced by myocardial ischemia–reperfusion [21]. Recent studies have evidenced an ER stress in both brain [24–26] and heart [27–29] of rodents exposed to chronic IH. Furthermore, the IH-induced ER stress in the brain appears to be related to HIF-1 since CHOP deletion abolished the IH-dependent increase in HIF-1 α mRNA content [25]. While ER stress and HIF-1 pathways have been viewed as two major factors in triggering damage to the heart under the condition of IH, the interrelationship between them in this pathophysiological condition has not been established. Activation of the ER stress/HIF-1 pathway by chronic IH could represent a major contributing factor in the enhanced response to myocardial ischemia–reperfusion and possibly, a potential therapeutic target against OSA-associated cardiovascular pathologies.

The aims of the present study were: first, to determine whether chronic IH exposure *per se* induces a myocardial ER stress that predisposes the myocardium to an increased susceptibility to I/R *in vivo*; and second, to investigate the relationship between IH-induced ER stress, HIF-1 activation and consequently myocardial sensibility to ischemia–reperfusion injury.

2. Methods

2.1. Animals

Male C57BL/6J mice, HIF-1 α +/- or their wild-type (WT, Swiss x S129) littermates (8 week old) were randomized to 14 days of IH or air (normoxia, N). The IH stimulus was applied automatically during daytime, as rodents preferentially sleep during this period. IH consisted of repetitive cycles of hypoxia and reoxygenation. Briefly, cages were

flushed for 30 s with nitrogen to achieve a hypoxia plateau (5% FiO₂) followed by 30 s of air to restore N (21% FiO₂).

A set of mice were intraperitoneally (*i.p.*) treated 5 days per week of exposure, during the exposure, with the tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) an ER stress inhibitor (75 mg·kg⁻¹). The experiments were conducted in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Council of Europe, European Treaties ETS 123, Strasbourg, 18 March 1986) and with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 85–23, revised 1996) and were approved by an Institutional Animal Care and Use Committee (agreement number B 38 516 10 006, n° 273_UHTA-U1042-EBC-02).

2.2. Ischemia–reperfusion protocol

At the end of the IH exposure, HIF-1 α ^{+/-} and their WT control mice, as well as C57Bl6J mice, treated or not with TUDCA, (Fig. 1) were anesthetized by an *i.p.* injection of sodium pentobarbital (70 mg·kg⁻¹). Animals were intubated with a tidal volume of 0.2 ml and a breathing rate of 160 per minute. Body temperature was maintained at 37 °C. A left thoracotomy was performed and the pericardium was removed. A 7-0 silk suture was passed around the left interventricular artery. Successful left interventricular coronary artery occlusion was confirmed by an ST segment shift on the electrocardiogram (Powerlab) and whitening of the ischemic area. After 45 min of ischemia, the ligature was removed and the myocardium was reperfused for 90 min, according to a previous study showing that 90 min is enough to induce a stable comparable necrosis area [30].

2.3. Infarct size measurement

At the end of reperfusion, the coronary artery was briefly re-occluded, and 1 ml Unisperse blue pigment was injected intravenously to delineate the area at risk (AAR). Then, hearts were excised and cut into five 1 mm-thick transverse slices. Each slice was incubated for 20 min in a 1% triphenyltetrazolium chloride solution at 37 °C to differentiate infarcted from viable myocardial areas [31]. Extent of AAR and area of necrosis (AN) was quantified by planimetric analysis (Image J software) and corrected by the weight of each slice [32].

2.4. Murine adult cardiomyocytes isolation and calcium measurements

Cardiomyocytes were isolated with enzymatic digestion according to a previously described procedure [33]. To measure cytosolic, endoplasmic reticulum or mitochondrial Ca²⁺, cardiomyocytes were loaded for 20 min at 37 °C with Fluo4-AM (3 μ M; Invitrogen), Fluo-5N (3 μ M; Invitrogen), or Rhod2-AM (6 μ M; Invitrogen), respectively. After being loaded, probes were washed out with Tyrode solution and calcium organite content was recorded by confocal microscopy (DynaScope-LSM710 equipped with a 63 \times lens). Fluo4-AM, Fluo-5N and Rhod2-AM fluorescence signals were obtained by excitation at 488 nm and detected with a spectral range between 495 and 699 nm (HFT488 dichroic beamsplitter). Cells were analyzed with paired combinations of probes (Fluo4-Rhod2/Fluo5-Rhod2). For each probe, fluorescence recorded after ER leakage, induced by inositol triphosphate receptor-mediated stimulation (histamine 10 μ M), was expressed relative to baseline (F1/F0). Results (mean values of 4 cells per heart) were computed by calculating the Ca²⁺ slope between 100 and 50 s (slope_{100–50}) after histamine.

2.5. Assessment of myocardial ER stress and HIF-1 α

Myocardial ER stress was assessed in C57Bl6J mice, either at the end of the IH exposure (in left ventricle from mice treated or not with TUDCA) or after the I/R protocol (in AAR, after 15 min of reperfusion). HIF-1 α mRNA content or nuclear/cytosolic ratio were assessed at the

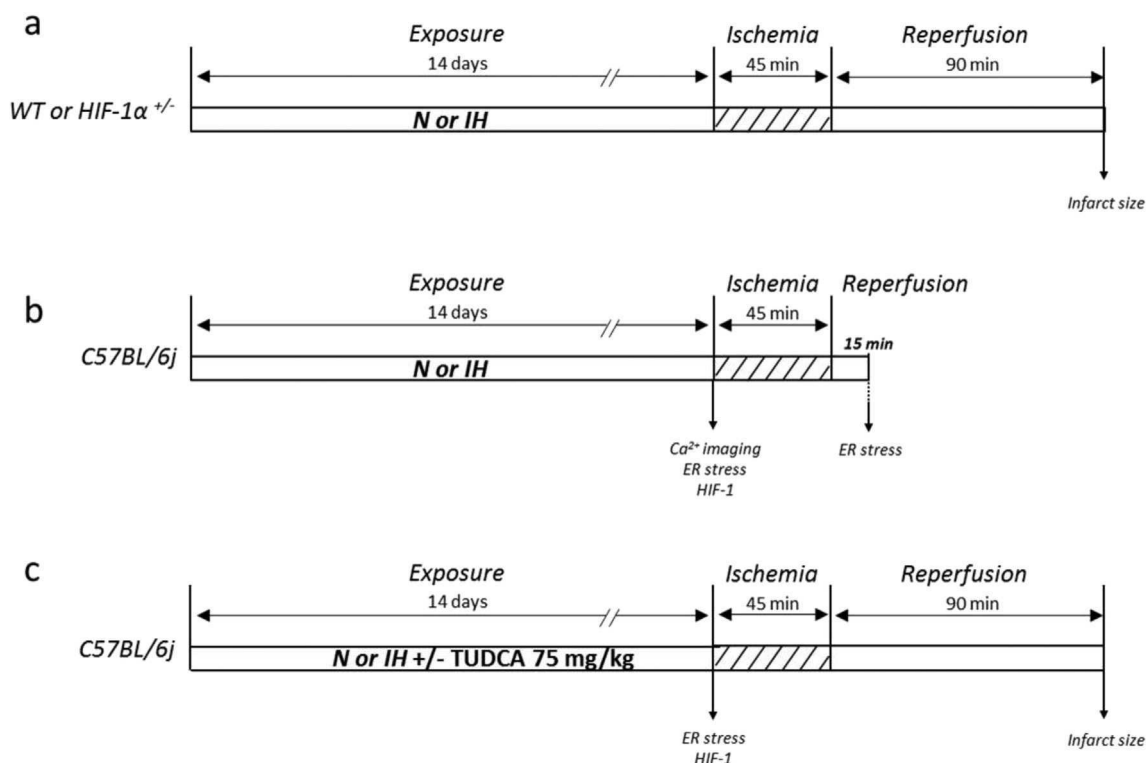


Fig. 1. Experimental design. (a) Wild-type (WT) and HIF-1 α ^{+/-} mice were randomly submitted to intermittent hypoxia (IH) or air (N) during 14 days, followed by an *in vivo* ischemia (45 min)-reperfusion (90 min) (I/R) protocol to measure infarct size. (b, c) C57Bl6j mice were exposed to 14 days of IH or N, treated or not with tauroursodeoxycholic acid (TUDCA, 75 mg·kg⁻¹ i.p., 5 days per week) and submitted or not to an *in vivo* ischemia/reperfusion (I/R) protocol. Intra-organelle calcium exchanges, ER stress and HIF-1 activity were investigated at different time points after IH exposure and/or I/R protocol and infarct size was assessed at the end of the I/R protocol, as previously described.

end of IH exposure, in mice treated or not with TUDCA (Fig. 1). Hearts were rapidly harvested and frozen in liquid nitrogen before cytosolic and nuclear protein extraction using nuclear extract kit (Active Motif), as previously described [9]. Expression of myocardial Grp78, CHOP, ATF6 α , ATF4, Cleaved(c)-caspase3(casp3), casp3, HIF-1 α and phosphorylation of eIF2 α and PERK were assessed by Western blot. Proteins were submitted to electrophoresis (10–12% acrylamide) and transferred to a polyvinyl di-fluoride membrane before antibody hybridization (anti-Grp78, PeIF2 α , eIF2 α , PPERK, PERK, CHOP, ATF6 α , ATF4, cCasp3, casp3 actin, tubulin (1/1000, Santa Cruz and Cell signaling)) and chemiluminescence protein detection. All quantifications were performed relative to tubulin or actin and nuclear/cytosolic ratio was calculated for CHOP, ATF4 and HIF-1 α . Total mRNA was also extracted. Total Xbp-1, unspliced Xbp-1 and HIF-1 α mRNA contents were assessed by quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction and normalized with hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT). Primers were 5'GTGCAGGCCAGTTGTACC^{3'}/3'TCTGGGTAGACCTCTGGGAG^{5'} for total Xbp1, 5'CAGACTATGTGCACCTCTGC^{3'}/3'TCTGGGTAGACCTCTGGGAG^{5'} for unspliced Xbp1, 5'ACGATGAACATCAAGTCAGCAACG^{3'}/3'TCACAAATCAGCACCAAGCAGC^{5'} for HIF-1 α and 5'TCTTGCTGACTGCTGGATTACAT^{3'}/3'CCAGGGAAAGCAAAGTTTGCATT^{5'} for HPRT. Total and unspliced Xbp-1 mRNA contents were quantified using a Xbp-1 standard curve and Spliced Xbp-1 (sXbp-1) was then calculated by the formula (total Xbp-1–unspliced Xbp-1). HIF-1 α mRNA content was calculated relative to HPRT, using the 2 $^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

2.6. Assessment of myocardial HIF-1 activity

Nuclear extracts were then incubated in wells coated with oligonucleotides containing an HIF-1 hypoxia response element in order to detect specifically nuclear active HIF-1. Then, a classic ELISA technique was performed using a kit containing dual antibody incubation and horseradish peroxidase luminescence (Abcam).

2.7. Statistical analysis

Graphics were obtained using Graph Pad Prism® software. Results, expressed as means \pm SEM, were analyzed using two-way analyses of variance followed by post-hoc *t*-test (Bonferroni) using Graph Pad Prism®. Statistical significance was set at *p* less than 0.05.

3. Results

3.1. IH increases myocardial susceptibility to ischemia-reperfusion through HIF-1 activation

Although previous work suggests a role for HIF-1 in IH-induced infarct size enhancement, its direct involvement remains to be evidenced. Here, we addressed this question using mice with partial HIF-1 α deficiency. The extent of ischemia was similar in all experimental groups since there was no significant difference in the AAR/LV ratio (Fig. 2a). While chronic IH induced a significant increase in infarct size in WT mice (33.7 \pm 9.4 vs. 61.0 \pm 5.6% in N and IH groups, respectively, *p* < 0.05), it did not increase infarct size in HIF-1 α ^{+/-} mice (42.4 \pm 2.7% vs. 24.7 \pm 3.4% in N and IH groups, respectively) (Fig. 2b). This result definitely demonstrates the foremost role of HIF-1 in the increase in myocardial I/R injury induced by IH.

3.2. IH induces myocardial ER Ca²⁺ overload, ER stress and subsequent ischemia-reperfusion injury

3.2.1. IH induces ER Ca²⁺ overload and ER stress

ER stress is known to have a major impact in cardiomyocyte survival and death. In order to understand the impact of chronic IH on cell death, cardiomyocytes calcium exchanges between ER, cytosol and

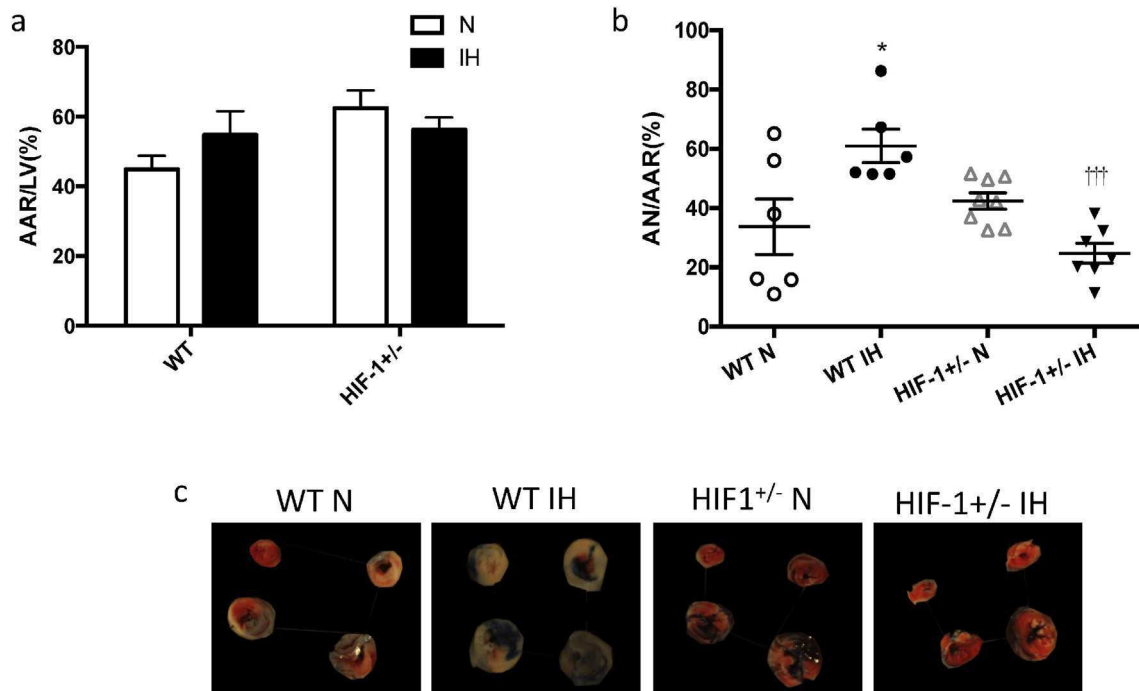


Fig. 2. HIF-1 is involved in chronic intermittent hypoxia (IH)-induced increase in myocardial infarct size. *In vivo* ischemia (45 min)-reperfusion (90 min) was performed in wild-type (WT) and HIF-1 α ^{+/-} mice, submitted to IH or N. (a) Area at risk (AAR) relative to left ventricle (LV) and (b) area of necrosis (AN) relative to area at risk were evaluated by colorimetry and planimetry. (c) Representative images of myocardial infarct expansion in each group. Data are means \pm SEM, *p less than 0.05 vs. WT/N mice, †††p less than 0.001 vs. WT /IH (n = 6–8).

mitochondria as well as myocardial ER stress markers were assessed after IH alone. We also performed ER stress assessment after IH plus I/R protocol.

In N mice, histamine-induced Ca²⁺ leakage from the ER was accompanied by an increase in cytosolic and mitochondrial Ca²⁺. However, in cardiomyocytes from IH-exposed mice, histamine did not induce a Ca²⁺ leakage from the ER (Fig. 3d, blue line). This is also characterized by an increase in ER Ca²⁺ loading (F1/F0 slope_{100–50}: 0.25 \pm 0.08 vs. 0.04 \pm 0.03 in IH and N groups, respectively, p < 0.05) (Fig. 3b). Fig. 3d also shows a weak increase in cytosolic Ca²⁺ content (green line) and a higher mitochondrial Ca²⁺ loading (red line) in IH compared to N.

Intermittent hypoxia *per se* induced a myocardial ER stress characterized by an increased Grp78 content (1.3 \pm 0.1 fold increase vs. N, p < 0.05), eIF2 α phosphorylation (1.3 \pm 0.1 fold increase vs. N, p < 0.05) and Xbp-1 s mRNA expression (3.8 \pm 0.9 fold increase vs. N, p < 0.05) (Fig. 3e, f, m) whereas PERK phosphorylation, nuclear/cytosolic ATF4 ratio and ATF6 α expression were not changed (Fig. 2g, h, k). Interestingly, nuclear/cytosolic CHOP was significantly decreased by IH alone (0.4 \pm 0.05 fold decrease vs. N, p < 0.05) (Fig. 3i). Simultaneously, IH induced a significant increase in cCasp3/casp3 ratio (2.5 \pm 0.3 fold increase vs. N, p < 0.01) (Fig. 3j).

After the *in vivo* I/R protocol, ER stress was also more important in IH than in N mice. It was characterized by a dramatic decrease in Grp78 expression (0.6 \pm 0.1 fold decrease vs. N, p < 0.01) and Xbp-1 splicing (0.5 \pm 0.07 fold decrease vs. N, p < 0.001) without modification in eIF2 α phosphorylation and ATF6 α expression (Fig. 4a, h, b, g). IH also enhanced PERK phosphorylation (2.2 \pm 0.7 fold increase vs. N) and increased nuclear/cytosolic ATF4 ratio (2.8 \pm 0.8 fold increase vs. N, p = 0.0866) and CHOP ratio (6.1 \pm 1.2 fold increase vs. N, p = 0.0591) (Fig. 4c, d, e). However, this was not associated with elevation of cCasp3/casp3 ratio (Fig. 4f). These results demonstrate a differential ER stress response depending on the hypoxia-reoxygenation status (IH vs. IH + I/R).

3.2.2. ER stress inhibition abolishes the IH-induced increase in infarct size

In order to demonstrate the impact of IH-induced ER stress status on subsequent ischemia-reperfusion injury, we administered an ER stress

inhibitor, tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), a chemical chaperone derived from bile salt. Daily TUDCA administration during IH exposure decreased all ER stress markers as well as cCasp3/casp3 ratio, validating TUDCA as an inhibitor of IH-induced ER stress (Supplemental data Fig. S1 a-i). The extent of ischemia was similar in all experimental groups since there was no significant difference in the AAR/LV ratio (Fig. 5a). TUDCA treatment totally abolished the IH-induced increase in infarct size (41.6 \pm 6.0% vs. 64.9 \pm 6.5% in untreated N and IH groups, respectively, p < 0.05 compared to 55.5 \pm 7.6% vs. 49.9 \pm 3.0% in TUDCA-treated N and IH groups, respectively) (Fig. 5b). This demonstrates that ER stress plays a major role in myocardial I/R injury induced by IH exposure.

3.3. Relationship between ER stress and HIF-1 signaling

IH is known to activate HIF-1 especially through oxidative stress. IH did not impact mRNA content or nuclear/cytosolic HIF-1 α ratio (Supplemental data Fig. S2a, b) whereas it significantly enhanced myocardial HIF-1 activity (1.3 \pm 0.04 fold increase in IH vs. N mice, p < 0.001) (Fig. 6). TUDCA treatment decreased HIF-1 α mRNA content (0.48 \pm 0.03 fold decrease vs. IH-TUDCA, p < 0.001) without any effect on nuclear/cytosolic HIF-1 α ratio (Supplemental data Fig. S2 c, d). Finally, TUDCA dramatically reduced HIF-1 activity in N (0.17 \pm 0.04 fold increase vs. control N mice, p < 0.0001) and IH-exposed mice (0.14 \pm 0.02 fold increase vs. control N mice, p < 0.0001) and completely abolished its IH-dependent increase (Fig. 6). This demonstrates that ER stress is a new myocardial activator of HIF-1 during IH.

4. Discussion

Obstructive sleep apnea is known to contribute to infarct expansion and less myocardial salvage after acute myocardial infarction [4]. In the current study, we provide *in vivo* evidence in mice that intermittent hypoxia induces a myocardial ER stress associated with HIF-1 activation, leading to infarct size expansion. Moreover, we demonstrate that both increased infarct size and HIF-1 activation were attenuated by specific ER stress inhibition during IH exposure.

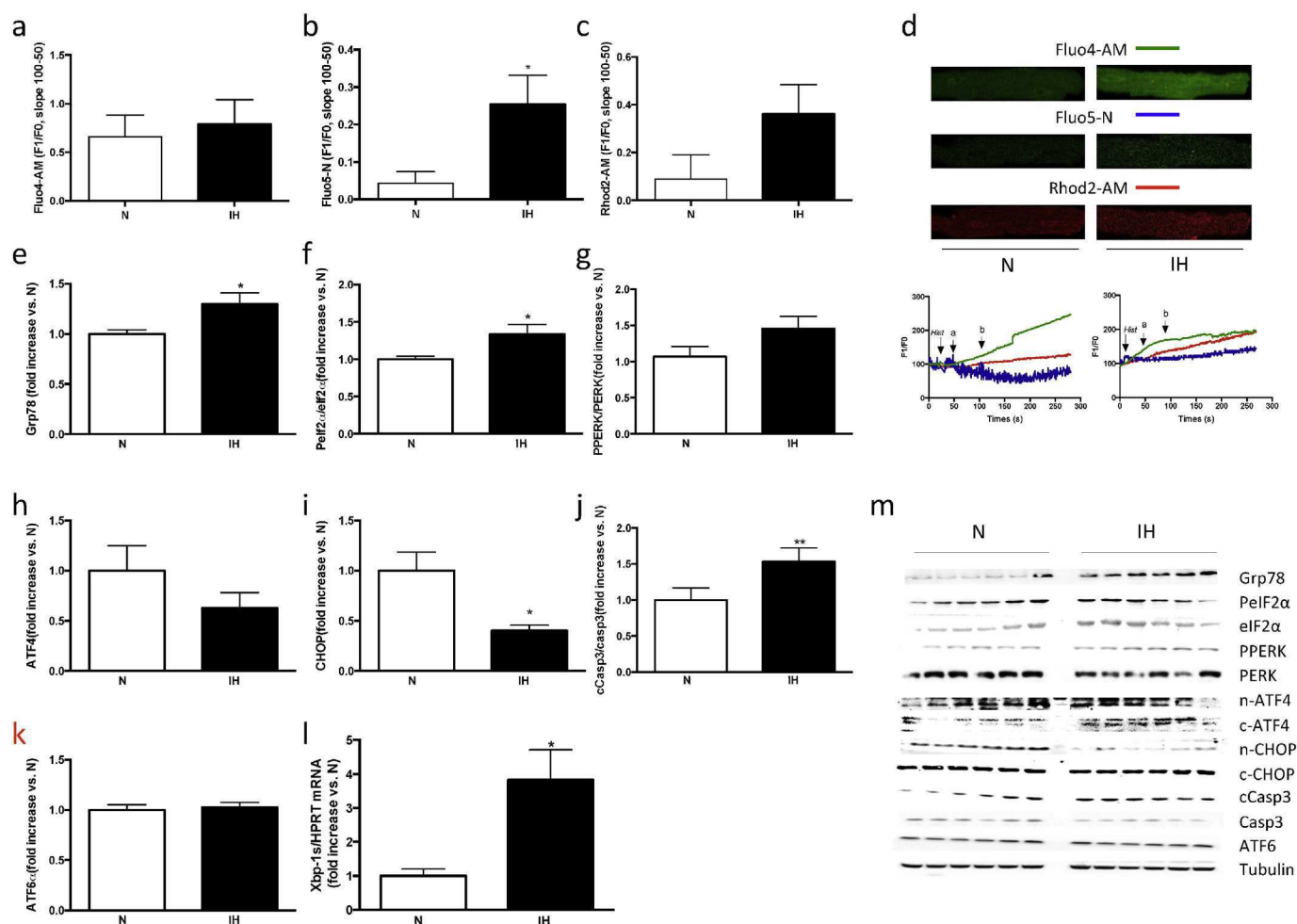


Fig. 3. Intermittent hypoxia (IH) induces Ca^{2+} homeostasis disturbances and myocardial ER stress. (a–d) Inter-organelle Ca^{2+} exchanges were analyzed on isolated cardiomyocytes from mice exposed to IH or N. Ca^{2+} slopes (100–50 s) were determined after ER leakage with histamine (10 μM) in (a) cytosol (Fluo4-AM), (b) ER (Fluo5-N) and (c) mitochondria (Rhodamin-2), (n = 7–8). (d) Representative responses of isolated adult cardiomyocyte after histamine. (e–m) Myocardial ER stress was assessed in mice exposed to IH or N for 14 days. (e) Grp78 relative to tubulin, (f) phospho-eIF2 α relative to eIF2 α , (g) phospho-PERK relative to PERK, (h) nuclear to cytosolic (n/c) ratio of ATF4, (i) n/c ratio of CHOP, (j) cleaved-caspase3 (casp3) relative to casp3, (k) ATF6 α relative to tubulin, (l) myocardial mRNA expression of spliced XBP-1 (Xbp-1s) relative to HPRT and (m) representative immunoblotting for the above proteins. Data are means \pm SEM, *p less than 0.05, **p less than 0.01 vs. N mice (n = 4–6 per group).

4.1. HIF-1 plays a pivotal role in the IH-induced increase in infarct size

Depending on the duration, depth and pattern of the hypoxic stimulus, IH can induce both beneficial and detrimental effects [6] on the myocardium that have all been related to HIF-1 activation [9,16]. Others and we have shown that acute paradigms of intermittent or sustained hypoxia as well as ischemic preconditioning reduce myocardial infarction [16,34–37]. The involvement of HIF-1 in IH-induced preconditioning is confirmed by the lack of cardioprotection in mice with partial HIF-1 α deficiency [35]. In contrast, recent data demonstrated that long-term HIF-1 activation by HIF-1 inducers or PHD2 inhibitors results in myocardial failure [38,39]. The mechanisms involved in the switch from protective to maladaptive responses have not been specifically investigated but this paradoxical effect of HIF-1 appears to be relevant in clinical situations particularly to explain the failure of cardioprotective strategies. Previous data from our group suggest that response to IH could depend on specific gene transcription by HIF-1. For example, we have demonstrated that HIF-1-induced iNOS gene expression was necessary for IH preconditioning since prevention of HIF-1 interaction with the iNOS gene promoter also abolished the cardioprotection [16]. In contrast, we also demonstrated that chronic IH activates HIF-1-related transcription of endothelin-1 gene, leading to subsequent increase in infarct size [9].

The present study is the first to show the detrimental effect of chronic IH on myocardial infarct size *in vivo*, since all previous studies were performed on less clinically relevant *ex vivo* preparations [10,12,16]. To our knowledge, this is the first direct demonstration of HIF-1 involvement in myocardial I/R injury following chronic IH. This result represents a logical continuation of our published work demonstrating the role of ET-1, one of HIF-1 major target genes, in the IH-induced increase in myocardial infarction [9]. Furthermore, in a recent clinical report, Kaczmarek et al. have shown that tissue HIF-1 α mRNA content positively correlates with O_2 desaturation in OSA patients [40]. Thus, the need to evaluate and control HIF-1 activation in OSA patients, and more especially in patients with cardiovascular risk factors, is an emerging aspect of translational research.

4.2. ER stress is involved in the IH-induced increase in infarct size

Severe ER stress plays a pivotal role in cell death in response to myocardial ischemia–reperfusion (I/R) [23]. We and others recently demonstrated the efficiency of cardioprotective strategies (*i.e.* adiponectin [27] and methallothionein [28] treatments and high intensity exercise [41]) in reducing IH-induced myocardial apoptosis and ER stress. However, the role of ER stress in the IH-induced increase in infarct size remains to be directly evidenced. In the present study, we highlight that chronic

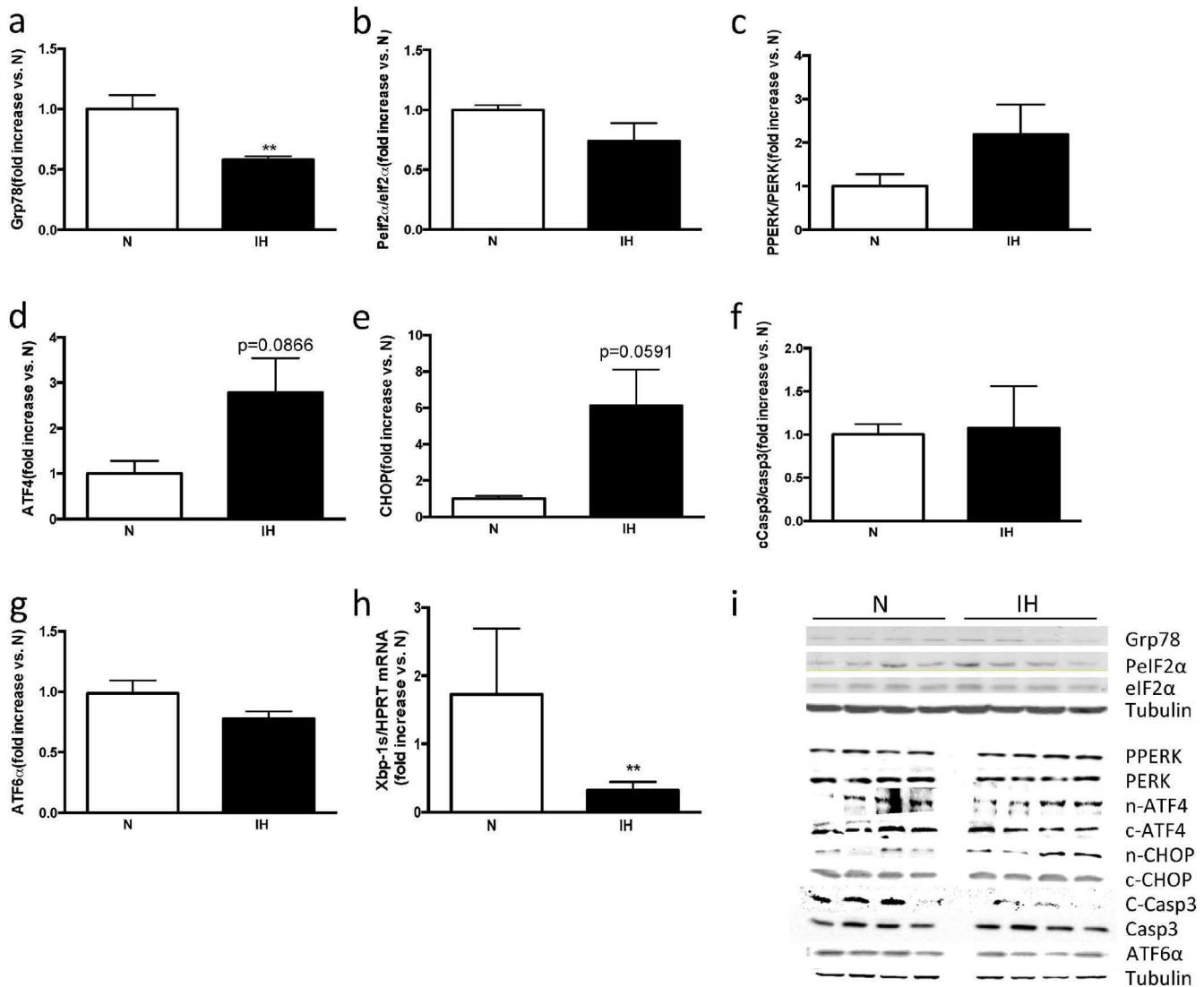


Fig. 4. The association of intermittent hypoxia (IH) and ischemia–reperfusion induces a severe myocardial ER stress. ER stress was assessed in mice exposed to IH or N for 14 days followed by an *in vivo* ischemia (45 min)/reperfusion(90 min) protocol. (a) Grp78 relative to tubulin, (b) phospho-eIF2 α relative to eIF2 α , (c) phospho-PERK relative to PERK, (d) nuclear to cytosolic (n/c) ratio of ATF4, (e) n/c ratio of CHOP, (f) cleaved-caspase3 (casp3) relative to casp3, (g) ATF6 α relative to tubulin, (h) myocardial mRNA expression of spliced XBP-1 (Xbp-1 s) relative to HPRT and (i) representative immunoblotting for the above proteins. Data are means \pm SEM, **p less than 0.01 vs. N mice (n = 4–6 per group).

IH induces ER Ca²⁺ overload, known to initiate ER stress [42]. We further demonstrate that IH *per se* induced an ER stress, characterized by an increase in Grp78, eIF2 α phosphorylation and Xbp-1 splicing. This response is characteristic of the UPR, which is classically initiated by the release of Grp78 to attenuate translation, especially through eIF2 α phosphorylation, and to repair unfolded proteins and limits ER stress through Xbp-1 splicing [23] (Fig. 7, step 1). Interestingly, we observed that CHOP expression was decreased following 14 days of IH, suggesting that the level of ER stress triggered by IH was not sufficient to activate the PERK-ATF4-CHOP death-signaling pathway. These results suggest that the IH-increased caspase 3 cleavage that we observed may not solely result from ER stress activation, but also from an ER stress-independent pathway. On the other hand, when associated with an I/R protocol, IH also induced an ER stress that is different from the one induced by IH alone. Indeed, it is characterized by (i) an important decrease in myocardial Grp78 expression and Xbp-1 splicing, (ii) a more important phosphorylation of PERK than after IH alone along with (iii) a trend to increase in ATF4 and CHOP expressions, underlying a severe and may be deleterious ER stress (Fig. 7, step 3). In accordance, a decrease in Grp78 expression has been linked to a deleterious ER stress

following reperfusion in cardiac myocytes [43] and Grp78 overexpression has been proposed as a potential therapeutic strategy against intense ER stress [44]. A decrease in Xbp-1 splicing has also been associated with the transition from adaptive to maladaptive ER response in a cerebral model of I/R [45]. Finally, we observed an IH-activation of the PERK-ATF4-CHOP pathway, which traduces an excessive ER stress that could explain the enhancement in infarct size in response to IH [46]. However, the activation of the PERK-ATF4-CHOP pathway was not associated with subsequent activation of caspase 3. This could be explained by our experimental design, as we performed protein analysis after only 15 min of reperfusion, which may be too short to investigate I/R-related apoptosis [30]. This result also suggests a possible involvement of other ER-stress induced death signaling pathways, such as autophagy [47]. The complexity of the mechanisms regulating cardiomyocyte survival after an ischemic insult has been nicely reviewed by Glembotski [48], with particular emphasis on the transition between prosurvival and deleterious aspects of I/R-activated ER stress, that can be influenced by other associated ER stress-enhancing factors such as chronic IH. In our study, inhibition of ER stress by administration of TUDCA [32,49] during IH exposure prevented the associated increase in infarct size. This

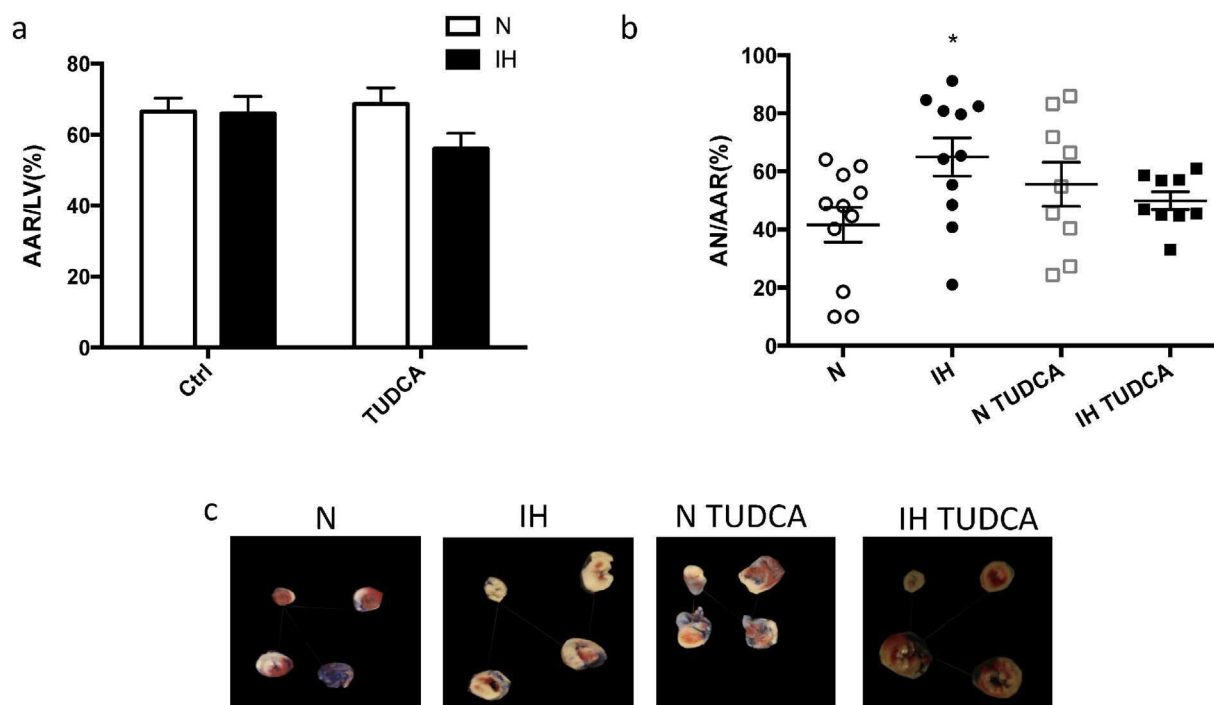


Fig. 5. ER stress inhibition during intermittent hypoxia (IH) prevents the increase in infarct size. *In vivo* ischemia (45 min)–reperfusion (90 min) was performed in C57bl6 mice exposed to IH or air (N), and treated or not with tauroursodeoxycholic acid (TUDCA, 75 mg·kg⁻¹ i.p., 5 days per week). (a) Area at risk (AAR) relative to left ventricle (LV) and (b) area of necrosis (AN) relative to area at risk were evaluated by colorimetry and planimetry. (c) Representative images of myocardial infarct expansion in each group. Data are means ± SEM, *p less than 0.05 vs. N mice (n = 6–8).

clearly demonstrates that the moderate ER stress induced by chronic IH, when associated with another stress such as I/R, plays a major role in myocardial I/R injury (Fig. 7, steps 1 and 3).

4.3. ER stress as a new mechanism to enhance HIF-1 activity

Finally, as we demonstrated that both HIF-1 and ER stress activation were involved in the IH-induced increase in infarct size, we investigated whether these two mechanisms were linked and in particular, we hypothesized that ER stress induced HIF-1 activation and subsequent increase in infarct size in response to IH. As previously described [9], we confirmed that chronic IH enhanced HIF-1 nuclear activity. Furthermore,

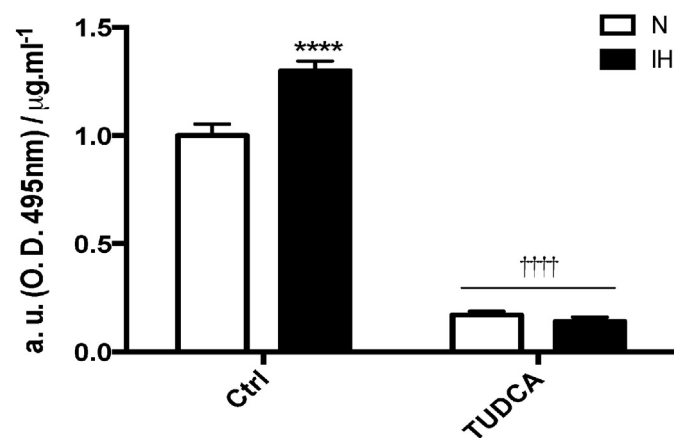


Fig. 6. ER stress inhibition abolishes the increase in HIF-1 activity induced by intermittent hypoxia (IH). HIF-1 activity (arbitrary units of optic density, a. u. of O. D. 495 nm, per µg·ml⁻¹ of protein) was performed using enzymatic linked immunoabsorbant assay in mice exposed to IH or N and treated (TUDCA) or not (Ctrl) with tauroursodeoxycholic acid (TUDCA, 75 mg·kg⁻¹ i.p., 5 days per week). Data are means ± SEM, ****p less than 0.0001 vs. Ctrl/N mice, †††p less than 0.0001 vs. Ctrl (n = 6).

we demonstrated that, in addition to preventing the IH-increased in infarct size, TUDCA also abolished the related increase in HIF-1 activity (Fig. 7, step 2). In accordance with recent studies showing that ER stress increases HIF-1α mRNA content in *C. elegans* [19] and in brainstem motoneurons [25], we show that inhibiting ER stress decreased both HIF-1α mRNA content and activity. An abundant literature has demonstrated that HIF-1 activation in response to IH is dependent on the production of reactive oxygen species (for a review, see [50]). In the present study, we demonstrate for the first time that ER stress could represent an additional mechanism regulating nuclear HIF-1 activity and subsequent cardiomyocyte death (Fig. 7). Further studies are necessary to understand the specific role of ER stress on HIF-1 activity regulation.

4.4. Limitation of the study

4.4.1. IH stimulus

We are conscious that the hypoxic stimulus used in this study is very severe, with a nadir arterial oxygen saturation around 60%. However, this experimental model has been extensively used by our group and others as, in the absence of confounding factors (*i.e.*, obesity) or genetic susceptibility for complications, IH needs to be severe enough to induce detrimental cardiovascular effects [6]. Despite this limitation, the IH model proved to be useful for investigating the various consequences elicited by sleep apnea, and in particular several animal studies evidenced an IH-induced susceptibility to myocardial infarction. The recent results of Buchner et al., confirmed a similar greater infarct size in OSA compared to control patients [4].

4.4.2. Experimental design

We acknowledge that our ischemia–reperfusion model does not reproduce exactly the time course of myocardial ischemic insults that occur in patients. However, such experimental animal models are widely used to study the development of myocardial infarct size [51]. In the study of Roubille et al., the authors described the time-course of infarct size expansion and apoptosis after 40 min ischemia, followed by

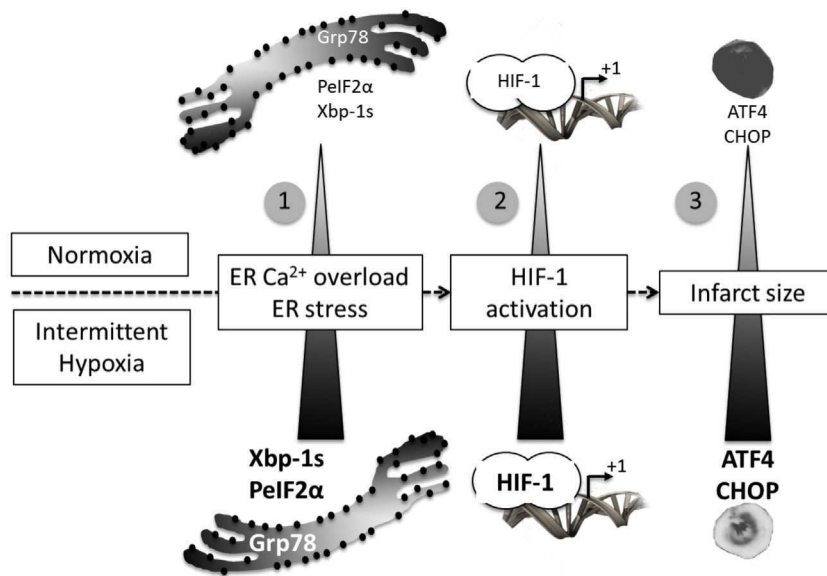


Fig. 7. Schematic summary of the study. IH-induced ER stress leads to HIF-1 activation and increased susceptibility to myocardial ischemia–reperfusion. IH induces a moderate increase in ER stress markers such as Grp78, phosphorylation of eIF2 and splicing of Xbp-1s (step 1). ER stress is responsible for both the IH-associated HIF-1 activation (step 2) and the IH-induced increase in infarct size (necrotic area in white, viable area in black) (step 3).

different time of reperfusion and they reported that infarct size and apoptosis reached a plateau at 60 min of reperfusion [30]. We are therefore confident with our results on infarct size (after 90 min reperfusion). Furthermore, our present results confirmed *in vivo* the expected IH-induced increase in infarct size, that we previously observed in *ex vivo* models in rats [9,12,13]. By contrast, we acknowledge that only 15 min reperfusion may be not sufficient to detect I/R-related apoptosis, *i.e.* caspase 3 cleavage, which may require a longer time to occur. However, the first minutes of reperfusion are determinant for the expansion of I/R lesions [51] and we recently demonstrated that ER stress markers are detectable after 15 min. of I/R [32].

4.4.3. HIF-1 α deficient mice

Finally, if our model of HIF-1 α ^{+/-} mice allowed others and us to demonstrate the involvement of HIF-1 in different consequences of hypoxia [35,52], further studies using cardiomyocyte-specific HIF-1 deficiency would be very interesting to avoid compensatory effects of whole-body knock-out.

4.5. Conclusions and clinical relevance

This pre-clinical study, describing a novel regulatory mechanism of HIF-1 activity by ER stress, offers different targets for human investigations. Based on our present study, it would be of great interest to extend the screening of ER stress and HIF-1 activity to OSA patients, stratified for both the severity of their apnoeic disease and the OSA-associated cardio-metabolic complications. Indeed, the beneficial effects of ER stress inhibition during exposure to IH suggest a potential new therapeutic approach to improve myocardial susceptibility to ischemia–reperfusion in OSA patients.

Conflict of interest

The authors report no relationships that could be construed as a conflict of interest.

Acknowledgements

We are grateful to Pr. P. Carmeliet for furnishing HIF-1 α ^{+/-} mice and their wild-type counterparts. This study was supported by grants

from Fonds de dotation “Agir pour les maladies chroniques”, Fondation de France and Université Joseph Fourier (INP-AGIR).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.02.096>.

References

- [1] T. Young, P.E. Peppard, D.J. Gottlieb, Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165 (2002) 1217–1239.
- [2] V.K. Somers, D.P. White, R. Amin, W.T. Abraham, F. Costa, A. Culebras, et al., Sleep apnea and cardiovascular disease: an American Heart Association/American College of Cardiology Foundation Scientific Statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on Clinical Cardiology, Stroke Council, and Council on Cardiovascular Nursing, *J. Am. Coll. Cardiol.* 52 (2008) 686–717.
- [3] V.K. Somers, D.P. White, R. Amin, W.T. Abraham, F. Costa, A. Culebras, et al., Sleep apnea and cardiovascular disease: an American Heart Association/American College of Cardiology Foundation Scientific Statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on Clinical Cardiology, Stroke Council, and Council on Cardiovascular Nursing. In collaboration with the National Heart, Lung, and Blood Institute National Center on Sleep Disorders Research (National Institutes of Health), *Circulation* 118 (2008) 1080–1111.
- [4] S. Buchner, A. Satz, K. Debl, A. Hetzenecker, A. Luchner, O. Husser, et al., Impact of sleep-disordered breathing on myocardial salvage and infarct size in patients with acute myocardial infarction, *Eur. Heart J.* 35 (2014) 192–199.
- [5] A.S. Gami, E.J. Olson, W.K. Shen, R.S. Wright, K.V. Ballman, D.O. Hodge, et al., Obstructive sleep apnea and the risk of sudden cardiac death: a longitudinal study of 10,701 adults, *J. Am. Coll. Cardiol.* 62 (2013) 610–616.
- [6] M. Dematteis, D. Godin-Ribuot, C. Arnaud, C. Ribuot, F. Stanke-Labesque, J.L. Pepin, et al., Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding the human disease, *ILAR J.* 50 (2009) 262–281.
- [7] C. Arnaud, P.C. Beguin, S. Lantuejoul, J.L. Pepin, C. Guillermet, G. Pelli, et al., The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184 (2011) 724–731.
- [8] C. Arnaud, L. Poulain, P. Levy, M. Dematteis, Inflammation contributes to the atherogenic role of intermittent hypoxia in apolipoprotein-E knock out mice, *Atherosclerosis* 219 (2011) 425–431.
- [9] E. Belaidi, M. Joyeux-Faure, C. Ribuot, S.H. Launois, P. Levy, D. Godin-Ribuot, Major role for hypoxia inducible factor-1 and the endothelin system in promoting myocardial infarction and hypertension in an animal model of obstructive sleep apnea, *J. Am. Coll. Cardiol.* 53 (2009) 1309–1317.
- [10] A.M. Park, Y.J. Suzuki, Effects of intermittent hypoxia on oxidative stress-induced myocardial damage in mice, *J. Appl. Physiol.* 102 (2007) 1806–1814.
- [11] L. Chen, J. Zhang, T.X. Gan, Y. Chen-Izu, J.D. Hasday, M. Karmazyn, et al., Left ventricular dysfunction and associated cellular injury in rats exposed to chronic intermittent hypoxia, *J. Appl. Physiol.* 104 (2008) 218–223.

- [12] A. Ramond, D. Godin-Ribuot, C. Ribuot, P. Totoston, I. Koritchneva, S. Cachot, et al., Oxidative stress mediates cardiac infarction aggravation induced by intermittent hypoxia, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 27 (2013) 252–261.
- [13] P. Totoston, W. Fhayli, G. Faury, I. Koritchneva, S. Cachot, M. Baldazza, et al., Atorvastatin protects against deleterious cardiovascular consequences induced by chronic intermittent hypoxia, *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 238 (2013) 223–232.
- [14] G. Yuan, S.A. Khan, W. Luo, J. Nanduri, G.L. Semenza, N.R. Prabhakar, Hypoxia-inducible factor 1 mediates increased expression of NADPH oxidase-2 in response to intermittent hypoxia, *J. Cell. Physiol.* 226 (2011) 2925–2933.
- [15] A. Weidemann, R.S. Johnson, *Biology of HIF-1alpha*, *Cell Death Differ.* 15 (2008) 621–627.
- [16] E. Belaidi, P.C. Beguin, P. Levy, C. Ribuot, D. Godin-Ribuot, Prevention of HIF-1 activation and iNOS gene targeting by low-dose cadmium results in loss of myocardial hypoxic preconditioning in the rat, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294 (2008) H901–H908.
- [17] T. Eckle, D. Kohler, R. Lehmann, K. El Kasmi, H.K. Eltzschig, Hypoxia-inducible factor-1 is central to cardioprotection: a new paradigm for ischemic preconditioning, *Circulation* 118 (2008) 166–175.
- [18] H.X. Zhao, X.L. Wang, Y.H. Wang, Y. Wu, X.Y. Li, X.P. Lv, et al., Attenuation of myocardial injury by postconditioning: role of hypoxia inducible factor-1alpha, *Basic Res. Cardiol.* 105 (2010) 109–118.
- [19] C. Werno, J. Zhou, B. Brune, A23187, ionomycin and thapsigargin upregulate mRNA of HIF-1alpha via endoplasmic reticulum stress rather than a rise in intracellular calcium, *J. Cell. Physiol.* 215 (2008) 708–714.
- [20] B. Lopez-Hernandez, V. Cena, I. Posadas, The endoplasmic reticulum stress and the HIF-1 signalling pathways are involved in the neuronal damage caused by chemical hypoxia, *Br. J. Pharmacol.* 172 (2015) 2838–2851.
- [21] J. Groenendyk, L.B. Agellon, M. Michalak, Coping with endoplasmic reticulum stress in the cardiovascular system, *Annu. Rev. Physiol.* 75 (2013) 49–67.
- [22] U. Ozcan, Q. Cao, E. Yilmaz, A.H. Lee, N.N. Iwakoshi, E. Ozdelen, et al., Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes, *Science* 306 (2004) 457–461.
- [23] J. Groenendyk, P.K. Sreenivasaiiah, H. Kim do, L.B. Agellon, M. Michalak, *Biology of endoplasmic reticulum stress in the heart*, *Circ. Res.* 107 (2010) 1185–1197.
- [24] Y. Zhu, P. Fenik, G. Zhan, B. Sanfillipo-Cohn, N. Naidoo, S.C. Veasey, Eif-2a protects brainstem motoneurons in a murine model of sleep apnea, *J. Neurosci.* 28 (2008) 2168–2178.
- [25] Y.T. Chou, G. Zhan, Y. Zhu, P. Fenik, L. Panossian, Y. Li, et al., C/EBP homologous binding protein (CHOP) underlies neural injury in sleep apnea model, *Sleep* 36 (2013) 481–492.
- [26] Y.H. Zhou, Z.W. Wen, D.S. Liang, X.H. Cai, L.Y. Ni, Y. Li, et al., Effect of endoplasmic reticulum stress in brain injury following chronic intermittent hypoxia in weanling rat, *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 92 (2012) 1706–1710.
- [27] W. Ding, X. Zhang, H. Huang, N. Ding, S. Zhang, S.Z. Hutchinson, Adiponectin protects rat myocardium against chronic intermittent hypoxia-induced injury via inhibition of endoplasmic reticulum stress, *PLoS One* 9 (2014) e94545.
- [28] S. Zhou, X. Yin, Y. Zheng, X. Miao, W. Feng, J. Cai, et al., Metallothionein prevents intermittent hypoxia-induced cardiac endoplasmic reticulum stress and cell death likely via activation of Akt signaling pathway in mice, *Toxicol. Lett.* 227 (2014) 113–123.
- [29] G. Bourdier, P. Flore, H. Sanchez, J.L. Pepin, E. Belaidi, C. Arnaud, High-intensity training reduces intermittent hypoxia-induced ER stress and myocardial infarct size, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 310 (2016) H279–H289.
- [30] F. Roubille, A. Franck-Miclo, A. Covinhas, C. Lafont, F. Cransac, S. Combes, et al., Delayed postconditioning in the mouse heart in vivo, *Circulation* 124 (2011) 1330–1336.
- [31] M.T. Vivaldi, R.A. Kloner, F.J. Schoen, Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rats, *Am. J. Pathol.* 121 (1985) 522–530.
- [32] E. Belaidi, J. Decors, L. Augeul, A. Durand, M. Ovize, Endoplasmic reticulum stress contributes to heart protection induced by cyclophilin D inhibition, *Basic Res. Cardiol.* 108 (2013) 363.
- [33] F.N. Obame, C. Plin-Mercier, R. Assaly, R. Zini, J.L. Dubois-Rande, A. Berdeaux, et al., Cardioprotective effect of morphine and a blocker of glycogen synthase kinase 3 beta, SB216763 [3-(2,4-dichlorophenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione], via inhibition of the mitochondrial permeability transition pore, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 326 (2008) 252–258.
- [34] J. Forkel, X. Chen, S. Wandinger, F. Keser, A. Duschin, U. Schwanke, et al., Responses of chronically hypoxic rat hearts to ischemia: KATP channel blockade does not abolish increased RV tolerance to ischemia, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286 (2004) H545–H551.
- [35] Z. Cai, H. Zhong, M. Bosch-Marce, K. Fox-Talbot, L. Wang, C. Wei, et al., Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 alpha, *Cardiovasc. Res.* 77 (2008) 463–470.
- [36] G. Heusch, HIF-1alpha and paradoxical phenomena in cardioprotection, *Cardiovasc. Res.* 96 (2012) 214–215 (discussion 6–9).
- [37] G. Heusch, Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning, *Circ. Res.* 116 (2015) 674–699.
- [38] R. Bekeredian, C.B. Walton, K.A. MacCannell, J. Ecker, F. Kruse, J.T. Outten, et al., Conditional HIF-1alpha expression produces a reversible cardiomyopathy, *PLoS One* 5 (2010) e11693.
- [39] J. Moslehi, Y.A. Minamishima, J. Shi, D. Neuberg, D.M. Charytan, R.F. Padera, et al., Loss of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity in cardiomyocytes phenocopies ischemic cardiomyopathy, *Circulation* 122 (2010) 1004–1016.
- [40] E. Kaczmarek, J.P. Bakker, D.N. Clarke, E. Ciszmadia, O. Kocher, A. Veves, et al., Molecular biomarkers of vascular dysfunction in obstructive sleep apnea, *PLoS One* 8 (2013) e70559.
- [41] G. Bourdier, P. Flore, H. Sanchez, J. Pepin, E. Belaidi, C. Arnaud, High-intensity training reduces intermittent hypoxia-induced ER stress and myocardial infarct size, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* (2015).
- [42] J. Krebs, L.B. Agellon, M. Michalak, Ca(2+) homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: an integrated view of calcium signaling, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 460 (2015) 114–121.
- [43] S. Doroudgar, D.J. Thuerauf, M.C. Marcinko, P.J. Belmont, C.C. Glembotski, Ischemia activates the ATF6 branch of the endoplasmic reticulum stress response, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 29735–29745.
- [44] H.Y. Fu, T. Minamino, O. Tsukamoto, T. Sawada, M. Asai, H. Kato, et al., Overexpression of endoplasmic reticulum-resident chaperone attenuates cardiomyocyte death induced by proteasome inhibition, *Cardiovasc. Res.* 79 (2008) 600–610.
- [45] T. Ibuki, Y. Yamasaki, H. Mizuguchi, M. Sokabe, Protective effects of XBP1 against oxygen and glucose deprivation/reoxygenation injury in rat primary hippocampal neurons, *Neurosci. Lett.* 518 (2012) 45–48.
- [46] E. Szegezdí, A. Duffy, M.E. O'Mahoney, S.E. Logue, L.A. Mylotte, T. O'Brien, et al., ER stress contributes to ischemia-induced cardiomyocyte apoptosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349 (2006) 1406–1411.
- [47] R. Sano, J.C. Reed, ER stress-induced cell death mechanisms, *Biochim. Biophys. Acta* 2013 (1833) 3460–3470.
- [48] C.C. Glembotski, Endoplasmic reticulum stress in the heart, *Circ. Res.* 101 (2007) 975–984.
- [49] X. Gao, L. Fu, M. Xiao, C. Xu, L. Sun, T. Zhang, et al., The nephroprotective effect of tauroursodeoxycholic acid on ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury by inhibiting endoplasmic reticulum stress, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* (2013).
- [50] G.L. Semenza, Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1, *Physiology (Bethesda)* 24 (2009) 97–106.
- [51] M. Ovize, G.F. Baxter, F. Di Lisa, P. Ferdinandy, D. Garcia-Dorado, D.J. Hausenloy, et al., Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology, *Cardiovasc. Res.* 87 (2010) 406–423.
- [52] E. Gras, E. Belaidi, A. Briancon-Marjollet, J.L. Pepin, C. Arnaud, D. Godin-Ribuot, Endothelin-1 mediates the IH-induced inflammatory vascular remodelling through HIF-1 activation, *J. Appl. Physiol.* (2015) (jap 00641 2015).

Figure s1

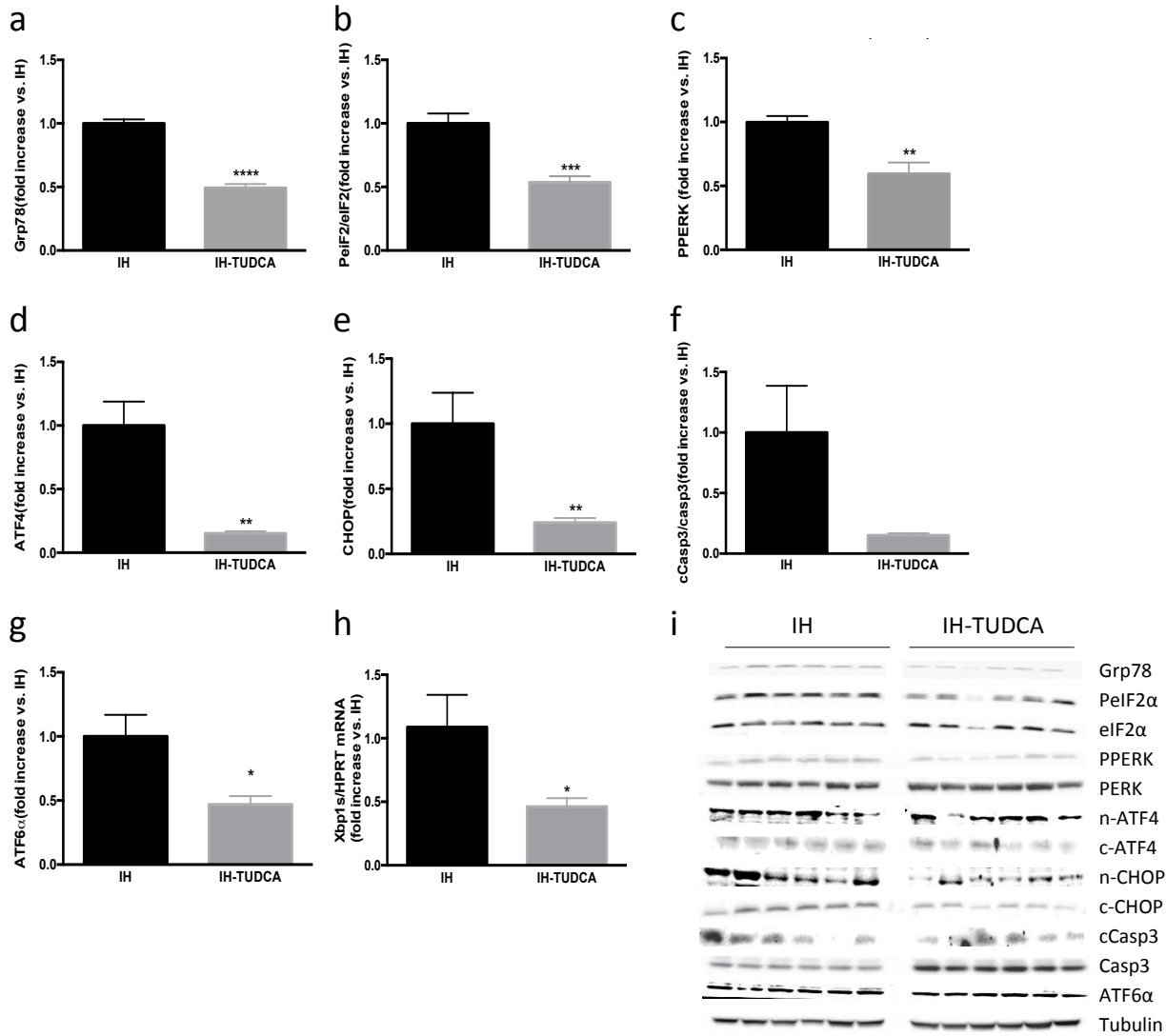
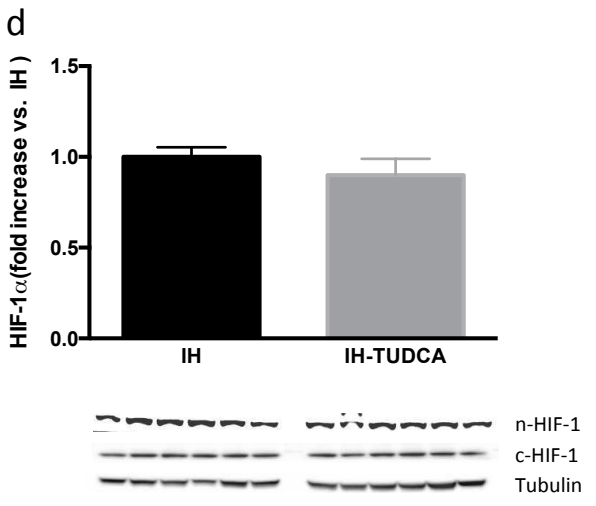
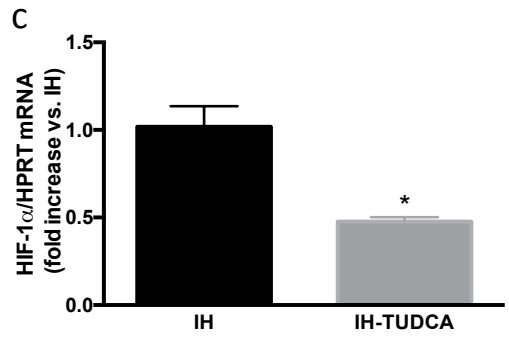
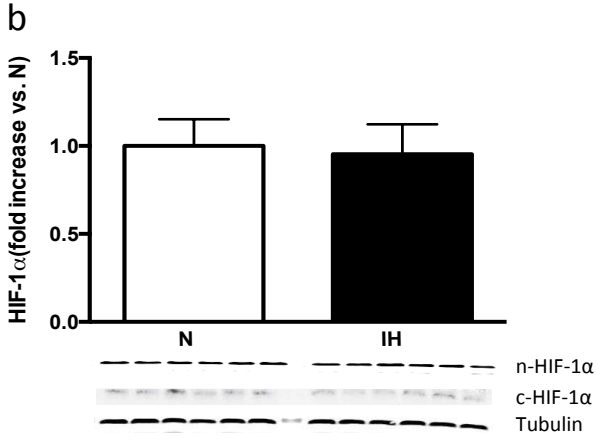
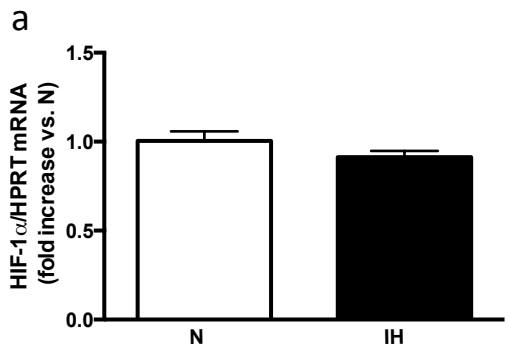


Figure s2



1.2. Article n°2 :

L'exercice aérobic intense prévient l'augmentation la taille d'infarctus et le stress du RE induits par l'hypoxie intermittente.

Nous nous sommes intéressés à une stratégie thérapeutique visant à inhiber ce stress du RE qui participe aux complications cardiovasculaires induites par l'HI, et nous avons choisi d'étudier les effets de l'exercice dont les bénéfices sur la santé cardiovasculaire ont largement été démontrés [268]. Notamment, nous souhaitons étudier les effets d'un entraînement aérobic intense qui semble responsable d'une diminution du stress du RE et d'une amélioration de la santé cardiovasculaire similaires voire supérieures aux exercices traditionnels en endurance [274].

Très peu d'études se sont intéressées aux impacts de l'exercice dans le contexte de la maladie apnéique. Nous avons émis l'hypothèse qu'un exercice aérobic intense permettrait de réduire le stress du RE et les dommages myocardiques post-ischémique induits par l'HI.

Dans un premier temps nous avons validé chez des rats Wistar mâles l'efficacité supérieure d'un protocole d'exercice aérobic de haute intensité de 10 jours par rapport à un protocole d'exercice endurance standard en terme de performance (VMA, endurance) et de métabolisme aérobic (activité de la CS). Pour l'étude, des rats Wistar mâles ont été exposés à l'HI ou à la N à raison de 8 h/jour pendant 21 jours. Durant la première semaine d'exposition, les rats ont été habitués au tapis de course pendant 4 séances. Ensuite, l'entraînement à haute intensité de 10 jours a été réalisé à raison de 5 séances/semaine pendant les 2 dernières semaines d'exposition. A la fin du conditionnement, les pressions artérielles ont été mesurées par cathétérisme artérielle et les cœurs prélevés pour déterminer la taille d'infarctus ex-vivo ou pour étudier le stress du RE par Western-Blot. Le dosage des catécholamines circulantes a été réalisé par ELISA sur du plasma de sang prélevé à la fin des procédures expérimentales.

Les résultats confirment l'effet bénéfique de l'exercice aérobic intense dans la prévention de l'augmentation de la taille d'infarctus induite par l'HI, possiblement *via* une diminution du stress du RE et de l'activité sympathique HI-dépendants. Les effets bénéfiques de l'inhibition du stress du RE et de l'activation sympathique lors de l'exposition à l'HI suggèrent un rôle central de ces voies de signalisation dans les complications cardiovasculaires associées à une exposition à l'HI. Elles pourraient représenter des approches thérapeutique potentielle afin d'améliorer le pronostic post-IM chez le patients SAOS (i.e. réduire la taille d'infarctus et les complications associées).

“High-intensity training reduces intermittent hypoxia-induced ER stress and myocardial infarct size “

Guillaume Bourdier, Patrice Flore, Hervé Sanchez, Jean-Louis Pépin, Elise Belaidi and Claire Arnaud

American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology 2016; 310:
H279–H289

High-intensity training reduces intermittent hypoxia-induced ER stress and myocardial infarct size

Guillaume Bourdier,^{1,2} Patrice Flore,^{1,2} Hervé Sanchez,³ Jean-Louis Pepin,^{1,2} Elise Belaidi,^{1,2*} and  Claire Arnaud^{1,2*}

¹Grenoble Alpes University, HP2 Laboratory, Grenoble, France; ²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1042, Grenoble, France; and ³Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Operational Environments, Brétigny/Orge, France

Submitted 9 June 2015; accepted in final form 9 November 2015

Bourdier G, Flore P, Sanchez H, Pepin JL, Belaidi E, Arnaud C. High-intensity training reduces intermittent hypoxia-induced ER stress and myocardial infarct size. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 310: H279–H289, 2016. First published November 13, 2015; doi:10.1152/ajpheart.00448.2015.—Chronic intermittent hypoxia (IH) is described as the major detrimental factor leading to cardiovascular morbimortality in obstructive sleep apnea (OSA) patients. OSA patients exhibit increased infarct size after a myocardial event, and previous animal studies have shown that chronic IH could be the main mechanism. Endoplasmic reticulum (ER) stress plays a major role in the pathophysiology of cardiovascular disease. High-intensity training (HIT) exerts beneficial effects on the cardiovascular system. Thus, we hypothesized that HIT could prevent IH-induced ER stress and the increase in infarct size. Male Wistar rats were exposed to 21 days of IH (21–5% fraction of inspired O₂, 60-s cycle, 8 h/day) or normoxia. After 1 wk of IH alone, rats were submitted daily to both IH and HIT (2 × 24 min, 15–30m/min). Rat hearts were either rapidly frozen to evaluate ER stress by Western blot analysis or submitted to an ischemia-reperfusion protocol ex vivo (30 min of global ischemia/120 min of reperfusion). IH induced cardiac proapoptotic ER stress, characterized by increased expression of glucose-regulated protein kinase 78, phosphorylated protein kinase-like ER kinase, activating transcription factor 4, and C/EBP homologous protein. IH-induced myocardial apoptosis was confirmed by increased expression of cleaved caspase-3. These IH-associated proapoptotic alterations were associated with a significant increase in infarct size (35.4 ± 3.2% vs. 22.7 ± 1.7% of ventricles in IH + sedentary and normoxia + sedentary groups, respectively, *P* < 0.05). HIT prevented both the IH-induced proapoptotic ER stress and increased myocardial infarct size (28.8 ± 3.9% and 21.0 ± 5.1% in IH + HIT and normoxia + HIT groups, respectively, *P* = 0.28). In conclusion, these findings suggest that HIT could represent a preventive strategy to limit IH-induced myocardial ischemia-reperfusion damages in OSA patients.

obstructive sleep apnea; intermittent hypoxia; ischemia-reperfusion; high-intensity aerobic training; endoplasmic reticulum stress

NEW & NOTEWORTHY

We demonstrated that intermittent hypoxia induced cardiac proapoptotic ER stress and increased infarct size, which were prevented by high-intensity aerobic training. These results strengthen the need for early identification of patients with sleep apnea at risk for cardiovascular complications and suggest that exercise can be used as a new preventive strategy for these patients.

* E. Belaidi and C. Arnaud contributed equally to this work.

Address for reprint requests and other correspondence: C. Arnaud, Laboratoire HP2, Institut Jean Roget, Faculté de Médecine-Pharmacie de Grenoble, BP 170, 38042 Grenoble Cedex 9, France (e-mail: claire.arnaud@ujf-grenoble.fr).

OBSTRUCTIVE SLEEP APNEA (OSA) syndrome is a common disease characterized by recurrent episodes of pharyngeal collapses occurring during sleep, leading to intermittent hypoxia (IH), sleep fragmentation, and variations of intrathoracic pressure. OSA is recognized as an independent risk factor for the development of cardiovascular disease, as it is independently associated with hypertension, atherosclerosis, cardiac rhythm disorders, and coronary artery disease (3). Clinical and experimental studies have suggested that chronic IH is the major stimulus leading to cardiovascular morbimortality in OSA patients (45). Recently, Buchner et al. (9) demonstrated that OSA patients exhibit an increase in infarct size after an ischemic event compared with patients without OSA. Several animal studies have confirmed these clinical observations and demonstrated that IH induces an elevation of mean arterial blood pressure (BP) and increases myocardial infarct size after ischemia-reperfusion protocols (6, 35, 54, 57, 62).

The firstline therapy for OSA remains the application of continuous positive airway pressure (CPAP), which substantially decreases the number and severity of respiratory events in patients (3). However, as the effects of CPAP on BP are limited (7, 55) and depend on the duration of CPAP use during the night (4), further large randomized clinical trials are needed to clarify the real impact of CPAP treatment to reduce cardiovascular risk. A better understanding of the pathophysiological mechanisms involved in the deleterious effects of IH is a major research priority and could help to provide new alternative or complementary treatment to CPAP in the management of OSA-associated cardiovascular risk.

The involvement of endoplasmic reticulum (ER) stress in the pathophysiology of cardiovascular diseases is well documented (47). The ER is a multifunctional organelle that controls the synthesis, folding, assembly, and transport of proteins. Oxidative stress, Ca²⁺ dysregulation, or ischemia can interfere with ER function, leading to an accumulation of unfolded proteins to exceed its processing capacities. The resulting ER stress triggers the unfolded protein response (UPR), which induces signal transduction events to restore ER homeostasis (47). Glucose-regulated protein kinase (Grp)78, an ER chaperone, dissociates from three distinct UPR sensors and activates specific pathways: 1) double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase (PERK) phosphorylation leads to translational inhibition through the transient phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor (eIF)2 α ; 2) inositol-requiring protein-1 α , through splicing of the mRNA encoding the transcriptional factor X box-binding protein (XBP)1 mRNA, induces the expression of UPR-related genes that are known to fix or degrade proteins; and 3) activating transcrip-

tion factor (ATF)6 also serves as a preferential transcription activator (47). The three arms of the UPR coordinately regulate the transcription of UPR-related genes encoding ER chaperones and protein folding enzymes to reduce the accumulation of unfolded proteins (31). However, during long-term activation of the ER stress response, the UPR fails to control the level of unfolded and misfolded proteins, and ER-initiated proapoptotic signaling is induced (47). Indeed, PERK, through ATF4, contributes to apoptotic cell death via activation of C/EBP homologous protein (CHOP) (25) and caspase pathway (i.e., caspase-3) activation (51), and the ATF6 branch is also involved in apoptotic cell death (50). Few studies have investigated the role of ER stress in the context of IH. ER stress has been shown to underlie neural injuries in an animal model of IH (11), and two recent studies have described a beneficial effect of both adiponectin (18) and metallothionein (70) on IH-induced myocardial ER stress and cell death. Therefore, we first hypothesized that IH induces proapoptotic ER stress that could underlie cardiac damage after myocardial infarction.

Beneficial effects of aerobic exercise on cardiovascular health are well established (32). In animals, the most commonly used exercise model is running at a moderate intensity on a treadmill (i.e., 30–60 min of running at treadmill speeds of 15–20 m/min for at least 5–12 wk), and this kind of exercise has been shown to reduce myocardial infarct size after ischemia-reperfusion (19, 20, 29). Shorter low-intensity exercise protocols also attenuate postischemic myocardial injuries, as 1–3 consecutive days of exercise result in both enhanced postischemic recovery and reduced infarct size (17, 23, 24, 68). In addition to protocol duration, it seems that training intensity may also represent a crucial factor in exercise-induced cardioprotection (1, 44, 60), and a growing body of evidence from both human and animal studies suggests a greater effect of high-intensity aerobic training (HIT) compared with moderate-intensity training (MIT) on cardiovascular, muscle, and metabolic adaptations (38, 49, 61, 64, 66). Among the putative mechanisms that have been proposed to explain exercise-induced cardioprotection, several studies have focused on the exercise-associated increase in myocardial antioxidant capacity (29, 56) and improvement of Ca^{2+} homeostasis (20, 23, 24, 34, 65). More recently, it has been shown that exercise could also exert beneficial effects through a reduction of ER stress in several contexts such as Alzheimer's disease (36), insulin resistance (14), and muscle apoptosis (39). To our knowledge, there is only one study that has reported a protective effect of exercise in the context of IH. The authors reported a beneficial effect of exercise on IH-induced myocardial oxidative stress

and apoptosis (10). In the present study, we first tested whether HIT would exert greater effects on performance and mitochondrial adaptations than MIT. We then hypothesized that HIT would reduce IH-induced ER stress and the associated postischemic myocardial damages.

As mentioned above, the firstline treatment of OSA is CPAP, which appears to be insufficient to reduce cardiovascular risk in many patients. Therefore, a combination of CPAP with other therapeutic strategies is a growing field of research. If our hypotheses are verified, targeting IH-induced ER stress by HIT could represent a new promising preventive strategy to limit IH-induced postischemic myocardial damage in OSA patients.

METHODS

Animals

This investigation conformed with the National Institutes of Health (NIH) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH Pub. No. 85-23, Revised 1996).

Adult male Wistar rats (2 mo old, 300–350g) were used in this study. Rats were obtained from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). The study was approved by the University Grenoble Alpes Animal Research Ethic Committee (authorization no. 184_UHTA_U1042_CA_03). Rats were housed ($n = 4$ rats/cage) at the animal care facility of the HP2 Laboratory (approval no. A38 516 10006) under a 12:12-h light-dark cycle at 20–22°C and allowed free access to standard food and water.

Experimental Design

The first set of experiments was designed to validate the type of aerobic training. Rats were randomized to sedentary (Sed), MIT, or HIT conditions. Exercise effects on muscle citrate synthase (CS) activity, maximal aerobic speed (MAS), and endurance were then evaluated after 2 wk of training ($n = 4–8$ rats/condition).

Another group of rats was randomly assigned to normoxia or IH for a 21-day exposure. In both conditions, rats were assigned to Sed or HIT conditions to constitute the following four groups: normoxia (N)/Sed, IH/Sed, N/HIT, and IH/HIT. Training began after the first week of normoxia or IH and lasted until the end of exposure. In each group, two sets of experiments were performed: the first set of rats was used to investigate the effects of IH and HIT on ER stress ($n = 6$ rats/condition) and the second set was used to evaluate the effects of IH and HIT on myocardial infarct size ($n = 11–15$ rats/condition). Arterial pressure was recorded in all animals (Fig. 1).

Aerobic Trainings

Training was carried out on a motorized treadmill (0% grade, Bioseb, Vitrolles, France). Rats were first accustomed to the treadmill

Fig. 1. Experimental design. Wistar rats were randomly submitted to normoxia (N) or intermittent hypoxia (IH) during 21 days and subjected to two different conditions, sedentary (Sed) or high-intensity interval training (HIT), during the last 10 days of exposure. Thus, the following four subgroups of animals were used in the present study: N/Sed, N/HIT, IH/Sed, and IH/HIT. Two sets of measurements were realized to evaluate infarct size and investigate the involvement of endoplasmic reticulum (ER) stress for each condition.

	Week 1	Week 2	Week 3	
N/Sed	N	N	N	n=21
IH/Sed	IH	IH	IH	n=20
N/HIT	N + treadmill adaptation	N + training	N + training	n=17
IH/HIT	IH + treadmill adaptation	IH + training	IH + training	n=21

- Blood pressure measurement
- Infarct size assessment or ER-stress evaluation

running for 4 days during the first week of exposure (no more than 15 min/session). MIT or HIT was then performed for 10 days during the last 2 wk of normoxia or IH exposure (5 days/wk).

MIT protocol. MIT was performed at a constant speed of 15 m/min corresponding to 60% MAS during 60 min. Twenty-four hours after the last training session, rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (60 mg/kg), and muscle samples were taken.

HIT protocol. HIT consisted in 2 bouts of 24-min exercise interspaced by 30 min of recovery. The treadmill speed was set at 15 m/min for the first step and corresponded to a 6-min warmup (50% MAS) followed by six steps of 3 min with increased intensity to reach 30 m/min (corresponding to 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, and 90% MAS). The highest intensity corresponded to ~90% MAS. Twenty-four hours after the last training session, rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (60 mg/kg), and muscle samples were taken.

CS Assay

Muscles devoid of connective tissue (5 mg) were homogenized in extraction buffer [containing 5 mM HEPES, 1 mM EGTA, and 0.10% (vol/vol) Triton X-100] and incubated for 60 min on ice. DTT (1 mM) was extemporaneously added. The assay mixture contained measurement buffer [containing 1 M Tris-HCl, 10 mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), 10 mM acetyl-Co, and milli-Q water] and diluted sample (100 µg soluble proteins/ml total assay). Sample absorbance at 412 nm was monitored in 1.5-ml cuvettes using a spectrophotometer with the thermostat at 30°C (3 min). CS activity was measured with the addition of 10 mM oxaloacetate during 3 min (with data expressed in IU/g fresh weight).

MAS and Endurance

MAS can be used as an indicator of performance, owing to the linear relationship between O₂ consumption and exercise intensity (8, 49, 59). MAS was individually determined using an incremental exercise protocol at 0° inclination consisting of a 6-min warmup at 13 m/min; speed was then increased by 3 m/min every 2 min until the rat was unable to run. MAS is the speed corresponding to the last entire stage completed by the animal.

Endurance was defined in this experiment as the running time to exhaustion at 75% MAS. After a 6-min warmup at 13–18 m/min, speed was increased to reach an intensity of 75% MAS. Exercise was stopped when the rat was no longer able to run.

IH Protocol

Animals were exposed daily to 8 h of IH or normoxia during their daytime sleep period for 21 days. The IH stimulus was performed using a specifically designed device, as previously described (2). It consisted of 1-min cycles with alternating 30 s of hypoxia [5% fraction of inspired O₂ (FiO₂)] and 30 s of normoxia (21% FiO₂). FiO₂ was monitored throughout the experiment with a gas analyzer (ML206, AD Instruments, Oxford, UK). Normoxic rats were exposed to air streams to reproduce equivalent levels of noise and turbulence related to gas circulation as IH without hypoxia. At the end of the exposure, rats were anesthetized with intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (60 mg/kg). Arterial BP was recorded, blood was collected, and hearts were rapidly excised and either rapidly frozen (for Western blot and quantitative PCR analyses) or used for the Langendorff technique.

Arterial BP Measurement

The temperature of anesthetized rats was maintained at 37°C and adjusted using a rectal probe connected to a thermal pad (Harvard Apparatus, Les Ulis, France). Arterial BP was measured using an arterial carotid catheter linked to a mechanotransducer. Systolic BP, diastolic BP,

mean BP, and heart rate were recorded using a PowerLab data-acquisition system (Powerlab, AD Instruments).

Blood Samples

After arterial BP measurement, animals were heparinized (500 U/kg). Blood was collected in capillary tubes and centrifuged (13,000 rpm for 7 min at 21°C) to measure hematocrit.

Venous blood was also collected from the inferior cava vein with EDTA and antioxidant solution [950 mg EGTA, 600 mg glutathione (pH 6–7), 10 ml H₂O, 10 µl/ml] and rapidly centrifuged (13,000 rpm for 10 min at 4°C) to collect plasma and for the catecholamine assay.

Catecholamine Assay

Epinephrine and norepinephrine were measured in venous plasma samples using the CatCombi ELISA kit (IBL, Hamburg, Germany). Data are expressed in nanograms per milliliter.

Western Blot Analysis

Frozen hearts were homogenized (Precellys 24, 6,500 rpm, 3X20s-5s, Bertin Technology, Montigny le Bretonneux, France) to extract total proteins (sample lysis buffer: 5 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 20 mM NaF, 1 mM DTT, and protease inhibitor cocktail). The protein concentration was calculated using a Bradford assay (Bradford reagent, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Depending on the proteins analyzed, 30–100 µg of protein were separated by SDS polyacrylamide gels (8–12%) and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. Next, membranes were blocked with 5% non-fat milk or BSA in Tris-buffered saline (TBS) with Tween 20 (0.1%). Membranes were then incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies in TBS-Tween 20-5% BSA or nonfat milk: phospho-eIF2α, eIF2α, ATF4, and cleaved caspase-3 (1:500, Cell Signaling Technology, Hitchin, UK), ATF6 (1:200), phospho-PERK, PERK, CHOP, and Grp78 (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), and actin (1:2,000, Sigma-Aldrich). The following day, membranes were incubated for 1 h at room temperature with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG (1:5,000, Santa Cruz Biotechnology). Enhanced chemiluminescence was performed with the Western Blot ECL substrate (Clarity, Bio-Rad, Marnes-la Coquette, France) according to the manufacturer's instructions and video acquisition (chemidoc-xrs-system, Bio-Rad). The relative amount of protein was quantified by densitometry (Image Lab, Bio-Rad) and expressed as a ratio of the loading control. Phosphorylated proteins were expressed relative to total protein, and nonphosphorylated proteins were expressed relative to actin. Finally, protein expressions of IH/Sed, N/HIT, and IH/HIT groups were expressed relative to the N/Sed group, which was normalized to 1.

Quantitative Real-Time RT-PCR Analysis

Total RNA was isolated from the whole heart using TRI reagent (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's specifications. Total RNA (0.5 µg) was reversely transcribed to cDNA using iScript Reverse Transcription Supermix (C-1000 Thermal Cycler, Bio-Rad). Quantitative real-time PCR was performed using SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) and PCR primers (Sigma-Aldrich) for the following rat ER stress-related genes: spliced XBP1, forward 5'-GAGTCCGCAGCAGGTG-3' and reverse 5'-GCGTCA-GAATCCATGGGA-3'; and total XBP1, forward 5'-GTGCAG-GCCCAGTTGTCACC-3' and reverse 5'-TCTGGGTAGACCT-CTGGGAG-3'. Cycling parameters were as follows: 95°C for 30 s, 95°C for 5 s, and 58°C for 10 s and increments of 0.5°C for 5 s from 65 to 95°C. All PCR assays were performed in triplicate (CFX96 Touch RT PCR, Bio-Rad). The PCR fluorescent signals for spliced XBP1 and total XBP1 were standardized to PCR fluorescent signals obtained from endogenous reference genes (actin and cyclin A; CFX Manager 3.1, Bio-Rad). Comparative and relative quantification of the

spliced XBP1 product were normalized to total XBP1 and calculated by the $2^{\Delta\Delta C_t}$ method (where C_t is threshold cycle).

Ex Vivo Ischemia-Reperfusion Protocol

Langendorff perfusion. Hearts of anaesthetized rats were rapidly excised and immediately immersed in 4°C Krebs-Henseleit buffer solution [containing (in mM) 118 NaCl, 4.7 KCl, 1.8 CaCl₂, 1.2 MgSO₄, 1.2 KH₂PO₄, 25.2 NaHCO₃, and 11 glucose]. The aortic stump was cannulated, and the heart was perfused using the Langendorff technique at constant pressure (75 mmHg) with oxygenated Krebs-Henseleit buffer. The myocardial temperature was maintained at 37°C. A water-filled latex balloon, coupled with a pressure transducer, was inserted into the left ventricular (LV) cavity via the left atrium for pressure recording. LV end-diastolic pressure was adjusted to ~7 mmHg. After 20 min of stabilization, no-flow global and total ischemia was induced by stopping the perfusion for 30 min. Thereafter, the heart was reperfused for 120 min. Hemodynamic variables were continuously recorded [LV end-diastolic pressure, LV developed pressure, cardiac contractility (dP/dt), and heart rate, Labchart, AD Instruments] (35).

Infarct size determination. At the end of ischemia-reperfusion protocol, atria were removed, and the heart was frozen at -20°C for 10 min. The heart was then cut into 2-mm transverse sections from the apex to base (6–7 slices/heart). Once thawed, the slices were incubated at 37°C with 1% triphenyltetrazolium chloride in phosphate buffer (pH 7.4) for 20 min and fixed for 1 day in 10% formaldehyde to clearly distinguish stained viable tissue from unstained unviable tissue. Infarct size was determined by a computerized planimetric technique (ImageJ software, NIH) and expressed as a percentage of the ventricular size (35).

Statistical Analysis

Statistics were performed using GraphPad Prism 6 software (San Diego, CA). Data are expressed as means ± SE. Differences between groups over time were determined by two-way ANOVA with a subsequent Tukey's post hoc test for multiple group comparisons. P values of <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

HIT Versus MIT Effects on Performance and Mitochondrial Adaptations

We assessed metabolic and functional variables to determine which protocol (MIT or HIT) of equal volume (i.e., total energy expenditure, although different intensity) promoted more beneficial outcomes after short-term training. CS is a pacemaking enzyme of the tricarboxylic acid cycle used as an

indicator of cellular aerobic metabolism (43). HIT significantly increased maximal CS activity in soleus muscle (56.7 ± 4.1 vs. 37.9 ± 4.8 UI in HIT and Sed groups, respectively, $P < 0.05$; Fig. 2A), whereas MIT had no significant effect. Functional capacity was assessed as MAS and endurance at 75% MAS. HIT induced a greater increase in MAS than MIT (50.8 ± 1.5 vs. 35.7 ± 3.2 m/min in HIT and before training/HIT groups, respectively, $n = 4$, $P < 0.05$; and 44.3 ± 4.3 vs. 34.4 ± 2.6 m/min in MIT and before training/MIT, respectively, $n = 4$, $P < 0.15$; Fig. 2B). Finally, endurance at 75% MAS tended to be higher in the HIT group compared with the MIT group (69.3 ± 8.6 vs. 48.2 ± 10.1 min in HIT and MIT groups, respectively, $P = 0.08$; Fig. 3C). Based on the greater short-term effect of HIT on performance (MAS and endurance) and mitochondrial adaptations (CS activity), we retained this protocol for the trained groups of the present study.

HIT Prevents IH-Induced Cardiac Proapoptotic ER Stress

Chronic IH triggered cardiac ER stress, as characterized by a significant enhancement of Grp78 (ER chaperone) expression (2.6 ± 0.6 -fold increase, $P < 0.01$; Fig. 3A) and increased phosphorylation of PERK (1.7 ± 0.2 -fold increase, $P < 0.05$; Fig. 3B) and eIF2 α (1.5 ± 0.1 -fold increase, $P = 0.058$; Fig. 3C). Whereas ATF6 expression and XBP1 mRNA splicing were not increased by IH (Fig. 3, E and F), IH also induced ER-initiated proapoptotic signaling with a significant raise in ATF4 expression (1.6 ± 0.2 -fold increase, $P < 0.05$; Fig. 3D) and a trend of enhanced CHOP expression (1.5 ± 0.4 -fold increase; Fig. 3G), which were associated with increased expression of cleaved caspase-3 (3.4 ± 1.3 -fold increase, $P < 0.05$; Fig. 3H).

HIT prevented this IH-induced proapoptotic ER stress, as shown by the absence of a significant increase in GRP78 expression, PERK and eIF2 α phosphorylation, and proapoptotic ATF4 and CHOP expression in the IH/HIT group. ATF6 expression was significantly reduced, and splicing of XBP1 mRNA was not modified. Finally, HIT also prevented the IH-induced increase in cleaved caspase-3 (Fig. 3).

In the normoxic group, HIT alone induced slight ER stress, as shown by the significant increase in Grp78 expression, compared with the N/Sed group (2.3 ± 0.3 -fold increase, $P < 0.05$; Fig. 3A). However, this HIT-induced ER stress was different from that induced by IH, as HIT did not activate the UPR (i.e., no significant effect of HIT on PERK and eIF2 α phosphorylation or on ATF4,

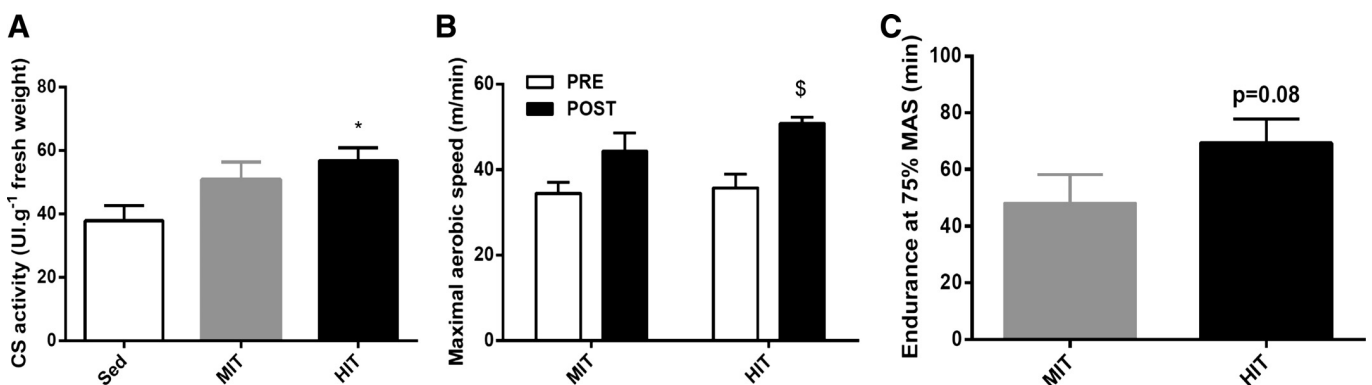


Fig. 2. HIT effects. A–C: maximal activity of the mitochondrial enzyme citrate synthase (CS; A), maximal aerobic speed (MAS; B), and posttraining endurance at 75% MAS (C) in rats under Sed, traditional moderate-intensity training (MIT), or HIT conditions before (PRE) and after (POST) endurance trainings ($n = 4$ –8 rats/conditions). Data are means ± SE. * $P < 0.05$ vs. the Sed group; \$ $P < 0.05$ vs. the PRE/HIT group.

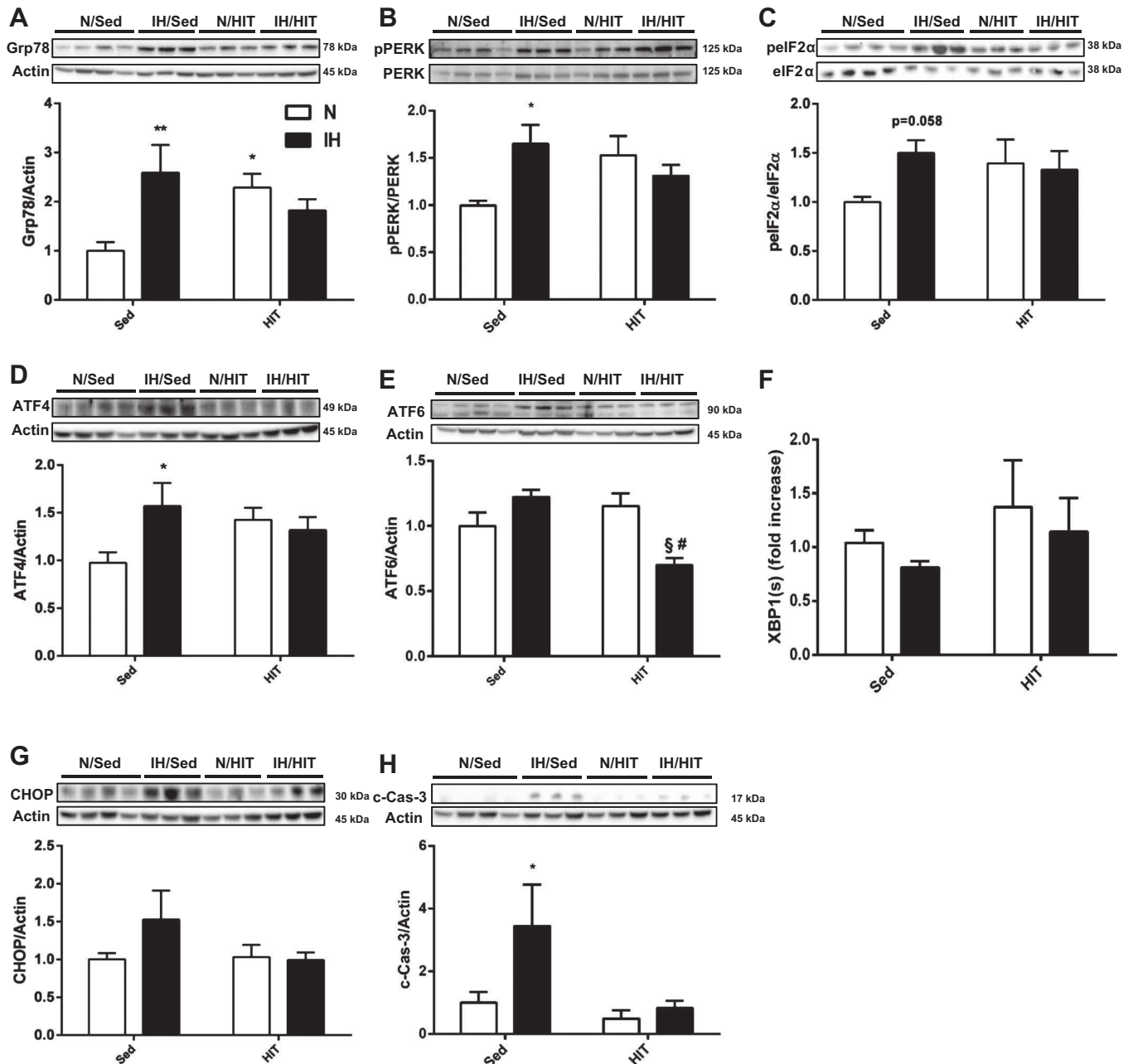


Fig. 3. HIT prevents IH-induced cardiac ER stress. *A–H*: glucose-regulated protein kinase (Grp)78 relative to actin (*A*), phosphorylated (p-)protein kinase-like ER kinase (PERK) relative to PERK (*B*), p-eukaryotic translation initiation factor (eIF)2 α relative to eIF2 α (*C*), activating transcription factor (ATF)4 relative to actin (*D*), ATF6 relative to actin (*E*), spliced X box-binding protein 1 [XBP1(s)] mRNA relative to total X box-binding protein 1 [XBP1(t)] mRNA (*F*), C/EBP homologous protein (CHOP) relative to actin (*G*), and cleaved caspase-3 relative to actin (*H*) in animals exposed for 21 days to either IH or normoxia and submitted to Sed or HIT conditions ($n = 6$ rats/group). Data are means \pm SE. ** $P < 0.01$ vs. the N/Sed group; * $P < 0.05$ vs. the N/Sed group; # $P < 0.05$ vs. the IH/Sed group; § $P < 0.05$ vs. the N/HIT group.

CHOP, and ATF6 expression and XBP1 mRNA splicing) or cleaved caspase-3 (Fig. 3).

HIT Prevents the IH-Induced Increase in BP and Infarct Size

IH was associated with a significant increase in heart rate (Fig. 4A) and mean BP (134 ± 3.8 vs. 119 ± 3.6 mmHg, $P < 0.05$; Fig. 4B). This IH-induced elevation of mean BP was demonstrated by significant increases in both systolic and diastolic BP (systolic BP: 155 ± 5.1 vs. 138 ± 3.6 mmHg and

diastolic BP: 123 ± 3.3 vs. 109 ± 3.7 mmHg in IH/Sed and N/Sed groups, respectively, $P < 0.05$) and was associated with a trend of an increase in sympathetic activity that was assessed indirectly through measurement of plasma catecholamine levels. In Sed animals, norepinephrine concentrations tended to be greater in hypoxic rats (27.7 ± 5.4 vs. 13.3 ± 1.8 ng/ml in IH/Sed and N/Sed, groups respectively, $P = 0.08$; Fig. 4C). HIT prevented both IH-induced increases in heart rate and BPs (mean BP: 122 ± 5.0 and 113 ± 4.3 mmHg, systolic BP:

145 ± 6.0 and 135 ± 5.1 mmHg, and diastolic BP: 111 ± 5.2 and 103 ± 4.1 mmHg in IH/HIT and N/HIT groups, respectively; Fig. 4) and the IH-associated increased plasma norepinephrine levels (17.5 ± 5.9 and 11.96 ± 2.7 ng/ml in IH/HIT and N/HIT groups, respectively; Fig. 4C). Finally, under Sed conditions, infarct size was significantly higher in hypoxic than normoxic groups (34.5 ± 2.9% vs. 22.7 ± 1.7% in IH/Sed and N/Sed groups, respectively, $P < 0.05$). This IH-induced increase in infarct size was prevented by HIT (28.8 ± 3.9% and 21.0 ± 5.1% in IH/HIT and N/HIT groups, respectively), whereas HIT alone had no effect in normoxic animals (Fig. 5). Hemodynamic Langendorff variables were not different between the four groups at any time of the experiment (Table 1).

DISCUSSION

In the present study, we demonstrated that chronic exposure to IH induces sustained cardiac proapoptotic ER stress, an elevation of arterial BP, and increased myocardial infarct size after ischemia-reperfusion, which were all prevented by short-term HIT. Therefore, to limit myocardial damage after an ischemic event, early diagnosis and treatment of sleep apnea are particularly relevant. Furthermore, specific aerobic training might represent a potent preventive strategy to improve the prognosis in OSA patients presenting with myocardial infarction.

Duality of the IH Stimulus

It is well known that hypoxia is an ambivalent stimulus that can exert both beneficial and detrimental effects, in particular in the myocardium. We have previously demonstrated that the duration, depth, and pattern of the hypoxic stimulus are crucial to determine whether the effect is protective or detrimental. On one hand, we showed that 4 h of IH (1-min cycle, 10% $F_{I_{O_2}}$) reduced myocardial infarct size in rats, whereas 30 min of IH or 4 h of continuous hypoxia at 10% $F_{I_{O_2}}$ did not (5), suggesting that myocardial preconditioning can be achieved with a very specific protocol of acute IH. On the other hand, a more severe IH stimulus (5% $F_{I_{O_2}}$) is detrimental for the myocardium (i.e., increases myocardial infarct size) when applied either in an acute (4 h) or a chronic (several weeks) protocol (5, 35, 54). The specific IH stimulus used in the present study (1-min cycle, 5% $F_{I_{O_2}}$, for several weeks) is now commonly used to emulate OSA-like IH (16).

Chronic Exposure to IH Promotes Cardiac Proapoptotic ER Stress

In the present study, we have shown that chronic exposure to IH induces sustained cardiac ER stress. This ER stress was characterized by significant upregulation of the chaperone Grp78, increased phosphorylation of both PERK and eIF2 α , and a significant increase in ATF4 expression and a trend of

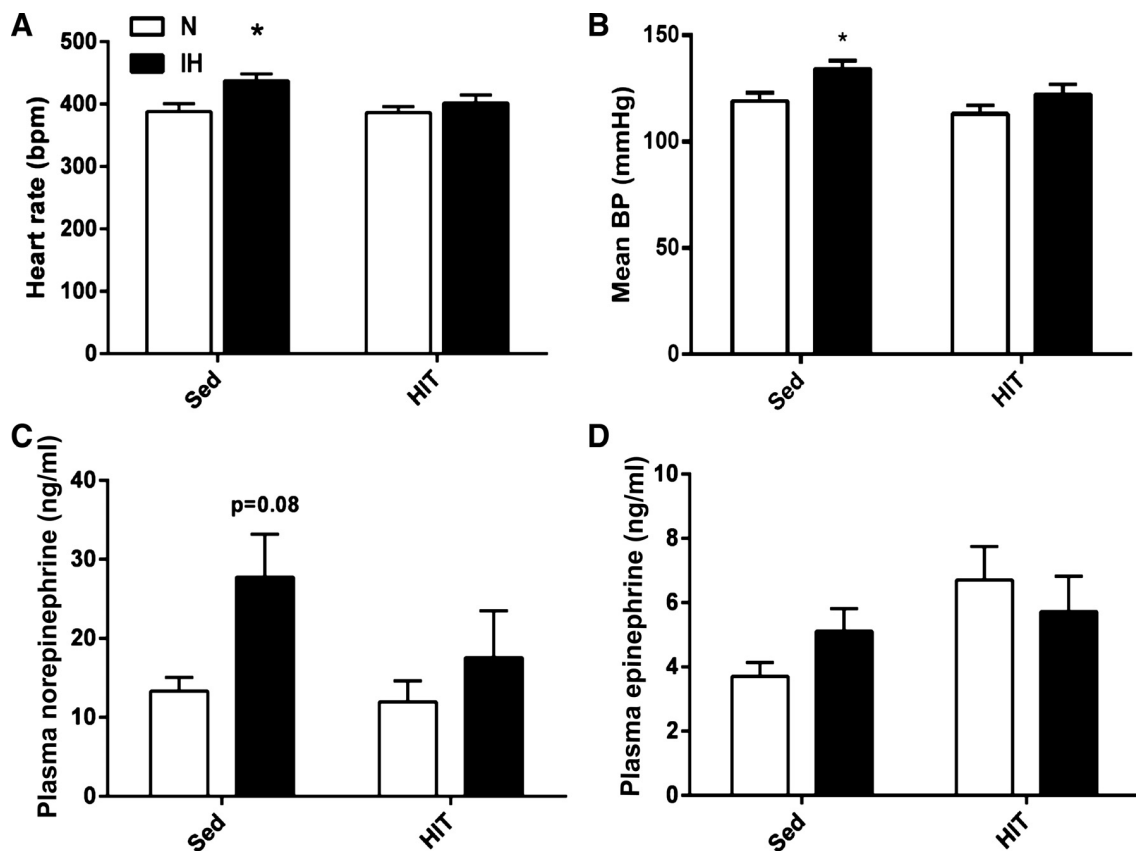


Fig. 4. HIT prevents the IH-induced increase in heart rate and blood pressure (BP). A–D: heart rate [in beats/min (bpm); A], mean arterial BP (B), and plasma norepinephrine (C) and epinephrine (D) concentrations in animals exposed for 21 days to either IH or N and submitted to Sed or HIT conditions ($n = 12$ –22 rats/group). Data are means ± SE. * $P < 0.05$ vs. the N/Sed group.

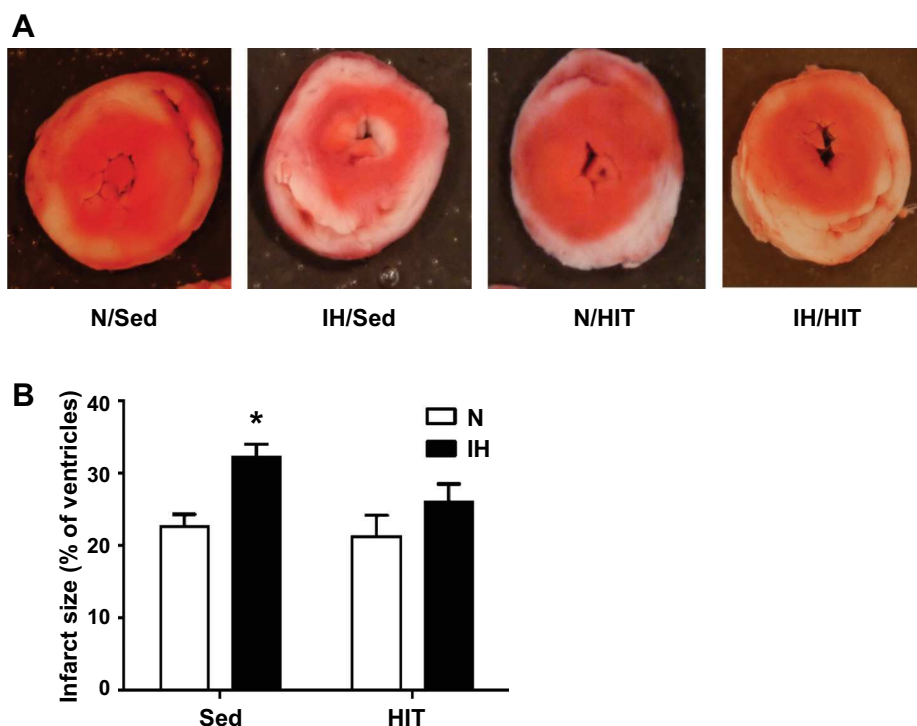


Fig. 5. HIT prevents the IH-induced increase in infarct size. *A*: representative images of myocardial infarct expansion. *B*: infarct size expressed as a percentage of ventricular size in animals exposed for 21 days to either IH or normoxia and subjected to Sed or HIT conditions ($n = 11-15$ rats/group). Data are means \pm SE. * $P < 0.05$ vs. the N/Sed group.

increases in ATF6 and CHOP expression. Finally, this IH-induced ER stress was associated with myocardial apoptosis, as we further demonstrated increased expression of cleaved caspase-3 in rats exposed to IH. These results are consistent with recent studies in rats and mice that have demonstrated that chronic IH induces proapoptotic ER stress in both the myocardium (18, 70) and neurons (11, 71). Furthermore, the link between ER stress and apoptosis is now well described. In particular, CHOP seems to be the main ER actor involved in apoptosis regulation, as it reduces the expression of the antiapoptotic factor Bcl-2 (46) and upregulates the proapoptotic factor BIM (69), subsequently activating caspase signaling. Supporting this, CHOP deficiency is protective against ER stress-induced apoptosis and myocardial dysfunction (52). In our model, we cannot exclude that IH could directly induce apoptosis independently of ER stress, through the classical extrinsic or intrinsic mitochondrial apoptotic pathways. In fact, sympathetic activation and oxidative stress, both activated by IH, can also induce myocardial apoptosis, subsequent to ER stress activation or in an ER stress-independent manner (13, 15, 33, 58, 63).

IH-Induced Increase in BP and Infarct Size: Potential Role of ER Stress

We confirmed results of previous studies indicating that IH was associated with chronic sympathetic activation (for a review, see Ref. 21) and an increase in arterial BP (6, 35, 57, 62). As ER stress inhibitors have been shown to prevent both ANG II-induced systemic hypertension (37) and hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension (42) in mice, our data suggest that prolonged ER stress induced by IH could contribute to the IH-induced elevation of arterial BP. We further confirmed that chronic exposure to IH was associated with an increased response to myocardial ischemia-reperfusion (i.e.,

increased infarct size), which is consistent with previous studies in both rodents (6, 35, 54, 57, 62) and humans (9). This result is particularly relevant as it suggests that a subject previously exposed to chronic IH will have a poor prognosis after an acute myocardial event. This raises the need to better understand mechanisms that could be activated by chronic IH and involved in the IH-increased infarct size after myocardial ischemia-reperfusion to identify and treat at-risk patients. Again, ER stress could represent a good intermediate mechanism as its role in the pathophysiology of cardiovascular diseases is well documented (26, 47). CHOP-deficient mice failed to increase infarct size after myocardial ischemia-reperfusion (48), and, in the context of chronic IH, previous studies have demonstrated the role of IH-induced ER stress on myocardial apoptosis and the subsequent contractile dysfunction (18, 70). The results of the present study support this and suggest that IH-induced proapoptotic ER stress could explain the IH-associated increased in myocardial infarction.

HIT Prevents IH-Associated Myocardial ER Stress and Increased Infarct Size

Interestingly, we further demonstrated that HIT inhibits IH-induced ER stress and also prevents the IH-induced increase in arterial BP and infarct size. The beneficial effect of HIT in decreasing proapoptotic ER stress has been previously described in skeletal muscles of rats and was associated with a decrease in fasting plasmatic glucose and insulin (39). Exercise training has also been shown to reduce ER stress-induced apoptosis in Alzheimer's disease in mice (36). As previously mentioned, proapoptotic ER stress has been correlated with myocardial damage in several pathophysiological conditions, such as ischemia-reperfusion, myocardial infarction, and heart failure (47). Therefore, in our study, the normalization of myocardial ER stress by HIT could explain the limitation of

Table 1. Hemodynamic variables in Langendorff-perfused rat hearts

	Stab	R30	R60	R120
Heart rate, beats/min				
N/Sed	273 ± 9	175 ± 22	173 ± 48	181 ± 26
IH/Sed	273 ± 10	150 ± 28	198 ± 17	204 ± 20
N/HIT	272 ± 8	162 ± 17	221 ± 34	192 ± 12
IH/HIT	256 ± 8	201 ± 21	199 ± 14	193 ± 15
Coronary flow, ml/min				
N/Sed	14.7 ± 1.0	5.2 ± 0.3	4.8 ± 0.3	3.2 ± 0.2
IH/Sed	16.3 ± 1.2	5.0 ± 0.6	4.3 ± 0.5	3.2 ± 0.4
N/HIT	14.4 ± 0.6	5.3 ± 0.9	4.7 ± 0.6	4.0 ± 0.4
IH/HIT	14.3 ± 1.3	6.6 ± 0.9	6.2 ± 0.8	5.4 ± 0.8
Left ventricular end-diastolic pressure, mmHg				
N/Sed	6.0 ± 1.0	71.5 ± 6.6	58.2 ± 7.2	45.6 ± 6.7
IH/Sed	7.8 ± 1.1	69.8 ± 6.7	55.3 ± 6.7	53.7 ± 6.7
N/HIT	7.0 ± 0.9	66.3 ± 2.7	58.7 ± 2.9	49.5 ± 3.2
IH/HIT	6.9 ± 1.1	69.1 ± 4.9	56.6 ± 4.3	43.9 ± 3.3
Left ventricular developed pressure, mmHg				
N/Sed	90.9 ± 5.5	18.1 ± 4.1	32.0 ± 4.1	25.4 ± 3.9
IH/Sed	96.3 ± 10.0	13.2 ± 2.6	33.6 ± 7.4	25.1 ± 5.1
N/HIT	92.2 ± 7.0	28.4 ± 6.2	34.3 ± 5.1	26.5 ± 2.9
IH/HIT	108.6 ± 8.1	19.1 ± 4.9	29.6 ± 4.7	25.8 ± 3.2
dP/dt _{min} , mmHg/min				
N/Sed	1685 ± 98	431 ± 69	602 ± 78	528 ± 57
IH/Sed	1792 ± 187	478 ± 160	626 ± 133	431 ± 66
N/HIT	1771 ± 147	583 ± 92	709 ± 74	571 ± 56
IH/HIT	1960 ± 117	474 ± 103	618 ± 92	545 ± 63
dP/dt _{max} , mmHg/min				
N/Sed	2217 ± 179	506 ± 97	785 ± 115	660 ± 80
IH/Sed	2308 ± 345	584 ± 219	613 ± 88	524 ± 76
N/HIT	2282 ± 230	749 ± 166	939 ± 141	772 ± 81
IH/HIT	2939 ± 303*	567 ± 110	784 ± 130	736 ± 91

Data are means ± SE; $n = 11-15$ rats/group. Heart rate, coronary flow, left ventricular end-diastolic pressure, left ventricular developed pressure, and cardiac contractility (dP/dt) were determined after 20 min of stabulation (Stab), 30 min of reperfusion (R30), 60 min of reperfusion (R60), and 120 min of reperfusion (R120) in animals exposed for 21 days to either intermittent hypoxia (IH) or normoxia (N) and submitted to sedentary (Sed) or high-intensity training (HIT) conditions. * $P < 0.05$ vs. N/Sed and N/HIT groups.

IH-induced increase in infarct size. Accordingly, two studies have recently demonstrated that other cardioprotective interventions (i.e., methallothionein and adiponectin) were also efficient against IH-induced ER stress and associated cardiomyocyte death (18, 70), independently of any ischemia-reperfusion protocol.

HIT Activates Adaptive ER Stress

We chose HIT as a preventive strategy to limit both IH-induced myocardial ER stress and increased infarct size, as only 2 wk has the potential to exert beneficial effects on performance and mitochondrial adaptations. Interestingly, in the normoxic group, HIT induced slight ER stress, different from the stress induced by IH. These data suggest that HIT may activate the adaptive pathway of the UPR, which maintains ER homeostasis upon luminal stress and allows myocardium adaptations to exercise. In accordance, exercise-induced ER stress has been well documented in different organs, such as the skeletal muscle (67), liver (27), and brain (40), and is considered as a pro-survival, and not a pro-apoptotic, response of the UPR. However, in our study, HIT-induced ER stress was not associated with any beneficial or deleterious effect on cardiovascular parameters (i.e., arterial BP and infarct size).

HIT as a Preventive Strategy Against OSA-Related Cardiovascular Consequences

Exercise is described as an efficient strategy for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. It is asso-

ciated with a decrease in cardiovascular mortality, through a lowering of resting heart rate, improved vascular endothelial function, increased vasculogenesis, and several metabolic adaptations of the myocardium, which result in improved tolerance to ischemia-reperfusion. Indeed, the ability of exercise to protect the heart against ischemia-reperfusion injuries in both human and animal models is well documented (22). Although it is generally admitted that MIT is sufficient to reduce the risk and recurrence of cardiovascular diseases, the beneficial effects of exercise may vary according to its intensity and duration (22). Moreover, high-intensity exercise brings greater short-term cardiovascular effects than MIT (28). In the context of a 21-day exposure to IH, current animal models of long-term moderate aerobic training were not suitable. Thus, we opted for an efficient short-term intense protocol aimed at improving cardiovascular variables and that could be applied together with IH exposure. We demonstrated that only 10 sessions of HIT elicited greater effects than traditional MIT on performance (i.e., MAS and endurance) and muscle adaptation (i.e., CS activity) and was also associated with an improvement of cardiovascular parameters (i.e., arterial BP and infarct size). These results are consistent with previous studies that have demonstrated that HIT can decrease sympathetic activation and arterial BP in humans (12, 53). Concerning animal studies, HIT has been shown to decrease arterial BP, preserve endothelial function (30), and improve myocardial contractile function both under basal conditions (38) and in a model of postinfarction heart failure (34, 49) in rats.

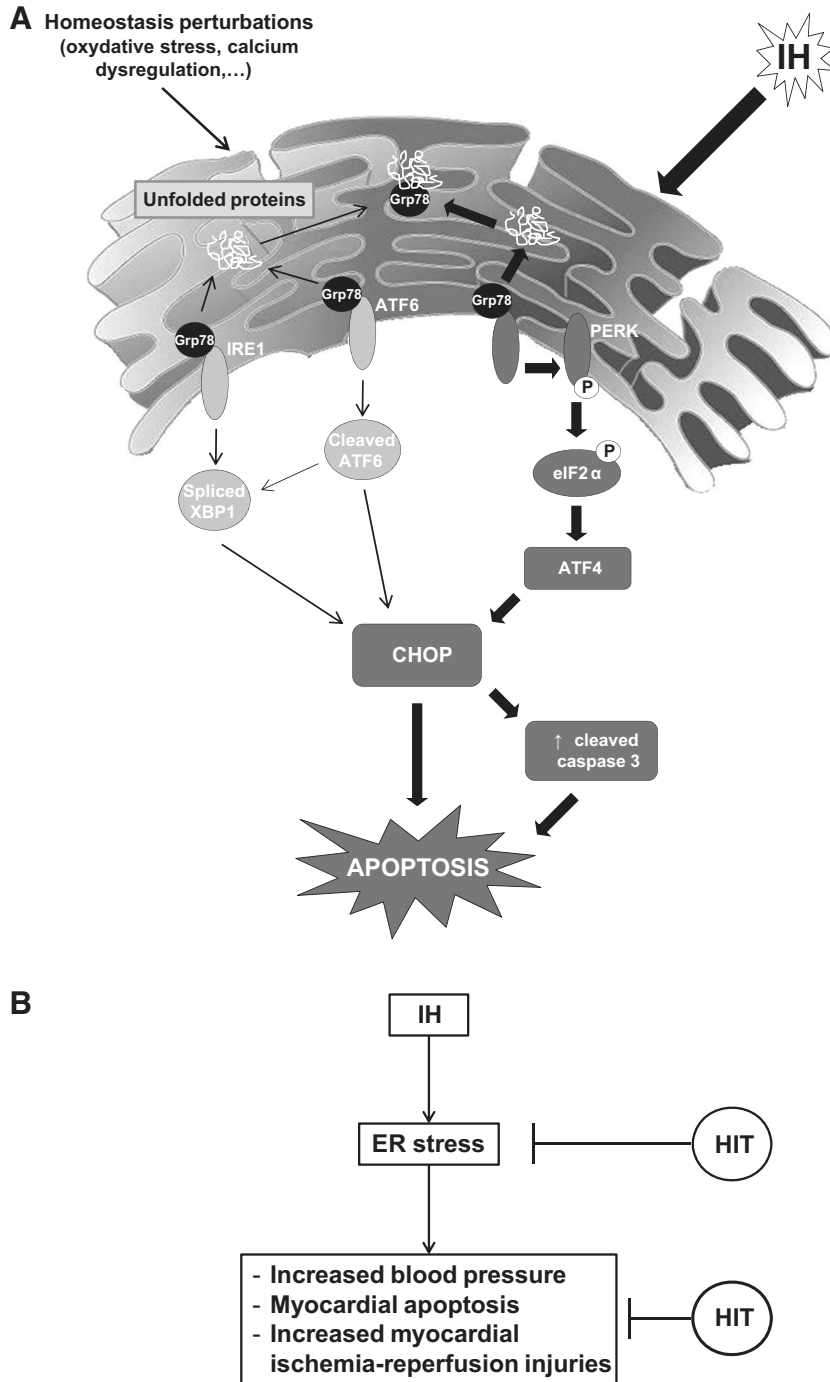


Fig. 6. IH-induced myocardial proapoptotic ER stress. *A*: several stimuli (i.e., oxidative stress, Ca^{2+} perturbations, and ischemia) can induce ER stress. The generation of unfolded proteins induces Grp78 release from inositol-requiring protein-1, ATF6, and PERK and activation of the three pathways of the unfolded protein response. Upon intense stresses, the unfolded protein response cannot control the level of unfolded proteins, and the ER initiates proapoptotic pathways, leading to the upregulation of CHOP and activation of the caspase pathway. Chronic IH also induces proapoptotic ER stress, characterized by the activation of the PERK/ATF4/CHOP pathway and expression of cleaved caspase-3. Thin arrows show the common ER stress response; thick arrows show IH-induced ER stress and apoptosis. *B*: through inhibition of IH-induced proapoptotic ER stress, short-term HIT prevented myocardial apoptosis and therefore may prevent IH-induced cardiovascular alterations.

Conclusions

HIT prevents the IH-dependent increase in myocardial infarction after ischemia-reperfusion, possibly through a down-regulation of the proapoptotic ER stress pathway (Fig. 6). Thus, our results suggest that HIT could represent a very promising preventive strategy to limit IH-induced myocardial ischemia reperfusion-related damages in OSA patients and improve their prognosis. The severity of sleep apnea can also be reduced by exercise only (41); therefore, rehabilitation programs should be implemented and evaluated in OSA patients that present with high cardiovascular risk.

GRANTS

This work was supported by the Fond de Dotation (Agir pour les Maladies Chroniques).

DISCLOSURES

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

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: G.B., E.B., and C.A. performed experiments; G.B., E.B., and C.A. analyzed data; G.B., E.B., and C.A. interpreted results of experiments; G.B. and C.A. prepared figures; G.B. and C.A. drafted manu-

script; G.B., P.F., J.-L.P., E.B., and C.A. edited and revised manuscript; G.B., P.F., H.S., J.-L.P., E.B., and C.A. approved final version of manuscript; P.F., H.S., E.B., and C.A. conception and design of research.

REFERENCES

- Adachi H, Koike A, Obayashi T, Umezawa S, Aonuma K, Inada M, Korenaga M, Niwa A, Marumo F, Hiroe M. Does appropriate endurance exercise training improve cardiac function in patients with prior myocardial infarction? *Eur Heart J* 17: 1511–1521, 1996.
- Arnaud C, Beguin PC, Lantuejoul S, Pepin JL, Guillermet C, Pelli G, Burger F, Buatois V, Ribuot C, Baguet JP, Mach F, Levy P, Dematteis M. The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition. *Am J Respir Crit Care Med* 184: 724–731, 2011.
- Baguet JP, Barone-Rochette G, Tamisier R, Levy P, Pepin JL. Mechanisms of cardiac dysfunction in obstructive sleep apnea. *Nat Rev Cardiol* 9: 679–688, 2012.
- Barbe F, Duran-Cantolla J, Capote F, de la Pena M, Chiner E, Masa JF, Gonzalez M, Marin JM, Garcia-Rio F, de Aauri JD, Teran J, Mayos M, Monasterio C, del Campo F, Gomez S, de la Torre MS, Martinez M, Montserrat JM. Long-term effect of continuous positive airway pressure in hypertensive patients with sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 181: 718–726, 2010.
- Beguin PC, Joyeux-Faure M, Godin-Ribuot D, Levy P, Ribuot C. Acute intermittent hypoxia improves rat myocardium tolerance to ischemia. *J Appl Physiol* 99: 1064–1069, 2005.
- Belaidi E, Joyeux-Faure M, Ribuot C, Launois SH, Levy P, Godin-Ribuot D. Major role for HIF-1 and the endothelin system in promoting myocardial infarction and hypertension in an animal model of obstructive sleep apnea. *J Am Coll Cardiol* 53: 1309–1317, 2009.
- Bratton DJ, Stradling JR, Barbe F, Kohler M. Effect of CPAP on blood pressure in patients with minimally symptomatic obstructive sleep apnoea: a meta-analysis using individual patient data from four randomised controlled trials. *Thorax* 69: 1128–1135, 2014.
- Brooks GA, White TP. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 45: 1009–1015, 1978.
- Buchner S, Satz A, Debl K, Hetzenecker A, Luchner A, Husser O, Hamer OW, Poschenrieder F, Fellner C, Zeman F, Riegger GA, Pfeifer M, Arzt M. Impact of sleep-disordered breathing on myocardial salvage and infarct size in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 35: 192–199, 2014.
- Chen TI, Shen YJ, Wang IC, Yang KT. Short-term exercise provides left ventricular myocardial protection against intermittent hypoxia-induced apoptosis in rats. *Eur J Appl Physiol* 111: 1939–1950, 2011.
- Chou YT, Zhan G, Zhu Y, Fenik P, Panossian L, Li Y, Zhang J, Veasey S. C/EBP homologous binding protein (CHOP) underlies neural injury in sleep apnea model. *Sleep* 36: 481–492, 2013.
- Ciolac EG, Bocchi EA, Bortolotto LA, Carvalho VO, Greve JM, Guimaraes GV. Effects of high-intensity aerobic interval training vs. moderate exercise on hemodynamic, metabolic and neuro-humoral abnormalities of young normotensive women at high familial risk for hypertension. *Hypertens Res* 33: 836–843, 2010.
- Communal C, Singh K, Pimentel DR, Colucci WS. Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the β -adrenergic pathway. *Circulation* 98: 1329–1334, 1998.
- da Luz G, Frederico MJ, da Silva S, Vitto MF, Cesconetto PA, de Pinho RA, Pauli JR, Silva AS, Cintra DE, Ropelle ER, De Souza CT. Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats. *Eur J Appl Physiol* 111: 2015–2023, 2011.
- Dalal S, Foster CR, Das BC, Singh M, Singh K. β -Adrenergic receptor stimulation induces endoplasmic reticulum stress in adult cardiac myocytes: role in apoptosis. *Mol Cell Biochem* 364: 59–70, 2012.
- Dematteis M, Godin-Ribuot D, Arnaud C, Ribuot C, Stanke-Labesque F, Pepin JL, Levy P. Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding the human disease. *Ilar J* 50: 262–281, 2009.
- Demirel HA, Powers SK, Zergeroglu MA, Shanely RA, Hamilton K, Coombes J, Naito H. Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *J Appl Physiol* 91: 2205–2212, 2001.
- Ding W, Zhang X, Huang H, Ding N, Zhang S, Hutchinson SZ. Adiponectin protects rat myocardium against chronic intermittent hypoxia-induced injury via inhibition of endoplasmic reticulum stress. *PLoS One* 9: e94545, 2014.
- Farah C, Kleindienst A, Bolea G, Meyer G, Gayrard S, Geny B, Obert P, Cazorla O, Tanguy S, Reboul C. Exercise-induced cardioprotection: a role for eNOS uncoupling and NO metabolites. *Basic Res Cardiol* 108: 389, 2013.
- Farah C, Meyer G, Andre L, Boissiere J, Gayrard S, Cazorla O, Richard S, Boucher F, Tanguy S, Obert P, Reboul C. Moderate exercise prevents impaired Ca^{2+} handling in heart of CO-exposed rat: implication for sensitivity to ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299: H2076–H2081, 2010.
- Fletcher EC. Invited review: Physiological consequences of intermittent hypoxia: systemic blood pressure. *J Appl Physiol* 90: 1600–1605, 2001.
- Frasier CR, Moore RL, Brown DA. Exercise-induced cardiac preconditioning: how exercise protects your achy-breaky heart. *J Appl Physiol* 111: 905–915, 2011.
- French JP, Hamilton KL, Quindry JC, Lee Y, Upchurch PA, Powers SK. Exercise-induced protection against myocardial apoptosis and necrosis: MnSOD, calcium-handling proteins, and calpain. *FASEB J* 22: 2862–2871, 2008.
- French JP, Quindry JC, Falk DJ, Staib JL, Lee Y, Wang KK, Powers SK. Ischemia-reperfusion-induced calpain activation and SERCA2a degradation are attenuated by exercise training and calpain inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H128–H136, 2006.
- Galehdar Z, Swan P, Fuerth B, Callaghan SM, Park DS, Cregan SP. Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress is regulated by ATF4-CHOP-mediated induction of the Bcl-2 homology 3-only member PUMA. *J Neurosci* 30: 16938–16948, 2010.
- Glembotki CC. Endoplasmic reticulum stress in the heart. *Circ Res* 101: 975–984, 2007.
- Gonzalez B, Manso R. Induction, modification and accumulation of HSP70s in the rat liver after acute exercise: early and late responses. *J Physiol* 556: 369–385, 2004.
- Guiraud T, Nigam A, Gremeaux V, Meyer P, Juneau M, Bosquet L. High-intensity interval training in cardiac rehabilitation. *Sports Med* 42: 587–605, 2012.
- Hamilton KL, Staib JL, Phillips T, Hess A, Lennon SL, Powers SK. Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med* 34: 800–809, 2003.
- Haram PM, Kemi OJ, Lee SJ, Bendheim MO, Al-Share QY, Waldum HL, Gilligan LJ, Koch LG, Britton SL, Najjar SM, Wisloff U. Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity. *Cardiovasc Res* 81: 723–732, 2009.
- Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6: 1099–1108, 2000.
- Haskell WL, Lee IM, Pate RR, Powell KE, Blair SN, Franklin BA, Macera CA, Heath GW, Thompson PD, Bauman A. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Circulation* 116: 1081–1093, 2007.
- Iwai-Kanai E, Hasegawa K, Araki M, Kakita T, Morimoto T, Sasayama S. α - and β -adrenergic pathways differentially regulate cell type-specific apoptosis in rat cardiac myocytes. *Circulation* 100: 305–311, 1999.
- Johnsen AB, Hoydal M, Rosbjorgen R, Stolen T, Wisloff U. Aerobic interval training partly reverse contractile dysfunction and impaired Ca^{2+} handling in atrial myocytes from rats with post infarction heart failure. *PLoS One* 8: e66288, 2013.
- Joyeux-Faure M, Stanke-Labesque F, Lefebvre B, Beguin P, Godin-Ribuot D, Ribuot C, Launois SH, Bessard G, Levy P. Chronic intermittent hypoxia increases infarction in the isolated rat heart. *J Appl Physiol* 98: 1691–1696, 2005.
- Kang EB, Kwon IS, Koo JH, Kim EJ, Kim CH, Lee J, Yang CH, Lee YI, Cho IH, Cho JY. Treadmill exercise represses neuronal cell death and inflammation during $A\beta$ -induced ER stress by regulating unfolded protein response in aged presenilin 2 mutant mice. *Apoptosis* 18: 1332–1347, 2013.
- Kassan M, Galan M, Partyka M, Saifudeen Z, Henrion D, Trebak M, Matrougui K. Endoplasmic reticulum stress is involved in cardiac damage and vascular endothelial dysfunction in hypertensive mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32: 1652–1661, 2012.

38. Kemi OJ, Haram PM, Loennechen JP, Osnes JB, Skomedal T, Wisloff U, Ellingsen O. Moderate vs. high exercise intensity: differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function. *Cardiovasc Res* 67: 161–172, 2005.
39. Kim K, Kim YH, Lee SH, Jeon MJ, Park SY, Doh KO. Effect of exercise intensity on unfolded protein response in skeletal muscle of rat. *Korean J Physiol Pharmacol* 18: 211–216, 2014.
40. Kim Y, Park M, Boghossian S, York DA. Three weeks voluntary running wheel exercise increases endoplasmic reticulum stress in the brain of mice. *Brain Res* 1317: 13–23, 2010.
41. Kline CE, Crowley EP, Ewing GB, Burch JB, Blair SN, Durstine JL, Davis JM, Youngstedt SD. The effect of exercise training on obstructive sleep apnea and sleep quality: a randomized controlled trial. *Sleep* 34: 1631–1640, 2011.
42. Koyama M, Furuhashi M, Ishimura S, Mita T, Fuseya T, Okazaki Y, Yoshida H, Tsuchihashi K, Miura T. Reduction of endoplasmic reticulum stress by 4-phenylbutyric acid prevents the development of hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306: H1314–H1323, 2014.
43. Larsen S, Nielsen J, Hansen CN, Nielsen LB, Wibrand F, Stride N, Schroder HD, Boushel R, Helge JW, Dela F, Hey-Mogensen M. Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *J Physiol* 590: 3349–3360, 2012.
44. Lee IM, Sesso HD, Oguma Y, Paffenbarger RS Jr. Relative intensity of physical activity and risk of coronary heart disease. *Circulation* 107: 1110–1116, 2003.
45. Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, Agusti AG. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet* 365: 1046–1053, 2005.
46. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 21: 1249–1259, 2001.
47. Minamino T, Komuro I, Kitakaze M. Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Circ Res* 107: 1071–1082, 2010.
48. Miyazaki Y, Kaikita K, Endo M, Horio E, Miura M, Tsujita K, Hokimoto S, Yamamoto M, Iwakaki T, Gotoh T, Ogawa H, Oike Y. C/EBP homologous protein deficiency attenuates myocardial reperfusion injury by inhibiting myocardial apoptosis and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 1124–1132, 2011.
49. Moreira JB, Bechara LR, Bozi LH, Jannig PR, Monteiro AW, Dourado PM, Wisloff U, Brum PC. High- versus moderate-intensity aerobic exercise training effects on skeletal muscle of infarcted rats. *J Appl Physiol* 114: 1029–1041, 2013.
50. Morishima N, Nakanishi K, Nakano A. Activating transcription factor-6 (ATF6) mediates apoptosis with reduction of myeloid cell leukemia sequence 1 (Mcl-1) protein via induction of WW domain binding protein 1. *J Biol Chem* 286: 35227–35235, 2011.
51. Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 277: 34287–34294, 2002.
52. Nam DH, Han JH, Lee TJ, Shishido T, Lim JH, Kim GY, Woo CH. CHOP deficiency prevents methylglyoxal-induced myocyte apoptosis and cardiac dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 85: 168–177, 2015.
53. Pal S, Radavelli-Bagatini S, Ho S. Potential benefits of exercise on blood pressure and vascular function. *J Am Soc Hypertens* 7: 494–506, 2013.
54. Park AM, Suzuki YJ. Effects of intermittent hypoxia on oxidative stress-induced myocardial damage in mice. *J Appl Physiol* 102: 1806–1814, 2007.
55. Pepin JL, Timsit JF, Tamisier R, Levy P. Is CPAP effective in reducing blood pressure in minimally symptomatic obstructive sleep apnoea? *Thorax* 69: 1068–1070, 2014.
56. Ramires PR, Ji LL. Glutathione supplementation and training increases myocardial resistance to ischemia-reperfusion in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H679–H688, 2001.
57. Ramond A, Godin-Ribuot D, Ribouot C, Totoson P, Koritchneva I, Cachot S, Levy P, Joyeux-Faure M. Oxidative stress mediates cardiac infarction aggravation induced by intermittent hypoxia. *Fundam Clin Pharmacol* 27: 252–261, 2013.
58. Remondino A, Kwon SH, Communal C, Pimentel DR, Sawyer DB, Singh K, Colucci WS. β -Adrenergic receptor-stimulated apoptosis in cardiac myocytes is mediated by reactive oxygen species/c-Jun NH2-terminal kinase-dependent activation of the mitochondrial pathway. *Circ Res* 92: 136–138, 2003.
59. Shepherd RE, Gollnick PD. Oxygen uptake of rats at different work intensities. *Pflugers Arch* 362: 219–222, 1976.
60. Tanasescu M, Leitzmann MF, Rimm EB, Willett WC, Stampfer MJ, Hu FB. Exercise type and intensity in relation to coronary heart disease in men. *JAMA* 288: 1994–2000, 2002.
61. Tjonna AE, Lee SJ, Rognmo O, Stolen TO, Bye A, Haram PM, Loennechen JP, Al-Share QY, Skogvoll E, Slordahl SA, Kemi OJ, Najjar SM, Wisloff U. Aerobic interval training versus continuous moderate exercise as a treatment for the metabolic syndrome: a pilot study. *Circulation* 118: 346–354, 2008.
62. Totoson P, Fayli W, Faury G, Korichneva I, Cachot S, Baldazza M, Ribouot C, Pepin JL, Levy P, Joyeux-Faure M. Atorvastatin protects against deleterious cardiovascular consequences induced by chronic intermittent hypoxia. *Exp Biol Med (Maywood)* 238: 223–232, 2013.
63. von Harsdorf R, Li PF, Dietz R. Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation* 99: 2934–2941, 1999.
64. Wisloff U, Ellingsen O, Kemi OJ. High-intensity interval training to maximize cardiac benefits of exercise training? *Exerc Sport Sci Rev* 37: 139–146, 2009.
65. Wisloff U, Loennechen JP, Currie S, Smith GL, Ellingsen O. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca^{2+} sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 54: 162–174, 2002.
66. Wisloff U, Stoylen A, Loennechen JP, Bruvold M, Rognmo O, Haram PM, Tjonna AE, Helgerud J, Slordahl SA, Lee SJ, Videm V, Bye A, Smith GL, Najjar SM, Ellingsen O, Skjaerpe T. Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients: a randomized study. *Circulation* 115: 3086–3094, 2007.
67. Wu J, Ruas JL, Estall JL, Rasbach KA, Choi JH, Ye L, Bostrom P, Tyra HM, Crawford RW, Campbell KP, Rutkowski DT, Kaufman RJ, Spiegelman BM. The unfolded protein response mediates adaptation to exercise in skeletal muscle through a PGC-1 α /ATF6 α complex. *Cell Metab* 13: 160–169, 2011.
68. Yamashita N, Hoshida S, Otsu K, Asahi M, Kuzuya T, Hori M. Exercise provides direct biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation. *J Exp Med* 189: 1699–1706, 1999.
69. Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem* 276: 13935–13940, 2001.
70. Zhou S, Yin X, Zheng Y, Miao X, Feng W, Cai J, Cai L. Metallothionein prevents intermittent hypoxia-induced cardiac endoplasmic reticulum stress and cell death likely via activation of Akt signaling pathway in mice. *Toxicol Lett* 227: 113–123, 2014.
71. Zhu Y, Fenik P, Zhan G, Sanfillipo-Cohn B, Naidoo N, Veasey SC. Eif-2 α protects brainstem motoneurons in a murine model of sleep apnea. *J Neurosci* 28: 2168–2178, 2008.

1.3. Article n°3 :

Etude du rôle de l'hypoxie intermittente post-infarctus dans la progression de la cardiomyopathie ischémique vers l'insuffisance cardiaque

Après avoir étudié les effets de l'HI sur l'accident ischémique aigu, nous nous sommes intéressés aux effets de l'HI sur le développement de l'IC post-infarctus. En effet, après un IM, les patients apnéiques présentent une maladie coronarienne plus sévère, une ischémie myocardique prolongée, un potentiel de sauvetage du myocarde moindre et une détérioration ventriculaire plus importante que des patients non apnéiques [5]. Cependant, il existe très peu d'études sur l'impact de l'HI sur le développement de la cardiomyopathie ischémique et les mécanismes impliqués ne sont pas connus.

Dans cette étude, nous avons pour objectif principal d'évaluer la cinétique du remodelage cardiaque et de la dysfonction contractile dans un modèle de ligature coronaire chez le rat, soumis ou non à une HI chronique, et de déterminer les mécanismes impliqués. D'après nos précédents travaux, nous avons pour hypothèse que le stress du RE et HIF-1 α , qui sont impliqués dans de nombreuses complications CVs et/ou dans les altérations cardiaques associées à l'HI pourrait également avoir un rôle majeur post-infarctus. Nous avons également émis l'hypothèse que l'activation sympathique qui est activée par l'HI et qui participe au phénomène de désensibilisation myocardique, pourrait avoir un rôle central dans les complications cardiaques observées chez les patients SAOS post-IM.

Des rats Wistar mâles ont subi ou non une ligature coronaire gauche pour induire un IM. 3 jours post-chirurgie, l'IM a été vérifié par échocardiographie et les animaux avec IM ont été exposés durant 1 semaine, 4 semaines et 12 semaines à la normoxie ou à l'hypoxie intermittente. Un suivi longitudinal par échocardiographie a été réalisé pour l'ensemble des animaux afin d'évaluer le remodelage ventriculaire et la fonction contractile. A la fin des expositions de 1 semaine, 4 semaines ou 12 semaines, la fonction cardiaque a également été évaluée par cathétérisme intra-ventriculaire. Les tissus ont été prélevés afin d'évaluer le remodelage ventriculaire (RT-qPCR et histologie) le stress du RE et l'expression de HIF-1 α (Western-blot) et l'activation sympathique (RT-qPCR, Western-blot, histologie). Cette activation sympathique a également été étudiée de manière indirecte par l'analyse spectrale des pressions et des fréquences dans les domaines fréquentiels, ainsi que par analyse histologique des surrénales.

Les résultats montrent que l'HI post-IM est responsable d'une dysfonction systolique sévère associée à une hyperactivation sympathique, une augmentation du stress du RE proapoptotique et une surexpression du facteur de transcription HIF-1 α . Ainsi, ces mécanismes physiopathologiques qui participent aux complications cardiovasculaires induites par l'HI sont exacerbés post-infarctus et semblent contribuer de manière substantielle au mauvais pronostic chez les patients SAOS.

“Characterization of intermittent hypoxia-induced cardiac remodeling and contractile dysfunction in a post-ischemic rat model “

Guillaume Bourdier, Maximin Détrait, Stéphane Doutreleau, Emeline Lemarié, Sandrine Brasseur, Jean-Louis Pépin, Elise Belaidi and Claire Arnaud

En cours de rédaction

Introduction

Long term cardiac outcomes after MI are associated with increased risk of incident heart failure (HF) and poor prognosis [1, 2], and several conditions that could aggravate this pattern have been identified. Among them, obstructive sleep apnea (OSA) syndrome is recognized as an independent cardiovascular risk factor [3], with a prevalence of OSA around 50% in patients hospitalized for myocardial infarction (MI) [4]. In addition, OSA promotes infarct expansion and less myocardial salvaged after acute MI [5], and is also associated with reduced survival in patients with HF [6]. Intermittent hypoxia (IH), a hallmark feature of OSA, has been identified as the key mediator of OSA-related cardiovascular damages [7]. Experimental studies demonstrated that IH, in absence of any confounding factor, induces cardiac hypertrophy and apoptosis which were characterized by elevation of cardiomyocyte areas and a 2-fold increase in caspase 3 activity [8]. These IH-induced cardiac alterations were associated with contractile dysfunction, as shown by a significantly decreased ejection fraction compared to the control group [9]. Furthermore, in response to acute myocardial ischemia-reperfusion, we demonstrated that IH induces an increase in infarct size in both mice [10] and rat [11]. However, to our knowledge, the role of IH on the progression of post-MI heart failure has never been investigated.

Using the rodent model of chronic IH, we and others previously demonstrated that chronic exposure to IH induces several intermediate mechanisms responsible for the related-cardiovascular consequences. Among them, IH is known to induce a chronic and sustained sympathetic activation associated with increased heart susceptibility to infarction [11] and systemic hypertension [12], an increase in Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 activity [13], closely related to infarct size [14, 15] and a myocardial proapoptotic ER stress which also contribute to increase vulnerability to I/R following IH exposure [11, 15] and contribute to cardiac cell death and cardiac dysfunction following IH exposure [16, 17].

Briefly, endoplasmic reticulum (ER) plays a major role in protein synthesis, protein folding, calcium homeostasis and cellular responses to stress. Accumulation of unfolded or misfolded proteins in ER lumen induces an adaptive response, the unfolded protein response (UPR), to restore ER homeostasis. UPR is initiated by the release of glucose-regulated protein 78 kDa (Grp78) from transmembrane ER sensors, leading to activation of 3 signaling pathways involving double-stranded RNA activated protein kinase-like ER kinase (PERK), activating transcription factor 6 (ATF6) and inositol required enzyme1 (IRE-1). Although this process is initially beneficial to restore ER homeostasis, prolonged stress induces accumulation of ER stress proteins and triggers pathological

response with increased cell death, especially through activation of the proapoptotic transcription factor C/EBP homologous protein (CHOP) [18].

In the context of IH, it has been demonstrated that IH-induced ER stress in the brain could mediate HIF-1 activation. Indeed, CHOP deletion prevents the IH-induced increase HIF-1 α mRNA content [19], and we further demonstrated that TUDCA, an inhibitor of ER stress administered during the IH exposure, abolishes the IH-induced myocardial HIF-1 activity that results in limited infarct size [10].

Chronic activation of sympathetic nervous system (SNS) is a well-known substrate of cardiac remodeling and contractile dysfunction post-MI [20] and several studies suggest that cardiac alterations mediated by SNS involved ER stress activation [21-23]. Therefore, the aims of the present study was 1) to determine the kinetic of IH-induced cardiac remodeling and contractile dysfunction in post-MI rats; and 2) to investigate whether IH and MI induces synergistic effects on sympathetic activation, ER stress and HIF-1 activation.

Material and methods

Study population. Wistar male rats (5 weeks old, 200-220g, Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) were housed at the animal care facility of the HP2 Laboratory (approval no. A38 51610006) under a 12:12-h light-dark cycle at 20–22°C and allowed free access to standard food and water. The experimental procedures were conducted in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Council of Europe, European Treaties ETS 123, Strasbourg, 18 March 1986) and with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 85–23, revised 1996) and were approved by an Institutional Animal Care and Use Committee (agreement number n° 2015032010109170 (APAFIS#695)).

Myocardial infarction. Rats were deeply anesthetized [ketamine (100 mg/kg i.p., Imalgene 1000, Merial, France) and xylazine (4 mg/kg i.p., Rompun, Bayer, Allemagne)], intubated and ventilated in a 50% O₂–50% air mixture on a volume control ventilator (Rovent, Kent Scientific, Connecticut, USA). Anesthesia was maintained with 0.5% isoflurane (Isoflo, Axience, Pantin, France) in a 50% O₂–50% air mixture during the procedure. Respiratory rate, tidal volume (Kent Scientific) and expired CO₂ (Capnoscan, Kent Scientific) were monitored. Rat temperature was maintained at 37°C using a rectal probe connected to a heating pad. After a left thoracotomy was performed, the pericardium was dissected, and the left anterior coronary artery was ligated using a nonabsorbable braided silk suture (sofsilk 6-0, Covidien, Boulogne-Billancourt, France).

The rib cage was closed and the wound sutured (polysorb 4-0, Covidien). Sham-operated rats were subjected to the same surgical procedure except the coronary artery ligation. All animals were given 0.03mg/kg buprenorphin (Buprécare, Axience) subcutaneously immediately after surgery.

Echocardiography (2D and M-mode) was performed after 3 days to exclude animals with small infarcts according to the procedure described by Litwin et al. [24]. About the 109 rats operated, 15 died (14%) during the first 24h and 10 (9%) were excluded. All the Sham-operated rats survived. (Figure 1).

Intermittent hypoxia exposure. Among the three groups described above, three exposure durations were determined to analyze effects of intermittent hypoxia (IH) on post myocardial infarction. Thus, we exposed rats to IH or normoxia (N) during 1 week, 4 weeks and 12 weeks after the echocardiography control (Fig 1). Animals were exposed daily to 8 h of IH or N during their daytime sleep period. The IH stimulus was performed using a specifically designed device, as previously described [25]. It consisted of 1-min cycles with alternating 30 s of hypoxia [5% fraction of inspired O₂

(FIO₂)] and 30 s of normoxia (21% FIO₂). FIO₂ was monitored throughout the experiment with a gas analyzer (ML206, AD Instruments, Oxford, UK). Normoxic rats were exposed to air streams to reproduce equivalent levels of noise and turbulence related to gas circulation as IH without hypoxia. Sham groups were maintained in housing cages during 1 week, 4 weeks and 12 weeks according to N or IH exposure. At the end of exposure, rats were anesthetized with injection of ketamine (100 mg/kg i.p., Merial) and xylazine (4 mg/kg i.p., Bayer) before experimental procedures.

Echocardiography. A longitudinal follow-up of rat left ventricle (LV) dimensions and function was performed weekly for animals exposed from 1 to 4 weeks and every two weeks for those exposed 12 weeks. Rats were anesthetized with 5% isoflurane (Axience) in a 50% O₂ –50% air mixture and maintained with 2 % isoflurane during the procedure. Using an ultra-high frequency probe (MS250 13-24MHz, VisualSonics), diastolic and systolic LV wall thickness, cavity diameters and ejection fraction and fractional shortening were measured and calculated as the mean of three cardiac cycles in M-mode long axis.

Experimental procedures. *Pressure-volume loop (PV loop) analysis:* Animals were deeply anesthetized as previously described. LV pressures and volumes were measured with a pressure-volume conductance catheter (SPR-839 : 1 week exposure and SPR-869 : 4 and 12 weeks exposure ; Millar Instruments, Houston, TX) was inserted into the right carotid artery to measure baseline arterial pressure (5 min record) and then fed retrograde into the LV to record systolic and diastolic hemodynamics. End-systolic-pressure-volume relationship (ESPVR) and end-diastolic-pressure-volume relationship (EDPVR) were calculated using five consecutive cycles following the occlusion of inferior vena cava.

Sympathetic nervous system activity: Power spectral analysis was carried out using the baseline record before the insertion into the LV cavity. Signals were processed using rodent spectral analysis software (SA-BPV, Nevrokard, Ljubljana, Slovenia). Frequency domain analysis of heart rate, systolic, diastolic, mean and pulse pressure variability was performed. Power and normalized units of the low frequency (LF) and high frequency (HF) components of the resulting power spectra, as well as the LF/HF ratio, considered as general marker of sympathovagal balance, were computed.

Histology. Intracardiac injection of KCl 120mM stopped rat hearts in diastolic phase. Hearts and adrenal glands were harvested and fixed overnight in 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) and were embedded in paraffin. Five micrometers sections (RM2255 Fully Automated Rotary Microtome, Leica) were stained with Sirius-red to visualize interstitial collagen density in the infarct remote areas. The cardiac myocyte size was examined by FITC-labeled wheat germ agglutinin

(Sigma-Aldrich) staining of membranes, and left ventricular cardiac myocyte membranes were observed by fluorescence microscopy.

Infarct size measurement and tissue sampling. After experimental procedures, hearts were excised and sectioned into atria and ventricles. The right ventricle was (RV) was harvested and the left ventricle (LV) was opened from the base to the apex along the middle of the septum and photographed. Infarcted areas were determined using the photos, as previously described [26] (DMC-GF3, Panasonic, Osaka, Japan). Then, the LV was divided into two zones: the infarcted area and the remote area. Tissues were quickly weighted, rapidly frozen and kept at -80°C.

Western blotting. Frozen samples of remote areas were homogenized using mortar and pestle and were lysed (Precellys 24, 6,500 rpm, 3X20 s- 5 s, Bertin Technology, Montigny le Bretonneux, France) to extract total proteins (sample lysis buffer : 5 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 20 mM NaF, 1 mM DTT, and protease inhibitor cocktail). The protein concentration was calculated using a Bradford assay (Bradford reagent, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Thirty milligrams of protein were separated by SDS polyacrylamide gels (8–12%) and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. Next, membranes were blocked with 5% nonfat milk or BSA in Tris-buffered saline (TBS) with Tween 20 (0.1%). Membranes were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies in TBS-Tween 20-5% BSA or nonfat milk. The following day, membranes were incubated for 1 h at room temperature with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). Enhanced chemiluminescence was performed with the Western Blot ECL substrate (Clarity, Bio-Rad, Marnes-la Coquette, France) according to the manufacturer's instructions and video acquisition (chemidoc-xrs-system, Bio-Rad). The relative amount of protein was quantified by densitometry (Image J). Myocardial ER stress was assessed in remote areas using the following antibodies: phospho-eIF2 α , eIF2 α , ATF4, caspase-12, caspase-3, cleaved caspase-3 (1:1000, Cell Signaling Technology, Hitchin, UK), ATF6 (1:500), phospho-PERK, PERK, nuclear CHOP, Grp78, TATA binding protein (TBP) (1:1000, Santa Cruz Biotechnology), HIF-1 α (1:500), actin and tubulin (1:2,000, Santa Cruz Biotechnology). Phosphorylated proteins were expressed relative to total proteins, and non-phosphorylated proteins were expressed relative to tubulin in myocardial extracts and actin in adrenal extracts. Nuclear CHOP was expressed relative to TBP.

RNA isolation, reverse transcription and quantitative real-time PCR. Total mRNA from remote areas and adrenal glands were extracted using RNA isolation kit (Nucleospin RNA Plus, Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). Total RNA (0.5 μ g) was reversely transcribed to cDNA using iScript Reverse

Transcription Supermix (C-1000 Thermal Cycler, Bio-Rad). Quantitative real-time PCR was performed using SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) and PCR primers (Sigma-Aldrich). All gene-specific oligonucleotide primer pairs used and their experimentally determined annealing temperatures are listed in table 1. Quantification of mRNA was standardized to the 2 best household genes (Cyca, Rplp0, HPRT1) selected with the RefFinder program[27] ; and was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Table 1).

Analysis and Statistics. Image analysis was performed using the non-commercial image processing software ImageJ. Statistics were performed using GraphPad Prism 6 software (San Diego, CA). Data are expressed as means \pm SEM. Differences between groups over time were determined by one-way ANOVA with a subsequent Dunn's post hoc test for multiple group comparisons. P values of 0.05 were considered statistically significant.

Results

IH alters left ventricular remodeling

Since the first week, MI induced a marked LV dilation with increased diastolic diameters [(LVID d); $p < 0.05$ vs Sham], associated with cardiac hypertrophy in MI-IH, as shown by significant increase in heart weight (HW) and left ventricular weight (LVW) ratios to body weight (BW) ($p < 0.05$ vs Sham; Table 2). After 4 week-exposure, LV dilation was significantly increased in MI-N, as shown by raised dimensions and volumes [LVID: 11.2 ± 0.2 vs 10.3 ± 0.1 in MI-N and MI-IH, respectively; Table 2), ESV: 308 ± 18 vs 231 ± 34 , and EDV: 364 ± 25 vs 271 ± 36 in MI-N and Sham, respectively; Table 3]. Although in the first time, IH seems to preserve from LV dilation, after 12-week exposure, heart dimensions and volumes were similar in MI groups. Moreover, cardiac hypertrophy was significantly increased in MI-IH ($p < 0.05$ vs Sham; Table 2). This aggravation of hypertrophy following 12-week IH-exposure is associated with LV systolic function significantly decreased when compared to the MI-N group (LVFS and LVEF: $p < 0.05$; Table 2 and Figure 2A).

At molecular levels, MI-induced hypertrophy was associated with major and quick expression increase of fetal genes, which slightly decrease from 1 to 12 weeks (Figure 3A, B and C). Interstitial fibrosis in remote LV areas was slightly more increased by IH than N from 1 to 12 weeks compared to Sham (Figure 3D).

IH aggravates cardiac dysfunction of rats with myocardial infarction

Overall cardiac function gradually declined in MI rats over the 12-week exposure compared to Sham-operated rats. Unexpectedly, while LV dilation observed in MI-N following 4-week exposure was superior to MI-IH, cardiac function was aggravated in MI-IH with significant decreased SV, CO, dP/dt_{max} and dP/dt_{min} ($p < 0.05$ vs Sham; Table 3). 12-week exposure confirm worsened cardiac function superior in MI-IH compared to MI-N (dP/dt_{max} and dP/dt_{min} : $p < 0.05$ vs Sham; Table 3) associated with an increase dilatation (EDV: $p < 0.05$ vs Sham; Table 3). Moreover, cardiac dysfunction was also characterized in MI-IH by significant reduction of EF and ESPVR ($p < 0.05$ vs MI-N and vs Sham, respectively; Figure 2A and B).

Previous studies demonstrated that LV hypertrophy and severe LV dysfunction are associated with increases in RV weight and lung weight [28]. As illustrated in Figure 2C and D, we shown that MI-IH after 12-week exposure significantly increase right ventricle weight (RVW) and lung weight (LW) ratios to BW ($p < 0.05$ vs MI-N and vs Sham).

Taken together, these data suggest that chronic IH exposure aggravates morbid cardiac phenotype and induces severe LV systolic dysfunction in rats following MI.

IH induces a sustained sympathetic hyperactivity and induces adrenal hypertrophy

We examined whether chronic exposure to IH post-MI may potentiate SNS activation induced by myocardial infarction. While 1-week exposure to IH was not sufficient to increase sympathetic activity (Figure 4A), a significant elevation of the low frequency to high frequency (LF/HF) ratio of diastolic blood pressure (DBP) was observed at 4 weeks and lasted until the end of the 12-week exposure period ($p < 0.05$ vs Sham; Figure 4A). As the adrenal medulla is a key SNS component, we examined its functional status after 12 weeks. IH rats presented adrenal hypertrophy with significant increased adrenal weight (AW) to body weight ratio ($p < 0.05$ vs Sham and MI-N; Figure 4B), associated with significant increase in the medullar area in MI-IH when compared to Sham ($p < 0.05$; Figure 4C). Finally, after 12-week exposure, MI caused a significant β 1-AR down-regulation ($p < 0.05$ vs Sham; Figure 4D).

IH induces a sustained overexpression of HIF-1 α post-MI

After 1-week exposure, HIF-1 α expression was not changed in MI-N, while HIF-1 α was overexpressed by IH exposure (1.7 ± 0.3 vs 1.0 ± 0.1 in MI-IH vs Sham, respectively). After 4-week exposure, HIF-1 α expression was significantly increased in both MI groups. Finally, HIF-1 α expression was decreased after 12 week in MI-N when IH induced a sustained overexpression of HIF-1 α over time.

IH promotes myocardial proapoptotic ER stress

Grp78 expression is considered as a classical marker of UPR during ER stress and CHOP, associated with Casp12 expression, mediate ER stress-induced apoptosis by increasing cleavage of caspase 3 (C-Casp3). After 1 week, myocardial ER stress in MI-N rats was not activated and nuclear CHOP, Casp12 and C-Casp3 expressions were similar to Sham (Figure 5B and C). In MI-IH, UPR was downregulated with significant decreased expressions of Grp78, ATF6, pPERK, p $\text{eIF}2\alpha$ and ATF4 ($p < 0.05$ vs Sham; Figure 5B), while CHOP and C-Casp3 expression were raised (figure 5C). 4-week exposure induced in MI a significant increase of nuclear CHOP and C-Casp3 expressions ($p < 0.05$ vs Sham; Figure S2) associated with a raised Grp78 expression (1.2 ± 0.0 vs 1.0 ± 0.0 in MI-N and Sham, respectively,

p=0.0683 vs Sham) whereas spliced Xbp1 (Xbp1-s), pPERK, p-eIF2 α and ATF4 and C-Casp12 were not changed. On the other hand, IH-exposure significantly augmented nuclear CHOP, C-Casp12 and C-Casp3 expressions associated with significant upregulation of p-eIF2 α while other ER stress markers were not changed. Finally, after 12-week exposure, MI-N presented a slight increase of Grp78 expression (1.3 ± 0.1 vs 1.0 ± 0.1 , in MI-N and Sham, respectively) while pro-apoptotic signaling was repressed. Whereas, as observed for HIF-1 α expression, IH-exposure continues to drive a pro-apoptotic signaling with significant raise of CHOP, Casp12 and C-Casp3 expressions ($p < 0.05$ vs Sham; Figure 5C). It is associated with significant increase of Grp 78 expression compared to Sham ($p < 0.05$, figure 5B).

References

1. Gottlieb, D.J., et al., *Prospective study of obstructive sleep apnea and incident coronary heart disease and heart failure: the sleep heart health study*. *Circulation*, 2010. **122**(4): p. 352-60.
2. Xie, J., et al., *Nocturnal Hypoxemia Due to Obstructive Sleep Apnea Is an Independent Predictor of Poor Prognosis After Myocardial Infarction*. *J Am Heart Assoc*, 2016. **5**(8).
3. Sanchez-de-la-Torre, M., F. Campos-Rodriguez, and F. Barbe, *Obstructive sleep apnoea and cardiovascular disease*. *Lancet Respir Med*, 2013. **1**(1): p. 61-72.
4. Lee, C.H., et al., *Obstructive sleep apnea in patients admitted for acute myocardial infarction. Prevalence, predictors, and effect on microvascular perfusion*. *Chest*, 2009. **135**(6): p. 1488-1495.
5. Buchner, S., et al., *Impact of sleep-disordered breathing on myocardial salvage and infarct size in patients with acute myocardial infarction*. *Eur Heart J*, 2014. **35**(3): p. 192-9.
6. Wang, H., et al., *Influence of obstructive sleep apnea on mortality in patients with heart failure*. *J Am Coll Cardiol*, 2007. **49**(15): p. 1625-31.
7. Dewan, N.A., F.J. Nieto, and V.K. Somers, *Intermittent hypoxemia and OSA: implications for comorbidities*. *Chest*, 2015. **147**(1): p. 266-74.
8. Chen, L., et al., *Left ventricular dysfunction and associated cellular injury in rats exposed to chronic intermittent hypoxia*. *J Appl Physiol* (1985), 2008. **104**(1): p. 218-23.
9. Chen, L., et al., *The Na⁺/Ca²⁺ exchanger-1 mediates left ventricular dysfunction in mice with chronic intermittent hypoxia*. *J Appl Physiol* (1985), 2010. **109**(6): p. 1675-85.
10. Belaidi, E., et al., *Endoplasmic reticulum stress as a novel inducer of hypoxia inducible factor-1 activity: its role in the susceptibility to myocardial ischemia-reperfusion induced by chronic intermittent hypoxia*. *Int J Cardiol*, 2016. **210**: p. 45-53.
11. Bourdier, G., et al., *High-intensity training reduces intermittent hypoxia-induced ER stress and myocardial infarct size*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2016. **310**(2): p. H279-89.
12. Lai, C.J., et al., *Enhanced sympathetic outflow and decreased baroreflex sensitivity are associated with intermittent hypoxia-induced systemic hypertension in conscious rats*. *J Appl Physiol* (1985), 2006. **100**(6): p. 1974-82.
13. Yuan, G., et al., *Induction of HIF-1 α expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca²⁺ signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR*. *J Cell Physiol*, 2008. **217**(3): p. 674-85.
14. Belaidi, E., et al., *Major role for hypoxia inducible factor-1 and the endothelin system in promoting myocardial infarction and hypertension in an animal model of obstructive sleep apnea*. *J Am Coll Cardiol*, 2009. **53**(15): p. 1309-17.
15. Belaidi, E., et al., *Targeting the ROS-HIF-1-endothelin axis as a therapeutic approach for the treatment of obstructive sleep apnea-related cardiovascular complications*. *Pharmacol Ther*, 2016. **168**: p. 1-11.
16. Zhou, S., et al., *Metallothionein prevents intermittent hypoxia-induced cardiac endoplasmic reticulum stress and cell death likely via activation of Akt signaling pathway in mice*. *Toxicol Lett*, 2014. **227**(2): p. 113-23.
17. Ding, W., et al., *Adiponectin protects rat myocardium against chronic intermittent hypoxia-induced injury via inhibition of endoplasmic reticulum stress*. *PLoS One*, 2014. **9**(4): p. e94545.
18. Groenendyk, J., L.B. Agellon, and M. Michalak, *Coping with endoplasmic reticulum stress in the cardiovascular system*. *Annu Rev Physiol*, 2013. **75**: p. 49-67.
19. Chou, Y.T., et al., *C/EBP homologous binding protein (CHOP) underlies neural injury in sleep apnea model*. *Sleep*, 2013. **36**(4): p. 481-92.
20. Hata, J.A., M.L. Williams, and W.J. Koch, *Genetic manipulation of myocardial beta-adrenergic receptor activation and desensitization*. *J Mol Cell Cardiol*, 2004. **37**(1): p. 11-21.
21. Zhuo, X.Z., et al., *Isoproterenol instigates cardiomyocyte apoptosis and heart failure via AMPK inactivation-mediated endoplasmic reticulum stress*. *Apoptosis*, 2013. **18**(7): p. 800-10.

22. Dalal, S., et al., *Beta-adrenergic receptor stimulation induces endoplasmic reticulum stress in adult cardiac myocytes: role in apoptosis*. Mol Cell Biochem, 2012. **364**(1-2): p. 59-70.
23. George, I., et al., *beta-adrenergic receptor blockade reduces endoplasmic reticulum stress and normalizes calcium handling in a coronary embolization model of heart failure in canines*. Cardiovasc Res, 2011. **91**(3): p. 447-55.
24. Litwin, S.E., et al., *Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat*. Circulation, 1994. **89**(1): p. 345-54.
25. Arnaud, C., et al., *The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **184**(6): p. 724-31.
26. Loennechen, J.P., et al., *Regional expression of endothelin-1, ANP, IGF-1, and LV wall stress in the infarcted rat heart*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(6): p. H2902-10.
27. Xie, F., et al., *miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs*. Plant Mol Biol, 2012.
28. Chen, Y., et al., *Left ventricular failure produces profound lung remodeling and pulmonary hypertension in mice: heart failure causes severe lung disease*. Hypertension, 2012. **59**(6): p. 1170-8.

Table 1

Genes	Primer pair used	Annealing temperature
Cyca (rat)	Forward : 5'-TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG-3' Reverse : 5'-CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC-3'	60°C
Rplp0 (rat, mouse)	Forward : 5'-CCCTGCACTCTCGCTTTCTGGA-3' Reverse : 5'-AGGGGCAGCAGCCGCAAATG-3'	58°C
HPRT1 (rat)	Forward : 5'-GGGGGACATAAAAGTTATTGGTGGGA-3' Reverse : 5'-GGTCCTTTTCACCAGCAAGCTTG-3'	60°C
Nppa (rat, mouse)	Forward : 5'-AGGCCATATTGGAGCAAATC-3' Reverse : 5'-CTCCTCCAGGTGGTCTAGCA-3'	60°C
Nppb (rat)	Forward : 5'-AACAACCTCAGCCCGTCAC-3' Reverse : 5'-AGGCCATATTGGAGCAAATC-3'	62°C
Acta-1 (rat, mouse)	Forward : 5'-GGCTCCCAGCACCATGAAGA-3' Reverse : 5'-CAGCACGATTGTCGATTGTCG-3'	63°C
MHC-1 β (rat)	Forward : 5'-TTGCTTACCCAACCCTAAGGATG-3' Reverse : 5'-TTGTGTTTCTGCCTGAAGGTGC-3'	60°C
TGF-1 β (rat, mouse, human)	Forward : 5'-GCTGCTGACCCCCACTGAT-3' Reverse : 5'-GCCACTGCCGGACAACCTC-3'	60°C
Collagene I (rat, mouse, human)	Forward : 5'-GCGAAGGCAACAGTCGATTC-3' Reverse : 5'-CCCAAGTTCGGGTGTGACTC-3'	60°C
Collagene III (rat, mouse, human)	Forward : 5'-CAGCTGGCCTTCTCAGACTT-3' Reverse : 5'-GCTGTTTTTGCAGTGGTATGTAATG-3'	60°C
β 1-AR (rat, mouse, human)	Forward : 5'-GCTGCGATTTTCGTCACCAAC-3' Reverse : 5'-GTACACGAAGGCCATGATG-3'	60°C
β 2-AR (rat, mouse)	Forward : 5'-ACGACATCACTCAGGAACGG-3' Reverse : 5'-TAGATCAGCACACGCCAAGG-3'	60°C
GRK2 (rat, mouse)	Forward : 5'-CCCTCTCACCATCTCTGAGCA-3' Reverse : 5'-CGGTTGGGAACAAGTAGAA-3'	58°C
Arrestine β 1 (rat, mouse)	Forward : 5'-CCTGTTTGTGGCTAACGTGC-3' Reverse : 5'-GTTTGGCGGGATCTCAAAGG-3'	60°C
<i>spliced</i> Xbp1 (rat)	Forward : 5'-GAGTCCGCAGCAGGTG-3' Reverse : 5'-GCGTCAGAATCCATGGGA-3'	58°C
CHOP (rat, mouse, human)	Forward : 5'-CTGGAAGCCTGGTATGAGGA-3' Reverse : 5'-CTCTGACTGGAATCTGGAGA-3'	58°C

Table 2

	BW (g)	AN/LV (%)	HW/BW (mg/g)	LVW/BW (mg/g)	LVIDd (mm)	LVIDs (mm)	LVPWd (mm)	LVPWs (mm)	LVFS (%)
1 week exposure									
Sham	359 ± 11	—	2.6 ± 0.0	2.1 ± 0.0	7.9 ± 0.1	5.2 ± 0.1	1.4 ± 0.0	2.1 ± 0.0	38.5 ± 1.0
MI-N	289 ± 6	28.3 ± 0.6	3.1 ± 0.1	2.5 ± 0.1	9.8 ± 0.3*	8.2 ± 0.3*	1.2 ± 0.0*	1.7 ± 0.0*	16.2 ± 1.1*
MI-IH	274 ± 10 *	28.2 ± 1.3	3.2 ± 0.2*	2.6 ± 0.1*	9.5 ± 0.2*	8.0 ± 0.2*	1.2 ± 0.0*	1.9 ± 0.0	15.8 ± 0.5*
4 weeks exposure									
Sham	407 ± 10	—	2.4 ± 0.0	1.9 ± 0.0	8.1 ± 0.2	5.4 ± 0.2	1.4 ± 0.0	2.1 ± 0.0	34.0 ± 0.9
MI-N	415 ± 8	29.1 ± 1.6	3.0 ± 0.1*	2.5 ± 0.1*	11.2 ± 0.2*	9.7 ± 0.2*	1.1 ± 0.1*	1.8 ± 0.0*	13.9 ± 0.4*
MI-IH	377 ± 13*	28.6 ± 1.4	3.0 ± 0.1*	2.3 ± 0.1*	10.3 ± 0.1*†	8.8 ± 0.2*†	1.2 ± 0.0*	2.0 ± 0.1†	14.7 ± 0.8*
12 weeks exposure									
Sham	583 ± 19	—	2.2 ± 0.0	1.7 ± 0.0	8.8 ± 0.1	5.3 ± 0.2	1.3 ± 0.0	2.1 ± 0.0	39.2 ± 1.1
MI-N	571 ± 23	22.5 ± 1.9	2.5 ± 0.0	2.0 ± 0.0	11.6 ± 0.2*	10.1 ± 0.2*	1.1 ± 0.0*	1.7 ± 0.0*	13.1 ± 0.5*
MI-IH	483 ± 22*	22.7 ± 0.9	3.0 ± 0.1*	2.2 ± 0.0*	11.4 ± 0.2*	10.1 ± 0.2*	1.0 ± 0.0*	1.5 ± 0.0*†	11.0 ± 0.7*†

Table 3

	ESP (mmHg)	EDP (mmHg)	ESV (μ l)	EDV (μ l)	SV (μ l)	CO (ml/min)	dP/dt _{max} (mmHg/s)	dP/dt _{min} (mmHg/s)	EDPVR
1 week exposure									
Sham	84.8 \pm 1.4	7.5 \pm 0.6	65 \pm 13	100 \pm 19	63 \pm 11	14.5 \pm 2.9	5014 \pm 225	-4472 \pm 75	0.07 \pm 0.0
MI-N	72.3 \pm 1.5*	9.1 \pm 0.3	171 \pm 27	231 \pm 42	89 \pm 21	22.4 \pm 5.6	3972 \pm 68	-2934 \pm 28*	0.06 \pm 0.0
MI-IH	82.7 \pm 1.4	10.8 \pm 0.7	196 \pm 19	244 \pm 25	79 \pm 9	18.9 \pm 4.1	4289 \pm 158	-3279 \pm 27	0.07 \pm 0.0
4 weeks exposure									
Sham	82.7 \pm 4.1	8.3 \pm 0.8	131 \pm 14	212 \pm 20	127 \pm 11	30.9 \pm 3.1	5339 \pm 325	-4269 \pm 280	0.04 \pm 0.0
MI-N	83.6 \pm 0.8	8.2 \pm 0.5	308 \pm 18*	364 \pm 25*	114 \pm 14	27.0 \pm 3.2	4510 \pm 209	-3452 \pm 132	0.03 \pm 0.0
MI-IH	82.3 \pm 1.9	8.9 \pm 0.9	231 \pm 34	271 \pm 36	82 \pm 9*	19.4 \pm 1.9*	4034 \pm 116*	-3294 \pm 126*	0.05 \pm 0.0
12 weeks exposure									
Sham	82.4 \pm 3.1	8.9 \pm 0.8	127 \pm 15	263 \pm 41	177 \pm 28	37.8 \pm 6.0	5285 \pm 270	-3883 \pm 199	0.04 \pm 0.0
MI-N	87.1 \pm 2.0	9.0 \pm 0.6	392 \pm 31*	461 \pm 31	132 \pm 9	27.9 \pm 2.6	4257 \pm 244*	-3274 \pm 177	0.02 \pm 0.0
MI-IH	84.6 \pm 2.8	5.5 \pm 1.0	470 \pm 36*	549 \pm 35*	118 \pm 5	24.7 \pm 1.4	4015 \pm 219*	-3201 \pm 117*	0.02 \pm 0.0

Figure 1

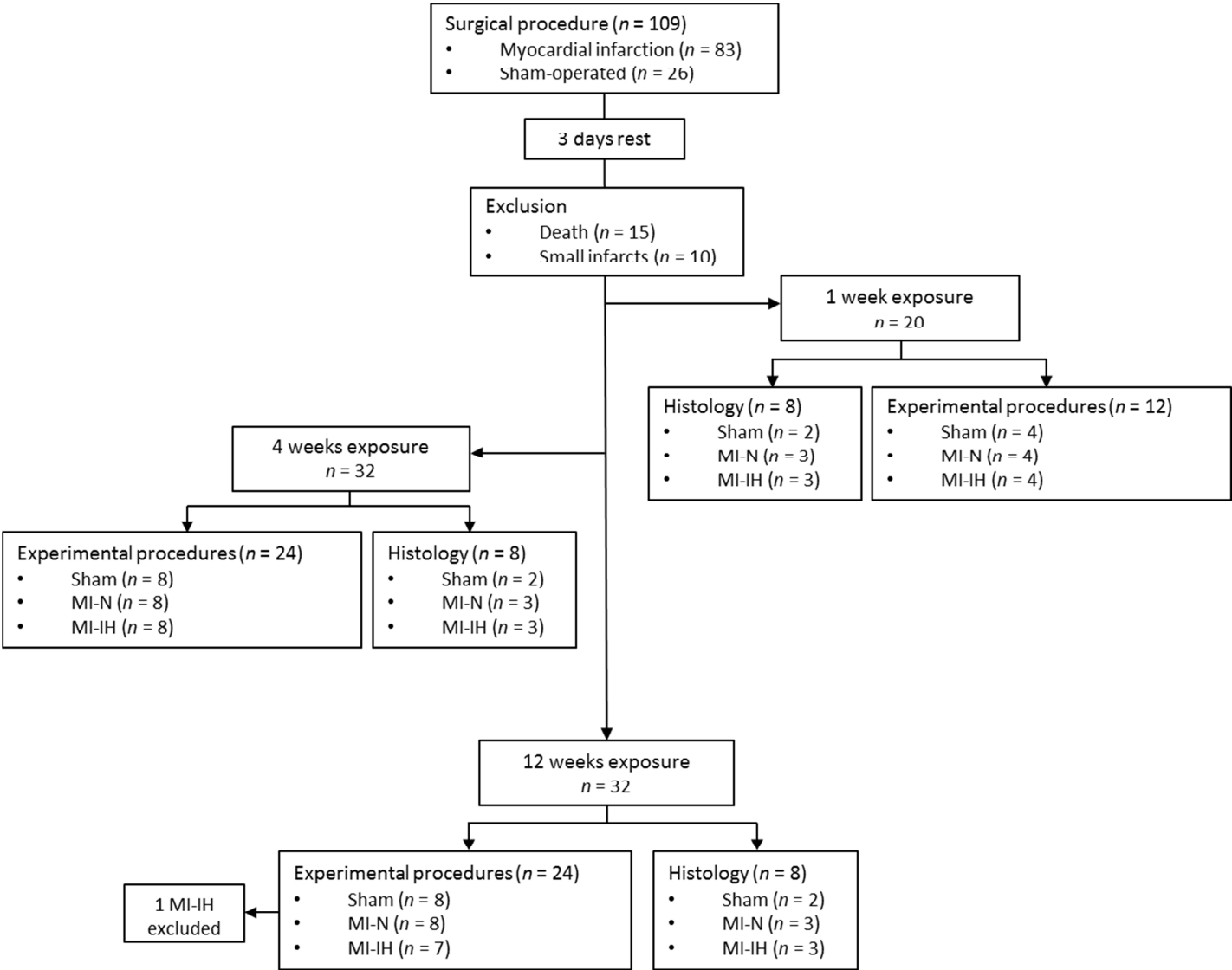


Figure 2

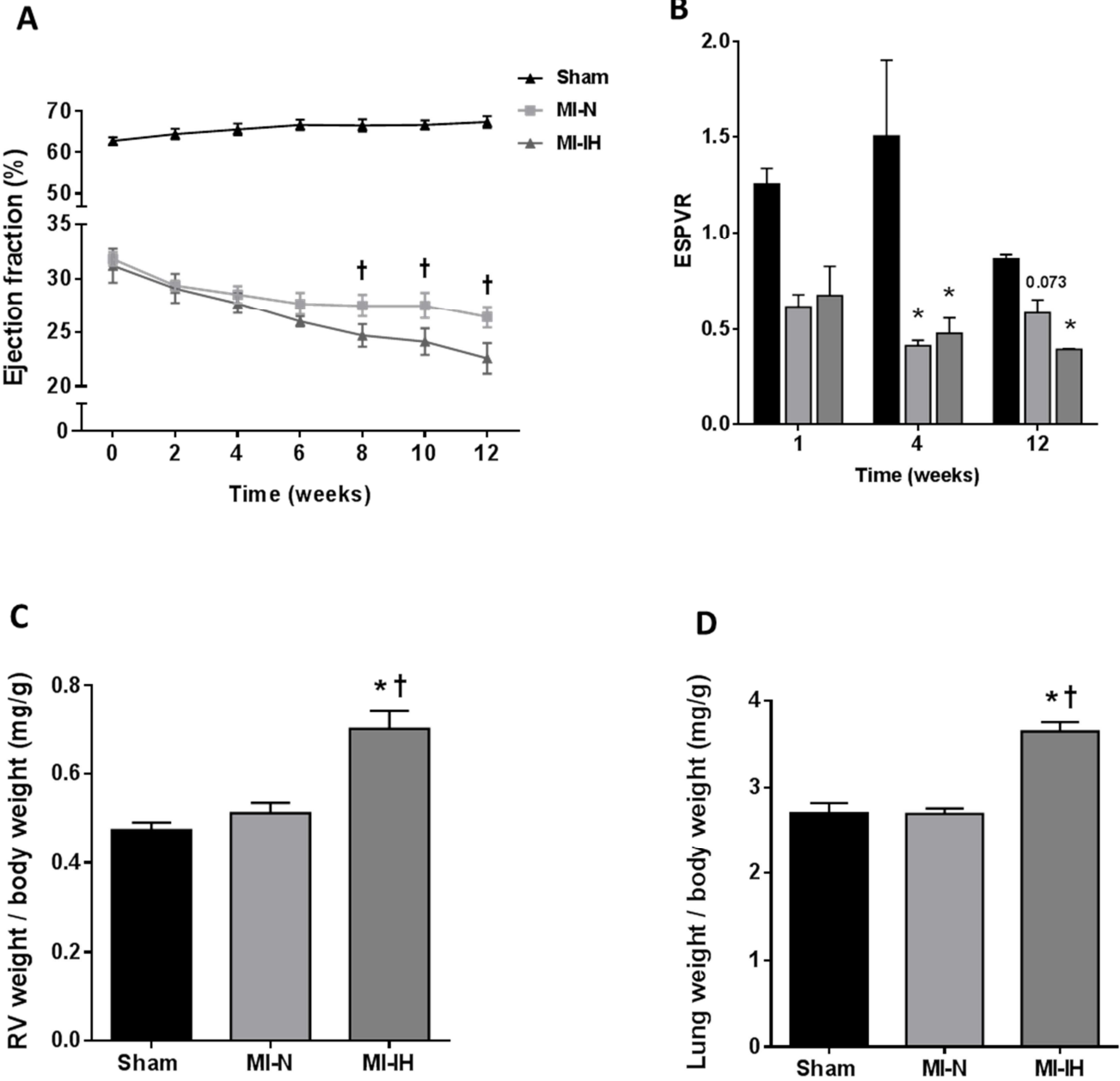


Figure 3

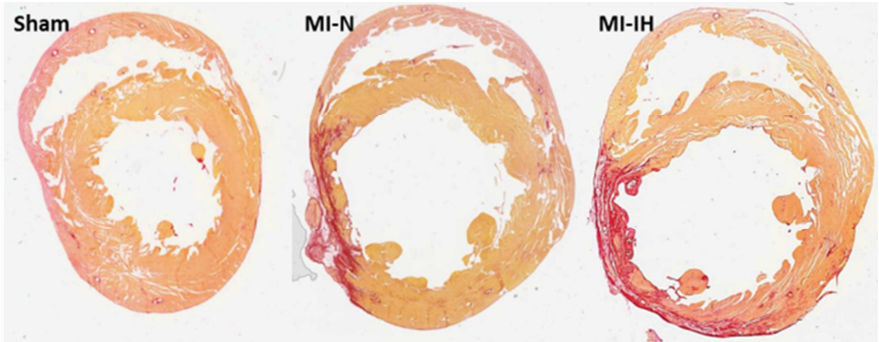
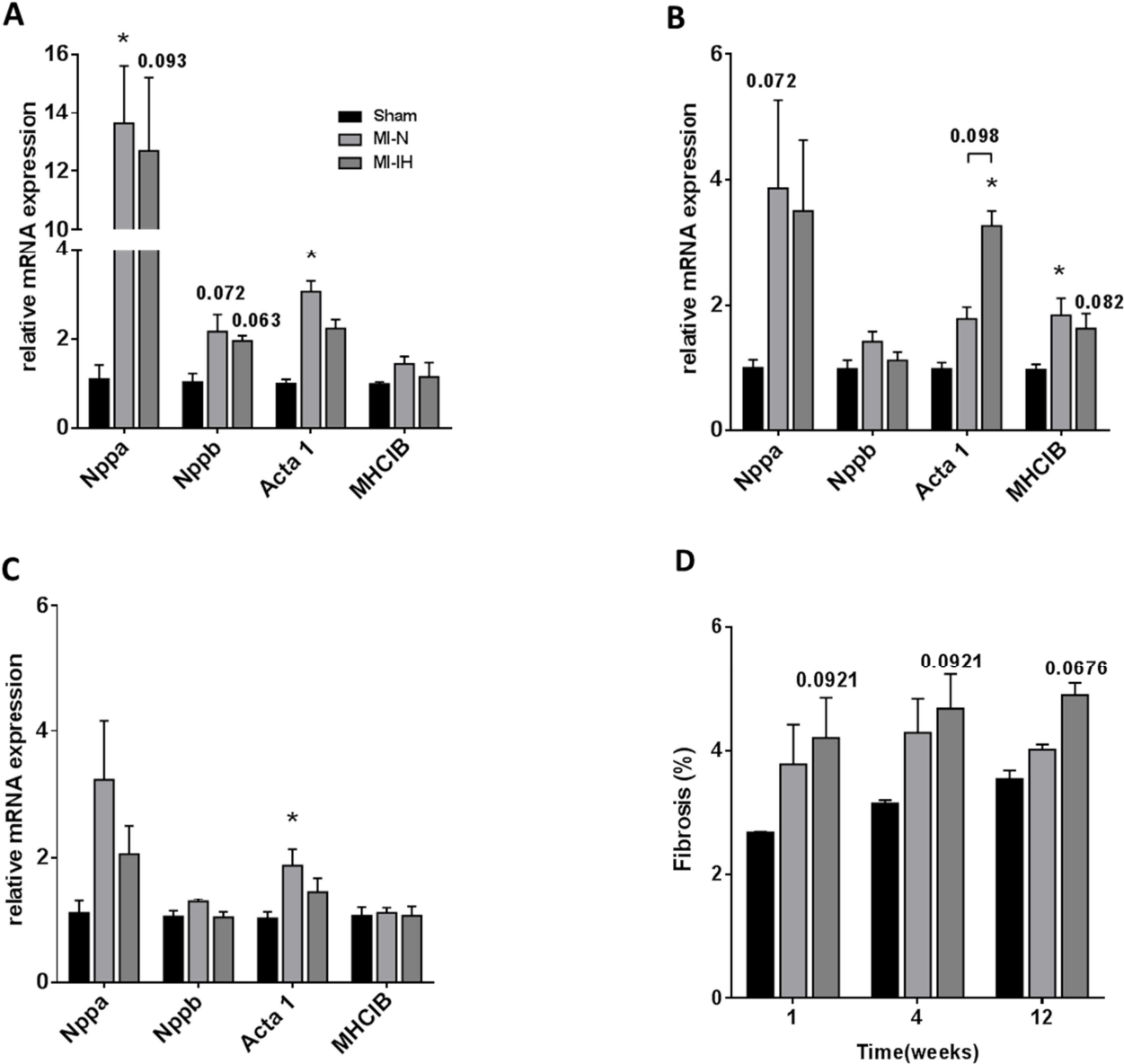


Figure 4

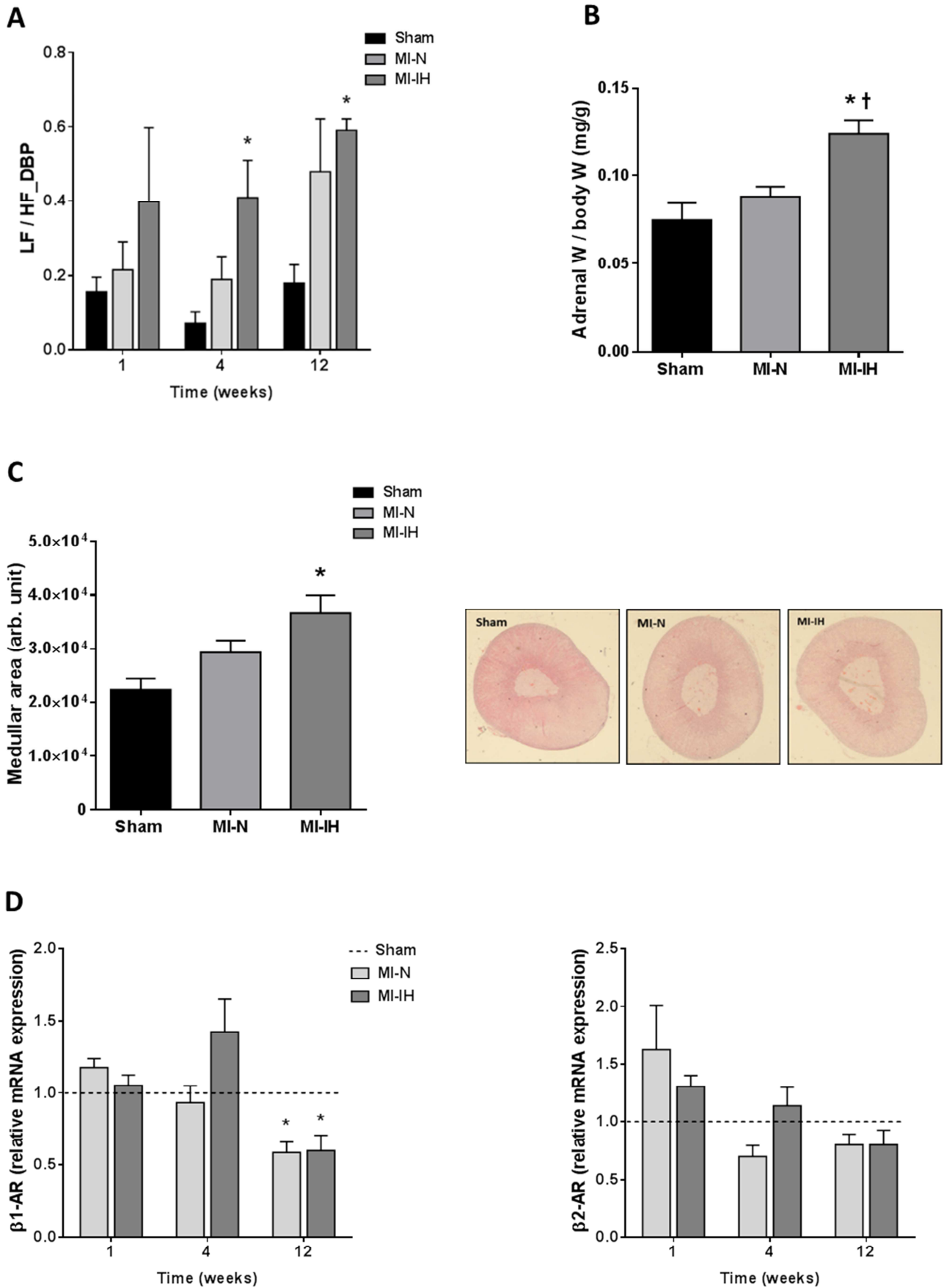


Figure 5

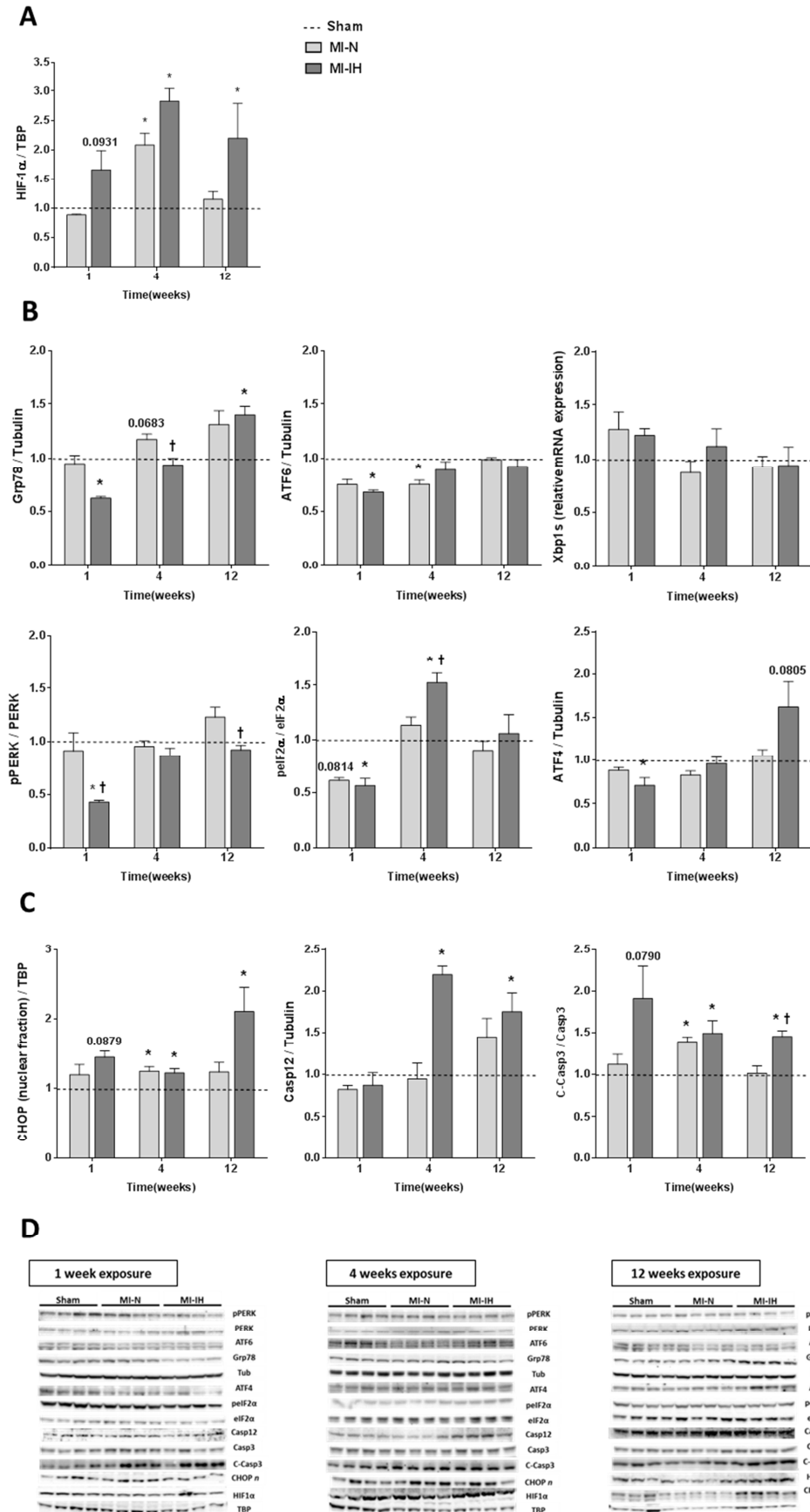


Figure legends

Table 1. Gene-specific oligonucleotide primer pairs used for quantitative real-time PCR with annealing temperatures.

Table 2. Effects of chronic IH exposure on morphological parameters *in vivo*. BW: body weight; AN/LV: area of necrosis/left ventricle; HW/BW: heart weight/body weight; LVW/BW: left ventricular weight/body weight; RVW/BW: right ventricular weight/body weight; LVID d: left ventricular internal diastolic diameter; LVID s: left ventricular internal systolic diameter; LVPW d: left ventricular posterior wall diastolic thickness; LVPW s: left ventricular posterior wall systolic thickness; LVFS: left ventricular fractional shortening. Values are mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. Sham; † $p < 0.05$ vs. MI-N

Table 3. Increased deterioration of cardiac function in rats exposed to chronic IH following myocardial infarction. MI: myocardial infarction; ESP: end-systolic pressure; EDP: end-diastolic pressure; ESV: end-systolic volume; EDV: end-diastolic volume; SV: stroke volume; CO: cardiac output; dP/dt_{max} : maximum first derivative of change in pressure rise with respect to time; dP/dt_{min} : maximum first derivative of change in pressure fall with respect to time; EDPVR: end-diastolic pressure-volume relationship. Values are mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. Sham.

Figure 1. Experimental design. The three experimental groups consisted of Sham operated (Sham), infarcted exposed to normoxia (MI-N) and infarcted exposed to intermittent hypoxia (MI-IH). Rats underwent (MI) or not (Sham) a ligation of the left coronary artery to induce myocardial infarction. Three days after coronary artery ligation, MI rats were exposed to 1 week, 4 weeks or 12 weeks N or IH. At the end of exposures, rats were anesthetized for experimental procedures (blood pressure and heart rate recording for power spectral analysis, pressure volume-loop) and tissues were harvested for histology and molecular biology.

Figure 2. Chronic IH aggravates morbid cardiac phenotype following MI. **A.** Echocardiographic measurement of ejection fraction (EF) over time. **B.** End-systolic pressure-volume relationship (ESPVR) after 1 week, 4 week-and 12-week exposure. **C.** RVW/BW: Right ventricle weight/body weight after 12 weeks **D.** LW/BW: lung weight/body weight after 12 weeks. Values are mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. Sham; † $p < 0.05$ vs. MI-N

Figure 3. Effect of chronic IH on cardiac remodeling

Natriuretic peptide type A (Nppa), natriuretic peptide type B (Nppb), actin alpha1 skeletal muscle (Acta1) and myosin heavy chain beta type 1 mRNA relative to household genes mRNA after **A.** 1 week

B. 4 weeks and **C.** 12 weeks of exposure. **D.** Interstitial fibrosis evaluated with Sirius red staining in the LV remote areas. Values are mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. Sham; † $p < 0.05$ vs. MI-N

Figure 4. Chronic IH exposure increased sympathetic activity post-MI **A.** Low frequency power-to-high-frequency power ratio of diastolic blood pressure (LF/HF_DBP) after 1-week, 4-week and 12-week exposure. **B.** Adrenal hypertrophy measured by adrenal weight to body weight (AW/BW) ratio, **C.** Medullar area in arbitrary units (arb. unit.). **D.** Quantitative RT-PCR analysis of β -adrenergic receptors 1 and 2 mRNA relative to household genes mRNA (β 1-AR and β 2-AR, respectively) in cardiac tissue after 1-week, 4-week and 12-week exposure. Values are mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. Sham; † $p < 0.05$ vs. MI-N.

Figure 5. Effect of chronic IH exposure on HIF-1 α expression, myocardial ER stress and apoptosis. **A.** HIF-1 α relative to tubulin. **B.** Glucose-regulated protein kinase (Grp)78 relative to tubulin, ATF6 relative to tubulin, spliced X box-binding protein 1 [XBP1(s)] mRNA relative to household genes mRNA, phosphorylated (p-) protein kinase-like ER kinase (PERK) relative to PERK, p-eukaryotic translation initiation factor (eIF)2 α relative to eIF2 α , activating transcription factor (ATF)4 relative to tubulin. **C.** Nuclear C/EBP homologous protein (CHOP) relative to TBP, Caspase 12 (Casp12) relative to tubulin and cleaved-caspase 3 (C-Casp3) relative to Caspase 3 (Casp3). **D.** Representative immunoblotting for the proteins. Values are mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. Sham; † $p < 0.05$ vs. MI-N.

1.4. Résultats complémentaires

- **Effet de l'hypoxie intermittente sur la désensibilisation β -adrénergique post-infarctus**

Les résultats de l'étude n°3 montrent que l'hypoxie intermittente entraîne une hyperactivation sympathique post-IM dès la première semaine d'exposition qui persiste durant toute la durée de l'exposition. Chez l'Homme et dans de nombreux modèles animaux, l'activation du SNS post-IM induit une production accrue de catécholamines [76, 91] qui est associée chez les patients IC à une diminution de la survie [305]. Cette production excessive est responsable d'une activation chronique du système β -adrénergique à l'origine d'une augmentation significative des concentrations de GRK2 cytosolique délétère chez les patients et les animaux IC [91]. Les modèles expérimentaux ont également montré que cette activation β -adrénergique est associée à une surexpression de GRK2 et de β -arrestine cytosoliques [76, 92, 306], et qu'une inhibition de GRK2 prévient la progression de l'IC et améliore la contractilité post-infarctus [307, 308]. D'après nos résultats, nous pensons que l'hyperactivation sympathique observée chez les animaux exposés à l'HI post-IM pourrait accélérer le phénomène de désensibilisation qui contribuerait de manière substantielle à l'aggravation de la fonction cardiaque observée.

Alors que le poids des surrénales est significativement augmenté par l'HI après 12S est associé à une augmentation de la taille des médullosurrénales (article n°3), la surface corticale et la surface totale des surrénales ne sont pas modifiés (figure 18A).

D'après la figure 18B et contrairement à la littérature, les concentrations de catécholamines plasmatiques ne sont pas augmentées post-IM. Enfin, alors que l'expression génique de GRK2 est significativement augmentée dans les surrénales de rats exposés 12 semaines, son expression protéique n'est pas modifiée, comme l'expression génique de β -arrestine (figure 18C).

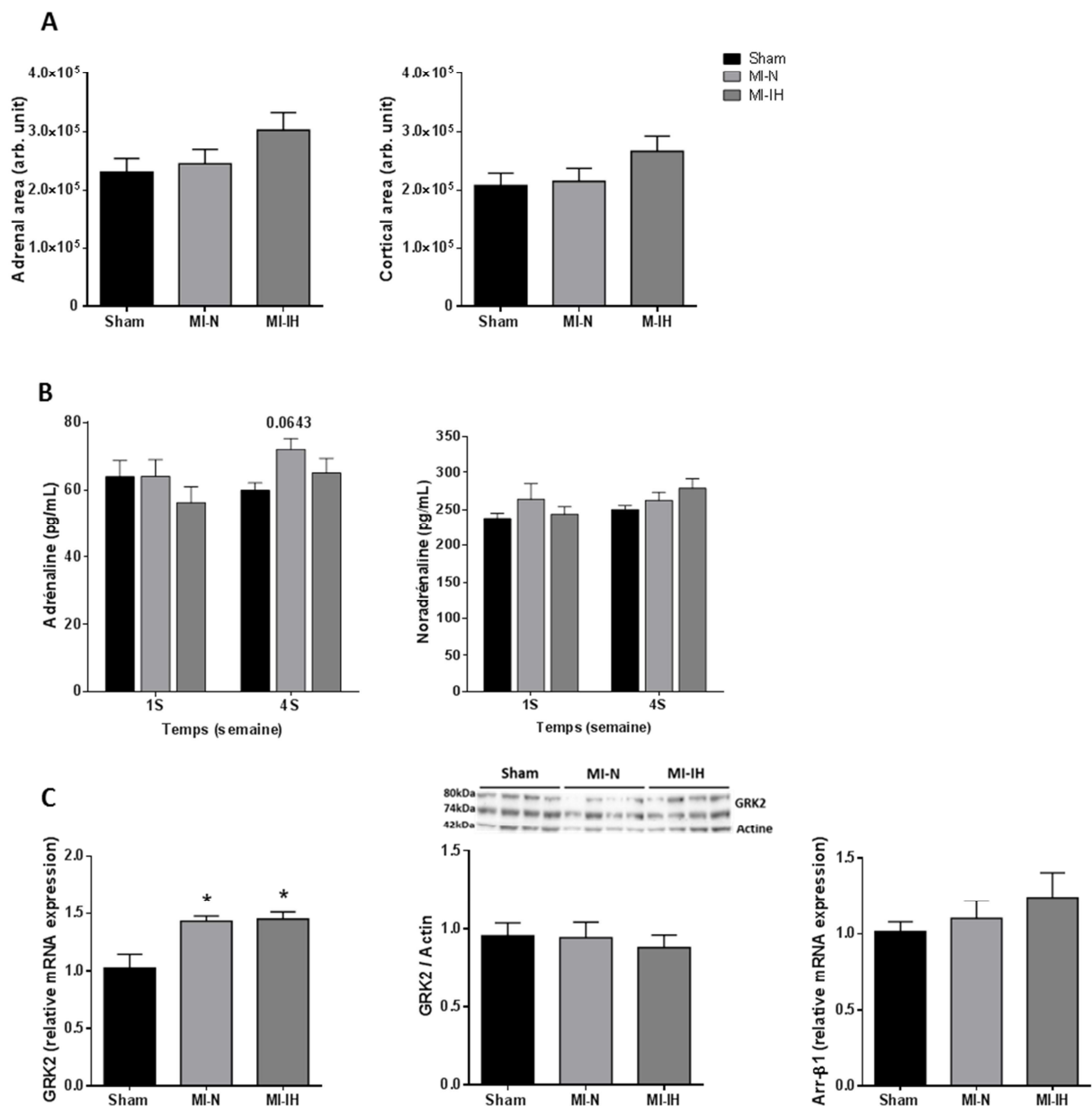


Figure 18. **A** : Surface des surrénales de rats exposés 12S par histologie. **B** : Concentrations plasmatiques de catécholamines (A+NA) des rats après 1S et 4S d'expositions. **C** : Expression de l'ARNm de GRK2 et β -arrestine par RT-qPCR par rapport à l'expression d'ARNm des gènes de ménages. Expression protéique de GRK2 par rapport à l'actine. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm erreur type à la moyenne. * $p < 0.05$ vs. Sham.

Dans le myocarde, les expressions géniques et protéiques de GRK2 et de β -arrestine varient peu après 1S, 4S et 12S d'exposition post-IM (figure 19). Nous observons néanmoins une augmentation

significative de l'expression de l'ARNm de GRK2 après 4S d'exposition à l'HI post-IM ($p < 0.05$ vs Sham, figure 19B) et une diminution significative de l'expression génique de β -arrestine à 12 S chez les animaux ligaturés (MI-N et MI-IH : $p < 0.05$ vs Sham, figure 19C).

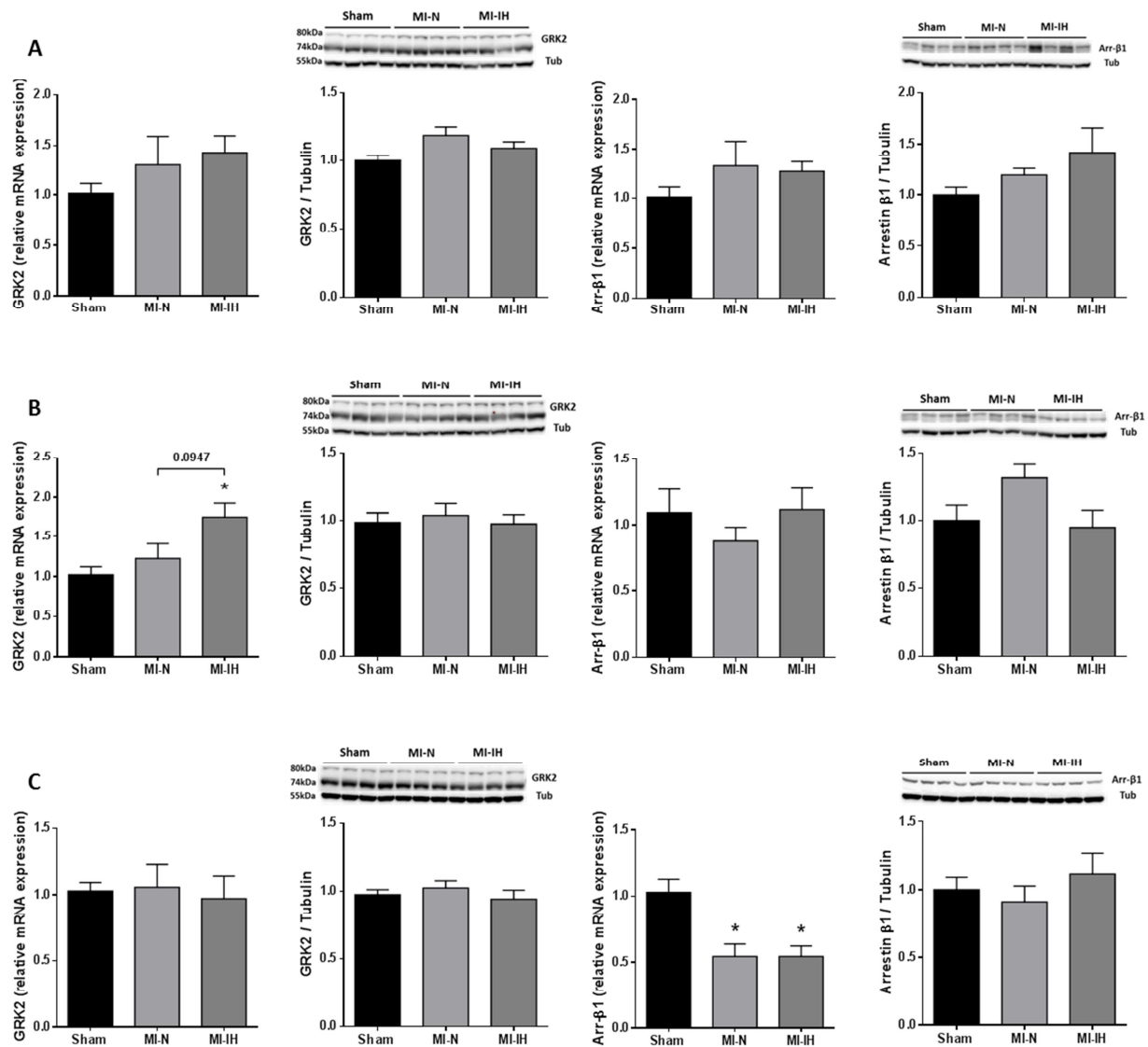


Figure 19. Expressions protéiques et géniques de GRK2 et β -arrestine dans le myocarde après **A** : 1 semaine ; **B** : 4 semaines et **C** : 12 semaines d'exposition. Expression de l'ARNm de GRK2 et β -arrestine par RT-qPCR par rapport à l'expression d'ARNm des gènes de ménages. Expression protéiques de GRK2 et β -arrestine par rapport à la tubuline Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm erreur type à la moyenne. * $p < 0.05$ vs. Sham.

Conclusion de l'article n°3

Nous avons pour la première fois étudié le rôle de l'HI dans l'évolution de la cardiomyopathie ischémique et avons montré que l'exposition chronique d'animaux à l'HI altère le remodelage ventriculaire et exacerbe les dommages myocardique et la dysfonction contractile post-IM. Ces altérations sont intimement liées à l'activation de trois mécanismes délétères post-IM dont les effets sont potentialisés par l'HI et persistent durant toute la durée de l'exposition, à savoir une hyperactivation sympathique, l'activation d'un stress du RE proapoptotique et l'augmentation de l'expression de HIF-1 α . Ainsi, le dépistage de ces voies de signalisation exacerbée par l'HI pourrait représenter un outil diagnostique et pronostique prometteur afin d'améliorer la prise en charge des patients SAOS à haut risque CV. Le traitement par PPC ayant des effets limités voire nuls sur l'amélioration des paramètres cardiaques chez les patients apnéiques sévères et souffrant d'une pathologie CV associée, il serait également intéressant d'étudier précisément la relation entre ces trois mécanismes physiopathologiques afin d'envisager de nouvelles thérapies complémentaires à la PPC permettant de diminuer la mortalité post-IM.

La discussion de l'ensemble des résultats de l'article n°3 a été intégrée à la discussion générale de la thèse.

Dans cette discussion générale, je me suis intéressé dans un premier temps au rôle de l'HI dans l'aggravation des pathologies ischémiques. J'ai effectué un bref rappel des résultats obtenus dans les trois articles présentés ici que j'ai confronté aux données de la littérature. Je me suis particulièrement attaché à la description des résultats obtenus dans l'article n°3. En effet, il n'existe pas de bibliographie sur les complications CVs de l'HI post-ischémie ; j'ai donc insisté sur la pertinence du modèle utilisé que j'ai développé au laboratoire durant cette thèse et sur le bien-fondé des différents paramètres analysés.

Dans un deuxième temps, je me suis intéressé aux mécanismes moléculaires et cellulaires activés par l'HI et qui sont impliqués dans l'initiation et à la progression de nombreuses pathologies CVs. Plus particulièrement, cette discussion m'a permis d'insister sur les trois principaux mécanismes étudiés durant la thèse, à savoir l'activité sympathique, le stress du RE et l'activation du facteur de transcription HIF-1 qui sont tous impliqués dans les altérations cardiaques induites par l'HI

Enfin, j'ai insisté sur le rôle joué par l'exposition chronique à l'HI dans l'activation et le maintien de ces mécanismes physiopathologiques qui semblent être des médiateurs majeurs des complications cardiaques associées au SAOS. L'exposition chronique à l'HI semble à l'origine d'une synergie forte entre activité sympathique, stress du RE et activité de HIF-1 qui renforce leurs conséquences délétères du SAOS sur la maladie ischémique cardiaque.

Troisième partie : Discussion

A travers ces travaux de thèse, nous avons pu mettre en évidence qu'une activation sympathique et un stress du RE proapoptotique sont initiés par l'exposition d'animaux à l'HI et sont associés à l'activation du facteur de transcription HIF-1. Ces mécanismes contribuent à augmenter la vulnérabilité du cœur à l'infarctus et semblent accélérer la progression de la pathologie vers l'IC. Ces résultats suggèrent donc l'importance de ces voies de signalisation induites par l'HI et responsables des complications cardiaques impliqués dans l'augmentation de la morbi-mortalité CV chez les patients SAOS.

1. SAOS, hypoxie intermittente et complications cardiovasculaires

Comme nous l'avons vu en introduction de ce manuscrit, il existe un lien de causalité entre le SAOS et l'incidence de nombreuses pathologies CVs, telles que l'hypertension artérielle, la maladie coronarienne et l'IC. L'HI chronique représente le facteur le plus délétère du SAOS en termes de répercussions CVs.

Chez le patient apnéique, l'augmentation de la pression artérielle est associée à la sévérité du SAOS (IAH), suggérant un rôle majeur de l'HI nocturne [309]. Ceci a largement été confirmé grâce à l'utilisation de nombreux modèles expérimentaux d'HI, à la fois chez l'Homme et chez l'animal [125], ce que nous avons pu également observer dans notre modèle de rats exposés à 21 jours d'HI (article n°2).

Chez le patient, un SAOS modéré à sévère est associé à un risque accru de maladies coronariennes [5]. De plus, les patients apnéiques présentent un moindre sauvetage myocardique suite à une ischémie qui se traduit par une augmentation de la taille d'infarctus [146], également présente chez les animaux exposés à l'HI [200]. Dans un premier temps, nous avons confirmé cette augmentation de la taille d'infarctus à la fois in-vivo (article n°1 [310]) et ex-vivo (article n°2 [311]) chez la souris et le rat, respectivement.

Finalement, les patients souffrants de SAOS présentent des signes précoces de dysfonction et de remodelage ventriculaire gauche [312], aggravés suite à un infarctus [5], et de nombreuses études montrent également une plus grande mortalité chez les patients SAOS insuffisants cardiaques [120]. Néanmoins, à ce jour, aucune étude ne s'est directement intéressée au rôle de l'HI sur le développement de la cardiomyopathie ischémique, ce que nous avons choisi d'étudier dans l'article n°3.

Nous avons montré que l'HI aggrave graduellement la dysfonction contractile post-infarctus. En effet, alors qu'1 semaine d'HI ne semble pas suffisante pour induire des altérations cardiaques supérieures à l'IM seule, une dysfonction contractile plus importante apparaît après 4 semaines dans le groupe exposé à l'HI. Finalement, 12 semaines post-IM, les animaux exposés à l'HI présentent une fonction contractile significativement plus altérée que les animaux exposés à la normoxie, et celle-ci est associée à une augmentation du poids des poumons et une hypertrophie ventriculaire droite (VD), deux marqueurs d'une dysfonction cardiaque sévère [313]. Comme énoncé en introduction, la finalité de la fonction cardiaque est d'assurer un débit cardiaque suffisant afin de garantir les apports métaboliques nécessaires à l'ensemble des organes. Lorsqu'il existe une diminution de ce débit cardiaque, un remodelage ventriculaire gauche adaptatif se met en place [314]. Comme attendu, les animaux ligaturés et exposés à la condition normoxique présentent une hypertrophie et une dilatation importante du VG dès la quatrième semaine avec une augmentation significative des

volumes et dimensions ventriculaires, qui s'accroissent après 12 semaines. De manière intéressante, la cinétique du remodelage est différente chez les animaux exposés à l'HI qui présentent une moindre modification des dimensions et des volumes ventriculaires comparés aux rats MI-N à 4 semaines. En revanche, après 12 semaines, si la dilatation ventriculaire est identique entre les deux groupes de rats ligaturés, les animaux HI présentent une hypertrophie plus marquée.

L'HI semble avoir un effet délétère sur le remodelage ventriculaire qui pourrait expliquer la dysfonction systolique observée. En effet, alors que la fonction cardiaque est diminuée par l'infarctus, le cœur hypoxique ne semble pas s'adapter à la diminution du débit cardiaque ce qui accentue la perte de fonction observée après 4 semaines d'exposition. Le remodelage est finalement différé, il intervient lorsque la dysfonction contractile est installée ce qui pourrait expliquer pourquoi la dysfonction cardiaque est accentuée lors d'une exposition chronique à l'HI (12 semaines). En effet, alors que les animaux ligaturés exposés à la normoxie (MI-N) semblent être dans une phase compensatoire, avec un remodelage ventriculaire et une fonction cardiaque préservée, les animaux hypoxiques présentent une dysfonction systolique sévère.

Nous avons évalué différents mécanismes impliqués dans le remodelage post-IM et qui pourrait expliquer la cinétique différente dans le groupe HI. L'étude de l'expression des gènes fœtaux ne montre pas d'effet de l'hypoxie, mais l'analyse histologique montre une fibrose plus importante à l'HI dès la première semaine et qui s'accroît progressivement. La fibrose est un des éléments clé du pronostic des patients insuffisants cardiaques en favorisant la rigidité ventriculaire et l'hétérogénéité myocardique conduisant au risque de mort subite et d'insuffisance cardiaque [315], et pourrait expliquer en partie les résultats observés.

Il existe peu d'études sur les effets de l'HI dans le développement de l'IC. En 2016, Li et al. ont exposé des animaux à 4 semaines d'HI sur un modèle d'IC préalablement induit par 12 semaines de constriction aortique abdominale (CAA) et montrent une diminution des fractions d'éjection et de raccourcissement par échocardiographie post-HI [169]. Ils utilisent ici un modèle d'IC largement reconnu qui induit une surcharge de pression, à l'origine d'une hypertrophie cardiaque et pulmonaire, d'un remodelage ventriculaire et de dysfonctions systoliques et diastoliques sévères [313, 314]. Le modèle d'HI est légèrement différent de celui que nous utilisons au laboratoire avec des cycles de 2 min (désaturation 30s (FiO₂ 5%) et réoxygénation 90s (FiO₂ 21%)), contre des cycles de 1 min au laboratoire (30s-30s). Les résultats indiquent que l'HI exacerbe le développement la dysfonction systolique lors de l'IC, mais ne nous renseignent pas sur son rôle dans la progression de la cardiomyopathie.

Une seconde étude s'est intéressée au rôle de l'HI dans un autre modèle expérimental d'IC, et montre plutôt une amélioration de la fonction cardiaque et une diminution du remodelage ventriculaire après 4 semaines d'HI sans modifications du poids des poumons [170]. Le modèle utilisé ici est la souris transgénique âgée de 6 semaines surexprimant le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) qui est impliqué dans l'inflammation et la fibrose ventriculaire, et qui est surexprimé dans de nombreux modèles expérimentaux et chez les patients IC [314]. Néanmoins, ce modèle semble moins sévère que les modèles d'IC classiquement utilisés (ligature coronaire, CAA) car les altérations de structures et de fonctions observées chez les souris âgées de 6 semaines sont modestes [316], et l'inhibition du TNF- α a montré des effets modérés voire nuls à la fois chez l'animal et l'homme, minimisant son rôle dans la progression de la pathologie [314]. Les résultats contradictoires observés lors de l'exposition à l'HI pourraient donc s'expliquer par des stades différents de développement de la cardiomyopathie. Alors que les animaux exposés peuvent être considérés comme IC dans la première étude, les souris de 6 semaines surexprimant TNF- α semblent plutôt être à un stade compensatoire de la pathologie comme nos animaux ligaturés et exposés à la normoxie. La définition de l'IC est complexe, puisque d'après la Task Force Européenne sur l'IC, les patients sont considérés « insuffisants cardiaques » lorsqu'ils présentent à la fois des symptômes d'IC (fatigue, essoufflement), des signes d'œdème ou de maladies pulmonaires, et des signes d'altérations structurelles ou fonctionnelles cardiaques [317]. Expérimentalement, l'évolution de la cardiomyopathie jusqu'au stade « IC » devrait donc nécessairement associer plusieurs de ces caractéristiques telles qu'un remodelage ventriculaire gauche, une dysfonction cardiaque sévère et une hypertrophie (et une fibrose) pulmonaire [313]. En effet, il a été démontré que la présence d'un remodelage ventriculaire et d'une dysfonction cardiaque seuls ne sont pas prédictifs d'une IC s'ils ne sont pas associés à une hypertrophie pulmonaire [306, 313]. Les symptômes d'insuffisance cardiaque étant difficiles à observer chez les animaux, l'hypertrophie pulmonaire associée à un remodelage et à une dysfonction cardiaque sévère semble donc être un indicateur plus fiable de l'IC que la simple mesure des dimensions et/ou fonctions ventriculaires.

D'après nos résultats sur la dysfonction contractile et le remodelage ventriculaire, et en regard des variables mesurées (hypertrophie du VD et des poumons) nous pouvons donc confirmer dans le modèle de ligature coronaire que j'ai développé au laboratoire lors de ma thèse, que l'HI aggrave de manière significative la cardiomyopathie post-infarctus.

Ainsi, d'après les résultats obtenus dans chacun des 3 articles, l'hypoxie intermittente aggrave la maladie ischémique. Elle est associée chez les patients SAOS à l'augmentation de la taille d'infarctus et semble être un acteur majeur des dysfonctions cardiaques post-IM. Associée à une prévalence largement sous-diagnostiquée, le SAOS semble donc être un acteur important du mauvais pronostic

chez les patients post-IM, ce qui souligne la nécessité d'un dépistage et d'une prise en charge précoces du SAOS pour diminuer la morbi-mortalité associée. Néanmoins, l'essai randomisé SAVE récemment mené chez plus de 2500 patients, a montré un effet bénéfique de la PPC sur les troubles cognitifs (anxiété, somnolence diurne) et la qualité de vie mais par sur la survenue d'évènements CVs chez les patients souffrant d'un SAOS modéré à sévère et d'une maladie cardiovasculaire associée [117]. Cela souligne également la nécessité de comprendre les mécanismes physiopathologies induit par l'HI afin de proposer des traitements complémentaires à la PPC efficaces au niveau CV.

2. Mécanismes moléculaires et cellulaires

Parmi les mécanismes impliqués dans les complications cardiovasculaires du SAOS et de l'HI, nous nous sommes intéressés à l'activation sympathique, à l'activation du facteur de transcription HIF-1 et au stress du RE. Alors que les deux premiers mécanismes sont classiquement décrits dans la littérature sur les conséquences délétères du SAOS et de l'HI [200], le stress du RE représente un mécanisme physiopathologique prometteur dans l'étude des complications CVs des patients apnéiques car il est impliqué dans plusieurs pathologies associées au SAOS, telle que la susceptibilité à l'ischémie-reperfusion et l'insuffisance cardiaque [218].

2.1. Activation sympathique

L'activation sympathique est largement associée au SAOS et aux différents modèles d'HI [125]. Nous avons confirmé son activation après l'HI avec une augmentation des concentrations plasmatiques de catécholamines (article n°2) et post-IM chez des rats exposés à l'HI avec une augmentation du ratio LF/HF, déterminée par analyse spectrale des pressions artérielles, et une hypertrophie des médullosurrénales (article n°3).

Aucune donnée concernant le rôle du système nerveux sympathique (SNS) dans l'aggravation de la taille d'infarctus associée au SAOS ou à l'HI chronique n'avaient à ce jour été publiée. Dans l'étude n°2, nous souhaitons donc utiliser une stratégie thérapeutique permettant d'inhiber à la fois l'activation sympathique et les complications CVs associées à l'HI. Les bénéfices de l'exercice sur la santé cardiovasculaires sont largement reconnus pour diminuer la pression artérielle et l'activité sympathique [318] mais aussi pour diminuer la sensibilité du cœur à l'infarctus [268]. Nous avons donc développé un modèle d'exercice appliqué pendant l'exposition à l'HI et avons montré qu'il était capable de prévenir l'augmentation des catécholamines plasmatiques ainsi que l'augmentation de la taille d'infarctus. Ainsi, l'activation sympathique induite par l'HI pourrait participer à l'augmentation de la susceptibilité du cœur hypoxique à l'infarctus.

Post-IM, l'HI est également responsable d'une activation sympathique dès la première semaine, qui augmente durant les 12 semaines d'exposition et qui reste supérieure à l'activité sympathique des animaux exposés à la normoxie. L'une des premières réponses à l'infarctus du myocarde est l'activation du SNS, résultant d'une production de catécholamines augmentée [91], qui sont associées chez les patients IC à une diminution de la survie [305] et à une activation chronique du système β -adrénergique délétère lors de l'IC [91]. Les modèles animaux ont largement confirmé l'activation du SNS post-IM avec une augmentation des concentrations des catécholamines circulantes qui sont associés à une désensibilisation β -adrénergique par l'activation de GRK2 et de β -

arrestine [76], et qui contribuent à la dysfonction contractile post-infarctus [306]. Ainsi, nous pensons que l'HI, via une hyperactivation du SNS pourrait précipiter la dysfonction contractile par une accélération de la désensibilisation myocardique.

Cependant, alors que nous avons montré une hyperactivation sympathique par l'HI (analyse spectrale et hypertrophie des surrénales), nous n'avons pas observé d'augmentation des taux de catécholamines circulantes chez les animaux ligaturés (figure 18B). De plus, alors que l'ARNm de GRK2 est significativement augmentée dans les surrénales de rats exposés 12 semaines, son expression protéique n'est pas modifiée, tout comme l'expression de la β -arrestine (figure 18C). Dans le myocarde, les expressions géniques et protéiques de GRK2 et de β -arrestine varient également peu (figure 19). Nos résultats ne permettent donc pas, à ce stade, de conclure de manière définitive sur une désensibilisation β -adrénergique plus importante dans le groupe HI. Néanmoins, tous ces résultats peuvent être discutés. Tout d'abord, il est important de préciser que les analyses biomoléculaires sur l'activation sympathique ont été réalisées sur des tissus d'animaux anesthésiés par injection d'un cocktail kétamine/xylazine et après cathétérisme intra-ventriculaire. Ainsi, les prélèvements ont été effectués après un période d'anesthésie relativement longue. L'utilisation d'un modèle de cœur isolé-perfusé de rats a révélé que l'administration de kétamine réduit significativement les concentrations cardiaques de NA et leurs absorptions [319]. Ces données suggèrent que l'absence d'augmentation des taux de catécholamines circulantes dans nos travaux pourrait être due à l'anesthésie. De plus, l'effet de l'anesthésie sur les catécholamines a un impact direct sur le processus de désensibilisation β -adrénergique. Les concentrations catécholaminergiques n'étant plus en excès, l'expression des protéines impliquées dans la désensibilisation est régulée. Ainsi, GRK2 est dégradée par le protéasome selon un processus rapide [320]. In-vitro, l'utilisation de cellules épithéliales HEK-293 transfectées pour GRK2 a montré une dégradation progressive de cette kinase et a ainsi permis de déterminer sa demi-vie, estimée à seulement 60 minutes et réduite encore de moitié lors d'une stimulation β -adrénergique soutenue [321]. De manière intéressante, ces expériences ont également révélé la présence d'un produit de dégradation de GRK2 à 74kDa lors des analyses biomoléculaires par Western-Blot qui n'est plus présent lors de l'inhibition du protéasome par la lactacystine, un inhibiteur hautement spécifique. Ce produit de dégradation est clairement présent sur l'ensemble des western-blot réalisés sur GRK2 dans nos travaux, à la fois au niveau surrénalien et cardiaque (figures 18C et 19). L'expression de β -arrestine étant étroitement corrélée à celle de GRK2, la dégradation de GRK2 pourrait expliquer l'absence de modification de son expression.

Au vu de nos résultats sur l'activation sympathique par l'HI post-IM et de ces considérations méthodologiques, l'accélération de la désensibilisation par l'HI n'est pas à exclure et reste à explorer.

Ainsi, il serait également intéressant d'étudier d'autres médiateurs de la désensibilisation post-IM tels que l'AMPc et la PKA, qui participent aux effets chronotropes et lusitropes positifs lors d'une stimulation β -adrénergique et dont les activités sont altérés par la désensibilisation.

2.2. Activation de HIF-1

Comme pour l'activation sympathique, nos travaux confirment l'activation de HIF-1 par l'HI, à la fois dans un modèle d'exposition à 14 jours d'HI (article n°1) et post-infarctus (article n°3).

Le facteur de transcription HIF-1 est connu pour ces effets protecteurs lorsqu'il est activé par de brefs épisodes ischémiques ou hypoxiques comme dans les phénomènes de pré- ou post-conditionnements [322]. Il est à l'origine de l'activation de mécanismes compensatoires (angiogénèse, activation de protéines antioxydantes) qui contribuent dans les modèles animaux à la diminution de la mortalité des cardiomyocytes lors de l'I/R [322].

En revanche, il semble que l'activation chronique de HIF-1 exerce des effets cardiaques délétères. En effet, sa stabilisation contribue au développement de la cardiomyopathie post-IM et est responsable de dysfonctions contractiles dans différents modèles expérimentaux [323, 324].

Comme énoncé en introduction, dans notre modèle, nous avons montré au laboratoire que l'HI chronique induit l'activation de HIF-1 à l'origine des conséquences délétères. En effet, l'exposition d'animaux à l'HI est responsable d'une activation soutenue de HIF-1 dans le cœur [152, 210], les vaisseaux [211], le cerveau [212] ou le foie [213]. Il a été démontré que cette activation soutenue et persistante de HIF-1 était impliquée dans les conséquences cardiovasculaires délétères de l'HI avec une augmentation de l'activité de HIF-1 associée à une susceptibilité accrue du myocarde à l'I/R [152]. Pour la première fois, nous mettons en évidence dans l'article n°1 par l'utilisation de souris HIF-1 $\alpha^{+/-}$ que HIF-1 est directement responsable de l'augmentation de la taille d'infarctus induite par l'HI, car les souris HIF-1 $\alpha^{+/-}$ soumises à l'hypoxie sont protégées des altérations cardiaques.

Dans l'article n°3, nous montrons post-IM que l'expression de HIF-1 α est augmentée chez les animaux exposés à l'HI dès la première semaine, s'amplifie et persiste durant les 12 semaines d'exposition. De façon intéressante, cette cinétique est similaire à celle de l'activation sympathique précédemment décrite et accompagne donc la dysfonction systolique observée. Récemment, un dosage sérique réalisé chez des patients souffrants d'une IC symptomatique a révélé une augmentation significative des concentrations sanguines de HIF-1 α , qui est corrélée à une diminution de la fraction d'éjection et associée à une diminution de la survie sans hospitalisation [325]. Ainsi, HIF-1 α semble être un

marqueur de la dysfonction contractile sévère chez les patients IC. Ces observations confirment les résultats que nous obtenons et montrent un lien entre dysfonction contractile et surexpression de HIF-1 α dans le cadre d'une pathologie chronique.

Finalement, des données non publiées du laboratoire ont montré une augmentation de l'activité de HIF-1 chez les patients avec pathologie coronarienne lorsqu'ils souffrent d'un SAOS sévère comparé à des patients non SAOS. Ainsi, l'activité de HIF-1 pourrait représenter un marqueur diagnostique de la sévérité du SAOS chez les patients à haut risque CV. De plus, le dosage sanguin ou tissulaire de HIF-1 chez les patients IC pourrait également être un biomarqueur diagnostique ou pronostique prometteur. Il serait envisageable de stratifier la sévérité de la pathologie selon les concentrations de HIF-1 α circulants.

2.3. Stress du réticulum endoplasmique

Finalement, nous avons étudié le stress du RE dans le contexte de la maladie ischémique et mis en évidence son implication dans l'aggravation des lésions myocardiques induites par l'HI.

Tout comme le facteur de transcription HIF-1, le stress du RE semble avoir un rôle ambivalent qui semble dépendante de l'activation distincte des différentes voies UPR. Ainsi, sous certains aspects, le stress du RE est adaptatif. La surexpression de ATF6 dans le cœur protège des dommages ischémiques et de l'hypertrophie dans des modèles d'IC [326], alors que la surexpression d'eIF2 α dans un modèle d'IC post-IM par le salubrinal, un inhibiteur sélectif de la déphosphorylation de eIF2 α , réduit l'apoptose et améliore la fonction cardiaque [327].

Néanmoins, l'activation prolongée du stress du RE semble avoir des effets cardiaques délétères. Ainsi, l'HI chronique semble entraîner un stress du RE délétère à l'origine d'une augmentation de l'apoptose [251] et d'une perte de fonction cardiaque [250].

Nous avons montré pour la première fois que le stress du RE induit par l'HI contribue à la réponse accrue à l'ischémie-reperfusion. En effet, l'inhibition du stress du RE induit par l'HI chronique par deux stratégies différentes, l'administration de TUDCA, un inhibiteur du stress du RE (article n°1) et l'exercice (article n°2) pendant la durée de l'exposition, préviennent l'augmentation de la taille d'infarctus induite par l'HI. Ces résultats sont concordants avec la littérature. En effet, alors que le stress du RE est impliqué dans plusieurs pathologies associées au SAOS comme la susceptibilité à l'ischémie-reperfusion [218], de récentes études ont montré que la réduction de ce stress induit par l'HI par différentes approches thérapeutiques a des effets bénéfiques au niveau cardiaque. Par

exemple, la surexpression de métallothionéines [251] ou l'administration d'adiponectine [250] réduisent le stress du RE HI-dépendant et protègent les cardiomyocytes de l'apoptose et d'une dysfonction cardiaque.

Dans l'étude n°3, nous avons montré que le stress du RE est activé 4 semaines post-IM chez les animaux N avec une augmentation des expressions de Grp78, CHOP et C-Casp3. Cependant, 12 semaines post-IM, alors que l'expression de Grp78 reste élevée, l'expression des médiateurs de l'apoptose se normalise. Dans le groupe exposé à l'HI, la cinétique d'activation du stress du RE est différente. Après 1 semaine, le stress du RE est réprimé avec une diminution significative de l'expression de nombreuses protéines (Grp78, pPERK, pelf2 α et ATF4) alors que l'expression des protéines de l'apoptose CHOP et C-Casp3 est amplifiée. Après 4 semaines d'exposition, nous observons l'activation d'un stress du RE proapoptotique avec une augmentation de l'expression de l'ensemble des protéines de l'UPR et de CHOP, Casp12 et C-Casp3 qui persistent après 12 semaines. L'activation du stress du RE proapoptotique par l'HI est progressive et la cinétique est également similaire à la dysfonction contractile observée précédemment, suggérant un rôle du stress du RE dans les complications cardiaques post-IM.

Le stress du RE est activé par l'ischémie mais son rôle dans le développement de l'IC post-IM reste mal connu. Chez la souris, les expressions de GRP78 et CHOP sont augmentées par l'ischémie et persiste 4 semaines post-IM [328]. L'inhibition de ce stress par un traitement au 4-phenylbutyric acid (4-PBA), une protéine chaperonne chimique, prévient la surexpression de CHOP et restaure la fonction cardiaque. Un autre modèle d'IC montre également une activation des médiateurs du stress du RE, associée à une augmentation de l'apoptose et à une dysfonction contractile [329]. Chez le rat, l'utilisation d'un activateur de la phosphorylation d'eIF2 α réduit l'apoptose via une diminution d'expression de la caspase 12. Cependant, ni l'IC, ni le traitement ne modifient l'expression de CHOP [327]. Ces résultats sont associés à une amélioration de la fonction cardiaque comparés aux animaux non traités ce qui confirme également un lien entre activation du stress du RE et dysfonction cardiaque. En 2015, Luo et al. ont étudié sur des souris CHOP KO l'évolution du remodelage ventriculaire gauche post-IM [330]. De manière intéressante, la délétion de CHOP ne prévient ni le remodelage ventriculaire, ni l'apparition de dysfonctions contractiles post-infarctus mais elle est responsable d'une augmentation de la mortalité par rupture myocardique, qui pourrait être due à une altération de la fibrose. En effet, l'inhibition de CHOP semble empêcher le recrutement de fibroblastes ce qui induit une rupture myocardique post-IM. [331]. Enfin, des rats injecté à l'isoprotérénol, agoniste β -adrénergique, présentent une activation aberrante du stress du RE proapoptotique (CHOP, Casp 12, C-Casp3) et de l'apoptose, conduisant à l'IC [332].

Ainsi, le stress du RE myocardique est un mécanisme central dans la physiopathologie post-infarctus. Il semble induit par l'activation sympathique post-IM et le facteur de transcription CHOP semble être un des médiateurs majeurs des conséquences délétères du stress du RE : il active l'apoptose, participe au développement de la fibrose et est associé à la dysfonction cardiaque post-IM.

Lors de l'exposition d'animaux à l'HI, le stress du RE joue un rôle important dans la sensibilité accrue du cœur à l'infarctus et son expression aberrante post-IM exacerbe chacun des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la progression de la cardiomyopathie ischémique. L'activation de CHOP, comme celle d'HIF-1 α , pourrait ainsi représenter un marqueur diagnostic ou pronostic prometteur chez des patients SAOS à haut risque cardiovasculaire.

3. Conclusions

Au cours de ces travaux, nous avons montré que l'HI a un impact délétère sur la maladie ischémique cardiaque avec une augmentation de la taille d'infarctus, une dysfonction contractile et un remodelage ventriculaire altéré. Trois mécanismes physiopathologiques sont principalement impliqués dans ces altérations structurelles et fonctionnelles induites par l'HI, à savoir l'activation sympathique, le stress du RE et l'activation du facteur de transcription HIF-1 (figure 20).

Les données de la littérature étoffent nos observations et permettent de confirmer le lien entre ces différents mécanismes cellulaires cardiaques dans le contexte de l'HI. Par exemple, il semble exister un lien bidirectionnel entre le stress du RE proapoptotique et l'activation du facteur de transcription HIF-1. En effet, alors que nous avons démontré que le stress du RE active HIF-1 [310], HIF-1 est également responsable de l'activation d'un stress du RE, ce qui a été démontré récemment au laboratoire par l'utilisation de souris HIF-1 α ^{+/-} chez lesquelles l'HI est incapable d'induire un stress du RE proapoptotique (données du laboratoire non publiées).

Il semble également exister une relation étroite entre l'activation de HIF-1 et l'activation sympathique. Nous avons montré dans nos travaux que l'exposition chronique à l'HI induit à la fois une surexpression de HIF-1 et d'une activation sympathique persistante. Toutefois, nous n'avons pas étudié le lien direct entre ces mécanismes cellulaires. En 2006, Peng et al. avait montré une diminution significative de l'activité sympathique chez des souris avec une délétion partielle pour HIF-1 lors de l'exposition chronique à l'HI [216]. De la même que pour HIF-1 et le stress du RE, de récentes évidences suggèrent qu'il existe aussi un lien bidirectionnel entre HIF-1 et activation sympathique, puisqu'il a été montré en réponse à l'hypoxie, l'activation adrénergique était capable d'augmenter l'expression et la stabilisation de HIF-1 α dans les reins de souris et dans les cellules épithéliales [333].

Finalement, il existe également une relation entre activation sympathique et stress du RE. Bien que nos résultats ne permettent pas d'établir ce lien dans notre modèle d'HI, les résultats de la littérature montrent qu'une stimulation β -adrénergique induit un stress du RE proapoptotique [332, 334], alors que l'utilisation de β -bloquant réduit le stress du RE proapoptotique dans un modèle d'IC post-IM chez le chien [329]. Le rôle du stress du RE dans l'activation sympathique n'a quant à lui jamais été démontré, mais l'injection de tunicamycine, un inducteur du stress du RE, est responsable d'une hypertension artérielle [335] qui est fortement associée à une activation sympathique lors d'exposition d'animaux à l'HI [336].

Ainsi, il semble exister une synergie forte entre ces différents mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement et la progression des pathologies ischémiques cardiaques, et l'HI semble avoir un rôle majeur dans la potentialisation de leurs effets (figure 20). Il semble aujourd'hui

important de diagnostiquer et traiter précocement un SAOS pour éviter la survenue de l'évènement ischémique ou de limiter ses conséquences délétères. Chez les patients avec post-IM, le diagnostic du SAOS représente également un enjeu majeur afin de limiter le développement de la cardiomyopathie ischémique. De ce fait, nos travaux ont permis d'identifier de potentiels biomarqueurs produits en grande quantité lors de l'HI et qui sont associés aux complications cardiaques retrouvés chez les patients SAOS. Il serait intéressant d'imaginer étendre le dépistage du stress du RE et de l'activation de HIF-1 chez des patients SAOS, stratifiés à la fois sur la sévérité du SAOS et sur les complications cardiaques. De plus, le développement de traitements visant à limiter un stress du RE proapoptotique et une suractivation de HIF-1 offrirait de nouvelles pistes thérapeutiques prometteuses pour améliorer la prise en charge des patients SAOS à haut risque cardiovasculaire.

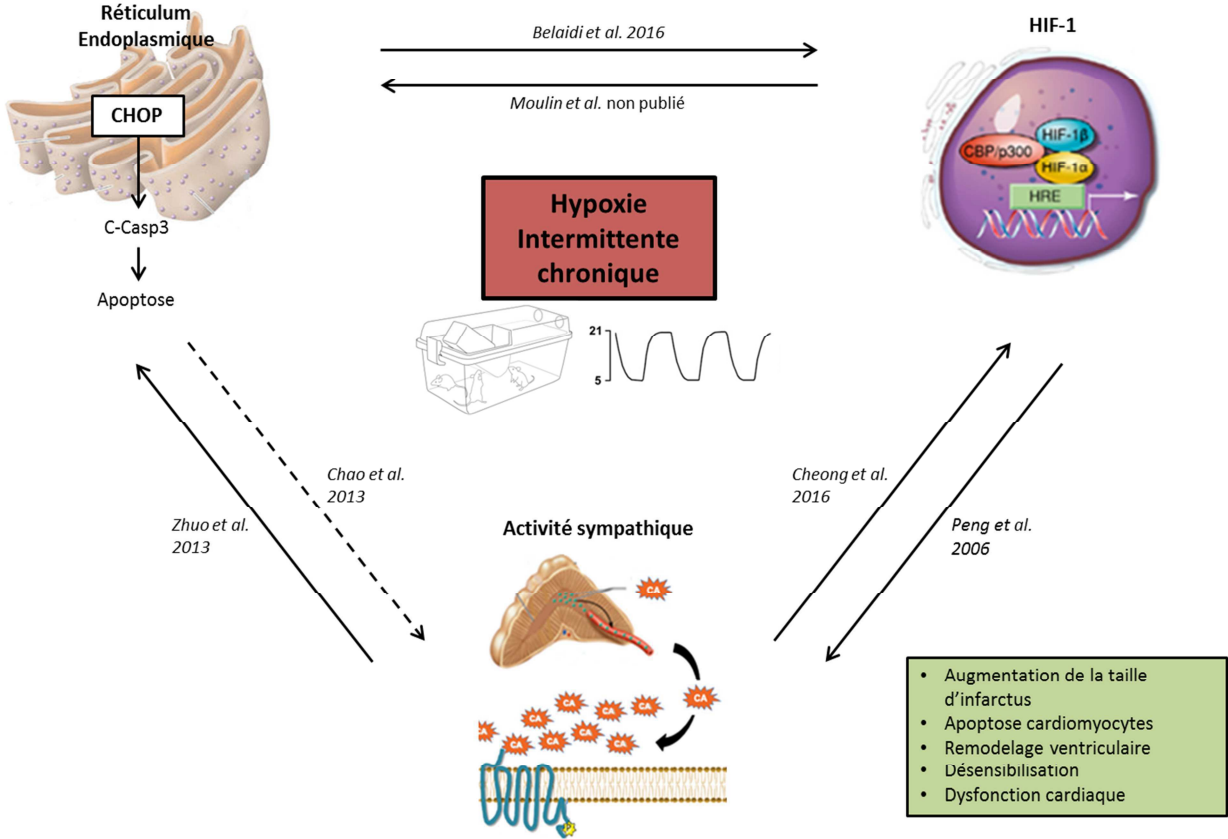


Figure 20. Mécanismes cellulaires activés par l'HI et impliqués dans le développement et la progression des pathologies ischémiques cardiaques associées au SAOS.

BIBLIOGRAPHIE

1. Murray, C.J., et al., *Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*. Lancet, 2012. **380**(9859): p. 2197-223.
2. Ponikowski, P., et al., *2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. Eur J Heart Fail, 2016. **18**(8): p. 891-975.
3. Mosterd, A. and A.W. Hoes, *Clinical epidemiology of heart failure*. Heart, 2007. **93**(9): p. 1137-46.
4. Levy, P., et al., *Obstructive sleep apnoea syndrome*. Nat Rev Dis Primers, 2015. **1**: p. 15015.
5. Arzt, M., et al., *Sleep-Disordered Breathing and Coronary Artery Disease*. Can J Cardiol, 2015. **31**(7): p. 909-17.
6. Sanchez-de-la-Torre, M., F. Campos-Rodriguez, and F. Barbe, *Obstructive sleep apnoea and cardiovascular disease*. Lancet Respir Med, 2013. **1**(1): p. 61-72.
7. *Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction*. Eur Heart J, 2000. **21**(18): p. 1502-13.
8. Thygesen, K., et al., *Third universal definition of myocardial infarction*. Circulation, 2012. **126**(16): p. 2020-35.
9. Neely, J.R. and L.W. Grotyohann, *Role of glycolytic products in damage to ischemic myocardium. Dissociation of adenosine triphosphate levels and recovery of function of reperfused ischemic hearts*. Circ Res, 1984. **55**(6): p. 816-24.
10. Khuri, S.F., et al., *The significance of the late fall in myocardial PCO₂ and its relationship to myocardial pH after regional coronary occlusion in the dog*. Circ Res, 1985. **56**(4): p. 537-47.
11. Steenbergen, C., et al., *Effects of acidosis and ischemia on contractility and intracellular pH of rat heart*. Circ Res, 1977. **41**(6): p. 849-58.
12. Karmazyn, M., et al., *The myocardial Na(+)-H(+) exchange: structure, regulation, and its role in heart disease*. Circ Res, 1999. **85**(9): p. 777-86.
13. Aiello, E.A., et al., *Evidence for an electrogenic Na⁺-HCO₃⁻ symport in rat cardiac myocytes*. J Physiol, 1998. **512** (Pt 1): p. 137-48.
14. Sanada, S., I. Komuro, and M. Kitakaze, *Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(5): p. H1723-41.
15. Zhu, X. and L. Zuo, *Characterization of oxygen radical formation mechanism at early cardiac ischemia*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e787.
16. Lavie, L., *Obstructive sleep apnoea syndrome--an oxidative stress disorder*. Sleep Med Rev, 2003. **7**(1): p. 35-51.
17. Vanden Hoek, T.L., et al., *Significant levels of oxidants are generated by isolated cardiomyocytes during ischemia prior to reperfusion*. J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(9): p. 2571-83.
18. Lesnefsky, E.J., et al., *Myocardial ischemia selectively depletes cardioplipin in rabbit heart subsarcolemmal mitochondria*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(6): p. H2770-8.
19. Bolli, R. and E. Marban, *Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning*. Physiol Rev, 1999. **79**(2): p. 609-34.
20. Reimer, K.A., et al., *Animal models for protecting ischemic myocardium: results of the NHLBI Cooperative Study. Comparison of unconscious and conscious dog models*. Circ Res, 1985. **56**(5): p. 651-65.
21. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 92-100.

22. Windecker, S., et al., *Future treatment strategies in ST-segment elevation myocardial infarction*. Lancet, 2013. **382**(9892): p. 644-57.
23. Leshnower, B.G., et al., *Progression of myocardial injury during coronary occlusion in the collateral-deficient heart: a non-wavefront phenomenon*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(3): p. H1799-804.
24. Jessup, M., et al., *2009 focused update: ACCF/AHA Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation*. Circulation, 2009. **119**(14): p. 1977-2016.
25. Pfeffer, J.M., M.A. Pfeffer, and E. Braunwald, *Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat*. Circ Res, 1985. **57**(1): p. 84-95.
26. Pfeffer, M.A. and E. Braunwald, *Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications*. Circulation, 1990. **81**(4): p. 1161-72.
27. St John Sutton, M., et al., *Left ventricular remodeling and ventricular arrhythmias after myocardial infarction*. Circulation, 2003. **107**(20): p. 2577-82.
28. Frangogiannis, N.G., *Pathophysiology of Myocardial Infarction*. Compr Physiol, 2015. **5**(4): p. 1841-75.
29. Hutchins, G.M. and B.H. Bulkley, *Infarct expansion versus extension: two different complications of acute myocardial infarction*. Am J Cardiol, 1978. **41**(7): p. 1127-32.
30. Christia, P., et al., *Systematic characterization of myocardial inflammation, repair, and remodeling in a mouse model of reperfused myocardial infarction*. J Histochem Cytochem, 2013. **61**(8): p. 555-70.
31. Travers, J.G., et al., *Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens*. Circ Res, 2016. **118**(6): p. 1021-40.
32. Sutton, M.G. and N. Sharpe, *Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy*. Circulation, 2000. **101**(25): p. 2981-8.
33. Vracko, R., D. Thorning, and R.G. Frederickson, *Connective tissue cells in healing rat myocardium. A study of cell reactions in rhythmically contracting environment*. Am J Pathol, 1989. **134**(5): p. 993-1006.
34. Picard, M.H., et al., *Immediate regional endocardial surface expansion following coronary occlusion in the canine left ventricle: disproportionate effects of anterior versus inferior ischemia*. Am Heart J, 1991. **121**(3 Pt 1): p. 753-62.
35. Konstam, M.A., et al., *Left ventricular remodeling in heart failure: current concepts in clinical significance and assessment*. JACC Cardiovasc Imaging, 2011. **4**(1): p. 98-108.
36. Bostrom, P., et al., *C/EBPbeta controls exercise-induced cardiac growth and protects against pathological cardiac remodeling*. Cell, 2010. **143**(7): p. 1072-83.
37. Bernardo, B.C., et al., *Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies*. Pharmacol Ther, 2010. **128**(1): p. 191-227.
38. van Berlo, J.H., M. Maillet, and J.D. Molkentin, *Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 37-45.
39. Levy, D., et al., *Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study*. N Engl J Med, 1990. **322**(22): p. 1561-6.
40. Levy, D., et al., *Risk of ventricular arrhythmias in left ventricular hypertrophy: the Framingham Heart Study*. Am J Cardiol, 1987. **60**(7): p. 560-5.
41. de Simone, G., et al., *Left ventricular mass predicts heart failure not related to previous myocardial infarction: the Cardiovascular Health Study*. Eur Heart J, 2008. **29**(6): p. 741-7.
42. Komuro, I. and Y. Yazaki, *Control of cardiac gene expression by mechanical stress*. Annu Rev Physiol, 1993. **55**: p. 55-75.

43. Izumo, S., et al., *Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. Interaction between hemodynamic and thyroid hormone-induced signals.* J Clin Invest, 1987. **79**(3): p. 970-7.
44. Izumo, S., B. Nadal-Ginard, and V. Mahdavi, *Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(2): p. 339-43.
45. Molkenin, J.D., et al., *A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy.* Cell, 1998. **93**(2): p. 215-28.
46. Lattion, A.L., et al., *Myocardial recruitment during ANF mRNA increase with volume overload in the rat.* Am J Physiol, 1986. **251**(5 Pt 2): p. H890-6.
47. McKay, R.G., et al., *Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion.* Circulation, 1986. **74**(4): p. 693-702.
48. Douglas, P.S., et al., *Left ventricular shape, afterload and survival in idiopathic dilated cardiomyopathy.* J Am Coll Cardiol, 1989. **13**(2): p. 311-5.
49. Lenkiewicz, J.E., M.J. Davies, and D. Rosen, *Collagen in human myocardium as a function of age.* Cardiovasc Res, 1972. **6**(5): p. 549-55.
50. Weber, K.T., *Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network.* J Am Coll Cardiol, 1989. **13**(7): p. 1637-52.
51. Tomasek, J.J., et al., *Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(5): p. 349-63.
52. Chaturvedi, R.R., et al., *Passive stiffness of myocardium from congenital heart disease and implications for diastole.* Circulation, 2010. **121**(8): p. 979-88.
53. de Bakker, J.M., et al., *Fractionated electrograms in dilated cardiomyopathy: origin and relation to abnormal conduction.* J Am Coll Cardiol, 1996. **27**(5): p. 1071-8.
54. Spach, M.S. and J.P. Boineau, *Microfibrosis produces electrical load variations due to loss of side-to-side cell connections: a major mechanism of structural heart disease arrhythmias.* Pacing Clin Electrophysiol, 1997. **20**(2 Pt 2): p. 397-413.
55. Kai, H., et al., *Diastolic dysfunction in hypertensive hearts: roles of perivascular inflammation and reactive myocardial fibrosis.* Hypertens Res, 2005. **28**(6): p. 483-90.
56. Cleutjens, J.P., et al., *Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart.* Am J Pathol, 1995. **147**(2): p. 325-38.
57. Baudino, T.A., et al., *Cardiac fibroblasts: friend or foe?* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(3): p. H1015-26.
58. Cohn, J.N., R. Ferrari, and N. Sharpe, *Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling.* J Am Coll Cardiol, 2000. **35**(3): p. 569-82.
59. Anversa, P., G. Olivetti, and J.M. Capasso, *Cellular basis of ventricular remodeling after myocardial infarction.* Am J Cardiol, 1991. **68**(14): p. 7D-16D.
60. Olivetti, G., et al., *Apoptosis in the failing human heart.* N Engl J Med, 1997. **336**(16): p. 1131-41.
61. Olivetti, G., et al., *Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart.* J Mol Cell Cardiol, 1996. **28**(9): p. 2005-16.
62. Wencker, D., et al., *A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure.* J Clin Invest, 2003. **111**(10): p. 1497-504.
63. Abbate, A., G.G. Biondi-Zoccai, and A. Baldi, *Pathophysiologic role of myocardial apoptosis in post-infarction left ventricular remodeling.* J Cell Physiol, 2002. **193**(2): p. 145-53.
64. Abbate, A., et al., *Right ventricular cardiomyocyte apoptosis in patients with acute myocardial infarction of the left ventricular wall.* Am J Cardiol, 2008. **102**(6): p. 658-62.
65. Narula, J., et al., *Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure.* N Engl J Med, 1996. **335**(16): p. 1182-9.

66. Baldi, A., et al., *Apoptosis and post-infarction left ventricular remodeling*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(2): p. 165-74.
67. Scheubel, R.J., et al., *Apoptotic pathway activation from mitochondria and death receptors without caspase-3 cleavage in failing human myocardium: fragile balance of myocyte survival?* J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(3): p. 481-8.
68. Abbate, A. and J. Narula, *Role of apoptosis in adverse ventricular remodeling*. Heart Fail Clin, 2012. **8**(1): p. 79-86.
69. Haunstetter, A. and S. Izumo, *Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease*. Circ Res, 1998. **82**(11): p. 1111-29.
70. Bers, D.M., *Cardiac excitation-contraction coupling*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 198-205.
71. Hasenfuss, G., et al., *Relationship between Na⁺-Ca²⁺-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium*. Circulation, 1999. **99**(5): p. 641-8.
72. Pogwizd, S.M., et al., *Upregulation of Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ exchanger expression and function in an arrhythmogenic rabbit model of heart failure*. Circ Res, 1999. **85**(11): p. 1009-19.
73. Goonasekera, S.A., et al., *Decreased cardiac L-type Ca⁽²⁾(+) channel activity induces hypertrophy and heart failure in mice*. J Clin Invest, 2012. **122**(1): p. 280-90.
74. Ai, X., et al., *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in heart failure*. Circ Res, 2005. **97**(12): p. 1314-22.
75. Pieske, B., et al., *Ca²⁺ handling and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in isolated failing and nonfailing human myocardium*. Circ Res, 1999. **85**(1): p. 38-46.
76. Lymperepoulos, A., G. Rengo, and W.J. Koch, *Adrenal adrenoceptors in heart failure: fine-tuning cardiac stimulation*. Trends Mol Med, 2007. **13**(12): p. 503-11.
77. Triposkiadis, F., et al., *The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(19): p. 1747-62.
78. Rockman, H.A., W.J. Koch, and R.J. Lefkowitz, *Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 206-12.
79. Port, J.D. and M.R. Bristow, *Altered beta-adrenergic receptor gene regulation and signaling in chronic heart failure*. J Mol Cell Cardiol, 2001. **33**(5): p. 887-905.
80. Kohout, T.A., et al., *Augmentation of cardiac contractility mediated by the human beta(3)-adrenergic receptor overexpressed in the hearts of transgenic mice*. Circulation, 2001. **104**(20): p. 2485-91.
81. Woo, A.Y. and R.P. Xiao, *beta-Adrenergic receptor subtype signaling in heart: from bench to bedside*. Acta Pharmacol Sin, 2012. **33**(3): p. 335-41.
82. Zhao, X.L., et al., *The alpha 1-subunit of skeletal muscle L-type Ca channels is the key target for regulation by A-kinase and protein phosphatase-1C*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **198**(1): p. 166-73.
83. Sulakhe, P.V. and X.T. Vo, *Regulation of phospholamban and troponin-I phosphorylation in the intact rat cardiomyocytes by adrenergic and cholinergic stimuli: roles of cyclic nucleotides, calcium, protein kinases and phosphatases and depolarization*. Mol Cell Biochem, 1995. **149-150**: p. 103-26.
84. Despa, S., et al., *Phospholemman-phosphorylation mediates the beta-adrenergic effects on Na/K pump function in cardiac myocytes*. Circ Res, 2005. **97**(3): p. 252-9.
85. Warne, T., et al., *Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 486-91.
86. Fraser, I.D., et al., *Assembly of an A kinase-anchoring protein-beta(2)-adrenergic receptor complex facilitates receptor phosphorylation and signaling*. Curr Biol, 2000. **10**(7): p. 409-12.
87. Huang, Z.M., et al., *GRK2 in the heart: a GPCR kinase and beyond*. Antioxid Redox Signal, 2014. **21**(14): p. 2032-43.
88. Freedman, N.J., et al., *Phosphorylation and desensitization of the human beta 1-adrenergic receptor. Involvement of G protein-coupled receptor kinases and cAMP-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 1995. **270**(30): p. 17953-61.

89. Lohse, M.J., et al., *Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems.* J Biol Chem, 1992. **267**(12): p. 8558-64.
90. Hausdorff, W.P., M.G. Caron, and R.J. Lefkowitz, *Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function.* FASEB J, 1990. **4**(11): p. 2881-9.
91. Lymperopoulos, A., G. Rengo, and W.J. Koch, *Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy.* Circ Res, 2013. **113**(6): p. 739-53.
92. Lymperopoulos, A., G. Rengo, and W.J. Koch, *GRK2 inhibition in heart failure: something old, something new.* Curr Pharm Des, 2012. **18**(2): p. 186-91.
93. Woodall, M.C., et al., *G protein-coupled receptor kinase 2: a link between myocardial contractile function and cardiac metabolism.* Circ Res, 2014. **114**(10): p. 1661-70.
94. Gottlieb, D.J., et al., *Prospective study of obstructive sleep apnea and incident coronary heart disease and heart failure: the sleep heart health study.* Circulation, 2010. **122**(4): p. 352-60.
95. Tkacova, R., et al., *Overnight shift from obstructive to central apneas in patients with heart failure: role of PCO2 and circulatory delay.* Circulation, 2001. **103**(2): p. 238-43.
96. Bousquet, J., R. Dahl, and N. Khaltaev, *Global Alliance against Chronic Respiratory Diseases.* Eur Respir J, 2007. **29**(2): p. 233-9.
97. Peppard, P.E., et al., *Increased prevalence of sleep-disordered breathing in adults.* Am J Epidemiol, 2013. **177**(9): p. 1006-14.
98. Young, T., et al., *The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults.* N Engl J Med, 1993. **328**(17): p. 1230-5.
99. Quintana-Gallego, E., et al., *Gender differences in obstructive sleep apnea syndrome: a clinical study of 1166 patients.* Respir Med, 2004. **98**(10): p. 984-9.
100. Millman, R.P., et al., *Body fat distribution and sleep apnea severity in women.* Chest, 1995. **107**(2): p. 362-6.
101. Punjabi, N.M., *The epidemiology of adult obstructive sleep apnea.* Proc Am Thorac Soc, 2008. **5**(2): p. 136-43.
102. Redolfi, S., et al., *Relationship between overnight rostral fluid shift and Obstructive Sleep Apnea in nonobese men.* Am J Respir Crit Care Med, 2009. **179**(3): p. 241-6.
103. White, L.H. and T.D. Bradley, *Role of nocturnal rostral fluid shift in the pathogenesis of obstructive and central sleep apnoea.* J Physiol, 2013. **591**(5): p. 1179-93.
104. Thompson, S.R., U. Ackermann, and R.L. Horner, *Sleep as a teaching tool for integrating respiratory physiology and motor control.* Adv Physiol Educ, 2001. **25**(1-4): p. 101-16.
105. Young, T., P.E. Peppard, and D.J. Gottlieb, *Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective.* Am J Respir Crit Care Med, 2002. **165**(9): p. 1217-39.
106. Thomasouli, M.A., et al., *The impact of diet and lifestyle management strategies for obstructive sleep apnoea in adults: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials.* Sleep Breath, 2013. **17**(3): p. 925-35.
107. Araghi, M.H., et al., *Effectiveness of lifestyle interventions on obstructive sleep apnea (OSA): systematic review and meta-analysis.* Sleep, 2013. **36**(10): p. 1553-62, 1562A-1562E.
108. Foster, G.D., et al., *A randomized study on the effect of weight loss on obstructive sleep apnea among obese patients with type 2 diabetes: the Sleep AHEAD study.* Arch Intern Med, 2009. **169**(17): p. 1619-26.
109. Chirinos, J.A., et al., *CPAP, weight loss, or both for obstructive sleep apnea.* N Engl J Med, 2014. **370**(24): p. 2265-75.
110. Malhotra, A. and D.P. White, *Obstructive sleep apnoea.* Lancet, 2002. **360**(9328): p. 237-45.
111. Randerath, W.J., et al., *Non-CPAP therapies in obstructive sleep apnoea.* Eur Respir J, 2011. **37**(5): p. 1000-28.
112. Holty, J.E. and C. Guilleminault, *Maxillomandibular advancement for the treatment of obstructive sleep apnea: a systematic review and meta-analysis.* Sleep Med Rev, 2010. **14**(5): p. 287-97.

113. Ferguson, K.A., et al., *Oral appliances for snoring and obstructive sleep apnea: a review*. Sleep, 2006. **29**(2): p. 244-62.
114. Bazzano, L.A., et al., *Effect of nocturnal nasal continuous positive airway pressure on blood pressure in obstructive sleep apnea*. Hypertension, 2007. **50**(2): p. 417-23.
115. Marin, J.M., et al., *Association between treated and untreated obstructive sleep apnea and risk of hypertension*. JAMA, 2012. **307**(20): p. 2169-76.
116. Guo, J., et al., *Effect of CPAP therapy on cardiovascular events and mortality in patients with obstructive sleep apnea: a meta-analysis*. Sleep Breath, 2016. **20**(3): p. 965-74.
117. McEvoy, R.D., et al., *CPAP for Prevention of Cardiovascular Events in Obstructive Sleep Apnea*. N Engl J Med, 2016. **375**(10): p. 919-31.
118. Gay, P., et al., *Evaluation of positive airway pressure treatment for sleep related breathing disorders in adults*. Sleep, 2006. **29**(3): p. 381-401.
119. Engleman, H.M., et al., *Effect of continuous positive airway pressure treatment on daytime function in sleep apnoea/hypopnoea syndrome*. Lancet, 1994. **343**(8897): p. 572-5.
120. Kasai, T. and T.D. Bradley, *Obstructive sleep apnea and heart failure: pathophysiologic and therapeutic implications*. J Am Coll Cardiol, 2011. **57**(2): p. 119-27.
121. Briancon-Marjollet, A., et al., *The impact of sleep disorders on glucose metabolism: endocrine and molecular mechanisms*. Diabetol Metab Syndr, 2015. **7**: p. 25.
122. Morgan, B.J., *Acute and chronic cardiovascular responses to sleep disordered breathing*. Sleep, 1996. **19**(10 Suppl): p. S206-9.
123. Dewan, N.A., F.J. Nieto, and V.K. Somers, *Intermittent hypoxemia and OSA: implications for comorbidities*. Chest, 2015. **147**(1): p. 266-74.
124. Somers, V.K., et al., *Sleep apnea and cardiovascular disease: an American Heart Association/American College Of Cardiology Foundation Scientific Statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on Clinical Cardiology, Stroke Council, and Council On Cardiovascular Nursing. In collaboration with the National Heart, Lung, and Blood Institute National Center on Sleep Disorders Research (National Institutes of Health)*. Circulation, 2008. **118**(10): p. 1080-111.
125. Dematteis, M., et al., *Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding the human disease*. Ilar J, 2009. **50**(3): p. 262-81.
126. Kalaria, R.N., et al., *Hypoxia of sleep apnoea: cardiopulmonary and cerebral changes after intermittent hypoxia in rats*. Respir Physiol Neurobiol, 2004. **140**(1): p. 53-62.
127. Klein, J.B., et al., *Akt-mediated valosin-containing protein 97 phosphorylation regulates its association with ubiquitinated proteins*. J Biol Chem, 2005. **280**(36): p. 31870-81.
128. Lin, M., et al., *Chronic intermittent hypoxia impairs baroreflex control of heart rate but enhances heart rate responses to vagal efferent stimulation in anesthetized mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(2): p. H997-1006.
129. Dematteis, M., et al., *Intermittent hypoxia induces early functional cardiovascular remodeling in mice*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **177**(2): p. 227-35.
130. Lesske, J., et al., *Hypertension caused by chronic intermittent hypoxia--influence of chemoreceptors and sympathetic nervous system*. J Hypertens, 1997. **15**(12 Pt 2): p. 1593-603.
131. Tamišier, R., et al., *A new model of chronic intermittent hypoxia in humans: effect on ventilation, sleep, and blood pressure*. J Appl Physiol (1985), 2009. **107**(1): p. 17-24.
132. Minoves, M., et al., *An innovative intermittent hypoxia model in cell cultures allowing fast PO2 oscillations with minimal gas consumption*. Am J Physiol Cell Physiol, 2017: p. ajpcell 00098 2017.
133. Marin, J.M., et al., *Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study*. Lancet, 2005. **365**(9464): p. 1046-53.

134. Munzel, T., et al., *Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction*. *Ann Med*, 2008. **40**(3): p. 180-96.
135. McNicholas, W.T. and M.R. Bonsignore, *Sleep apnoea as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence, basic mechanisms and research priorities*. *Eur Respir J*, 2007. **29**(1): p. 156-78.
136. Totoson, P., et al., *Atorvastatin protects against deleterious cardiovascular consequences induced by chronic intermittent hypoxia*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2013. **238**(2): p. 223-32.
137. Peppard, P.E., et al., *Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension*. *N Engl J Med*, 2000. **342**(19): p. 1378-84.
138. Becker, H.F., et al., *Effect of nasal continuous positive airway pressure treatment on blood pressure in patients with obstructive sleep apnea*. *Circulation*, 2003. **107**(1): p. 68-73.
139. Kanagy, N.L., *Vascular effects of intermittent hypoxia*. *Ilar J*, 2009. **50**(3): p. 282-8.
140. Minoguchi, K., et al., *Increased carotid intima-media thickness and serum inflammatory markers in obstructive sleep apnea*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005. **172**(5): p. 625-30.
141. Drager, L.F., et al., *Early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005. **172**(5): p. 613-8.
142. Friedlander, A.H., R. Yueh, and M.R. Littner, *The prevalence of calcified carotid artery atheromas in patients with obstructive sleep apnea syndrome*. *J Oral Maxillofac Surg*, 1998. **56**(8): p. 950-4.
143. Hayashi, M., et al., *Nocturnal oxygen desaturation correlates with the severity of coronary atherosclerosis in coronary artery disease*. *Chest*, 2003. **124**(3): p. 936-41.
144. Drager, L.F., et al., *Effects of continuous positive airway pressure on early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007. **176**(7): p. 706-12.
145. Arnaud, C., et al., *Inflammation contributes to the atherogenic role of intermittent hypoxia in apolipoprotein-E knock out mice*. *Atherosclerosis*, 2011. **219**(2): p. 425-31.
146. Buchner, S., et al., *Impact of sleep-disordered breathing on myocardial salvage and infarct size in patients with acute myocardial infarction*. *Eur Heart J*, 2014. **35**(3): p. 192-9.
147. Lee, C.H., et al., *Severe obstructive sleep apnea and outcomes following myocardial infarction*. *J Clin Sleep Med*, 2011. **7**(6): p. 616-21.
148. Garcia-Rio, F., *Recurrent acute myocardial infarction and CPAP effect in mild-severe OSA: is an independent risk factor?* *Int J Cardiol*, 2014. **171**(2): p. e19.
149. Joyeux-Faure, M., et al., *Chronic intermittent hypoxia increases infarction in the isolated rat heart*. *J Appl Physiol (1985)*, 2005. **98**(5): p. 1691-6.
150. Ramond, A., et al., *Oxidative stress mediates cardiac infarction aggravation induced by intermittent hypoxia*. *Fundam Clin Pharmacol*, 2013. **27**(3): p. 252-61.
151. Park, A.M. and Y.J. Suzuki, *Effects of intermittent hypoxia on oxidative stress-induced myocardial damage in mice*. *J Appl Physiol (1985)*, 2007. **102**(5): p. 1806-14.
152. Belaidi, E., et al., *Major role for hypoxia inducible factor-1 and the endothelin system in promoting myocardial infarction and hypertension in an animal model of obstructive sleep apnea*. *J Am Coll Cardiol*, 2009. **53**(15): p. 1309-17.
153. Mehra, R., et al., *Association of nocturnal arrhythmias with sleep-disordered breathing: The Sleep Heart Health Study*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006. **173**(8): p. 910-6.
154. Gami, A.S., et al., *Obstructive sleep apnea and the risk of sudden cardiac death: a longitudinal study of 10,701 adults*. *J Am Coll Cardiol*, 2013. **62**(7): p. 610-6.
155. Myerburg, R.J. and M.J. Junttila, *Sudden cardiac death caused by coronary heart disease*. *Circulation*, 2012. **125**(8): p. 1043-52.
156. Kuniyoshi, F.H., et al., *Day-night variation of acute myocardial infarction in obstructive sleep apnea*. *J Am Coll Cardiol*, 2008. **52**(5): p. 343-6.
157. Lu, Z., et al., *Increase in vulnerability of atrial fibrillation in an acute intermittent hypoxia model: importance of autonomic imbalance*. *Auton Neurosci*, 2013. **177**(2): p. 148-53.

158. Haider, A.W., et al., *Systolic blood pressure, diastolic blood pressure, and pulse pressure as predictors of risk for congestive heart failure in the Framingham Heart Study*. *Ann Intern Med*, 2003. **138**(1): p. 10-6.
159. Hedner, J., H. Ejjnell, and K. Caidahl, *Left ventricular hypertrophy independent of hypertension in patients with obstructive sleep apnoea*. *J Hypertens*, 1990. **8**(10): p. 941-6.
160. Noda, A., et al., *Cardiac hypertrophy in obstructive sleep apnea syndrome*. *Chest*, 1995. **107**(6): p. 1538-44.
161. Chen, L., et al., *Left ventricular dysfunction and associated cellular injury in rats exposed to chronic intermittent hypoxia*. *J Appl Physiol* (1985), 2008. **104**(1): p. 218-23.
162. Hayashi, T., et al., *Role of gp91phox-containing NADPH oxidase in left ventricular remodeling induced by intermittent hypoxic stress*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. **294**(5): p. H2197-203.
163. Parker, J.D., et al., *Acute and chronic effects of airway obstruction on canine left ventricular performance*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999. **160**(6): p. 1888-96.
164. Shahar, E., et al., *Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: cross-sectional results of the Sleep Heart Health Study*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001. **163**(1): p. 19-25.
165. Ferrier, K., et al., *Sleep-disordered breathing occurs frequently in stable outpatients with congestive heart failure*. *Chest*, 2005. **128**(4): p. 2116-22.
166. Javaheri, S., *Sleep disorders in systolic heart failure: a prospective study of 100 male patients. The final report*. *Int J Cardiol*, 2006. **106**(1): p. 21-8.
167. Wang, H., et al., *Influence of obstructive sleep apnea on mortality in patients with heart failure*. *J Am Coll Cardiol*, 2007. **49**(15): p. 1625-31.
168. Laaban, J.P., et al., *Left ventricular systolic dysfunction in patients with obstructive sleep apnea syndrome*. *Chest*, 2002. **122**(4): p. 1133-8.
169. Li, S., et al., *Delayed neutrophil apoptosis mediates intermittent hypoxia-induced progressive heart failure in pressure-overloaded rats*. *Sleep Breath*, 2016. **20**(1): p. 95-102.
170. Naghshin, J., et al., *Chronic intermittent hypoxia exposure improves left ventricular contractility in transgenic mice with heart failure*. *J Appl Physiol* (1985), 2012. **113**(5): p. 791-8.
171. Bisogni, V., et al., *The sympathetic nervous system and catecholamines metabolism in obstructive sleep apnoea*. *J Thorac Dis*, 2016. **8**(2): p. 243-54.
172. Dimsdale, J.E., et al., *The effect of sleep apnea on plasma and urinary catecholamines*. *Sleep*, 1995. **18**(5): p. 377-81.
173. Somers, V.K., et al., *Influence of ventilation and hypocapnia on sympathetic nerve responses to hypoxia in normal humans*. *J Appl Physiol* (1985), 1989. **67**(5): p. 2095-100.
174. Narkiewicz, K., et al., *Selective potentiation of peripheral chemoreflex sensitivity in obstructive sleep apnea*. *Circulation*, 1999. **99**(9): p. 1183-9.
175. Tamisier, R., et al., *14 nights of intermittent hypoxia elevate daytime blood pressure and sympathetic activity in healthy humans*. *Eur Respir J*, 2011. **37**(1): p. 119-28.
176. Greenberg, H.E., et al., *Chronic intermittent hypoxia increases sympathetic responsiveness to hypoxia and hypercapnia*. *J Appl Physiol* (1985), 1999. **86**(1): p. 298-305.
177. Kumar, G.K., et al., *Chronic intermittent hypoxia induces hypoxia-evoked catecholamine efflux in adult rat adrenal medulla via oxidative stress*. *J Physiol*, 2006. **575**(Pt 1): p. 229-39.
178. Kumar, G.K., et al., *Activation of tyrosine hydroxylase by intermittent hypoxia: involvement of serine phosphorylation*. *J Appl Physiol* (1985), 2003. **95**(2): p. 536-44.
179. Narkiewicz, K., et al., *Altered cardiovascular variability in obstructive sleep apnea*. *Circulation*, 1998. **98**(11): p. 1071-7.
180. Ponikowski, P., et al., *Depressed heart rate variability as an independent predictor of death in chronic congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy*. *Am J Cardiol*, 1997. **79**(12): p. 1645-50.
181. Danesh, J., et al., *Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses*. *BMJ*, 2000. **321**(7255): p. 199-204.

182. Minoguchi, K., et al., *Elevated production of tumor necrosis factor-alpha by monocytes in patients with obstructive sleep apnea syndrome*. Chest, 2004. **126**(5): p. 1473-9.
183. Ryan, S., C.T. Taylor, and W.T. McNicholas, *Predictors of elevated nuclear factor-kappaB-dependent genes in obstructive sleep apnea syndrome*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. **174**(7): p. 824-30.
184. Arnaud, C., et al., *Obstructive sleep apnea, immuno-inflammation, and atherosclerosis*. Semin Immunopathol, 2009. **31**(1): p. 113-25.
185. Arnaud, C., et al., *The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **184**(6): p. 724-31.
186. May, A.M., D.R. Van Wagoner, and R. Mehra, *OSA and Cardiac Arrhythmogenesis: Mechanistic Insights*. Chest, 2017. **151**(1): p. 225-241.
187. Lavie, L., *Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia--revisited--the bad ugly and good: implications to the heart and brain*. Sleep Med Rev, 2015. **20**: p. 27-45.
188. Stal, P.S. and B. Johansson, *Abnormal mitochondria organization and oxidative activity in the palate muscles of long-term snorers with obstructive sleep apnea*. Respiration, 2012. **83**(5): p. 407-17.
189. Schulz, R., et al., *Decreased plasma levels of nitric oxide derivatives in obstructive sleep apnoea: response to CPAP therapy*. Thorax, 2000. **55**(12): p. 1046-51.
190. Varadharaj, S., et al., *Endothelial nitric oxide synthase uncoupling: a novel pathway in OSA induced vascular endothelial dysfunction*. Respir Physiol Neurobiol, 2015. **207**: p. 40-7.
191. Franco, C.M., et al., *Obstructive sleep apnea severity correlates with cellular and plasma oxidative stress parameters and affective symptoms*. J Mol Neurosci, 2012. **47**(2): p. 300-10.
192. Mancuso, M., et al., *Oxidative stress biomarkers in patients with untreated obstructive sleep apnea syndrome*. Sleep Med, 2012. **13**(6): p. 632-6.
193. Peng, Y.J., et al., *Induction of sensory long-term facilitation in the carotid body by intermittent hypoxia: implications for recurrent apneas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(17): p. 10073-8.
194. Lee, M.Y., et al., *Intermittent hypoxia induces NF-kappaB-dependent endothelial activation via adipocyte-derived mediators*. Am J Physiol Cell Physiol, 2016. **310**(6): p. C446-55.
195. Yuan, X., et al., *Telmisartan attenuates myocardial apoptosis induced by chronic intermittent hypoxia in rats: modulation of nitric oxide metabolism and inflammatory mediators*. Sleep Breath, 2015. **19**(2): p. 703-9.
196. Chen, L., et al., *Oxidative stress and left ventricular function with chronic intermittent hypoxia in rats*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **172**(7): p. 915-20.
197. Nanduri, J., et al., *HIF-1alpha activation by intermittent hypoxia requires NADPH oxidase stimulation by xanthine oxidase*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0119762.
198. Yuan, G., et al., *Induction of HIF-1alpha expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca²⁺ signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR*. J Cell Physiol, 2008. **217**(3): p. 674-85.
199. Wang, G.L., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(12): p. 5510-4.
200. Belaidi, E., et al., *Targeting the ROS-HIF-1-endothelin axis as a therapeutic approach for the treatment of obstructive sleep apnea-related cardiovascular complications*. Pharmacol Ther, 2016. **168**: p. 1-11.
201. Semenza, G.L. and G.L. Wang, *A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(12): p. 5447-54.
202. Jiang, B.H., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension*. Am J Physiol, 1996. **271**(4 Pt 1): p. C1172-80.
203. Cai, Z., et al., *Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury*. Circulation, 2003. **108**(1): p. 79-85.

204. Yuan, G., et al., *Ca²⁺/calmodulin kinase-dependent activation of hypoxia inducible factor 1 transcriptional activity in cells subjected to intermittent hypoxia*. J Biol Chem, 2005. **280**(6): p. 4321-8.
205. Semenza, G.L., *Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1*. Physiology (Bethesda), 2009. **24**: p. 97-106.
206. Cahan, C., et al., *Erythropoietin levels with treatment of obstructive sleep apnea*. J Appl Physiol (1985), 1995. **79**(4): p. 1278-85.
207. Gozal, D., A.J. Lipton, and K.L. Jones, *Circulating vascular endothelial growth factor levels in patients with obstructive sleep apnea*. Sleep, 2002. **25**(1): p. 59-65.
208. Phillips, B.G., et al., *Effects of obstructive sleep apnea on endothelin-1 and blood pressure*. J Hypertens, 1999. **17**(1): p. 61-6.
209. Kaczmarek, E., et al., *Molecular biomarkers of vascular dysfunction in obstructive sleep apnea*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e70559.
210. Belaidi, E., et al., *Prevention of HIF-1 activation and iNOS gene targeting by low-dose cadmium results in loss of myocardial hypoxic preconditioning in the rat*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(2): p. H901-8.
211. Gras, E., et al., *Endothelin-1 mediates intermittent hypoxia-induced inflammatory vascular remodeling through HIF-1 activation*. J Appl Physiol (1985), 2016. **120**(4): p. 437-43.
212. Wang, Z.F., J. Kang, and B. Dai, *[Expression and activation of hypoxia inducible factor-1alpha and iNOS in the brain of rats with chronic intermittent hypoxia]*. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 2009. **32**(10): p. 739-43.
213. da Rosa, D.P., et al., *Simulating sleep apnea by exposure to intermittent hypoxia induces inflammation in the lung and liver*. Mediators Inflamm, 2012. **2012**: p. 879419.
214. Allahdadi, K.J., et al., *Endothelin type A receptor antagonist normalizes blood pressure in rats exposed to eucapnic intermittent hypoxia*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **295**(1): p. H434-40.
215. Wang, Z., et al., *Effects of cyclic intermittent hypoxia on ET-1 responsiveness and endothelial dysfunction of pulmonary arteries in rats*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e58078.
216. Peng, Y.J., et al., *Heterozygous HIF-1alpha deficiency impairs carotid body-mediated systemic responses and reactive oxygen species generation in mice exposed to intermittent hypoxia*. J Physiol, 2006. **577**(Pt 2): p. 705-16.
217. Polotsky, V.Y., et al., *Intermittent and sustained hypoxia induce a similar gene expression profile in human aortic endothelial cells*. Physiol Genomics, 2010. **41**(3): p. 306-14.
218. Groenendyk, J., L.B. Agellon, and M. Michalak, *Coping with endoplasmic reticulum stress in the cardiovascular system*. Annu Rev Physiol, 2013. **75**: p. 49-67.
219. Kitakaze, M. and O. Tsukamoto, *What is the role of ER stress in the heart? Introduction and series overview*. Circ Res, 2010. **107**(1): p. 15-8.
220. Ron, D. and P. Walter, *Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(7): p. 519-29.
221. Bertolotti, A., et al., *Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(6): p. 326-32.
222. Mori, K., *Signalling pathways in the unfolded protein response: development from yeast to mammals*. J Biochem, 2009. **146**(6): p. 743-50.
223. Calfon, M., et al., *IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA*. Nature, 2002. **415**(6867): p. 92-6.
224. Wang, X.Z. and D. Ron, *Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase*. Science, 1996. **272**(5266): p. 1347-9.
225. Szegezdi, E., et al., *Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis*. EMBO Rep, 2006. **7**(9): p. 880-5.
226. Jing, G., J.J. Wang, and S.X. Zhang, *ER stress and apoptosis: a new mechanism for retinal cell death*. Exp Diabetes Res, 2012. **2012**: p. 589589.

227. Nakagawa, T., et al., *Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta*. Nature, 2000. **403**(6765): p. 98-103.
228. Morishima, N., et al., *An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12*. J Biol Chem, 2002. **277**(37): p. 34287-94.
229. Thuerauf, D.J., et al., *Activation of the unfolded protein response in infarcted mouse heart and hypoxic cultured cardiac myocytes*. Circ Res, 2006. **99**(3): p. 275-82.
230. Doroudgar, S., et al., *Ischemia activates the ATF6 branch of the endoplasmic reticulum stress response*. J Biol Chem, 2009. **284**(43): p. 29735-45.
231. Toko, H., et al., *ATF6 is important under both pathological and physiological states in the heart*. J Mol Cell Cardiol, 2010. **49**(1): p. 113-20.
232. Shintani-Ishida, K., et al., *Ischemic preconditioning protects cardiomyocytes against ischemic injury by inducing GRP78*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **345**(4): p. 1600-5.
233. Liu, X.H., et al., *Ischemic postconditioning protects myocardium from ischemia/reperfusion injury through attenuating endoplasmic reticulum stress*. Shock, 2008. **30**(4): p. 422-7.
234. Liu, X.H., et al., *Cardiomyocyte-specific disruption of Serca2 in adult mice causes sarco(endo)plasmic reticulum stress and apoptosis*. Cell Calcium, 2011. **49**(4): p. 201-7.
235. Xin, W., et al., *Attenuation of endoplasmic reticulum stress-related myocardial apoptosis by SERCA2a gene delivery in ischemic heart disease*. Mol Med, 2011. **17**(3-4): p. 201-10.
236. Sawada, T., et al., *X-box binding protein 1 regulates brain natriuretic peptide through a novel AP1/CRE-like element in cardiomyocytes*. J Mol Cell Cardiol, 2010. **48**(6): p. 1280-9.
237. Okada, K., et al., *Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis*. Circulation, 2004. **110**(6): p. 705-12.
238. Fu, H.Y., et al., *Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload*. Circulation, 2010. **122**(4): p. 361-9.
239. Hamada, H., et al., *Dilated cardiomyopathy caused by aberrant endoplasmic reticulum quality control in mutant KDEL receptor transgenic mice*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(18): p. 8007-17.
240. Yang, J., Z. Wang, and D.L. Chen, *Shikonin ameliorates isoproterenol (ISO)-induced myocardial damage through suppressing fibrosis, inflammation, apoptosis and ER stress*. Biomed Pharmacother, 2017. **93**: p. 1343-1357.
241. Ayala, P., et al., *Attenuation of endoplasmic reticulum stress using the chemical chaperone 4-phenylbutyric acid prevents cardiac fibrosis induced by isoproterenol*. Exp Mol Pathol, 2012. **92**(1): p. 97-104.
242. Arnardottir, E.S., et al., *Molecular signatures of obstructive sleep apnea in adults: a review and perspective*. Sleep, 2009. **32**(4): p. 447-70.
243. Zhu, Y., et al., *Eif-2a protects brainstem motoneurons in a murine model of sleep apnea*. J Neurosci, 2008. **28**(9): p. 2168-78.
244. Zhou, Y.H., et al., *[Effect of endoplasmic reticulum stress in brain injury following chronic intermittent hypoxia in weanling rat]*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2012. **92**(24): p. 1706-10.
245. Cai, X.H., et al., *Endoplasmic reticulum stress plays critical role in brain damage after chronic intermittent hypoxia in growing rats*. Exp Neurol, 2014. **257**: p. 148-56.
246. Shi, Z., L. Xu, and R. Zhou, *[Tauroursodeoxycholic acid suppresses endoplasmic reticulum stress in pulmonary tissues of intermittent hypoxia mice]*. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2015. **40**(11): p. 1165-72.
247. Ding, W., et al., *Adiponectin protects the kidney against chronic intermittent hypoxia-induced injury through inhibiting endoplasmic reticulum stress*. Sleep Breath, 2016. **20**(3): p. 1069-74.
248. Yi, H., et al., *PERK/eIF2alpha contributes to changes of insulin signaling in HepG2 cell induced by intermittent hypoxia*. Life Sci, 2017. **181**: p. 17-22.
249. Hwang, S.Y., et al., *Reduction of oxidative stress attenuates lipoapoptosis exacerbated by hypoxia in human hepatocytes*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(2): p. 3323-34.

250. Ding, W., et al., *Adiponectin protects rat myocardium against chronic intermittent hypoxia-induced injury via inhibition of endoplasmic reticulum stress*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e94545.
251. Zhou, S., et al., *Metallothionein prevents intermittent hypoxia-induced cardiac endoplasmic reticulum stress and cell death likely via activation of Akt signaling pathway in mice*. Toxicol Lett, 2014. **227**(2): p. 113-23.
252. Aiello, K.D., et al., *Effect of exercise training on sleep apnea: A systematic review and meta-analysis*. Respir Med, 2016. **116**: p. 85-92.
253. Ignarro, L.J., M.L. Balestrieri, and C. Napoli, *Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: an update*. Cardiovasc Res, 2007. **73**(2): p. 326-40.
254. Keteyian, S.J., et al., *Peak aerobic capacity predicts prognosis in patients with coronary heart disease*. Am Heart J, 2008. **156**(2): p. 292-300.
255. Brown, D.A., et al., *Susceptibility of the heart to ischaemia-reperfusion injury and exercise-induced cardioprotection are sex-dependent in the rat*. J Physiol, 2005. **564**(Pt 2): p. 619-30.
256. Freimann, S., et al., *Prior exercise training improves the outcome of acute myocardial infarction in the rat. Heart structure, function, and gene expression*. J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(6): p. 931-8.
257. Frasier, C.R., R.L. Moore, and D.A. Brown, *Exercise-induced cardiac preconditioning: how exercise protects your achy-breaky heart*. J Appl Physiol (1985), 2011. **111**(3): p. 905-15.
258. Hoshida, S., et al., *Repeated physiologic stresses provide persistent cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in rats*. J Am Coll Cardiol, 2002. **40**(4): p. 826-31.
259. Yamashita, N., et al., *Exercise provides direct biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation*. J Exp Med, 1999. **189**(11): p. 1699-706.
260. Lennon, S.L., et al., *Loss of exercise-induced cardioprotection after cessation of exercise*. J Appl Physiol (1985), 2004. **96**(4): p. 1299-305.
261. Hamilton, K.L., et al., *MnSOD antisense treatment and exercise-induced protection against arrhythmias*. Free Radic Biol Med, 2004. **37**(9): p. 1360-8.
262. Hamilton, K.L., et al., *Short-term exercise training can improve myocardial tolerance to I/R without elevation in heat shock proteins*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **281**(3): p. H1346-52.
263. Hamilton, K.L., et al., *Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion*. Free Radic Biol Med, 2003. **34**(7): p. 800-9.
264. Frasier, C.R., et al., *Redox-dependent increases in glutathione reductase and exercise preconditioning: role of NADPH oxidase and mitochondria*. Cardiovasc Res, 2013. **98**(1): p. 47-55.
265. Kemi, O.J., et al., *Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca²⁺ cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban*. J Mol Cell Cardiol, 2007. **43**(3): p. 354-61.
266. Kemi, O.J., et al., *Aerobic fitness is associated with cardiomyocyte contractile capacity and endothelial function in exercise training and detraining*. Circulation, 2004. **109**(23): p. 2897-904.
267. Wisloff, U., et al., *Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats*. Cardiovasc Res, 2001. **50**(3): p. 495-508.
268. Powers, S.K., et al., *Mechanisms of exercise-induced cardioprotection*. Physiology (Bethesda), 2014. **29**(1): p. 27-38.
269. Calvert, J.W. and D.J. Lefer, *Role of beta-adrenergic receptors and nitric oxide signaling in exercise-mediated cardioprotection*. Physiology (Bethesda), 2013. **28**(4): p. 216-24.
270. Hong, J., et al., *The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Cardiovascular Disease and Exercise*. Int J Vasc Med, 2017. **2017**: p. 2049217.
271. Wei, X., X. Liu, and A. Rosenzweig, *What do we know about the cardiac benefits of exercise?* Trends Cardiovasc Med, 2015. **25**(6): p. 529-36.
272. Tanasescu, M., et al., *Exercise type and intensity in relation to coronary heart disease in men*. JAMA, 2002. **288**(16): p. 1994-2000.

273. Mezzani, A., et al., *Aerobic exercise intensity assessment and prescription in cardiac rehabilitation: a joint position statement of the European Association for Cardiovascular Prevention and Rehabilitation, the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation and the Canadian Association of Cardiac Rehabilitation*. Eur J Prev Cardiol, 2013. **20**(3): p. 442-67.
274. Wisloff, U., et al., *Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients: a randomized study*. Circulation, 2007. **115**(24): p. 3086-94.
275. Molmen-Hansen, H.E., et al., *Aerobic interval training reduces blood pressure and improves myocardial function in hypertensive patients*. Eur J Prev Cardiol, 2012. **19**(2): p. 151-60.
276. Moholdt, T., et al., *Aerobic interval training increases peak oxygen uptake more than usual care exercise training in myocardial infarction patients: a randomized controlled study*. Clin Rehabil, 2012. **26**(1): p. 33-44.
277. Ramos, J.S., et al., *The impact of high-intensity interval training versus moderate-intensity continuous training on vascular function: a systematic review and meta-analysis*. Sports Med, 2015. **45**(5): p. 679-92.
278. Angadi, S.S., et al., *High-intensity interval training vs. moderate-intensity continuous exercise training in heart failure with preserved ejection fraction: a pilot study*. J Appl Physiol (1985), 2015. **119**(6): p. 753-8.
279. Kemi, O.J., et al., *Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy*. J Appl Physiol (1985), 2002. **93**(4): p. 1301-9.
280. Wisloff, U., et al., *Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca²⁺ sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 2002. **54**(1): p. 162-74.
281. Zhang, L.Q., et al., *Sprint training restores normal contractility in postinfarction rat myocytes*. J Appl Physiol (1985), 2000. **89**(3): p. 1099-105.
282. Lee, I.M., H.D. Sesso, and R.S. Paffenbarger, Jr., *Physical activity and coronary heart disease risk in men: does the duration of exercise episodes predict risk?* Circulation, 2000. **102**(9): p. 981-6.
283. Wisloff, U., et al., *A single weekly bout of exercise may reduce cardiovascular mortality: how little pain for cardiac gain? 'The HUNT study, Norway'*. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, 2006. **13**(5): p. 798-804.
284. Wilson, M., et al., *Diverse patterns of myocardial fibrosis in lifelong, veteran endurance athletes*. J Appl Physiol (1985), 2011. **110**(6): p. 1622-6.
285. La Gerche, A., et al., *Exercise-induced right ventricular dysfunction and structural remodelling in endurance athletes*. Eur Heart J, 2012. **33**(8): p. 998-1006.
286. Baldesberger, S., et al., *Sinus node disease and arrhythmias in the long-term follow-up of former professional cyclists*. Eur Heart J, 2008. **29**(1): p. 71-8.
287. Williams, P.T. and P.D. Thompson, *Increased cardiovascular disease mortality associated with excessive exercise in heart attack survivors*. Mayo Clin Proc, 2014. **89**(9): p. 1187-94.
288. Gay-Jordi, G., et al., *Losartan prevents heart fibrosis induced by long-term intensive exercise in an animal model*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e55427.
289. Benito, B., et al., *Cardiac arrhythmogenic remodeling in a rat model of long-term intensive exercise training*. Circulation, 2011. **123**(1): p. 13-22.
290. Quan, S.F., et al., *Association of physical activity with sleep-disordered breathing*. Sleep Breath, 2007. **11**(3): p. 149-57.
291. Mendelson, M., et al., *Effects of exercise training on sleep apnoea in patients with coronary artery disease: a randomised trial*. Eur Respir J, 2016. **48**(1): p. 142-50.
292. Iftikhar, I.H., C.E. Kline, and S.D. Youngstedt, *Effects of exercise training on sleep apnea: a meta-analysis*. Lung, 2014. **192**(1): p. 175-84.
293. Chwiesko-Minarowska, S., et al., *Rehabilitation of patients with obstructive sleep apnea syndrome*. Int J Rehabil Res, 2013. **36**(4): p. 291-7.

294. Chen, T.I., et al., *Short-term exercise provides left ventricular myocardial protection against intermittent hypoxia-induced apoptosis in rats*. Eur J Appl Physiol, 2011. **111**(8): p. 1939-50.
295. Chen, M.Y., et al., *Role of Sodium-Hydrogen Exchanger-1 (NHE-1) in the Effect of Exercise on Intermittent Hypoxia-Induced Left Ventricular Dysfunction*. Chin J Physiol, 2015. **58**(4): p. 254-62.
296. Chen, T.I. and M.Y. Chen, *Zinc Is Indispensable in Exercise-Induced Cardioprotection against Intermittent Hypoxia-Induced Left Ventricular Function Impairment in Rats*. PLoS One, 2016. **11**(12): p. e0168600.
297. Bell, R.M., M.M. Mocanu, and D.M. Yellon, *Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(6): p. 940-50.
298. Ferrari, R., et al., *[Effect and action mechanism of hypothermia to preserve the ischaemic myocardium (author's transl)]*. G Ital Cardiol, 1980. **10**(11): p. 1496-507.
299. Schwarz, E.R., et al., *What is the required reperfusion period for assessment of myocardial infarct size using triphenyltetrazolium chloride staining in the rat?* J Thromb Thrombolysis, 2000. **10**(2): p. 181-7.
300. Pfeffer, M.A., et al., *Myocardial infarct size and ventricular function in rats*. Circ Res, 1979. **44**(4): p. 503-12.
301. Litwin, S.E., et al., *Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat*. Circulation, 1994. **89**(1): p. 345-54.
302. Malliani, A., et al., *Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain*. Circulation, 1991. **84**(2): p. 482-92.
303. Burkhoff, D., *Mechanical properties of the heart and its interaction with the vascular system*. Cardiac Physiology, 2002: p. 23.
304. Werno, C., J. Zhou, and B. Brune, *A23187, ionomycin and thapsigargin upregulate mRNA of HIF-1alpha via endoplasmic reticulum stress rather than a rise in intracellular calcium*. J Cell Physiol, 2008. **215**(3): p. 708-14.
305. Florea, V.G. and J.N. Cohn, *The autonomic nervous system and heart failure*. Circ Res, 2014. **114**(11): p. 1815-26.
306. Theilade, J., et al., *Differential G protein receptor kinase 2 expression in compensated hypertrophy and heart failure after myocardial infarction in the rat*. Basic Res Cardiol, 2003. **98**(2): p. 97-103.
307. Salazar, N.C., et al., *GRK2 blockade with betaARKct is essential for cardiac beta2-adrenergic receptor signaling towards increased contractility*. Cell Commun Signal, 2013. **11**: p. 64.
308. Lymperopoulos, A., et al., *Reduction of sympathetic activity via adrenal-targeted GRK2 gene deletion attenuates heart failure progression and improves cardiac function after myocardial infarction*. J Biol Chem, 2010. **285**(21): p. 16378-86.
309. Young, T., et al., *Estimation of the clinically diagnosed proportion of sleep apnea syndrome in middle-aged men and women*. Sleep, 1997. **20**(9): p. 705-6.
310. Belaidi, E., et al., *Endoplasmic reticulum stress as a novel inducer of hypoxia inducible factor-1 activity: its role in the susceptibility to myocardial ischemia-reperfusion induced by chronic intermittent hypoxia*. Int J Cardiol, 2016. **210**: p. 45-53.
311. Bourdier, G., et al., *High-intensity training reduces intermittent hypoxia-induced ER stress and myocardial infarct size*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2016. **310**(2): p. H279-89.
312. Aslan, K., et al., *Early left ventricular functional alterations in patients with obstructive sleep apnea syndrome*. Cardiol J, 2013. **20**(5): p. 519-25.
313. Chen, Y., et al., *Left ventricular failure produces profound lung remodeling and pulmonary hypertension in mice: heart failure causes severe lung disease*. Hypertension, 2012. **59**(6): p. 1170-8.
314. Gomes, A.C., et al., *Rodent models of heart failure: an updated review*. Heart Fail Rev, 2013. **18**(2): p. 219-49.
315. Zannad, F., P. Rossignol, and W. Iraqi, *Extracellular matrix fibrotic markers in heart failure*. Heart Fail Rev, 2010. **15**(4): p. 319-29.

316. Kubota, T., et al., *Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha*. *Circ Res*, 1997. **81**(4): p. 627-35.
317. Dickstein, K., et al., *ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM)*. *Eur J Heart Fail*, 2008. **10**(10): p. 933-89.
318. Ciolac, E.G., et al., *Effects of high-intensity aerobic interval training vs. moderate exercise on hemodynamic, metabolic and neuro-humoral abnormalities of young normotensive women at high familial risk for hypertension*. *Hypertens Res*, 2010. **33**(8): p. 836-43.
319. Miletich, D.J., et al., *The effect of ketamine on catecholamine metabolism in the isolated perfused rat heart*. *Anesthesiology*, 1973. **39**(3): p. 271-7.
320. Penela, P., et al., *Mechanisms of regulation of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and cardiovascular disease*. *Cardiovasc Res*, 2006. **69**(1): p. 46-56.
321. Penela, P., et al., *Degradation of the G protein-coupled receptor kinase 2 by the proteasome pathway*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(52): p. 35238-44.
322. Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease*. *Annu Rev Physiol*, 2014. **76**: p. 39-56.
323. Holscher, M., et al., *Unfavourable consequences of chronic cardiac HIF-1alpha stabilization*. *Cardiovasc Res*, 2012. **94**(1): p. 77-86.
324. Bekeredjian, R., et al., *Conditional HIF-1alpha expression produces a reversible cardiomyopathy*. *PLoS One*, 2010. **5**(7): p. e11693.
325. Li, G., et al., *Admission hypoxia-inducible factor 1alpha levels and in-hospital mortality in patients with acute decompensated heart failure*. *BMC Cardiovasc Disord*, 2015. **15**: p. 79.
326. Doroudgar, S. and C.C. Glembotski, *New concepts of endoplasmic reticulum function in the heart: programmed to conserve*. *J Mol Cell Cardiol*, 2013. **55**: p. 85-91.
327. Liu, Y., et al., *Reduced endoplasmic reticulum stress might alter the course of heart failure via caspase-12 and JNK pathways*. *Can J Cardiol*, 2014. **30**(3): p. 368-75.
328. Luo, T., et al., *Attenuation of ER stress prevents post-infarction-induced cardiac rupture and remodeling by modulating both cardiac apoptosis and fibrosis*. *Chem Biol Interact*, 2015. **225**: p. 90-8.
329. George, I., et al., *beta-adrenergic receptor blockade reduces endoplasmic reticulum stress and normalizes calcium handling in a coronary embolization model of heart failure in canines*. *Cardiovasc Res*, 2011. **91**(3): p. 447-55.
330. Luo, G., et al., *Ablation of C/EBP homologous protein increases the acute phase mortality and doesn't attenuate cardiac remodeling in mice with myocardial infarction*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. **464**(1): p. 201-7.
331. Shimazaki, M., et al., *Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction*. *J Exp Med*, 2008. **205**(2): p. 295-303.
332. Zhuo, X.Z., et al., *Isoproterenol instigates cardiomyocyte apoptosis and heart failure via AMPK inactivation-mediated endoplasmic reticulum stress*. *Apoptosis*, 2013. **18**(7): p. 800-10.
333. Cheong, H.I., et al., *Hypoxia sensing through beta-adrenergic receptors*. *JCI Insight*, 2016. **1**(21): p. e90240.
334. Dalal, S., et al., *Beta-adrenergic receptor stimulation induces endoplasmic reticulum stress in adult cardiac myocytes: role in apoptosis*. *Mol Cell Biochem*, 2012. **364**(1-2): p. 59-70.
335. Chao, Y.M., M.D. Lai, and J.Y. Chan, *Redox-sensitive endoplasmic reticulum stress and autophagy at rostral ventrolateral medulla contribute to hypertension in spontaneously hypertensive rats*. *Hypertension*, 2013. **61**(6): p. 1270-80.
336. Lai, C.J., et al., *Enhanced sympathetic outflow and decreased baroreflex sensitivity are associated with intermittent hypoxia-induced systemic hypertension in conscious rats*. *J Appl Physiol* (1985), 2006. **100**(6): p. 1974-82.

