



HAL
open science

Rôle de l'hypoxia-inducible factor-1 dans la susceptibilité myocardique à l'ischémie-reperfusion induite par l'hypoxie intermittente

Sophie Moulin

► **To cite this version:**

Sophie Moulin. Rôle de l'hypoxia-inducible factor-1 dans la susceptibilité myocardique à l'ischémie-reperfusion induite par l'hypoxie intermittente. Physiologie [q-bio.TO]. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAV034 . tel-02048461

HAL Id: tel-02048461

<https://theses.hal.science/tel-02048461>

Submitted on 25 Feb 2019

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Physiologie, Physiopathologie, Pharmacologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Sophie MOULIN

Thèse dirigée par **Pr. Diane GODIN-RIBUOT**,
codirigée par **Dr. Elise BELAIDI**,

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

Rôle de l'*hypoxia-inducible factor-1* dans la susceptibilité myocardique à l'ischémie-reperfusion induite par l'hypoxie intermittente

Thèse soutenue publiquement le **5 novembre 2018**,
devant le jury composé de :

Mr Jeremy FAUCONNIER

CRCN CNRS, Université de Montpellier, Rapporteur

Mr Michel GALINIER

PU-PH, Université Paul Sabatier, CHU Toulouse, Rapporteur

Mr Henri BENOIT

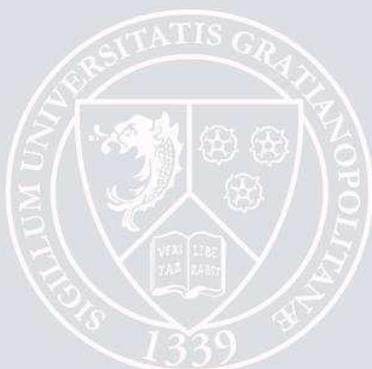
PU, Université Grenoble Alpes, Président

Mme Sophie GIORGETTI-PERALDI

CR Inserm, Université Nice, Examinatrice

Mr Jean-Louis PEPIN

PU-PH, Université Grenoble Alpes, CHU Grenoble Alpes, Examineur



Rôle de l'*hypoxia-inducible factor-1* dans la susceptibilité myocardique à l'ischémie-reperfusion induite par l'hypoxie intermittente

Résumé : Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) est un problème de santé publique majeur qui est considéré comme un facteur indépendant de risque de survenue d'un infarctus du myocarde (IM). Les altérations cardiovasculaires associées au SAOS sont principalement dues à l'hypoxie intermittente (HI) chronique. En particulier, l'HI induit l'activation du facteur de transcription *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1), susceptible d'être impliqué dans la vulnérabilité accrue du myocarde à l'ischémie-reperfusion. L'objectif de cette thèse était d'étudier le rôle de HIF-1 dans les mécanismes induits par l'HI et impliqués dans l'augmentation de la taille de l'infarctus suite à une ischémie-reperfusion. Ces travaux ont mis en évidence deux nouveaux effets délétères de l'HI, à savoir l'induction d'un stress du réticulum endoplasmique (RE) et d'altérations mitochondriales. A travers, l'inhibition génétique et/ou pharmacologique de HIF-1, nous avons montré que HIF-1 apparaît comme un acteur primordial dans l'ensemble des mécanismes délétères de l'HI, incluant ceux découverts lors de cette thèse. De plus, HIF-1 joue un rôle majeur dans l'augmentation de la taille de l'IM induite par l'HI chronique. Parallèlement, son activation myocardique est corrélée à l'index d'apnées-hypopnées chez des patients apnéiques atteints d'une maladie coronarienne (comparativement aux non-apnéiques). Par conséquent, l'activation de HIF-1 pourrait être utilisée comme marqueur diagnostique du SAOS chez les patients à risque cardiovasculaire. HIF-1 pourrait également représenter une cible pour le développement de nouvelles thérapies complémentaires ou substitutives aux traitements actuels.

Mots clés : *hypoxia-inducible factor-1*, syndrome d'apnées obstructives du sommeil, hypoxie intermittente, infarctus du myocarde, stress du réticulum endoplasmique, mitochondrie, *mitochondria-associated ER membranes*

Role of hypoxia-inducible factor-1 in myocardial susceptibility to ischemia-reperfusion induced by intermittent hypoxia

Summary: Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) is a major public health problem that is considered an independent risk factor for the occurrence of myocardial infarction (MI). The cardiovascular alterations associated with OSA are mainly due to the chronic intermittent hypoxia (IH). In particular, activation by IH, the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) transcription factor likely contributes to enhance myocardial vulnerability to ischemia-reperfusion injury. The aim of this thesis was to study the role of HIF-1 in the mechanisms involved in the increase in MI induced by chronic IH. This work has highlighted two new deleterious consequences of IH exposure, namely endoplasmic reticulum (ER) stress and mitochondrial alterations. Through genetic and/or pharmacological inhibition of HIF-1, we have shown that HIF-1 appears to be a primordial actor in all the deleterious mechanisms of IH, including those discovered during this thesis. HIF-1 also appears to play a major role in the IH-induced increase in MI size. In parallel, its myocardial activation is correlated with the apnea-hypopnea index in apnoeic, compared to non-apnoeic, patients with coronary heart disease. Therefore, HIF-1 activation could serve as a diagnostic marker of OSA in patients with cardiovascular risk. HIF-1 could also be a target for new therapeutic approaches, in complement or replacement of standard treatments.

Key words: hypoxia-inducible factor-1, obstructive sleep apnea syndrome, intermittent hypoxia, myocardial infarction, endoplasmic reticulum stress, mitochondria, mitochondria-associated ER membranes

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
REMERCIEMENTS	4
LISTE DES ABREVIATIONS	6
LISTE DES FIGURES.....	8
INTRODUCTION	9
1. Infarctus du myocarde	10
a. Prévalence et facteurs de risque.....	10
b. Définition et physiopathologie.....	10
c. Taille de l'infarctus	12
d. Acteurs cellulaires de l'ischémie-reperfusion myocardique.....	14
i. Ischémie	14
ii. Reperfusion	17
e. Mécanismes cellulaires de la réponse à l'ischémie-reperfusion	19
i. Stress du réticulum endoplasmique	20
Définition du réticulum endoplasmique	20
Définition du stress du réticulum endoplasmique.....	22
Implication dans la réponse à l'ischémie-reperfusion	25
ii. Mitochondria-associated ER membranes	27
Définition	27
Implication dans la réponse à l'ischémie-reperfusion	29
iii. Mitochondrie.....	31
Définition et métabolisme mitochondrial.....	31
Dynamique mitochondriale.....	33
Cycle du renouvellement des mitochondries	34
Implication dans la réponse à l'ischémie-reperfusion	36
2. Syndrome d'apnées obstructives du sommeil.....	38
a. Prévalence et facteurs de risque.....	38
b. Définition et physiopathologie.....	39
c. Diagnostic, critère de définition.....	40
d. Traitements	41
e. Conséquences cardiovasculaires du SAOS et de l'HI chronique	43
i. Conséquences vasculaires	43
Hypertension artérielle	43
Dysfonction endothéliale	44
Athérosclérose	44
ii. Conséquences cardiaques.....	45
Arythmies	45
Infarctus du myocarde	45
Remodelage ventriculaire	46
Insuffisance cardiaque	46
f. SAOS, HI chronique et mécanismes principaux	48
i. Activation sympathique.....	48
ii. Inflammation	48

iii.	Stress oxydant	49
iv.	Hypoxia-inducible factor-1	50
	Définition	50
	Régulation	52
	Implication de HIF-1 dans la réponse à l'HI chronique	54
3.	Objectifs	59
MATERIEL ET METHODES	62
1.	Design expérimentaux.....	63
a.	Etude 1.....	63
b.	Etude 2.....	64
c.	Etude 3.....	65
2.	Matériel	66
a.	Patients atteints d'une maladie coronarienne avec ou sans apnées du sommeil... 66	
b.	Animaux.....	66
3.	Méthodes	67
a.	Modèle d'exposition à l'hypoxie intermittente	67
b.	Ischémie-reperfusion <i>in vivo</i> et taille de l'infarctus.....	68
c.	Isolation des cardiomyocytes de souris adultes	68
i.	Flux calciques inter-organites	69
ii.	Proximity Ligation Assay par la méthode Duolink®	70
d.	Isolation de mitochondries de cœur	70
i.	Consommation d'oxygène	71
ii.	Production de peroxyde d'hydrogène	71
iii.	Potentiel de membrane	71
v.	Dosage de l'activité de la citrate synthase.....	72
vi.	Dosage de l'activité des complexes mitochondriaux.....	73
e.	Histologie.....	74
i.	Microscopie électronique à transmission.....	74
ii.	Coloration au dihydroéthidium	74
iii.	Immunohistochimie	75
f.	Biologie des protéines	76
i.	Extraction de protéines	76
ii.	Western Blot.....	76
iii.	Co-immunoprécipitation	77
g.	Biologie moléculaire de l'ADN.....	78
i.	Extraction de l'ARN	78
ii.	PCR quantitative en temps réel couplé à une transcription réverse (RT-qPCR) 78	
h.	Analyses statistiques	79
RESULTATS	80
1.	Etude 1 : Rôle de HIF-1 dans l'altération des MAM, le stress du RE et l'augmentation de la taille d'infarctus induits par l'HI chronique.....	81
2.	Etude 2 : Rôle de HIF-1 dans les altérations mitochondriales induites par l'HI chronique	121
a.	Dysfonction mitochondriale.....	124
b.	Altérations de la dynamique et du renouvellement des mitochondries.....	128
c.	Activation de l'AMPK et effet bénéfique de la metformine	130

3. Etude 3 : Rôle de HIF-1 dans les mécanismes d'adaptation délétères induits par l'HI chronique. Effets d'un inhibiteur de l'activité de HIF-1, la curcumine.....	133
a. Curcumine et taille de l'infarctus	135
b. Curcumine et mécanismes délétères de l'HI.....	135
DISCUSSION	138
1. Axe « HIF-1 - stress du RE » en HI chronique	140
a. HI, stress du RE	140
a. HI, HIF-1, stress du RE	141
b. HI, HIF-1, stress du RE, taille de l'infarctus.....	142
c. SAOS, HIF-1, stress du RE	142
2. Rôle de HIF-1 dans l'altération des MAM et de l'homéostasie calcique induite par l'HI chronique	143
a. HI, MAM, homéostasie calcique	143
b. HI, HIF-1, MAM, homéostasie calcique.....	146
3. Rôle de HIF-1 dans la dysfonction mitochondriale et la mitophagie induites par l'HI chronique	147
a. HI, fonction mitochondriale	147
b. HI, HIF-1, fonction mitochondriale.....	148
c. HI, biogénèse et dynamique	149
d. HI, HIF-1, dynamique.....	150
e. HI, mitophagie	151
f. HI, HIF-1, mitophagie.....	152
4. HI chronique et altérations mitochondriales, effets protecteurs de la metformine. 153	
a. HI, AMPK.....	153
b. HI, metformine, taille de l'infarctus	154
c. HI, metformine, dynamique et mitophagie	154
5. Rôle pivot de HIF-1 dans la susceptibilité myocardique à l'ischémie-reperfusion, induite par l'HI chronique	156
a. Mécanismes de l'HI	156
b. HI, curcumine, HIF-1	157
a. HI, curcumine, taille de l'infarctus	158
6. Conclusion	160
BIBLIOGRAPHIE	162
ANNEXE	187
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	201

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier le **Dr. Jeremy FAUCONNIER** et le **Pr. Michel GALINIER** d'avoir acceptés d'être rapporteurs de ma thèse et de m'avoir donnés leur regard d'expert sur mon travail.

Merci au **Pr. Henri BENOIT** d'avoir accepté de présider ce jury de thèse, en représentant l'Université Grenoble Alpes.

Je remercie le **Dr. Sophie GIORGETTI-PERALDI** pour l'intérêt qu'elle a porté à mon travail, en participant chaque année à mes comités de suivi de thèse et en acceptant d'examiner celle-ci.

Mes remerciements vont aussi au **Pr. Jean-Louis PEPIN**, examinateur dans ce jury et directeur du laboratoire HP2, pour m'avoir accueilli dans le laboratoire et donné les moyens de réaliser cette thèse dans d'excellentes conditions.

Merci à ma co-directrice, la **Pr. Diane GODIN-RIBUOT**, de m'avoir intégrée dans son équipe, de son suivi et de sa disponibilité tout au long de ma thèse.

Mes plus grands remerciements vont au **Dr. Elise BELAIDI**, co-directrice de ma thèse. Merci de m'avoir fait partager ton dynamisme, ta persévérance, ton amour de la recherche, et aussi de l'enseignement. Ton encadrement m'a permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions.

Je remercie l'ensemble de l'équipe fondamentale du laboratoire, et en particulier **Claire** pour tes conseils lors de nos réunions hebdomadaires, le **Pr. Christophe RIBUOT** d'avoir été mon tuteur pour l'enseignement, tous les membres du personnel technique ayant contribué à mes travaux (**Sophie, Emeline, Sandrine, Brigitte, Guillaume**), ainsi qu'**Audrey** pour ta disponibilité.

Merci aux **Dr. Marion PAULY, Dr. Hervé DUBOUCHAUD, Dr. Fred LAMARCHE** et **Dr. Guillaume VIAL** pour leurs aides lors de la réalisation des expérimentations au laboratoire LBFA.

Je remercie les doctorants passés et présents (**Amandine, Jessica, Marielle, Guillaume, Mélanie, Maximin, Yann**), ce fut un plaisir de partager des moments au laboratoire comme à l'extérieur. Merci spécifiquement à **Amandine**, tu as été ma grande sœur de la recherche, même à l'autre bout du monde.

Merci aux étudiants que j'ai encadré pour leur participation à ce travail (**Oscar, Marie, Martin, Chloé**).

Un grand merci à tous **mes amis**, pour leur soutien et leur présence au quotidien.

Je tiens à profondément remercier **ma famille** qui a toujours été là pour moi, dans les bons et les mauvais moments. Merci d'avoir partagé et participé à ce long parcours. Votre fierté, votre confiance et votre soutien ont été un moteur pour moi. C'est aussi grâce à vous que j'en suis arrivé là. Je vous en suis très reconnaissante.

Enfin, merci à **Benoit**, mon pilier de chaque jour. Merci pour ta patience et ton soutien.

LISTE DES ABREVIATIONS

4PBA : 4-phenylbutyrate	ERRs : estrogen-related receptors
acétyl-CoA : acétylcoenzyme A	ERSE : endoplasmic reticulum stress response element
ADP : adénosine biphosphate	ET-1 : endothéline 1
Ambra1 : <i>activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1</i>	FADH₂ : flavine adénine dinucléotide
AMPK : AMP-activated protein kinase	FCCP : p-trifluoromethoxy-carbonyl-cyanide-phenyl hydrazone
ASK1 : apoptosis signal regulating kinase 1	FDH : fumarate hydratase
ATF : activating transcription factor	FIH : facteur d'inhibition de HIF-1
ATP : adénosine triphosphate	FiO₂ : fraction inspirée en oxygène
Bak : Bcl-2 homologous antagonist killer	Fis1 : mitochondrial fission 1 protein
Bax : Bcl-2-associated X	FUNDC1 : fun14 domain containing 1
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2	G : glutamate
Bim : Bcl-2-like protein 11	Grp75 : glucose-regulated protein 75 kDa
Bip : <i>immunoglobulin-binding protein</i>	Grp78 : glucose-regulated protein 78 kDa
BNIP3 : Bcl2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3	GSK3β : <i>glycogen synthase kinase 3</i>
BNIP3L : Bcl2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like	H⁺ : proton
BSA : sérum bovin d'albumine	H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
Ca²⁺ : ion calcium	HCO₃⁻ : ion bicarbonate
CaMK : protéines kinases Ca ²⁺ /calmoduline-dépendantes	HI : hypoxie intermittente
CBP : p300/Creb-Binding Protein	HIF : hypoxia-inducible factor
CAGB : pontage aortocoronarien	HIF-1 : hypoxia-inducible factor 1
CHOP : <i>C/EBP homologous protein</i>	HLH : basic-helix-loop-helix
CK1δ : casein kinase 1δ	HRE : hypoxia response element
CRC : capacité de rétention calcique	HRP : peroxydase de raifort
CsA : cyclosporine A	hsp90 : heat shock protein 90
CypD : cyclophiline D	HTA : hypertension artérielle
DAG : diacylglycérol	IAH : index apnées-hypopnées
DCIP : 2,6-dichlorophenolindophenol	ID : domaine d'inhibition
DHE : dihydroéthidium	IDH : isocitrate déshydrogénase
Drp1 : dynamin related protein 1	IM : infarctus du myocarde
DTT : dithiothreitol	IP3 : inositol 1,4,5-triphosphate
EEG : électroencéphalogramme	IP3R : inositol 1,4,5-trisphosphate receptor
eIF2α : eukaryotic initiation factor 2	IRE1 : inositol requirement enzyme 1
ELISA : <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	IRF : interferon regulatory factor
Elongin BC/Cul/Rbx1 : Elongin BC/Cullin/RING domain protein 1	ISGF3 : interferon-stimulated gene factor 3
EMG : électromyogramme	JNK : c-Jun N-terminal kinases
EPO : érythropoïétine	K⁺ : ion potassium
ERAD : endoplasmic reticulum-associated degradation	LC3 : <i>microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>
ERO : espèces réactives de l'oxygène	LSD1 : lysine-specific demethylase-1
	M : malate
	MAM : mitochondria-associated ER membranes
	MAPK : <i>mitogen-activated protein kinases</i>

MARCH5 : ubiquitin ligase membrane-associated RING-CH protein 5
MCU : *mitochondrial calcium uniporter*
Mff : mitochondrial fission factor
Mfn : mitofusine
MiD : mitochondrial dynamics proteins
mTOR : mammalian target of rapamycin
N : normoxie
Na⁺ : ion sodium
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NCX : échangeur ion soduim/ion calcium
NF-κB : nuclear factor kappa B
NHE : échangeur ion soduim/proton
NQO1 : NADPH quinone oxidoreductase 1
NRF : nuclear respiratory factors
NRF1 : NF-E2-related factor 1
O₂ : dioxygène
O₂⁻ : anions superoxyde
OCT : *Optimal Cutting Temperature*
ODD : oxygen degradation domain
OMS : organisation mondiale de la santé
OPA1 : optic atrophy 1
OXPHOS : phosphorylation oxydative
p38 : p38 mitogen-activated protein kinases
PAS : *Per-Arnt-Sim*
PCAF : p300/CBP-associated factor
PCR : polymerase chain reaction
PERK : protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase
PGC-1α : peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1α
PHD : prolyl-4-hydroxylases
PI3K : phosphoinositide 3-kinase
Pink1 : *PTEN-induced putative kinase 1*
PIP₂ : phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PKC : protéine kinase C
PLA : Proximity Ligation Assay
PLB : phospholamban
PLC : phospholipase C
PLK3 : polo-like kinase 3
PPARs : peroxisome proliferator-activated receptors
PPC : pression positive continue
PTPIP51 : protein tyrosine phosphatase-interacting protein-51
PTPm : pore de transition de perméabilité mitochondriale
pVHL : peptide Von Hippel-Lindeau
RACK1 : receptor for activated C kinase 1
RCR : respiratory control rate
RE : réticulum endoplasmique
REL : réticulum endoplasmique lisse
RER : réticulum endoplasmique rugueux
RS : réticulum sarco/endoplasmique
RSUME : RWD-containing SUMOylation enhancer
RT-qPCR : PCR quantitative en temps réel couplé à une transcription réverse
RyR : récepteurs à la ryanodine
S : succinate
SAOS : syndrome d'apnées obstructives du sommeil
SDB : sleep disordered-breathing
SDH : succinate déshydrogénase
SENP : sentrin/SUMO-specific protease
SERCA : pompe sarco/endoplasmique Ca²⁺-ATPase
Sirt : sirtuine
STAT : signal transducteur and activator of transcription
SUMO1 : sumoylation par small ubiquitin-like modifier type 1
TAD : domaines d'activation de la traduction
TBARS : thiobarbituric acid reactive substances
Tfam : mitochondrial transcription factor A
TMPD : N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine
TMRM : tétraméthylrodamine
TRAF2 : TNF receptor associated 2
TUDCA : acide tauroursodésoxycholique
UPR : unfolded protein response
VAPB : vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C
VDAC : *voltage-dependent anion channel 1*
VEGF : vascular endothelial growth factor
WT : wild-type
XBP1 : X-box binding protein 1

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Classification de l'infarctus du myocarde	11
Figure 2 : Coupes de cœur illustrant la propagation de la mort cellulaire	13
Figure 3 : Modifications des échanges ioniques pendant l'ischémie	15
Figure 4 : Lésions du myocarde induites par l'ischémie-reperfusion	16
Figure 5 : Structure du réticulum endoplasmique dans une cellule myocardique.....	22
Figure 6 : Activation de la réponse UPR suite à un stress du réticulum endoplasmique,	25
Figure 7 : L'échanges de lipides et de calcium au niveau des MAM.....	28
Figure 8 : Le métabolisme mitochondrial	32
Figure 9 : La biogénèse, la fusion, la fission et la mitophagie.....	39
Figure 11 : Tracé d'enregistrement polysomnographique	41
Figure 12 : Régulation de l'activité du facteur de transcription HIF-1 α par le taux d'O ₂	51
Figure 13 : Structure de HIF-1 α et sa régulation.....	53
Figure 14 : Les différentes voies de signalisation régulant l'activation de HIF-1 α en HI	55
Figure 15 : Les mécanismes physiopathologiques du SAOS et de l'HI chronique	57
Figure 16 : Design expérimental de l'étude 1	63
Figure 17 : Design expérimental de l'étude 2	64
Figure 18 : Design expérimental de l'étude 3	65
Figure 19 : Dispositif d'exposition à l'HI de rongeurs	67
Figure 20 : Tableau des anticorps primaires utilisés en Western Blot.....	77
Figure 21 : Design expérimental et méthodologie de l'étude 1.	83
Figure 22 : Schéma de conclusion de l'étude 1.....	120
Figure 23 : Design expérimental et méthodologie de l'étude 2	123
Figure 24 : HI, HIF-1 et fonction mitochondriale.....	125
Figure 25 : HI, HIF-1 et capacité de rétention calcique.....	126
Figure 26 : HI, HIF-1 et expression des complexes mitochondriaux.....	127
Figure 27 : HI, HIF-1 et activité des complexes mitochondriaux	127
Figure 28 : HI, HIF-1 et biogénèse, dynamique	128
Figure 29: HI, HIF-1 et mitophagie.	129
Figure 30 : HI, HIF-1 et AMPK.....	130
Figure 31 : HI, metformine, dynamique.....	131
Figure 32 : HI, metformine, mitophagie.....	131
Figure 33 : Schéma de conclusion de l'étude 2.....	132
Figure 34 : Design expérimental et méthodologie de l'étude 3	134
Figure 35 : HI, curcumine, taille d'infarctus	135
Figure 36 : HI, HIF-1 et curcumine.....	136
Figure 37 : Schéma de conclusion de l'étude 3.....	137
Figure 38 : HI, HIF-1 et stress oxydant	149
Figure 39 : Schéma de conclusion de la thèse	161
Figure 40: Schéma de conclusion de l'étude en annexe.....	200

INTRODUCTION

1. Infarctus du myocarde

a. Prévalence et facteurs de risque

D'après l'organisation mondiale de la santé (OMS), les maladies cardiovasculaires restent la première cause mondiale de morbidité et mortalité avec 17,7 millions de personnes décédées chaque année, soit 31% des décès [1]. En particulier, l'infarctus du myocarde (IM) est responsable de 7 millions de décès par an. En France, entre 2000 et 2007, plus de 25 000 évènements d'IM diagnostiqués et autres décès d'origine coronaire ont été recensés chez des personnes de 35 à 74 ans. Dans cette étude, 55% des cas étaient des IM diagnostiqués, les autres étant des décès d'origine coronarienne sans IM avec antécédents de maladie coronarienne, ou des décès sans antécédents de maladie coronarienne et sans autre cause évidente de décès ou encore des décès avec des données insuffisantes. De plus, parmi les IM diagnostiqués, 86% des personnes n'avaient pas d'antécédents connus d'IM [2].

L'étude de Framingham [3] a mis en évidence de nombreux facteurs de risque d'IM, tels que le sexe, l'âge, les antécédents familiaux, le tabac, le diabète, le syndrome métabolique, l'hypertension artérielle ou encore la cholestérolémie. Récemment, le syndrome d'apnées obstructives du sommeil a aussi été identifié comme un facteur de risque indépendant d'IM [4].

b. Définition et physiopathologie

En 2000, la première définition mondiale de l'IM a été publiée par un groupe de travail (*Task Force*) en cardiologie, constitué par l'*American College of Cardiology* et l'*American Heart Association*. Avec le développement de nouvelles technologies de diagnostic et de pronostic, cette définition a été affinée plusieurs fois en moins de 20 ans, et une classification des infarctus est apparue. L'IM est défini comme la mort des cardiomyocytes suite à une ischémie prolongée, résultant d'un déséquilibre de l'apport sanguin et de la demande nécessaire au fonctionnement du myocarde [5]. Cette ischémie est due à un rétrécissement ou à une obstruction de la lumière d'une artère coronaire, entraînant une réduction ou une

interruption du débit sanguin.

La plupart des IM sont de type I. Ces IM découlent d'une pathologie vasculaire, l'athérosclérose. En effet, l'athérosclérose est caractérisée par la formation de plaques d'athérome dans les artères, entraînant un rétrécissement de la lumière du vaisseau. La plaque d'athérome peut se fissurer, s'éroder ou se rompre, engendrant la formation d'un thrombus dans la circulation sanguine. Ce thrombus est à l'origine d'une occlusion artérielle, provoquant une ischémie myocardique, puis la mort cellulaire (Figure 1).

L'IM de type II, également appelé IM secondaire, est causé par une inadéquation entre les apports et la demande myocardique en oxygène et en nutriments. Ce déséquilibre est notamment lié à une anémie, une hypertension ou à un rétrécissement de la lumière de l'artère coronaire, engendré par une plaque d'athérome stable, un vasospasme, une dysfonction endothéliale (Figure 1). L'IM de type III est la mort subite cardiaque, caractérisée par des symptômes cliniques d'IM, comme une élévation du segment ST sur l'ECG ou un bloc de branche gauche, sans élévations des biomarqueurs (décès avant prélèvement ou prélèvement trop précoce). Les IM de type IV et V sont des complications associées à des chirurgies, tel qu'une angioplastie (IVa), une thrombose de stent (IVb) ou un pontage aortocoronarien (CAGB, V) [1].

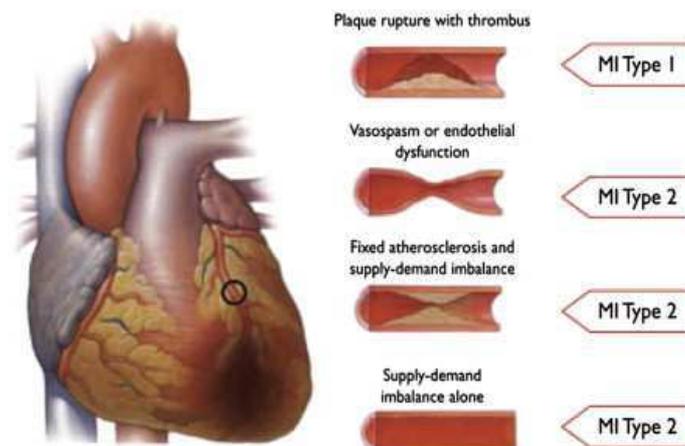


Figure 1: Classification de l'infarctus du myocarde (MI) en classe 1 ou 2 selon l'origine de l'ischémie, d'après Thygesen et al. [6].

Le diagnostic et la classification de l'IM sont basés sur l'évaluation des symptômes cliniques (douleurs thoraciques, dans les membres, nausées, vomissements...), le dosage de

biomarqueurs sanguins (troponine cardiaque I et T, fraction muscle-cerveau (MB) de la créatine kinase), le suivi électrocardiographique, et l'imagerie (échographie IRM, SPECT...).

La mort cellulaire engendrée par l'IM n'est pas immédiate, elle peut apparaître après plusieurs heures [6]. L'étendue de la mort cellulaire définit la taille de l'infarctus et dépend de divers facteurs.

c. Taille de l'infarctus

La taille d'infarctus est définie par la zone de cellules mortes suite à l'ischémie et à la reperfusion du myocarde. Elle est également souvent appelée zone nécrosée. La mort cellulaire a lieu de différentes manières, elle peut être due à une apoptose, une nécrose ou à une autophagie des cellules.

L'apoptose est caractérisée par une condensation et un fractionnement de la chromatine, un rétrécissement des cellules et, une fragmentation en corps apoptotiques qui seront éliminés par les macrophages [7].

La nécrose est liée au gonflement mitochondrial engendré par l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTPm, mécanisme détaillé par la suite). La rupture de la membrane mitochondriale déclenche une perte de l'intégrité de la cellule et une nécrose cellulaire [7].

Bien que les voies de signalisation de l'apoptose et la nécrose soient différentes, elles comportent des étapes identiques, telle que l'activation des caspases. Ainsi la chronologie de leur activation et la prépondérance d'un mécanisme sur l'autre pendant l'ischémie ou la reperfusion restent encore mal définies [7, 8].

L'autophagie est un mécanisme identifié plus récemment comme impliqué dans la mort cellulaire lors d'une ischémie-reperfusion. L'autophagie est caractérisée par une dégradation des cellules non fonctionnelles par les lysosomes [9].

La taille de la zone infarctée dépend de la durée d'ischémie, de la localisation et du degré d'obstruction de l'artère impliquée, et de la présence ou non de vaisseaux collatéraux.

Le dysfonctionnement cellulaire est réversible pour des ischémies de courte durée (moins de 15-20 min), au-delà il devient irréversible, entraînant la mort cellulaire [7]. Par conséquent,

comme le montre la Figure 4 (détaillée par la suite), l'expansion de la taille d'infarctus se fait proportionnellement à la durée de l'ischémie [10].

De plus, la taille de la zone nécrosée est corrélée positivement avec celle de la zone à risque [11], correspondant à la région irriguée par l'artère obstruée. Ainsi, plus la quantité de myocarde irriguée par l'artère est importante, plus la zone à risque et la taille d'infarctus seront importantes.

Tel qu'illustré ci-dessous dans la Figure 2, la mort cellulaire s'étend de l'endocarde vers l'épicarde, selon un front d'onde (*wavefront*) [12], mettant en évidence une hétérogénéité de la réponse des cellules myocardiques à un stress ischémique et ce, en fonction de leur localisation dans le cœur. Ce phénomène varie selon l'espèce et l'importance du réseau de coronaires collatérales. En effet, lorsqu'une artère est touchée par une ischémie, d'autres artères peuvent prendre le relais pour limiter l'hypoperfusion tissulaire et réduire la zone infarctée [13]. Le réseau de coronaires est plus ou moins ramifié selon les espèces ; par exemple il est bien développé chez l'Humain et peu chez la souris.

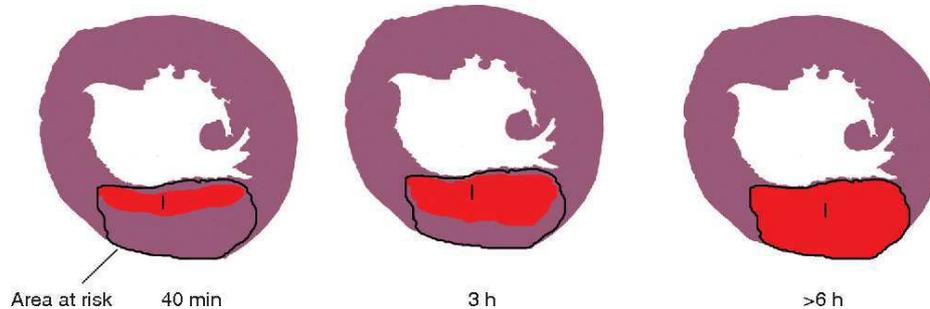


Figure 2 : Coupes de cœur illustrant la propagation de la mort des cellules myocardiques au cours de l'ischémie selon le phénomène de « *wavefront* » allant de l'endocarde vers l'épicarde, d'après Frangogianni et al. [7].

A la suite de l'infarctus, la zone nécrosée devient un tissu cicatriciel non contractile, constitué de collagène, permettant de garder l'intégrité du cœur. Ce tissu peut induire un défaut de contractilité, et engendrer un remodelage ventriculaire, pouvant aboutir au développement d'une insuffisance cardiaque [14]. La limitation de la taille de l'infarctus représente donc un enjeu important pour réduire les conséquences cardiaques.

d. Acteurs cellulaires de l'ischémie-reperfusion myocardique

L'ischémie et la reperfusion myocardique contribuent toutes les deux au développement de l'infarctus. Les principaux mécanismes cellulaires impliqués lors de ces deux phases sont décrits ci-dessous.

i. Ischémie

L'ischémie altère rapidement l'intégrité structurale du myocyte et la fonction cardiaque. Lors d'une ischémie de courte durée, le ralentissement de la fonction cardiaque permet de préserver les réserves énergétiques. Lors d'une ischémie de plus longue durée, les lésions deviennent irréversibles, provoquant la mort cellulaire [7].

Au bout de 60 secondes d'ischémie, la contractilité cardiaque diminue, malgré les nombreuses réserves en adénosine triphosphate (ATP) des cardiomyocytes. L'absence brutale d'oxygène altère le fonctionnement métabolique en passant d'un métabolisme aérobie à un métabolisme anaérobie. Le stock d'ATP est plus difficilement renouvelable. Ainsi, les cardiomyocytes tentent de produire de l'ATP différemment qu'en condition aérobie, notamment, à partir de la phosphocréatine, dont le stock est rapidement utilisé. L'absence de perfusion sanguine empêche l'apport en glucose, la production d'ATP est donc aussi réalisée à partir des stocks de glycogène par la glycolyse anaérobie. Une autre voie de production d'ATP est effectuée par l'adénylate kinase à partir de l'adénosine biphosphate (ADP) [15]. Néanmoins, l'efficacité du métabolisme anaérobie étant beaucoup plus faible que celui de la phosphorylation oxydative, l'ATP est plus vite consommé que produit. Cette réduction d'apport énergétique provoque des lésions irréversibles des cardiomyocytes. De plus, la glycolyse anaérobie entraîne une acidose intracellulaire, à cause de l'accumulation de métabolites acides (lactate, CO₂, protons). Cette glycolyse est donc ralentie au bout de 15-20 minutes d'ischémie [7].

L'acidose intracellulaire induit une activation de l'échangeur Na⁺/H⁺ (NHE, sortie d'un proton

H^+ en échange de l'entrée d'un ion sodium Na^+) (figure 3) [16]. Le pH acide active aussi le co-transporteur $Na^+-HCO_3^-$ (entrée d'un ion Na^+ et d'un ion bicarbonate, HCO_3^-) [17]. Ces deux mécanismes sont à l'origine d'une augmentation de la concentration intracellulaire de Na^+ . L'altération du fonctionnement de la pompe $Na^+/K^+-ATPase$ (sortie de 3 ions Na^+ en échange de l'entrée de 2 ions potassium, K^+) par le déficit en ATP contribue également à la surcharge sodique intracellulaire (figure 3). Cette surcharge sodique diminue l'activité de l'échangeur Na^+/Ca^{2+} (NCX, sortie d'un ion calcium, Ca^{2+} , en échange de l'entrée d'un ion Na^+) (figure 3), et favorise son fonctionnement en mode inverse, participant ainsi une surcharge calcique intracellulaire. Le déficit en ATP induit aussi la surcharge calcique intracellulaire, en réduisant l'extrusion active du calcium hors de la cellule (pompe $Ca^{2+}-ATPase$) et la recapture active du calcium dans le réticulum sarcoplasmique par la pompe sarco/endoplasmique $Ca^{2+}-ATPase$ (SERCA) (figure 2). Ces altérations de l'homéostasie ionique sont propices à l'apparition d'une hypercontracture. Elles favorisent également la survenue d'arythmies, en induisant une dépolarisation membranaire, une altération de la durée du potentiel d'action et l'apparition de post-dépolarisations [7].

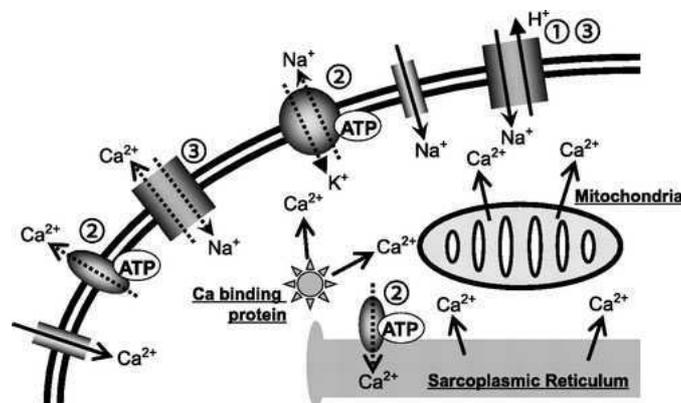


Figure 3 : Modifications des échanges ioniques pendant l'ischémie d'après Sanada et al. [16]. 1 : canaux échangeurs Na^+/H^+ , 2 : pompe $Na^+/K^+-ATPase$ et pompe $Ca^{2+}-ATPase$ de la membrane plasmique et du réticulum endoplasmique (SERCA), 3 : l'échangeur Na^+/Ca^{2+} .

De plus, lors d'une ischémie prolongée, l'acidose intracellulaire diminue la fonction contractile systolique, en inhibant la fixation du calcium sur les protéines contractiles, par compétition entre les protons et les ions Ca^{2+} [18]. L'effet délétère de l'ischémie sur la fonction contractile est également dû à une protéolyse des protéines contractiles [19].

En plus de la dysfonction systolique, nous venons de voir que l'ischémie myocardique

pouvait entraîner une dysfonction diastolique, puisqu'elle altère directement les acteurs de l'homéostasie calcique (pompe SERCA et Ca^{2+} -ATPase de la membrane plasmique). Par ailleurs, il a été montré que l'environnement hyperosmolaire diminue la compliance des ventricules [20].

Les conséquences de l'ischémie sont donc un changement métabolique et une altération de l'homéostasie ionique, provoquant des altérations de la contractilité cardiaque.

Depuis une vingtaine d'années, la taille d'infarctus n'est plus définie comme étant la zone nécrosée due aux lésions de l'ischémie, mais elle est, celle, induite par les lésions de l'ischémie et de la reperfusion (figure 4). En effet, tel qu'illustré par la figure 4, la taille d'infarctus est proportionnelle à la durée de l'ischémie sans reperfusion, elle correspond théoriquement à la zone à risque (en rouge). La reperfusion, à l'aide d'agents thrombolytiques ou par une intervention coronarienne percutanée, réduit théoriquement la taille d'infarctus (en vert), mais en réalité, les lésions myocardiques induites par la reperfusion induisent une expansion de la taille d'infarctus (en noir).

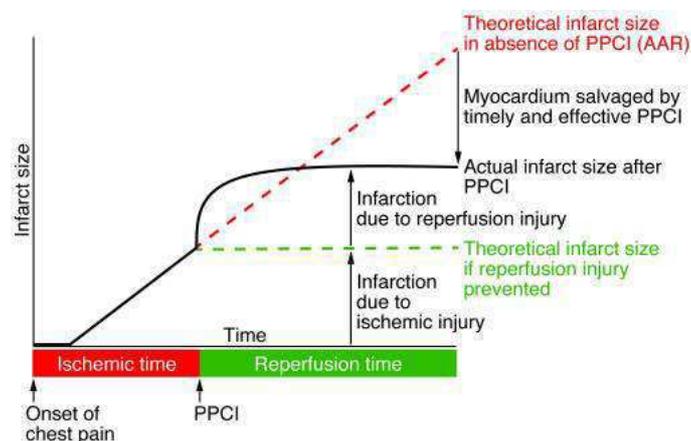


Figure 4 : Lésions du myocarde induites par l'ischémie-reperfusion, d'après Hausenloy et al. [10]. PPCI : reperfusion du myocarde par thérapie thrombolytique ou une intervention coronarienne percutanée.

ii. Reperfusion

L'unique option thérapeutique suite à une ischémie est la reperfusion. Elle est essentielle pour réduire la taille d'infarctus (figure 4), mais elle a lieu de manière brutale, avec un retour rapide de l'oxygène et des nutriments, provoquant potentiellement quatre types de conséquences myocardiques [10].

La première conséquence, réversible, est l'apparition d'arythmies ventriculaires, dont le traitement est maîtrisé [21].

La deuxième conséquence, irréversible, est le phénomène de « *no-reflow* », aussi appelé, obstruction microvasculaire. Elle est liée à un défaut de reperfusion, en raison d'une mauvaise dilatation de l'artère coronaire ou d'une compression de celle-ci par les cellules endothéliales ou les cardiomyocytes gonflés [22].

La troisième lésion de reperfusion, réversible, est la « sidération » myocardique, caractérisée par la dysfonction mécanique contractile pouvant perdurer jusqu'à plusieurs jours ou semaines après l'ischémie. Tel que décrit plus haut, cette dysfonction est causée par la surcharge calcique lors de l'ischémie [23].

La quatrième lésion de reperfusion, irréversible, est la mort de cardiomyocytes ayant survécus à l'ischémie. Cette conséquence est engendrée principalement par « les paradoxes de l'oxygène, du pH et du calcium », contribuant tous à l'ouverture du PTPm, et consécutivement à la mort des cardiomyocytes.

Le « paradoxe de l'oxygène » est lié à l'arrivée brutale d'oxygène dans la cellule, entraînant une hypercontracture et un stress oxydant. La déplétion en oxygène pendant l'ischémie et la réoxygénation rapide au début de la reperfusion provoquent une hypercontracture des myofibrilles, suivie d'une altération structurelle du sarcolemme et de la mort cellulaire. En effet, la restauration des stocks d'ATP a lieu avant le rééquilibrage ionique, notamment pour le calcium, induisant une activation de la contraction sans relâchement des sarcomères, et l'ouverture du PTPm [24]. D'autre part, l'arrivée d'oxygène induit la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dès les premières minutes de la reperfusion. Les ERO sont des espèces moléculaires oxygénées, possédant des électrons libres, les rendant hautement réactives. Ces ERO sont d'abord produits par la xanthine oxydase des cellules endothéliales puis, après plusieurs heures, par la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH)

oxydase des neutrophiles [25]. L'accumulation de ces radicaux a pour conséquence d'altérer le fonctionnement des canaux, d'endommager les membranes par la peroxydation des lipides membranaires, de dénaturer les enzymes et, de causer des lésions oxydatives à l'ADN. Les ERO déclenchent surtout l'ouverture du PTPm.

Le « paradoxe du pH » est causé par une restauration trop rapide du pH intracellulaire. Cette restauration est permise par l'élimination des protons, via l'échangeur NHE, et par l'apport des ions bicarbonates, via le symport $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ de la membrane plasmique (figure 4). Le retour à un pH physiologique active des enzymes (protéases, phospholipases) responsables d'une dégradation des membranes, contribuant à la mort cellulaire. L'augmentation également de l'activité des protéines contractiles compromet l'apport énergétique, en augmentant la demande en ATP, ce qui découple la phosphorylation oxydative mitochondriale [26]. Cette dysfonction mitochondriale participe aussi à l'ouverture du PTPm. Le « paradoxe du calcium » est dû à l'accumulation de calcium pendant l'ischémie, qui est potentialisée pendant la reperfusion. En effet, la restauration des stocks d'ATP rétablit le fonctionnement de canaux, comme les pompes SERCA, Ca^{2+} -ATPase de la membrane plasmique et Na^+/K^+ -ATPase. En revanche, le stress oxydant, en causant des dommages aux membranes et des dysfonctionnements des canaux, provoque une accumulation de calcium intracellulaire. De plus, à la reperfusion, l'échangeur NCX fonctionne en mode inverse afin d'éliminer le Na^+ , rentré avec le NHE pour restaurer le pH, induisant une entrée de calcium et aggravant l'accumulation de calcium intracellulaire [16]. La surcharge calcique intracellulaire couplée à la ré-énergisation du myocarde induit une force excessive et incontrôlable de contraction, ce qui provoque une hypercontracture des sarcomères. De plus, l'accumulation de calcium cytosolique et le rétablissement du potentiel de membrane mitochondrial à la reperfusion entraînent une entrée de calcium par le *mitochondrial calcium uniporter* (MCU) dans la mitochondrie. Etant sensible à une accumulation de calcium, le PTPm s'ouvre et induit la mort cellulaire [25], [24].

Enfin, brièvement, l'inflammation joue un rôle important dans les lésions myocardiques à la reperfusion. En effet, celle-ci déclenche une infiltration et une accumulation de neutrophiles dans le myocarde. Au début de la reperfusion, les neutrophiles sont concentrés dans la zone à risque, puis leur migration dans le myocarde est facilitée par l'augmentation de la quantité de molécules d'adhésions cellulaires (intégrines, sélectines, ICAM-1...). L'accumulation des neutrophiles peut amplifier la taille de la zone nécrosée en obstruant des vaisseaux

(ischémie secondaire), mais surtout les neutrophiles produisent des ERO, contribuant à l'ouverture PTPm, comme vu précédemment [27].

L'effecteur final des lésions de reperfusion est le PTPm. C'est un canal non sélectif, dont la structure n'est pas bien définie. L'acidose en ischémie bloque l'ouverture du PTPm [28], donc le PTPm est un acteur de la mort cellulaire spécifique de la reperfusion. Ainsi, dès le rétablissement du pH à la reperfusion, l'accumulation de calcium et la production d'ERO induisent l'ouverture du PTPm [29]. A travers le PTPm, qui laisse passer toutes les molécules inférieures à 1,5 kDa, de nombreux ions et molécules d'eau entrent dans la matrice mitochondriale. A l'inverse, des facteurs pro-apoptotiques, comme le cytochrome c de l'espace inter-membranaire, sont libérés dans le cytosol, activant la voie apoptotique des caspases [28]. Les conséquences fonctionnelles sont un découplage de la phosphorylation oxydative avec une diminution de la production d'ATP, et au niveau structurel, un gonflement et une destruction de la mitochondrie. Le relargage du contenu mitochondrial dans le cytosol provoque la mort cellulaire. Ainsi, l'ouverture du PTPm va déterminer les lésions de reperfusion [30]. A ce jour, une seule molécule est connue pour réguler l'ouverture du PTPm, la cyclophiline D (CypD). Cette protéine de la matrice mitochondriale est transloquée à la membrane mitochondriale interne pour induire l'ouverture du PTPm. De plus, son abolition génétique ou son inhibition par la cyclosporine A (CsA) retarde l'ouverture du PTPm [31, 32]. De nombreuses études chez l'animal ont montré un effet protecteur de la CsA sur l'IM [33]. Cliniquement, un effet bénéfique a été observé lors d'une étude unicentrique sur un petit nombre de patients présentant un IM [34], mais une étude multicentrique sur un grand nombre de patients n'a pas mis en évidence une action cardioprotectrice de la CsA [35].

e. Mécanismes cellulaires de la réponse à l'ischémie-reperfusion

Ces dernières années, la prise en charge des patients a bien évolué, permettant de diminuer l'incidence de l'IM, avec de nouvelles stratégies de reperfusion et de traitements pharmacologiques. En revanche, l'accroissement de l'incidence des pathologies cardiométaboliques, tels que le syndrome d'apnées du sommeil, l'obésité et le diabète,

aggrave la prévalence et la taille de l'IM. Ainsi, dans le contexte des pathologies chroniques, la recherche continue pour explorer d'autres mécanismes de la réponse à l'ischémie-reperfusion, et ceux qui font l'objet de cette thèse sont : le stress du réticulum endoplasmique associé à une perturbation de l'homéostasie calcique, une modification des points de contact entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie, et les altérations mitochondriales.

i. Stress du réticulum endoplasmique

Définition du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite intracellulaire des cellules eucaryotes, formant un réseau continu de membranes internes interconnectées, participant à de nombreuses fonctions cellulaires essentielles. Le RE peut être différencié en trois parties [36].

Le réticulum endoplasmique rugueux (RER) est sous forme de sacs entourés de ribosomes et est impliqué dans la synthèse de protéines. En effet, les protéines arrivent dans le RE sous forme de chaînes polypeptidiques dépliées. Le RE donne aux protéines leur structure 3D fonctionnelle, et permet des modifications post-traductionnelles si nécessaire. Le repliement est réalisé à l'aide de chaperonnes qui se lient aux protéines avec leur domaine hydrophobe. Les protéines sont ensuite sécrétées et envoyées vers leur localisation cellulaire. Le flux de protéines est variable, puisqu'il est ajusté en fonction des besoins cellulaires. Ainsi, l'activité du RE est régulée en permanence. Le RE participe à la maturation d'environ 30% des protéines [37, 38].

Le réticulum endoplasmique lisse (REL) est allongé et cylindrique. Il contribue à la synthèse de lipides, en contenant des enzymes clés de la synthèse des phospholipides, du cholestérol et de ses dérivés. Le REL régule aussi l'homéostasie calcique dans la cellule, en stockant le calcium et en le libérant dans le cytosol ou d'autres organites, à l'aide de protéines tampon captant le calcium dans son espace intracellulaire et d'échangeurs calciques au niveau de sa membrane.

Enfin, l'enveloppe nucléaire est aussi une extension du RE, dotées de ribosomes. Cette partie du RE contribue à réguler l'expression des gènes.

La proportion du RE ou de chacune de ces trois parties du RE varie selon le type cellulaire. Dans les cellules musculaires striés, telles que les cellules myocardiques, le REL est majoritaire et il est nommé le réticulum sarco/endoplasmique (RS). Le RS est une version morphologiquement différente du REL, spécialisé dans la régulation du calcium pour le couplage excitation-contraction. Il est composé de tubes allongés (le RS longitudinal), terminés par des bourgeons larges nommées citernes terminales (le RS jonctionnel) au niveau des invaginations de la membrane plasmiques, les tubules T (figure 5). Le tubule T et la citerne terminale forme ainsi une structure appelée diade. Le RS jonctionnel est impliqué pendant la phase de contraction musculaire, avec la présence des récepteurs à la ryanodine (RyR), qui permettent un relargage massif du calcium du RE dans le cytosol. En revanche, la phase de relaxation musculaire est permise par les pompes SERCA qui se trouvent au niveau du RS longitudinale (figure 5). D'autres échangeurs comme le canal inositol 1,4,5-*trisphosphate receptor* (IP3R) sont répartis de part et d'autres du RE [36, 39].

Dans toutes les cellules, et encore plus pour les cellules musculaires striées, la régulation du calcium du RE est un facteur majeur déterminant le bon fonctionnement de cet organe [40]. En effet, une déplétion en calcium dans le RE altère le fonctionnement de nombreuses protéines chaperonnes dépendantes du calcium, entraînant une accumulation de protéines mal conformées, et activant consécutivement le stress du RE. Ainsi, le RE est divisé en diverses parties avec des fonctions spécifiques, mais la continuité de cet organe entraîne qu'une altération d'une fonction a des répercussions sur les autres fonctions du RE.

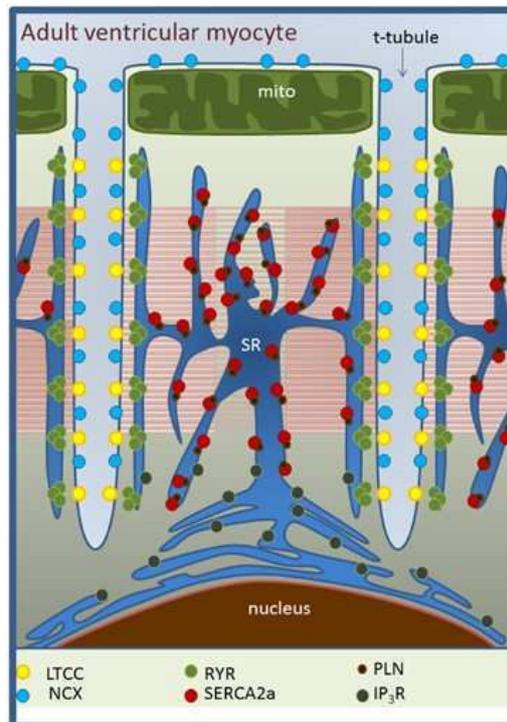


Figure 5 : Structure du réticulum endoplasmique dans une cellule myocardique, d'après Kane et al. [41]. Les récepteurs RyR sont présents au niveau du RS jonctionnel, alors que la pompe SERCA est au niveau du RS longitudinal. Le canal IP3R se trouve sur toute la continuité du RE. Les échangeurs calciques LTCC et NCX sont des canaux de la membrane plasmique.

Définition du stress du réticulum endoplasmique

Le stress du RE est activé par une accumulation de protéines mal repliées ou/et une perturbation de l'homéostasie calcique [42]. Afin de répondre à cette dysfonction du RE, des voies de signalisations intracellulaires sont stimulées et cette réponse est nommée *l'unfolded protein response* (UPR) (figure 6). Pour diminuer la quantité de protéines mal conformées, l'UPR a pour but de diminuer l'arrivée de nouvelles protéines dans le RE, via une atténuation de la synthèse protéique et une augmentation de la maturation des protéines, ou d'éliminer des protéines non réparables, par la hausse de l'activité transcriptionnelle de gènes codant pour les protéines chaperonnes ou des protéines de dégradation (*endoplasmic reticulum-associated degradation*, ERAD). Trois voies de signalisation composent la réponse UPR, chaque voie étant activée par une protéine transmembranaire du RE : *inositol requirement enzyme 1* (IRE1), *activating transcription factor* (ATF) 6 et *protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase* (PERK) (figure 6) [43].

En conditions normales, ces protéines transmembranaires sont liées à la protéine

chaperonne du RE, l'*immunoglobulin-binding protein/glucose-regulated protein 78 kDa* (Bip ou Grp78), ce qui les maintient dans un état inactif des protéines [44]. L'activité de la Grp78 est dépendante du calcium, qui capte 25% du calcium du RE [38]. La Grp78 est la protéine senseur du stress du RE, régulant l'activation des différentes voies de l'UPR. Ainsi, lors d'un stress du RE, IRE1, ATF6 et PERK sont activées par la dissociation de Grp78, qui va se fixer sur les protéines mal conformées [45].

La voie d'IRE1 est la plus conservée chez les eucaryotes [46]. IRE1 possède une double activité, de protéine kinase et d'endoribonucléase spécifique, régulée par phosphorylation. Ainsi, le détachement de Grp78 et IRE1 entraîne l'homodimérisation et l'autophosphorylation d'IRE1. IRE1 activé réalise l'épissage de l'ARNm d'un facteur de transcription nommé *X-box binding protein 1* (XBP1), induisant la traduction de la forme active de la protéine XBP1s (*spliced*) [47]. La protéine XBP1s se fixe sur les gènes cibles de la réponse UPR par reconnaissance des séquences *endoplasmic reticulum stress response element* (ERSE), dans la région promotrice des gènes. La voie d'IRE1 augmente notamment l'expression de la protéine chaperonne Grp78, des protéines de la voie de dégradation ERAD, responsable de l'export des protéines du RE vers le cytoplasme, afin qu'elles soient dégradées par le protéasome [42].

En ce qui concerne la voie d'ATF6, le détachement de Grp78 induit sa translocation vers l'appareil de Golgi par un transport vésiculaire. La protéine est alors clivée sur deux sites S1P et S2P par des protéases, libérant son fragment N-terminal [48]. Puis, la partie N-terminale d'ATF6 est transloquée dans le noyau, où elle exerce son action de facteur de transcription en se fixant sur les domaines ERSE, induisant l'expression du même type de protéines que la voie d'IRE1. De manière intéressante, ATF6 est une protéine interagissant avec la calréticuline, protéine sensible au calcium intracellulaire. Lors d'une déplétion en calcium induisant un stress du RE, l'interaction entre ATF6 et la calréticuline est réduite, participant à la translocation d'AT6 vers l'appareil de Golgi et à son activation [49].

La voie de PERK est initiée par l'homodimérisation de PERK, ainsi que son autophosphorylation par son activité protéine kinase. Phospho-PERK activé induit la phosphorylation de la sous-unité α de la protéine d'initiation *eukaryotic initiation factor 2* (eIF2 α), ce qui inhibe son activité. Ainsi, phospho-eIF2 α réduit la synthèse protéique en diminuant l'entrée des chaînes polypeptidiques dans le RE et la formation du complexe de pré-initiation de la traduction. De plus, la phosphorylation d'eIF2 α provoque l'activation du

facteur de transcription ATF4, régulant les gènes de la réponse UPR (figure 6) [42].

Ces trois voies de la réponse UPR permettent de réparer ou de dégrader les protéines mal conformées et d'atténuer la synthèse protéique. Mais si l'homéostasie du RE ne peut être rétablie, une activation prolongée du stress du RE ou un stress du RE trop intense induisent l'activation d'un signal pro-apoptotique via la réponse UPR. L'augmentation du niveau de phosphorylation d'eIF2 α et l'activation continue d'ATF4 provoquent l'activation du facteur de transcription *C/EBP homologous protein* (CHOP) [50]. CHOP régule l'activité de nombreux gènes pro-apoptotiques. Notamment son activation inhibe l'expression de la protéine anti-apoptotique *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) [51] et active la transcription et la translocation à la membrane de *Bcl-2-like protein 11* (Bim), une protéine pro-apoptotique de la famille de Bcl-2 [52]. De plus, CHOP induit un changement de conformation des protéines pro-apoptotiques *Bcl-2-associated X* (Bax) et *Bcl-2 homologous antagonist killer* (Bak) entraînant un efflux de calcium du RE vers le cytosol [53]. La hausse du calcium cytosolique active une protéase dépendante du Ca²⁺, la m-calpaïne, qui clive la procaspase-12 localisée à la membrane du RE [54]. La caspase-12 clivée active clive à son tour la procaspase-9 en caspase-9 clivée active, qui va à son tour cliver et activer la caspase-3, l'effecteur final de cette voie pro-apoptotique [55]. En plus d'ATF4, ATF6 peut activer la transcription de CHOP. Par ailleurs, IRE1 active l'apoptose par son interaction avec les protéines *TNF receptor associated 2* (TRAF2) et *apoptosis signal regulating kinase 1* (ASK1), qui stimulent les protéines *c-Jun N-terminal kinases* (JNK) et *p38 mitogen-activated protein kinases* (p38). Puis, directement ou par l'intermédiaire de la protéine Bax, ces protéines activent le facteur CHOP et, donc la cascade des caspases [56].

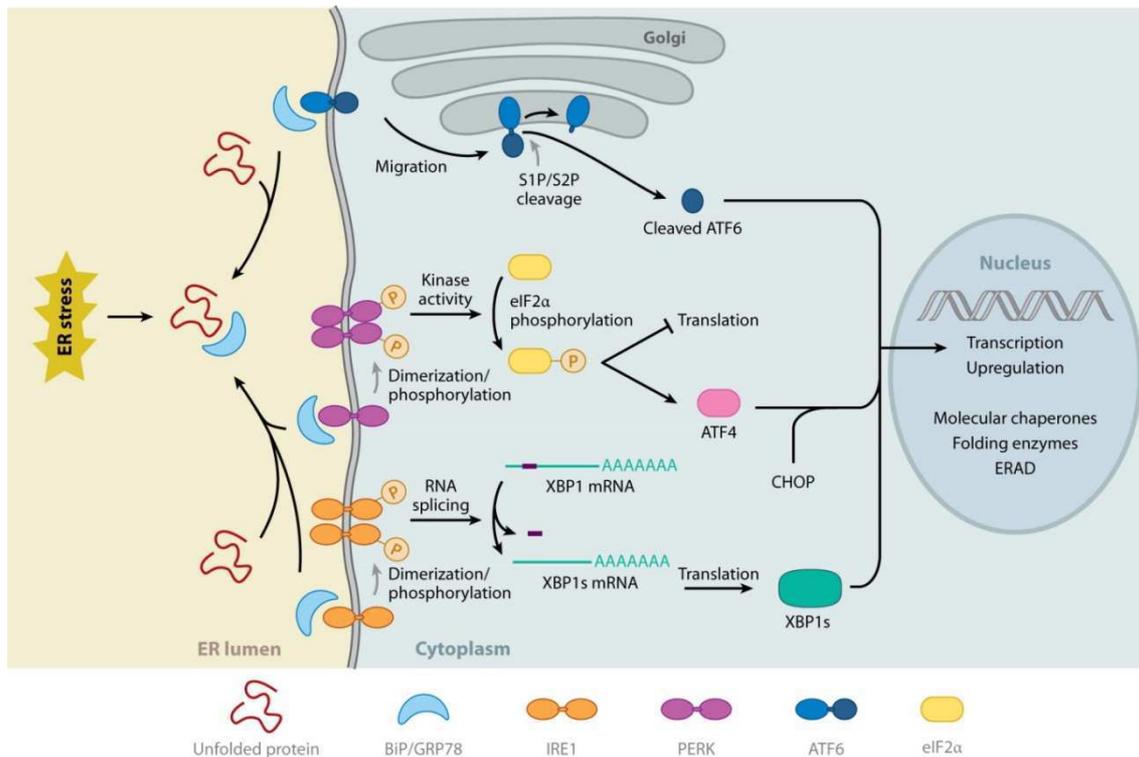


Figure 6 : Activation de la réponse UPR suite à un stress du réticulum endoplasmique, d'après Groenendyk et al. [43]. L'accumulation de protéines mal conformées dans la lumière du RE entraîne le recrutement de la protéine chaperonne GRP78 vers les protéines altérées. Le détachement de GRP78 des trois effecteurs membranaires de la réponse UPR, IRE1, ATF6 et PERK, active leurs voies de signalisation afin de restaurer l'homéostasie du RE.

Implication dans la réponse à l'ischémie-reperfusion

Le stress du RE est impliqué entre autres dans les pathologies cardiovasculaires, et en particulier dans la développement de l'IM [43]. Plusieurs publications montrent une activation du stress du RE en ischémie ou après l'ischémie-reperfusion [57-59]. Cependant, son rôle bénéfique ou délétère n'est pas clairement défini et dépend de sa durée d'activation.

La protéine senseur du stress du RE, la Grp78, a un rôle essentiel pour le système cardiovasculaire, puisque sa délétion complète entraîne de nombreux problèmes de développement embryonnaire, notamment au niveau de la cariogenèse, provoquant la mort *in utero* de l'embryon. De même sa délétion cardiaque spécifique chez la souris adulte entraîne la mort en trois semaines. Enfin, la surexpression de Grp78 induit un remodelage cardiaque pouvant aboutir à une insuffisance cardiaque [60]. L'ischémie-reperfusion

augmente l'expression de Grp78 *in vitro* et *in vivo*. De plus, lorsque Grp78 est surexprimée par un adénovirus dans des myocytes ventriculaires néonataux de rat ou par un système Cre-Lox spécifiquement dans le cœur de souris, les lésions dues à l'ischémie-reperfusion sont diminuées à travers une atténuation de la production d'ERO et une activation de la voie de signalisation Akt [61].

Comme Grp78, la voie IRE1 est aussi activée en ischémie, notamment avec la surexpression de XBP1 montrée *in vivo*, *in vitro* et dans le cœur de patients en ischémie [58, 62, 63]. La délétion cardiaque spécifique de XBP1 augmente la taille d'infarctus suite à une IR et altère la fonction cardiaque, alors que sa surexpression diminue la taille d'infarctus et améliore la fonction cardiaque.

Ensuite, la surexpression cardiaque spécifique d'ATF6 diminue les lésions induites par l'ischémie-reperfusion [64] alors que le blocage de son activité par un micro-ARN augmente la mort des cardiomyocytes néonataux de rat en réponse à l'hypoxie-réoxygénation [65].

En utilisant des modèles d'animaux transgéniques, l'ensemble des données précédentes a montré que l'activation de la Grp78 et des voies IRE1 et ATF6 est bénéfique dans la réponse à l'ischémie-reperfusion. Néanmoins, la délétion de CHOP protège le cœur en diminuant la taille d'infarctus [66], démontrant ainsi que le stress du RE peut potentiellement avoir un rôle délétère.

La voie PERK participe aussi à la réponse à l'ischémie avec une activation chronologique des éléments de la voie de signalisation en fonction de la durée de l'ischémie, d'abord la phosphorylation d'eIF2 α , puis l'augmentation de l'expression d'ATF4 et après de CHOP [67]. Ainsi, la durée de l'ischémie détermine l'effet du stress du RE, qui semble être cardioprotecteur pour une ischémie de courte durée par l'activation des voies ATF6, IRE1 et PERK-eIF2 α , et, pour des ischémies de plus longue durée, devenir pro-apoptotique avec l'activation de CHOP par la voie PERK-eIF2 α -ATF4, et également des voies ATF6 et IRE1 [68].

Ces différents travaux affirment que le stress du RE est activé lors d'une ischémie-reperfusion, mais surtout que sa régulation avant l'ischémie-reperfusion peut moduler la réponse du myocarde à ce stimuli. En effet, l'induction d'un stress du RE par divers agents pharmacologiques, tels que la tunicamycine, la thapsigargine ou encore le dithiothreitol (DTT), perturbe l'homéostasie calcique et induit un stress du RE responsable d'une augmentation de la mort cellulaire [69-71]. En revanche, l'inhibition du stress du RE par un agent pharmacologique, le 4-phenylbutyrate (4PBA), avant une ischémie-reperfusion est

cardioprotectrice [69]. Plusieurs inhibiteurs du stress du RE ont été testés chez l'animal dans le cadre de l'ischémie-reperfusion, mais aussi dans le contexte d'autres maladies cardiovasculaires, comme l'insuffisance cardiaque [56].

De plus, l'état du RE dans les cardiomyocytes peut notamment être altéré par des pathologies augmentant la susceptibilité du myocarde à l'ischémie-reperfusion. Par exemple, dans un modèle de rat diabétique, l'augmentation des marqueurs Grp78 et CHOP est associée à une aggravation de la mort cellulaire suite à une ischémie-reperfusion, et cet effet est aboli par la délétion de CHOP [72]. Un récent article suggère également qu'un stress du RE activé dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux, accroît le risque de spasme au niveau des artères coronaires, qui peut être à l'origine d'un IM [73].

Le stress du RE est donc un acteur majeur de la réponse à l'ischémie-reperfusion, en modifiant le fonctionnement des cellules cardiaques. Comme précédemment évoqué, la mitochondrie joue également un rôle majeur dans la réponse à l'IR. De plus, récemment, il a été montré que dès la phase précoce du stress du RE, les mitochondries se rapprochent du RE [74]. Ces points de contacts RE-mitochondries sont nommés les *mitochondria-associated ER membranes* (MAM) et semblent eux-aussi jouer un rôle majeur dans la réponse à l'ischémie-reperfusion.

ii. Mitochondria-associated ER membranes

Définition

Les MAM sont des rapprochements du RE et de la mitochondrie. Dans la cellule myocardique, ce rapprochement a lieu au niveau du RS longitudinal [36]. Alors que leur découverte a eu lieu depuis plus de cinquante d'années [75], l'étude approfondie de ces interactions a lieu depuis une vingtaine d'années.

Les points de contact RE-mitochondrie sont des zones membranaires avec une composition lipidique riche en cholestérol et sphingolipides, conférant à ces domaines une résistance aux détergents [76]. Cet enrichissement lipidique favorise aussi les interactions protéiques, expliquant le rôle des MAM dans de nombreuses voies de signalisation. Les MAM sont composés de plusieurs complexes protéiques.

Le complexe impliqué dans les échanges calciques entre le RE et la mitochondrie est composé du canal inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) 1 de la membrane du réticulum endoplasmique, du canal anionique *voltage-dependent anion channel* (VDAC) 1 de la membrane externe de la mitochondrie et de la protéine cytosolique *glucose-regulated protein 75 kDa* (Grp75) reliant la protéine VDAC1 et IP3R1 [77]. Ce complexe IP3R1/Grp75/VDAC1 permet le transport du calcium entre le RE et l'espace intermembranaire mitochondrial, puis le MCU de la membrane interne de la mitochondrie transfère le calcium dans la matrice mitochondriale [78] (figure 7). Dans ce complexe, les autres isoformes du récepteur IP3R ou les récepteurs à la ryanodine (RyR) peuvent participer aux interactions.

Le rapprochement des deux organites implique aussi la mitofusine (Mfn) 2, une protéine du RE, qui interagit avec les Mfn 1 ou 2 mitochondriales pour faire un pont [79] (figure 7).

Un troisième complexe est composé de la protéine du RE *vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C* (VAPB) et de la protéine mitochondriale *protein tyrosine phosphatase-interacting protein-51* (PTPIP51) [80].

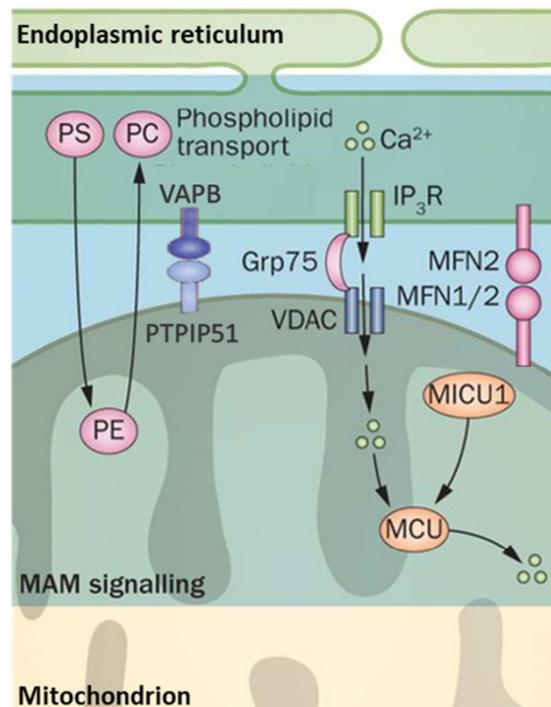


Figure 7 : L'échanges de lipides et de calcium au niveau des MAM est permis par la formation de complexes protéiques, IP3R-Grp75-VDAC, VAPB-PTPIP51 et les mitofusines 1 et 2, adapté de Burte et al. [81].

Les points de contact RE-mitochondrie sont régulés, en fonction des besoins cellulaires, à la fois par des signaux du RE et de la mitochondrie. En effet, l'état du RE peut renforcer ou amoindrir les MAM [74, 82]. La production de facteurs pro- ou anti-apoptotiques dans la mitochondrie régule aussi la présence des MAM [83]. Les mitochondries peuvent donc s'éloigner ou se rapprocher du RE. En particulier, les MAM sont impliqués dans des échanges calciques de haute intensité [84-87] (figure 7). En conditions physiologiques, le métabolisme mitochondrial induit la formation d'un potentiel électrochimique transmembranaire, avec des charges négatives dans la matrice mitochondriale, permettant ainsi l'entrée de calcium [88]. Ainsi, les échanges calciques se font du RE vers la mitochondrie, mais également lors d'un stress du RE, où le RE se vidange en calcium, la mitochondrie capte rapidement le calcium [89]. Les MAM participent aussi à la régulation de la dynamique mitochondriale et plus globalement à la signalisation cellulaire [90]. Les points de contact RE-mitochondrie contrôlent par exemple, le recrutement de la protéine *dynamine related protein 1* (Drp1) pour la fission mitochondriale [91], la réplication et la distribution de l'ADN mitochondrial lors de la séparation des mitochondries filles [92], ainsi que la mitophagie (dégradation de la mitochondrie par autophagie) [93].

Implication dans la réponse à l'ischémie-reperfusion

L'étude de ces interactions étant récente, de nouvelles protéines sont peu à peu découvertes comme appartenant aux MAM et leur rôle dans certaines pathologies commence à être exploré, notamment dans les maladies cardiovasculaires [94]. En particulier, deux études ont très récemment montré un rôle des MAM dans la susceptibilité à l'ischémie-reperfusion.

La première étude a montré une implication des MAM dans la vidange du calcium du RE vers la mitochondrie lors de l'ischémie-reperfusion et a aussi mis en évidence l'implication d'un nouveau partenaire des MAM dans le cœur, à savoir la CypD [95]. En effet, sur des myoblastes cardiaques de rat (cellules H9C2), l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de la CypD, le NIM811, ou d'un siARN dirigé contre CypD diminue les interactions du complexe IP3R1/Grp75/VDAC1, et ceci est associé à une diminution de la vidange calcique du RE vers la mitochondrie induite par l'histamine (activateur de l'IP3R). Ces résultats ont

été confirmés sur des cardiomyocytes isolés de souris délétées pour le gène codant pour la CypD ou traitées par le NIM811 ou la CsA, montrant l'implication de la CypD dans les MAM. Ensuite, sur ces modèles cellulaires, l'exposition des cellules à une hypoxie-réoxygénation (le modèle d'ischémie-reperfusion *in vitro*), induit une augmentation du nombre d'interactions du complexe IP3R1/Grp75/VDAC1/CypD, contribuant à la surcharge calcique de la mitochondrie, à l'ouverture du PTPm et consécutivement à l'augmentation de la mort cellulaire. Ces effets de l'hypoxie-réoxygénation sont prévenus par l'inhibition pharmacologique de la CypD et de l'IP3R ou par l'utilisation de siARN dirigés contre Grp75 ou de Mfn2 [95]. Tel que détaillé auparavant dans les mécanismes de la reperfusion, la CypD est une protéine de la matrice mitochondriale connue pour être transloquée à la membrane interne mitochondriale, et en particulier au niveau du PTPm, à la reperfusion ce qui participe à l'activation de l'ouverture du pore et à la mort cellulaire [96]. Le travail de Paillard et al. [95] met donc en évidence un nouveau rôle de la CypD lors de la réponse à l'ischémie-reperfusion mais surtout démontre que la disruption des contacts RE-mitochondrie préserve les cardiomyocytes des lésions dues à une ischémie-reperfusion.

La deuxième étude confirmant l'implication des MAM dans la susceptibilité des cardiomyocytes à l'ischémie-reperfusion, a mis en évidence le rôle de la protéine *glycogen synthase kinase 3 (GSK3) β* [97]. Sur des cardiomyocytes isolés de souris, la protéine GSK3β, localisée dans le RE, interagit avec le complexe IP3R1/Grp75/VDAC1/CypD par le récepteur IP3R1. L'utilisation d'un inhibiteur de la GSK3β, le SB21 montre que l'interaction de GSK3β avec l'IP3R1 est essentielle pour que l'IP3R1 interagisse avec les autres membres du complexe IP3R1/Grp75/VDAC1/CypD, permettant le relargage de calcium du RE dans la mitochondrie. Lors d'une hypoxie-réoxygénation, la phosphorylation de l'IP3R1 par la GSK3β, active la protéine, permettant le passage de calcium entre le RE et la mitochondrie en renforçant les MAM, induisant ainsi une surcharge calcique mitochondriale et cytosolique, responsable d'une aggravation de la mort cellulaire. Ainsi, l'utilisation de SB21 diminue la taille d'infarctus suite à une ischémie-reperfusion en diminuant la phosphorylation d'IP3R et son interaction avec les autres protéines des MAM [97].

Enfin le complexe Mfn1/Mfn2 peut lui aussi être impliqué dans la réponse à l'ischémie-reperfusion, puisque la délétion spécifiquement cardiaque de ces deux protéines protège le cœur de ces lésions [98].

Ces différentes études montrent donc que les points de contact RE-mitochondrie semblent

jouer un rôle majeur dans les dommages myocardiques d'une ischémie-reperfusion.

iii. Mitochondrie

Définition et métabolisme mitochondrial

Les mitochondries sont des organites dynamiques de la cellule, régulant des réactions cataboliques, menant à la production d'ATP. Ces organites représentent 25% du volume des cellules cardiaques humaines et produisent 6 kg d'ATP par jour pour la fonction cardiaque [99]. Dans les cardiomyocytes, les mitochondries sont localisées sous la membrane plasmique (mitochondries subsarcolemmales) ou entre les myofibrilles (mitochondries interfibrillaires). La mitochondrie, en plus de produire l'énergie cellulaire, contribue à diverses fonctions, allant de la croissance à la mort cellulaire. La majeure partie de la production d'ATP est réalisée par la chaîne respiratoire, qui est l'association de la chaîne de transport d'électrons et de la phosphorylation oxydative (OXPHOS), au niveau de la membrane interne de la mitochondrie (figure 8). Son alimentation dépend de la formation de l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA), qui est généré par la glycolyse à partir de substrats glucidiques et par la β -oxydation des acides gras. Ensuite, l'acétyl-CoA est utilisé par le cycle de Krebs, aussi appelé le cycle de l'acide citrique. L'ensemble de réactions du cycle de Krebs produit des électrons à haute énergie, contenus dans le nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) ou le flavine adénine dinucléotide (FADH₂). *Via* l'utilisation du NADH et FADH₂, ces électrons sont transférés le long de la chaîne de transport d'électrons avec une série de réactions redox. La chaîne de transport d'électrons comprend 5 complexes et deux navettes. Tout d'abord, le NADH est utilisé par le complexe I (NADH déshydrogénase) et le FADH₂ est consommé par le complexe II (succinate déshydrogénase), puis les électrons passent du complexe I ou II au complexe III (coenzyme Q-cytochrome c réductase) par la navette, le coenzyme Q (ubiquinone). Le dernier transfert d'électrons a lieu en direction du complexe IV (cytochrome C oxydase), réalisé par la navette, le cytochrome C. Au niveau du complexe IV, les électrons sont acceptés par le dioxygène (O₂), qui est réduit sous forme d'eau. Les réactions redox produisent de l'énergie, entraînant l'extrusion de protons dans l'espace inter-membranaire, et la création d'un gradient électrochimique de protons autour de la

membrane interne mitochondriale. Ce gradient de protons est utilisé par le complexe V (ATP-synthase), afin de phosphoryler l'ADP en ATP [100] (figure 8). Au cours du transfert d'électrons, des anions superoxyde (O_2^-) sont produits, par la fuite d'électrons au niveau du complexe I et III, principalement [101, 102]. Cette fuite d'électrons entraîne une réduction incomplète de l'oxygène, à l'origine de la fabrication d'anions superoxyde. Physiologiquement, des défenses antioxydantes sont présentes pour contrebalancer cette production d'ERO. La fonction mitochondriale résulte donc d'un équilibre entre la production d'ATP et d'ERO, qui sont tous deux des éléments dont l'homéostasie est perturbée en conditions pathologiques, notamment lors d'une ischémie-reperfusion [103].

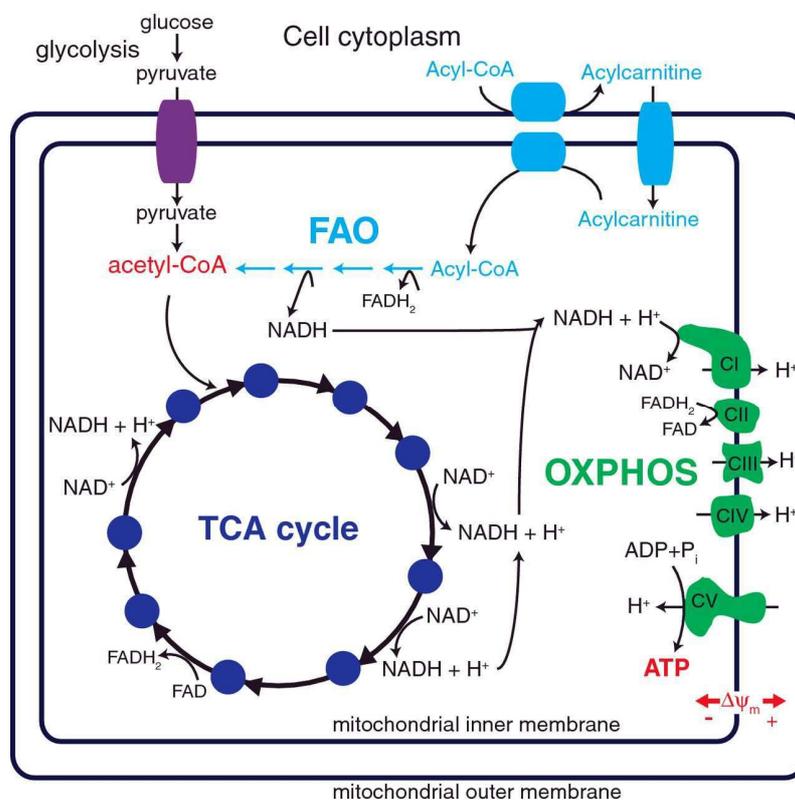


Figure 8 : Le métabolisme mitochondrial. A partir des nutriments, le glucose est utilisé par la glycolyse (violet) et les lipides par la β-oxydation (bleu clair), pour former de l'acétyl-coenzymeA (acétyl-CoA, en rouge) utilisé par le cycle de de Krebs (bleu foncé) qui, couplé à la la phosphorylation oxydative (vert), produit de l'ATP à partir de l'oxygène, d'après Nsiah-Sefaa et al. [104].

Les mitochondries sont des organites dotés d'une dynamique et d'un cycle de renouvellement qui régulent la bioénergétique mitochondriale, et mobiles pour former ou diminuer les points de contacts RE-mitochondrie, comme vu précédemment [105, 106].

Dynamique mitochondriale

La dynamique mitochondriale est composée de la fusion et de la fission (figure 9) [107], régulées par des protéines GTPases hautement conservées [108]. La fusion mitochondriale est la fusion de deux mitochondries en une grosse mitochondrie. Elle est régulée par les protéines Mfn 1 et 2, responsables de la fusion de la membrane mitochondriale externe, et par la protéine *optic atrophy 1* (OPA1), responsable de la fusion de la membrane mitochondriale interne [109]. La fusion mitochondriale est un mécanisme essentiel de l'organisme, puisque, la délétion totale de chaque mitofusine ou d'OPA1 est létale au stade embryonnaire [110, 111]. Précédemment décrit, les mitofusines sont des GTPases, impliquées aussi dans les MAM et formant des homo- ou des hétéro-complexes. Leur expression est donc redondante, et l'expression de l'une peut remplacer l'autre [110]. OPA1 est aussi une GTPase, dont le fonctionnement requiert la présence des mitofusines [112]. OPA1 existe sous plusieurs isoformes, une forme longue, et d'autres formes courtes, dues au clivage par des protéases, Oma1 et Yme1L. En conditions physiologiques, un équilibre a lieu entre les formes courtes et longues. Une altération de la balance en faveur de la forme courte d'OPA1 entraîne une activation de la fission, alors que la forme longue favorise la fusion [113, 114].

A l'inverse de la fusion, la fission sépare une mitochondrie endommagée en deux mitochondries filles, une fonctionnelle et une dysfonctionnelle qui va être dégradée par mitophagie (figure 9) [115]. La protéine GTPase majeure de la fission est la protéine Drp1 déjà citée avant. Sa délétion totale est létale au stade embryonnaire, alors que sa délétion cardiaque spécifique est létale environ 10 jours après la naissance (Ishihara et al. 2009; Ikeda et al. 2015; Kageyama et al. 2014; Song et al. 2015), signifiant l'importance de la dynamique mitochondriale dans le fonctionnement cellulaire. Lors de la fission d'une mitochondrie, Drp1 est transloquée du cytosol à la membrane externe mitochondriale. Ensuite, l'assemblage de Drp1 crée un anneau constricteur, divisant la mitochondrie en deux [116, 117]. L'importation de Drp1 à la mitochondrie est réalisée par différentes protéines [118, 119], *mitochondrial fission 1 protein* (Fis1) [120], mitochondrial fission factor (Mff) [121] et les *mitochondrial dynamics proteins* (MiD) de 49 et 51 kDa (MiD49, MiD51) [122, 123]. L'activité de Drp1 est contrôlée par sa phosphorylation avec des effets opposés. La

phosphorylation sur la sérine 616 augmente l'activité GTPase de Drp1, entraînant la fission, alors que la phosphorylation sur la sérine 637 diminue l'activité GTPase de Drp1, en faveur de la fusion. De nombreuses kinases et phosphatases régulent l'état de phosphorylation de Drp1 selon les processus cellulaires [124, 125]. Par ailleurs, la stabilité et le recrutement de Drp1 est aussi régulé par ubiquitination par l'*ubiquitin ligase membrane-associated RING-CH protein 5* (MARCH5) [126], et par sumoylation par *small ubiquitin-like modifier type 1* (SUMO1) [127].

La dynamique mitochondriale permet d'améliorer la qualité des mitochondries. La fusion améliore la synthèse d'ATP, en diluant les protéines oxydées et les mutations de l'ADN mitochondrial, qui ont un impact beaucoup plus délétère sur le fonctionnement cellulaire que les mutations nucléaires. En revanche, la fission crée deux petites mitochondries, dont une est fonctionnelle, et l'autre est facilement dégradables par mitophagie, afin d'éliminer les mitochondries endommagées produisant beaucoup de stress oxydant [128-130].

Cycle du renouvellement des mitochondries

Le cycle mitochondrial permet le renouvellement des mitochondries, et participe ainsi à la régulation du métabolisme mitochondrial. Il est composé de la biogénèse mitochondriale et de la mitophagie (figure 9). La biogénèse mitochondriale est la synthèse de nouvelles mitochondries. Même si les mitochondries ont leur propre génome (ADNmt), elles ne sont pas autonomes. La biogénèse mitochondriale est la coordination des génomes nucléaire et mitochondrial [131]. L'acteur majeur de la biogénèse mitochondriale est le facteur de transcription *peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1 α* (PGC-1 α), activé en réponse à des signaux cellulaires, tels qu'une privation d'énergie (Finck 2006). PGC-1 α interagit avec de nombreux co-activateurs pour activer la transcription de nombreux gènes nucléaires et mitochondriaux, appartenant notamment aux familles des *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs), des *estrogen-related receptors* (ERRs) et des *nuclear respiratory factors* (NRF) [132, 133]. Les cibles de PGC1 α sont aussi les gènes régulant la machinerie transcriptionnelle, la traduction et la réplication des gènes mitochondriaux, tels que la protéine *mitochondrial transcription factor A* (Tfam), dont la stabilisation est nécessaire à la réplication de l'ADN [134]. La régulation de la biogénèse se

fait aussi en contrôlant le passage de nombreuses protéines au niveau de la membrane mitochondriale [135].

La mitophagie correspond à la dégradation des mitochondries par autophagie (figure 9) [136]. Elle est régulée par différentes voies, dont une impliquant Parkin. En conditions physiologiques, la protéine *PTEN-induced putative kinase 1* (Pink1) est transloquée à la membrane externe mitochondriale où elle est rapidement clivée et dégradée. Lorsque la membrane mitochondriale est dépolarisée, Pink1 s'accumule à la membrane mitochondriale et recrute la protéine ligase ubiquitine E3, Parkin [137]. Parkin ubiquitine diverses protéines de la membrane externe de la mitochondrie, reconnues par la protéine p62, un adaptateur, faisant le lien entre les protéines ubiquitinylées et la protéine *microtubule-associated protein 1 light chain 3* (LC3), permettant le recrutement d'un autophagosome qui va absorber la mitochondrie ubiquitinylée [138]. D'autres protéines sont impliquées dans ce mécanisme de mitophagie [139], comme la protéine *activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1* (Ambra1), protéine interagissant avec la protéine Beclin1 (protéine initiatrice de l'autophagie) [140]. L'autophagosome fusionne avec les lysosomes pour terminer la dégradation de la mitochondrie. D'autres voies de la mitophagie dépendantes d'une interaction avec LC3 pour le recrutement des autophagosomes existent, tel que les cardiolipines, *fun14 domain containing 1* (FUNDC1), et *Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3* (BNIP3), *Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like* (BNIP3L ou NIX). Les cardiolipines sont des dimères de phospholipides synthétisés dans la membrane interne de la mitochondrie et transloqués à la membrane externe lors d'une dépolarisation, pour activer la mitophagie par interaction avec LC3 [141]. De façon intéressante, la mitophagie dépendante de BNIP3 et BNIP3L est surtout activée en hypoxie [142, 143]. En effet, une augmentation de l'expression de BNIP3 est observée dans de nombreuses situations hypoxiques sous l'influence de l'activation de l'*hypoxia-inducible factor 1* (HIF-1) [144, 145]. La mitophagie médiée par FUNDC1 est aussi activée par l'hypoxie [146].

Dans les pathologies cardiovasculaires, la dynamique et le renouvellement mitochondrial sont de plus en plus investigués [106, 147, 148].

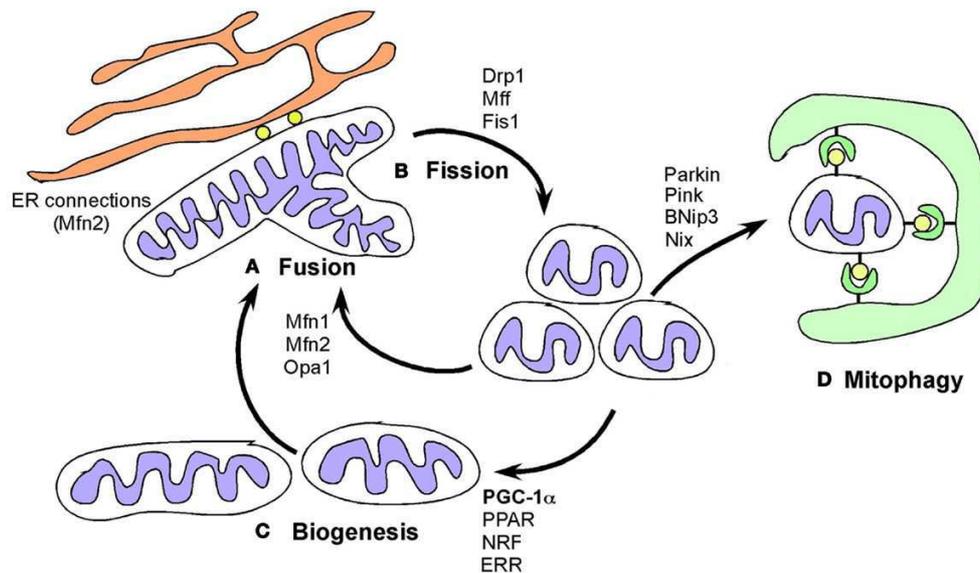


Figure 9 : L'homéostasie mitochondriale est régulée par la biogénèse, la fusion, la fission et la mitophagie, adapté de Boland et al. [149].

Implication dans la réponse à l'ischémie-reperfusion

L'étude récente des acteurs de la dynamique et du renouvellement mitochondrial a permis de montrer leur rôle dans la bioénergétique mitochondriale, ainsi que leur impact dans différentes pathologies, comme la réponse à une ischémie-reperfusion.

Comme vu précédemment, la délétion cardiaque de Mfn 1 et 2 protège le cœur d'une ischémie-reperfusion, avec une résistance de l'ouverture du PTPm, par une atténuation du stress oxydant et de la surcharge calcique mitochondriale, même en présence de mitochondries fragmentées, une diminution de la respiration et une altération de la fonction contractile [98]. De observations similaires ont été réalisées lors de la délétion cardiaque de Mfn 1 ou Mfn 2 chez des souris et sur des modèles cellulaires, challengés par des modèles d'ischémie-reperfusion [150-152]. En revanche, la délétion partielle d'OPA1 augmente la taille d'infarctus, sans modification de la morphologie des mitochondries, de la respiration mitochondriale et de la sensibilité du PTPm, mais avec des altérations de l'homéostasie calcique [111]. Avec le vieillissement des souris, cette délétion partielle induit des altérations de structure et de fonction des mitochondries associées au développement d'une dysfonction cardiaque [153, 154].

Ensuite pour la fission mitochondriale, l'utilisation de modèles animaux génétiques modifiés

pour Drp1, de modèles cellulaires ou l'utilisation de traitements inhibant Drp1 (Mdivi-1), ont mis en évidence qu'une absence de Drp1 diminue la respiration mitochondriale, la production d'ATP, la mitophagie et augmente la taille des mitochondries. De plus, l'inhibition de la fission permet de protéger le cœur des lésions d'une ischémie-reperfusion [150, 155-158].

Au niveau de la biogénèse mitochondriale, la délétion ou la surexpression de PGC-1 α a montré des modifications de fonctionnement mitochondrial pouvant amener à des dysfonctions cardiaques, mais son implication directe dans le contexte de l'ischémie-reperfusion n'a jamais été étudiée [159-162].

En revanche, l'implication de la mitophagie dans la réponse à l'ischémie-reperfusion a été plus explorée. La délétion totale de Parkin augmente la susceptibilité à l'ischémie-reperfusion, alors que sa surexpression protège les cardiomyocytes isolés de souris contre la mort cellulaire induite par l'hypoxie [163]. Les souris délétées pour Parkin ont un phénotype normal, avec une respiration mitochondriale normale, mais les mitochondries sont désordonnées et une accumulation de mitochondries endommagées apparaît avec l'âge [163-166].

La réponse à l'ischémie-reperfusion est donc bien régulée par le métabolisme mitochondrial, dont l'état dépend de la structure, de la fonction, de la dynamique et du renouvellement mitochondrial.

En conclusion de cette première partie, les maladies cardiovasculaires restent la première cause mondiale de morbidité et mortalité et la recherche ne cesse d'explorer les mécanismes impliqués dans la mort cellulaire induite par l'ischémie-reperfusion. Bien souvent, les mécanismes étudiés et impliqués sont communs à d'autres pathologies et notamment à des pathologies associées à la survenue de l'infarctus du myocarde. Parmi elles, le syndrome d'apnées obstructives du sommeil est considéré comme un facteur de risque indépendant de risque d'infarctus. En effet, la présence de cette maladie peut altérer le fonctionnement des cardiomyocytes, expliquant l'augmentation de la sévérité et du nombre d'évènements cardiovasculaires chez les patients apnéiques.

2. Syndrome d'apnées obstructives du sommeil

a. Prévalence et facteurs de risque

Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) appartient aux troubles respiratoires du sommeil (*sleep disordered-breathing*, SDB). Cette maladie représente l'une des pathologies respiratoires chroniques les plus fréquentes puisque, selon les données de l'OMS, elle touche plus de 100 millions de personnes [167]. Le SAOS est considéré comme un problème majeur de santé publique avec une prévalence continuant de croître à cause de son meilleur diagnostic et de l'augmentation de ses comorbidités comme le surpoids et l'obésité [168]. D'après l'étude de Levy et al, la prévalence du SAOS est variable et comprise entre 5 et 25% dans les pays industrialisés. Mais il est à noter que le SAOS touche toutes les populations, même s'il est souvent sous diagnostiqué dans certaines régions du monde [168].

Les principaux facteurs de risque du SAOS sont le sexe, l'âge, l'obésité et le rétrécissement des voies aériennes supérieures [168]. Une revue récente de 2016, reprenant les résultats de 24 études cliniques, montre que le SAOS touche 13 à 33% d'hommes et 6 à 19% de femmes. La proportion de patients apnéiques passe également de 6-17% dans une population adulte à 49 % dans une population âgée [169]. Cette pathologie provoque une dégradation de la qualité de vie (sommolence diurne, déficiences cognitives) Elle joue aussi un rôle prépondérant dans le développement de maladies cardiovasculaires [170] et métaboliques [171].

b. Définition et physiopathologie

En 2012, la première définition mondiale réalisée par le groupe de travail (*Task Force*) en recherche sur les troubles du sommeil, constitué par l'*American Academy of Sleep Medicine*, définit le SAOS comme étant la répétition de collapsus pharyngés au cours du sommeil [172]. Le diamètre des voies aériennes supérieures est régulé par de nombreux paramètres anatomiques, neurologiques et hormonaux [168]. Chez les patients apnéiques, la réduction de voies aériennes supérieures est souvent due à une accumulation de graisse au niveau du cou liée à l'obésité, ou à la structure maxillo-faciale, mais également à un phénomène de *fluid shift* lié à une dérégulation de la balance hydrosodée (le liquide interstitiel remontant au niveau du cou en position allongée) ou encore à une diminution de l'activité neuromusculaire pharyngée. Le SAOS peut être associé ou non à des ronflements liés aux collapsus pharyngés entraînant une vibration du palais mou, de la luette ou/et des parois latérales du pharynx.

Tel qu'illustré dans la figure 10, lorsque l'obstruction des voies aériennes est totale, l'apnée est caractérisée par une diminution du débit aérien de 90% pendant au moins 10 secondes. Une obstruction partielle est appelée hypopnée. Elle est définie par une diminution du débit aérien de 30% de plus de 10 secondes, associée à une diminution d'au moins 3% de la saturation artérielle en O₂ ou à un microéveil [172] (figure 10).

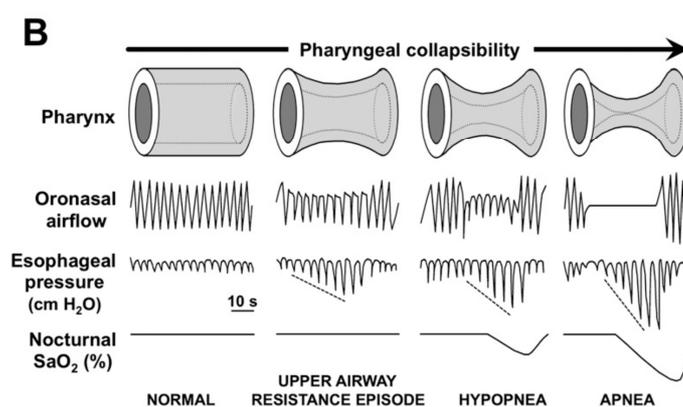


Figure 10 : Les différents stades de sévérité des événements respiratoires selon le collapsus pharyngé, le flux oronasal et la pression œsophagienne caractérisant les efforts respiratoires et la désaturation artérielle nocturne, adapté de Dematteis et al. [173].

c. Diagnostic, critère de définition

Parmi les différents signes cliniques d'un SAOS, le principal est la somnolence diurne excessive, due à une altération du sommeil causée par les nombreux microéveils induits par les événements apnéiques. D'autres symptômes peuvent être associés comme des ronflements, des céphalées au réveil, une asthénie chronique, une baisse des performances intellectuelles, physiques et sexuelles, des troubles de l'humeur et du comportement, ou encore la manifestation de pathologies cardiovasculaires et/ou métaboliques. La diversité des symptômes et des comorbidités associées rend cette maladie difficile à diagnostiquer. Ainsi, pendant de nombreuses années, l'implication du SAOS dans les pathologies cardiovasculaires n'était pas recherchée, puisque ces patients présentent souvent d'autres comorbidités (obésité, hypertension artérielle...) pouvant masquer l'effet propre du SAOS. Par ailleurs, les patients sous-estiment les symptômes du SAOS.

L'examen clinique de référence permettant le diagnostic du SAOS est la polysomnographie, validant la survenue d'apnées ou d'hypopnées durant le sommeil. Lors de ce diagnostic, d'autres examens sont réalisés : un électroencéphalogramme (EEG), un électromyogramme (EMG) des jambes et du menton, des mesures des mouvements respiratoires par pléthysmographie d'inductance au niveau du thorax et de l'abdomen ainsi que des mesures de saturation artérielle en O₂, fréquence cardiaque et pression artérielle. Comme illustré dans la figure 11 [174], chaque apnée est accompagnée d'un microéveil visible sur l'EEG induisant une fragmentation du sommeil. Lors du microéveil, des efforts respiratoires permettent de reprendre la respiration et de lutter contre le collapsus pharyngé (variations des pressions intrathoraciques). Les apnées sont aussi accompagnées d'une élévation transitoire de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque. Les cycles de désaturation-resaturation artérielle en O₂ provoquent des cycles d'hypoxie-réoxygénation générant une hypoxie intermittente chronique (HI). En résumé, le SAOS induit une fragmentation du sommeil, des efforts respiratoires et une HI chronique.

Le diagnostic et la sévérité du SAOS sont déterminés par l'index apnées-hypopnées (IAH), c'est à dire le nombre d'apnées et d'hypopnées par heure de sommeil. Le diagnostic est posé lorsque le patient présente des signes cliniques et un IAH supérieur à 5 ou en absence de signe clinique avec un IAH supérieur à 15. La sévérité du SAOS est qualifiée de légère quand

l'IAH est inférieure à 15, modérée lorsqu'il est compris entre 15 et 30, et sévère quand il est supérieur à 30 [172].

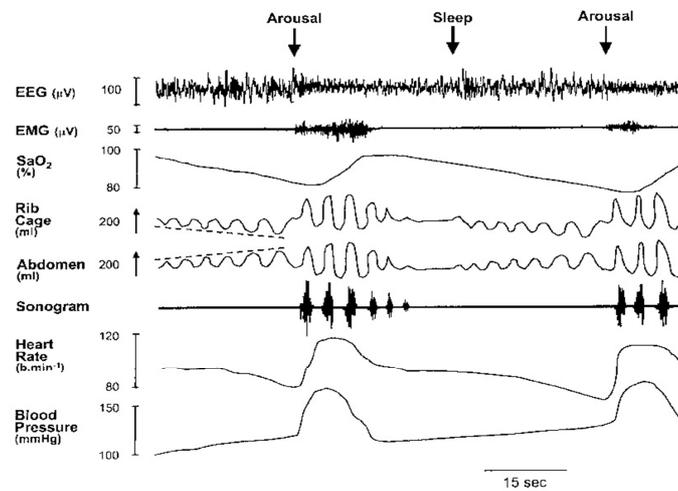


Figure 11 : Tracé d'enregistrement polysomnographique illustrant la fragmentation du sommeil, la fluctuation de la saturation en O₂, l'augmentation des efforts respiratoires thoraco-abdominaux et les modifications de la pression artérielle à chaque épisode apnéique, d'après Thomson et al. [174].

d. Traitements

Le traitement du SAOS permet de réduire les symptômes et d'améliorer la qualité de vie des patients, tout en étant adapté à la sévérité de la maladie et aux comorbidités associées. En première intention sont prescrites des règles hygiéno-diététiques : une perte de poids, l'arrêt de consommation d'alcool, de tabac et de sédatif et la pratique d'une activité physique régulière. Ensuite, divers traitements alternatifs chirurgicaux ou mécaniques existent. Néanmoins le traitement de référence reste l'application d'une pression positive continue (PPC) pendant le sommeil.

Pour les règles hygiéno-diététiques, par exemple, un article reprenant cinq études cliniques montre une diminution de l'IAH de 6,3 événements par heure avec l'exercice physique [175]. Les bénéfices de l'exercice physique sont attribués à une diminution de l'accumulation de liquide dans le cou et permettent aussi une amélioration de la qualité de vie. De même, plusieurs travaux ont montré une atténuation de l'IAH suite à la réduction du poids [176]. Cependant ces changements du mode de vie peuvent aider à réduire les apnées/hypopnées et atténuer les symptômes, mais leurs effets sont limités et doivent souvent être associés à la

PPC.

Chez des patients jeunes non obèses présentant des anomalies craniofaciales avec un avancement maxillo-facial marqué, une chirurgie maxillo-faciale avec un bon taux de réussite peut être réalisée. Par ailleurs, la chirurgie la plus fréquente est l'uvulo-palato-pharyngoplastie, consistant en la résection des tissus mous de la gorge (luette, amygdales, partie du palais) afin d'élargir le diamètre des voies aériennes supérieures [168]. Cette chirurgie concerne des patients ayant un rétrécissement rétroalatal, dont le diagnostic est souvent complexe, et son bénéfice à long terme peut s'estomper. Enfin le traitement mécanique, par l'orthèse d'avancée mandibulaire, permet d'avancer la mandibule et de retenir la langue afin de garder les voies aériennes supérieures ouvertes [177]. Cette prothèse est efficace pour des SAOS légers à modérés en réduisant l'IAH, mais sa compliance à long terme est mal connue et son efficacité reste moins bonne par rapport à la PPC.

L'application de la PPC permet de maintenir l'ouverture des voies aériennes supérieures, afin de réduire les apnées et rétablir un sommeil normal. L'appareil est composé d'un masque recouvrant le nez ou le nez et la bouche et d'un système de tuyaux reliant le masque à un dispositif générant un flux d'air. La PPC diminue le nombre et la sévérité des événements respiratoires, en normalisant la saturation en oxygène. Les bénéfices de la PPC sont une amélioration du sommeil et des fonctions cognitives [178]. La qualité de vie est améliorée chez 80 à 100% des patients observant à la PPC, mais le taux d'abandon ou de refus est élevé, atteignant jusqu'à 40% des patients à cause des contraintes d'utilisation [179]. Au niveau du risque cardiovasculaire associé au SAOS, une diminution de la pression artérielle a été observée avec la PPC [180, 181]. Néanmoins, une méta-analyse a suggéré que cet effet n'était pas associé à une réduction du risque d'évènements cardiovasculaires et de mortalité [182]. Ceci a été confirmé par l'étude SAVE, incluant plus de 2700 patients, montrant que la PPC n'a pas d'effet sur la survenue d'évènements cardiovasculaires associés au SAOS, chez des patients atteints d'un SAOS modéré à sévère et d'une maladie cardiovasculaire [183]. Cependant, l'observance des patients au traitement n'était que de 3,3h/nuit dans cette étude, or l'efficacité de la PPC est étroitement liée à son observance. En particulier une utilisation au minimum de 4h/nuit cinq fois par semaine est considérée comme nécessaire pour une efficacité du traitement.

Ainsi, le SAOS est une maladie sous-diagnostiquée, dont le traitement de référence, la PPC ne prévient que partiellement ses conséquences, faisant de cette maladie un problème

majeur de santé publique. La compréhension des mécanismes sous-jacents impliqués dans cette pathologie représente donc un enjeu majeur pour développer des thérapeutiques complémentaires ou substitutives à la PPC et améliorer la prise en charge des patients SAOS.

e. Conséquences cardiovasculaires du SAOS et de l'HI chronique

Comme vu précédemment, le SAOS est aujourd'hui reconnu comme un facteur indépendant de risque cardiovasculaire. En effet de nombreuses études ont montré un lien de causalité entre le SAOS et les maladies cardiovasculaires, notamment avec une étude récente sur l'impact du SAOS sur l'hypertension, la maladie coronarienne, les accidents vasculaires cérébraux, l'insuffisance cardiaque et les arythmies [4]. Parmi les conséquences physiopathologiques du SAOS précédemment citées, l'HI semble être la plus délétère en termes de complications cardiovasculaires. Ainsi, l'utilisation de modèles expérimentaux, tels que l'exposition d'animaux de façon chronique (plusieurs jours) à l'HI, permet de reproduire les conséquences cardiovasculaires du SAOS et de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents [173].

i. Conséquences vasculaires

Hypertension artérielle

L'élévation de la pression artérielle est corrélée positivement à la sévérité du SAOS, indépendamment de facteurs confondants [184]. Par ailleurs, le risque de développer une HTA est lié à la sévérité du SAOS, avec une multiplication du risque par trois pour des patients ayant un IAH > 15 [185]. La première démonstration du développement d'une HTA induite par l'HI a été réalisée par Fletcher et al. sur des rats exposés à 35 jours d'HI [186]. L'augmentation de la pression artérielle induite par l'HI a depuis été confirmée sur d'autres modèles animaux, comme des souris ou des rats exposées à 14 jours d'HI [187], mais aussi chez des volontaires sains exposés pendant 14 jours à des cycles d'HI [188].

Dysfonction endothéliale

La dysfonction endothéliale résulte d'un déséquilibre entre vasodilatation et vasoconstriction, dont l'endothélium vasculaire est le régulateur principal. Chez les patients apnéiques, l'altération de la fonction endothéliale est caractérisée par une détérioration de la vasodilatation endothélium-dépendante. De plus, en dehors de tous facteurs confondants, la sévérité du SAOS est corrélée positivement à l'aggravation de cette dysfonction [189]. La diminution de la vasodilatation endothélium-dépendante est aussi retrouvée chez des rats exposés à 28 jours d'HI [190]. De plus, une réponse accrue à un agent vasoconstricteur, l'endothéline 1 (ET-1), a été observé dans les aortes, les artères carotidiennes, les artères mésentériques ou les artères pulmonaires de rats ou souris exposés entre 1 et 5 semaines d'HI [191-193] [194, 195] Guo [196, 197] [198]. Bien que la vasoconstriction induite par l'ET-1 n'ait pas été étudiée, des taux élevés d'ET-1 ont été retrouvés dans le plasma et les tissus de patients apnéiques, [199-205], comme chez les animaux exposés à l'HI [198, 206-208].

Athérosclérose

Le SAOS est aussi un inducteur majeur de progression de l'athérosclérose, directement liée à la sévérité de la pathologie [209, 210]. Des marqueurs de remodelage vasculaire et d'athérosclérose, comme l'augmentation de l'épaisseur intima-média carotidienne et la présence de plaques athéromateuses carotidiennes, ont été d'avantage observés chez les patients apnéiques que chez les non-apnéiques [211-213]. Aussi, chez des souris exposées à 14 jours [214] ou 6 semaines d'HI [215], l'épaisseur intima-media est augmentée via l'induction d'un stress oxydant et d'une inflammation [214]. L'inflammation a également été démontrée comme impliquée dans l'augmentation des lésions athéromateuses induites par l'HI avec une augmentation de l'infiltration des lymphocytes dans les plaques d'athérome [216, 217].

ii. Conséquences cardiaques

Arythmies

Plus généralement, le risque de mort subite est plus élevé chez les patients apnéiques [218] et, contrairement aux patients non-apnéiques, est plus fréquent pendant la nuit que le matin [219]. Le risque d'arythmies ventriculaires est également plus élevé pendant la nuit [220, 221]. De plus, l'incidence de la fibrillation auriculaire est deux fois plus importante chez les patients apnéiques par rapport aux patients non apnéiques [222]. L'une des causes majeures de la mort subite est l'IM, engendrant des arythmies ventriculaires (tachycardie ou fibrillation). De plus, une étude animale récente montre un risque plus élevé de mort subite lié aux arythmies ventriculaires suite à une ischémie, chez des rats exposés à 14 jours d'HI. Ces arythmies sont dues à une activation du système nerveux sympathique associée à une altération de la repolarisation ventriculaire et à une augmentation de l'expression des canaux calciques endocardiques [223]. Par ailleurs, un article récent confirme également, chez le rat soumis à 7 jours d'HI, l'augmentation de la susceptibilité à la fibrillation auriculaire [224].

Infarctus du myocarde

L'ensemble des conséquences vasculaires du SAOS contribuent à la prévalence de l'IM [225]. Chez les patients apnéiques, l'infarctus du myocarde est plus sévère, avec une ischémie prolongée, une mort cellulaire plus importante et un remodelage ventriculaire gauche et droit aggravé [225]. L'incidence de l'IM est plus importante la nuit que le matin (nuit : 32%, levée du jour : 17%), contrairement aux patients non apnéiques (nuit : 7%, levée du jour : 47%) et 91% des patients avec un IM pendant la nuit ont un SAOS [226]. De plus, trois mois après un infarctus du myocarde, la fraction d'éjection ventriculaire gauche est plus basse et la taille d'infarctus plus étendue chez les patients apnéiques comparés à des patients non apnéiques [227]. Par ailleurs, une étude à moyen terme montre que 40% des patients avec un IM avaient un SAOS sévère (IAH > 30) et que ce SAOS sévère est lié à une moins bonne survie à 18 mois [228]. Sur du plus long terme, 6 ans post-IM, plusieurs études ont montré

que les patients avec un SAOS ont un moins bon pronostic vital avec une augmentation de la survenue d'évènements cardiovasculaires parfois fatals [229-231]. De plus, Buchner et al. ont démontré que la taille d'infarctus est corrélée positivement à l'IAH [227] signifiant l'impact de l'HI dans cette maladie coronarienne. Le rôle de l'HI dans l'augmentation de la susceptibilité myocardique à l'ischémie-reperfusion a été exploré dans quelques études chez l'animal. Alors qu'une HI aigue de 4h réduit les lésions d'une ischémie-reperfusion [232], l'exposition d'animaux de 14 jours à 5 semaines d'HI entraîne une augmentation de la taille d'infarctus [198, 233].

Les différents mécanismes impliqués seront évoqués dans la partie suivante puisqu'ils font l'objet du travail de cette thèse.

Remodelage ventriculaire

Comme vu précédemment, le SAOS aggrave le remodelage ventriculaire gauche post-IM [227]. L'hypertrophie ventriculaire gauche est liée à de nombreux facteurs confondants du SAOS, tels que l'hypertension artérielle et l'obésité [234]. Quelques études montrent que le SAOS est associé à des signes d'hypertrophie ventriculaire gauche indépendamment d'un IM ou d'une hypertension artérielle [235, 236]. Ce remodelage ventriculaire a aussi été observé dans des modèles animaux exposés à l'HI. Notamment dans un modèle de chien, 1 à 3 mois d'HI augmentent le volume d'éjection systolique et réduisent la fraction d'éjection du ventricule gauche [237]. Chez des souris exposées à 10 jours d'HI, une étude montre l'importance de la gp91^{phox}, composant de la NADPH oxydase, dans le développement d'un remodelage ventriculaire dû au stress oxydant [238]. Par ailleurs, l'échangeur NCX1 a aussi été montré comme étant un acteur majeur dans le remodelage ventriculaire après 8 semaines d'HI chez la souris [238, 239].

Insuffisance cardiaque

Un AHI>11 est indépendamment associé au risque de développer une insuffisance cardiaque [240]. Le SAOS est également un facteur indépendant de risque de mortalité chez les patients insuffisants cardiaques [241, 242]. Le SAOS, en augmentant l'activité sympathique,

serait responsable d'une accélération de la maladie [243, 244]. Dans un modèle de rats insuffisants cardiaques par constriction aortique abdominale, une exposition de 4 semaines à l'HI exacerbe le développement de l'insuffisance cardiaque, observé par une diminution des fractions d'éjection et de raccourcissement du ventricule gauche. Cet effet de l'HI semble être lié à une inflammation soutenue [245]. Par ailleurs, au laboratoire, le développement d'un modèle d'insuffisance cardiaque par ligature permanente de l'artère coronaire gauche chez le rat, a montré qu'une exposition de 4 à 12 semaines d'HI aggrave la dysfonction contractile. Ceci est caractérisé par une réduction du débit cardiaque, du volume d'éjection systolique et de la fraction d'éjection du ventricule gauche (travaux de thèse de G. Bourdier). Cette diminution de la fonction systolique est associée à une hypertrophie précoce du ventricule gauche et à une accélération de la dilatation. Il a été montré aussi que l'HI altérait la structure du ventricule gauche avec l'apparition d'une fibrose plus importante chez les animaux HI (travaux de thèse de G. Bourdier).

Le SAOS semble donc un facteur aggravant pour de nombreuses pathologies cardiovasculaires, et en particulier pour l'infarctus du myocarde. Une meilleure compréhension des mécanismes induits par l'HI permettrait sans doute un meilleur diagnostic et une meilleure prise en charge des patients apnéiques, en particulier dans le but de limiter ce risque cardiovasculaire. Dans le paragraphe suivant nous aborderons, de façon générale, les principaux mécanismes déjà connus pour être impliqués dans le développement des maladies cardiovasculaires associées au SAOS : l'activation sympathique, l'inflammation et le stress oxydant. A la fin, nous évoquerons aussi l'implication du facteur de transcription, HIF-1, puisqu'il joue un rôle majeur dans la réponse à l'hypoxie et ce, de concert avec les trois mécanismes cités ci-dessus.

f. SAOS, HI chronique et mécanismes principaux

i. Activation sympathique

Le système nerveux autonome est composé d'une branche « cardio-stimulante », le système nerveux orthosympathique, et d'une branche « cardio-inhibant », le système nerveux parasympathique. Pendant le sommeil, en condition normale, le système sympathique est diminué au profit du système parasympathique. Or chez un patient SAOS, à chaque microéveil, le système sympathique est activé et ceci est associé à des concentrations plasmatiques et urinaires en catécholamines élevées [246] (figure 15). La répétition chronique des apnées-hypopnées entraîne une altération de cette balance du système nerveux autonome au profit du système orthosympathique [247], associé à une augmentation de l'activité nerveuse sympathique musculaire [248] et une diminution de la sensibilité du baroréflexe [249] (figure 15). L'exposition de volontaires sains à 14 jours d'HI a permis de reproduire l'activation sympathique induite par le SAOS, caractérisée par une augmentation de l'activité nerveuse sympathique musculaire, de la pression artérielle et une diminution de la sensibilité du baroréflexe [188] (figure 15). L'exposition d'animaux à l'HI montre que le stress oxydatif est le principal activateur du système nerveux sympathique, en augmentant la sensibilité du chémoréflexe, en diminuant le baroréflexe et en augmentant la sécrétion de catécholamines par les glandes surrénales [250] (figure 15). L'activation sympathique est reconnue pour augmenter la prévalence de l'insuffisance cardiaque [251] et de la fibrillation atriale [222] associées au SAOS, mais actuellement aucune donnée ne l'associe à la susceptibilité du myocarde à l'ischémie-reperfusion.

ii. Inflammation

Le SAOS est considéré comme une maladie induisant une inflammation systémique de bas grade. De nombreuses études ont mis en évidence des taux élevés de marqueurs d'inflammation circulants, corrélés à la sévérité du SAOS, comme IL-6, IL-8, IL 10, ICAM-1,

MCP-1 [252-255]. De manière intéressante, ces marqueurs peuvent être différents selon le sexe, ce qui pourrait améliorer le diagnostic du SAOS avec des biomarqueurs dépendant du genre [256] (figure 15).

Comme dans la pathologie apnéique, l'HI induit une inflammation chez des souris mince ou obèse. Les mécanismes impliqués sont notamment une activation du facteur de transcription pro-inflammatoire *nuclear factor-κB* (NF-κB) [217, 257, 258], une augmentation de l'expression de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires [217], le recrutement et la polarisation en profil M1 pro-inflammatoire des macrophages [259, 260] (figure 15). Alors que l'impact du statut inflammatoire en HI a été étudié sur les altérations métaboliques et sur l'athérosclérose, son impact cardiaque a été peu étudié.

iii. Stress oxydant

Le stress oxydant, engendré par la répétition des cycles d'hypoxie-réoxygénation, est la conséquence la plus étudiée en HI et chez les patients SAOS. De plus, son implication dans le développement des maladies cardiovasculaires associées au SAOS est bien connue [261]. En effet, chez les patients apnéiques, des anions $O_2^{\cdot -}$ sont produits par les leucocytes circulants [262, 263] (figure 15). De plus, l'expression de la NADPH oxydase, produisant des anions $O_2^{\cdot -}$, est augmentée dans le sérum de patients SAOS et dans le tissu cardiaque de rats exposés 14 jours à l'HI [190, 264, 265] (figure 15). Par ailleurs, chez les patients apnéiques, la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO), estimée à partir de la quantité de nitrite et nitrate, est diminuée dans le sérum [266, 267]. Ceci a été confirmé par une mesure directe dans le cœur de rats exposés 8 sem à l'HI [268] (figure 15). Un autre marqueur du stress oxydant est l'augmentation de la peroxydation des lipides et de l'ADN retrouvée dans le sérum de patients SAOS [266, 269-271] et dans le cœur ou le foie de rongeurs à l'HI [268, 272] (figure 15). Enfin, une diminution des capacités antioxydantes est observée dans le sérum de patients apnéiques, caractérisée par exemple avec une diminution de la vitamine A et de l'enzyme superoxyde dismutase [273-276]. De même, l'expression cardiaque de la superoxyde dismutase est diminuée chez des rats exposés à 14 jours d'HI, reflétant une diminution des propriétés antioxydantes [190] (figure 15). Au niveau cardiaque, le stress oxydant a été ciblé pour prévenir la vulnérabilité du cœur à l'ischémie-reperfusion, induite

par l'HI. En effet, chez le rat exposé à 14 jours d'HI, l'utilisation du tempol, de la mélatonine, ou de l'atorvastatine abolit l'augmentation de la taille d'infarctus [190, 265].

Bien que l'ensemble des mécanismes ci-dessus soient clairement impliqués dans les conséquences de l'HI. A part le stress oxydant, peu d'entre eux ont été montré pour être impliqué dans l'augmentation de la taille d'infarctus, qui fait l'objet de ce travail de thèse. Par ailleurs, les beta-bloquants, les antioxydants ou les anti-inflammatoires n'ont à ce jour pas été montré pour améliorer les conséquences du SAOS [277-280]. Ainsi, la compréhension d'autres mécanismes de l'HI est primordial, et en particulier au laboratoire, nous nous intéressons au facteur de transcription, HIF-1.

iv. Hypoxia-inducible factor-1

Définition

HIF-1 est un facteur de transcription, découvert en 1991 [281], appartenant à la famille des facteurs induits par l'hypoxie (*hypoxia-inducible factor*, HIF), qui sont des hétérodimères composés de HIF-1 β , s'hybridant avec HIF-1 α , HIF-2 α ou HIF-3 α , pour former HIF-1, HIF-2 ou HIF-3, respectivement. Les sous-unités HIF-1 α et HIF-1 β sont composées dans la région N-terminale, d'un domaine *basic-helix-loop-helix* (HLH), permettant la fixation de HIF-1 à l'ADN. Ces protéines sont également pourvues de deux domaines *Per-Arnt-Sim* (PAS) permettant la fixation à l'ADN, et contribuant à l'hétérodimérisation des deux sous-unités. Pour la sous-unité HIF-1 α , ce domaine participe aussi à sa rétention cytosolique en normoxie (figure 13). HIF-1 α est constituée de deux domaines d'activation de la traduction (TAD) situés en position N- et C-terminales (figure 13). Les deux sous-unités HIF-1 α et HIF-1 β sont constitutivement exprimées. La sous-unité α est labile, ainsi l'activation de HIF-1 est dépendante de la stabilisation de HIF-1 α . En effet, HIF-1 α est sensible à la pression partielle ou taux d'oxygène [282].

En normoxie, la protéine HIF-1 α est hydroxylée sur une ou deux prolines en position 402 et

564 dans la région *oxygen degradation domain* (ODD), par des dioxygénases, les prolyl-4-hydroxylases (PHD) [283-285] (figure 12-13). Parmi les différentes PHD, 1, 2 ou 3, dans le cœur, la forme prédominante est la PHD3 [284, 285]. Les hydroxylations sont reconnues par le peptide Von Hippel-Lindeau (pVHL) [286], entraînant la fixation de l'ensemble du complexe VHL d'ubiquitinylation, contenant *Elongin BC/Cullin/RING domain protein 1* (Elongin BC/Cul/Rbx1) [287]. Ensuite, HIF-1 α ubiquitinylé est dégradé par le protéasome 26S. Par ailleurs, une autre protéine intervient dans la régulation de la transcription des gènes cibles, le facteur d'inhibition de HIF-1 (FIH-1), qui hydroxyle l'asparagine en position 803, dans le domaine C-TAD (figure 12-13). Ce facteur bloque le recrutement du co-activateur, l'acétyltransferase p300/*Creb-Binding Protein* (CBP), inhibant ainsi l'activité de HIF-1 (figure 12) [288].

En hypoxie, l'activité des dioxygénases est réduite, HIF-1 α est stabilisé, puis transloqué dans le noyau, où il interagit avec HIF-1 β pour former l'hétérodimère HIF-1 (figure 12) [283]. L'initiation de la transcription de centaines de gènes est régulée par HIF-1, et ce, à travers sa fixation sur les séquences *hypoxia response element* (HRE) dotés d'un motif 5'(A/G)CGTG3', localisés dans la région promotrice de chaque gène cible [198, 289] (figure 12). L'activité de HIF-1 consiste à la régulation de l'expression de gènes impliqués dans diverses fonctions, attribuant à ce facteur de transcription un rôle majeur dans l'angiogénèse, la production d'érythrocytes, la croissance, la prolifération, la survie, le métabolisme glucidique...

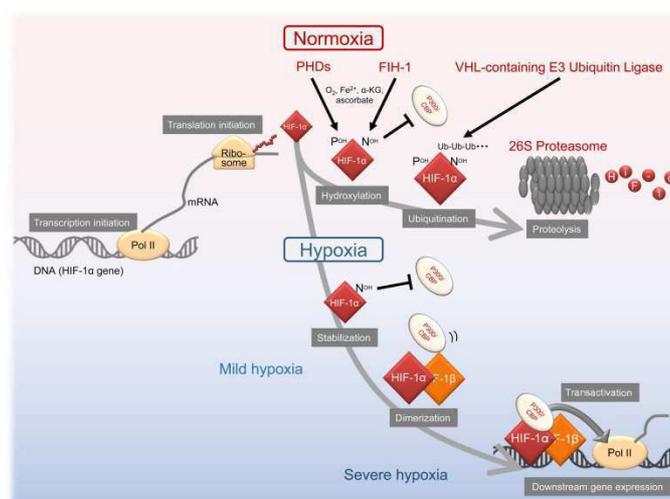


Figure 12 : Régulation de l'activité du facteur de transcription HIF-1 α par le taux d'oxygène, d'après Koyasu et al. [290].

Régulation

Comme vu précédemment, l'activité de HIF-1 est régulée par les hydroxylations de HIF-1 α dépendantes des PHD et du FIH. Mais il existe aussi des voies de régulations de HIF-1 indépendantes de l'oxygène [290](figures 12-13).

Si l'on s'intéresse plus précisément d'abord aux voies de régulation O₂ dépendantes, il apparaît que selon la profondeur de l'hypoxie, l'activité de HIF-1 est modulée. Par exemple, sur différents types cellulaires, une hypoxie modérée, avec 1% O₂ pendant 5h, inhibe les PHD alors qu'il faut une hypoxie plus sévère pour bloquer la fixation du FIH, 0,2% O₂ pendant 5h [291]. Le fonctionnement des PHD dépend de deux substrats, l'oxygène et l' α -ketoglutarate, ainsi que de deux cofacteurs, l'ion ferrique et l'ascorbate. Outre la régulation de l'oxygène, la disponibilité en α -ketoglutarate, un intermédiaire du cycle de Krebs, régule l'activité des PHD. Sa production dépend de l'activité de certaines enzymes de ce cycle, la succinate déshydrogénase (SDH), la fumarate hydratase (FDH) et les isocitrate déshydrogénase 1-2 (IDH), et de l'IDH3 cytosolique (figure 13). La fixation des PHD peut être empêchée par la fixation de la protéine *NADPH quinone oxidoreductase 1* (NQO1) sur le domaine ODD. En revanche, l'activité de certaines PHD comme la PHD2 peut aussi être favorisée par la sirtuine (Sirt) 2, une déacétylase, qui en enlevant un groupe acétyl dans le domaine d'inhibition (ID), augmente l'interaction de la PHD2 avec HIF-1 α . Le FIH est aussi sensible à la présence l' α -ketoglutarate et d'ion ferrique, ainsi il est aussi régulé par l'IDH3 (figure 12-13).

Pour ce qui est de la régulation de HIF-1 α indépendante de l'oxygène, elle peut avoir lieu au niveau de sa transcription, avec la fixation au niveau du promoteur du gène de facteurs activateurs, tels que le complexe *interferon-stimulated gene factor 3* (ISGF3, composé du *signal transduceur and activator of transcription* (STAT) 1, STAT2, *interferon regulatory factor* (IRF) 9) ou STAT3 ou NF- κ B, ou encore inhibiteur, comme *NF-E2-related factor 1* (NRF1). La traduction de HIF-1 est aussi régulée par la voie *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K)/Akt/*mammalian target of rapamycin* (mTOR). Par ailleurs, illustré sur la figure 13, la translocation nucléaire de HIF-1 est inhibée par la *mitogen-activated protein kinases* (MAPK), en phosphorylant des sérines à proximité du signal d'export de la protéine vers le noyau. De plus, l'hétérodimérisation avec HIF-1 β est empêché par la phosphorylation d'une sérine par la *protéine casein kinase 1 δ* (CK1 δ) dans le domaine PAS. L'activité transcriptionnelle est

aussi renforcée par l'acétylation du domaine C-TAD due à *p300/CBP-associated factor* (PCAF), ainsi la déacétylation de HIF-1 α par la Sirt1 a été montrée pour diminuer l'activité de HIF-1, en inhibant la fixation de l'acétyltransférase p300/CBP. Néanmoins, l'impact majoritaire de la modulation de l'activité de HIF-1 est au niveau de la stabilité de la protéine HIF-1 α . Par exemple, la protéine *heat shock protein 90* (hsp90) protège HIF-1 α d'une dégradation, par sa fixation sur le domaine PAS, mais la protéine *receptor for activated C kinase 1* (RACK1) peut dissocier hsp90 par compétition, induisant ainsi la déstabilisation de HIF-1 α en se substituant au pVHL dans le complexe d'ubiquitinylation [292]. La protéine HIF-1 α est déstabilisée par des phosphorylations induites par les protéines *glycogen synthase kinase 3* (GSK3) et *polo-like kinase 3* (PLK3) dans les domaines ID et N-TAD ; par la méthylation dû à l'histone méthyltransférase Set7/9, ainsi la déméthylation par *lysine-specific demethylase-1* (LSD1) stabilise HIF-1 α dans le domaine HLH (figure 13). Enfin, l'effet de la sumonylation sur la stabilité de HIF-1 α est encore controversé, puisque la sumonylation par le *RWD-containing SUMOylation enhancer* (RSUME) et la désomonylation par la *sentrin/SUMO-specific protease* (SENP) augmentent sa stabilité (figure 13).

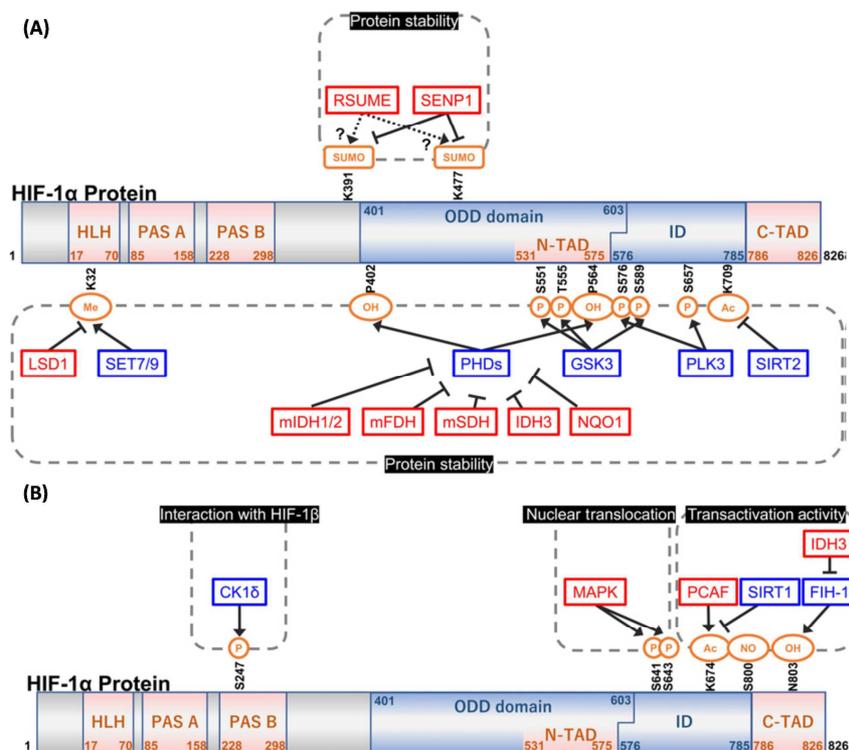


Figure 13 : Structure de HIF-1 α et sa régulation par hydroxylation (OH), acétylation (Ac), méthylation (Me), phosphorylation (P) et sumonylation (SUMO) d'après Koyasu et al.. [290].

L'activité du facteur de transcription HIF-1 est donc régulée de différentes manières. Néanmoins sa régulation conventionnelle est O₂ dépendant, avec une activation accrue de HIF-1 en hypoxie. Nous allons voir par la suite que l'intermittence de l'hypoxie est également un puissant activateur de HIF-1.

Implication de HIF-1 dans la réponse à l'HI chronique

Même si HIF-1 est connu pour ces effets protecteurs lorsqu'il est activé par de brefs épisodes d'hypoxie, par exemple lors du pré- ou post-conditionnement myocardique, son activation chronique et plus particulièrement en HI est délétère pour le système cardiovasculaire. Sur des cellules PC12 (cellules originaires d'un phéochromocytome de la medullosurrénale de rat), l'exposition à des cycles d'HI (30 secondes d'hypoxie à 1,5% et 4 minutes de normoxie à 20% d'oxygène) augmente proportionnellement en fonction du nombre de répétition de cycles d'HI (10, 30, 60, 120 fois) à la fois l'expression nucléaire de HIF-1 α et son activité transcriptionnelle. De plus, l'activité de HIF-1 est 2,5 fois plus importante avec 120 cycles d'HI qu'après une heure d'hypoxie continue à 1,5% d'oxygène [293] (figure 15). Enfin, la même équipe sur des cellules PC12, a montré qu'après 5 heures d'hypoxie continue, moins de 10 minutes de réoxygénation suffisaient pour dégrader la protéine HIF-1 α , alors que la stabilisation de HIF-1 α perdure au moins 90 minutes après 60 cycles d'HI [294] (figure 15). Ainsi, l'HI est un stimulus robuste, entraînant une activation de HIF-1 persistante et chronique.

Ce postulat s'appuie sur le fait que HIF-1 est bien connu pour être activé par le stress oxydant généré par l'HI, comme vu précédemment (figure 15). En effet, en HI, la production d'O₂⁻ par la NADPH oxydase inhibe directement les PHD, ou indirectement en activant la protéine kinase C (PKC) [282]. La PKC est produite par l'activation ROS-dépendante de la phospholipase C (PLC), une enzyme membranaire, qui clive le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP₂) en inositol tri-phosphate (IP3) et diacylglycérol (DAG). Le DAG active la PKC, alors que l'IP3 se lie aux canaux calciques de la membrane du réticulum endoplasmique (IP3R), impliqués dans l'efflux calcique du RE vers le cytosol. Le calcium active les protéines kinases Ca²⁺/calmoduline-dépendantes (CaMK), ainsi que la PKC, dont l'activité dépend de la concentration calcique intracellulaire [293]. Enfin, les ERO entraînent, une activation de la

synthèse de HIF-1 α par la voie PI3K/Akt/mTOR activée par la PKC [294], une stabilisation de HIF-1 α par l'inhibition des PHD, et une transactivation de HIF-1 par la phosphorylation du coactivateur, l'acétyltransferase p300/CBP, dû à la CaMK [282, 295](figure 14).

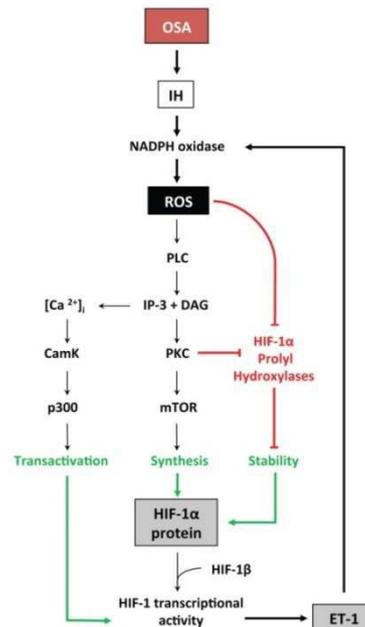


Figure 14 : Les différentes voies de signalisation régulant l'activation de HIF-1 α par le stress oxydant en HI, d'après Belaidi et al. [295].

En clinique, chez les patients SAOS, les gènes cibles de HIF-1 ont souvent été étudiés. Par exemple, la concentration plasmatique de l'érythropoïétine (EPO) est plus élevée chez les patients apnéiques par rapport aux patients contrôles, et cette différence est abolie par le traitement à la PPC [296]. De même, plusieurs études se sont intéressées à l'augmentation des taux plasmatiques du *vascular endothelial growth factor* (VEGF) et de l'ET-1 chez les patients SAOS, et ont montré une corrélation positive entre l'IAH et ces taux de molécules circulantes [202, 297-299]. Cependant, seulement deux études ont mesuré directement des éléments du facteur de transcription sur de petits effectifs (figure 15). Dans des biopsies de peau, l'expression des transcrits codant pour HIF-1 α est augmentée chez les patients atteints d'un SAOS sévère [300]. De même, dans le sérum de patients SAOS sévère, la quantité de protéine HIF-1 α est augmentée, par rapport aux patients contrôles ou avec un SAOS léger à modéré, et est positivement corrélée avec l'IAH [301].

Les modèles animaux et cellulaires d'HI ont permis de confirmer que ce facteur de transcription pouvait jouer un rôle majeur dans la physiopathologie du SAOS, voir même dans les pathologies associées. En effet, l'HI chronique est reconnue pour augmenter

l'expression de HIF-1 dans divers organes : cœur [198, 302], vaisseaux [258, 303], intestin [304], cerveau [305], foie ou poumons [306] (figure 15). En particulier, dans notre contexte, l'activation de HIF-1 a été montrée pour être impliquée dans les conséquences cardiovasculaires délétères de l'HI. Des travaux du laboratoire ont mis en évidence que chez le rat, l'exposition à 14 jours d'HI induit une augmentation de l'activité de HIF-1 et la fixation de HIF-1 sur le HRE du gène codant pour l'ET-1. Ceci est renforcé par une élévation de la quantité d'ET-1 au niveau cardiaque, qui est associé à une augmentation de la taille d'infarctus et de la pression artérielle [198]. Par ailleurs, au laboratoire, l'utilisation de souris partiellement déficientes pour le gène HIF-1 α a montré que 14 jours d'HI entraînent un remodelage vasculaire, induit par une augmentation de l'activité de NF- κ B dépendante de HIF-1 [258]. Dans ces deux études, l'administration du bosantan (un antagoniste mixte des récepteurs à l'ET-1) pendant l'exposition à l'HI a prévenu ces conséquences délétères pour le système cardiovasculaires, révélant le rôle délétère de HIF-1, à travers l'activation du gène codant pour l'ET-1 et l'intérêt d'étudier plus précisément ce facteur de transcription [198, 258].

Comme vu au début de ce chapitre l'activation de HIF-1 par le stress oxydant est donc bien décrite. A ce jour, HIF-1 est connu pour être un mécanisme secondaire de l'HI, mais il pourrait être placé en amont des mécanismes principaux du SAOS. En effet, la délétion partielle de HIF-1 α dans un modèle de souris exposées à l'HI empêche la genèse d'un stress oxydant, évalué avec un marqueur de la peroxydation des lipides, les *thiobarbituric acid reactive substances* (TBARS) [307]. Dans ce même article, la délétion de HIF-1 α abolit aussi l'activation sympathique, en préservant la sensibilité des chémorécepteurs et des barorécepteurs et la production des catécholamines [307]. Ainsi, l'abolition par HIF-1 du stress oxydant et de l'activation sympathique empêche l'augmentation de la pression artérielle [307] (figure 15). De plus, dans le même type de modèle expérimental, la délétion de HIF-1 α empêche le développement de l'inflammation induit par l'HI, responsable du remodelage vasculaire, en prévenant l'altération de l'épaisseur intima-média, la migration des splénocytes et la suractivité de NF- κ B [258] (figure 15). Ainsi, ces deux articles suggèrent donc que HIF-1 pourrait être le mécanisme clé de l'HI, et préviendrait aussi ses conséquences CV délétères.

Mécanismes du SAOS et de l'HI chronique	Modèle de SAOS	Marqueurs	Références
Activation sympathique	Patients SAOS	<ul style="list-style-type: none"> Déséquilibre de la balance du système nerveux autonome au profit du système sympathique Concentrations élevés en catécholamines Augmentation de l'activité nerveuse sympathique musculaire Diminution de la sensibilité du baroréflexe 	Review [246]
	Volontaires sains exposés à l'HI	<ul style="list-style-type: none"> Augmentation de l'activité nerveuse sympathique musculaire Diminution de la sensibilité du baroréflexe 	[188]
	Animaux exposés à l'HI	<ul style="list-style-type: none"> Concentrations élevés en catécholamines Augmentation de l'activité nerveuse sympathique musculaire Diminution de la sensibilité du baroréflexe Augmentation de la sensibilité du chémoréflexe Activation sympathique causée par le stress oxydant 	Review [250]
Inflammation	Patients SAOS	<ul style="list-style-type: none"> Exemple de biomarqueurs inflammatoires potentiels du SAOS chez les adultes: taux plasmatiques IL-6 et IL-10 Différences de variations des biomarqueurs du SAOS selon le genre 	Review [253] [256]
	Animaux exposés à l'HI	<ul style="list-style-type: none"> Activation du facteur de transcription pro-inflammatoire NF-κB Augmentations de l'expression des cytokines et chémokines pro-inflammatoires Recrutement et polarisation en profil M1 pro-inflammatoire des macrophages 	[217, 257, 258] [217] [259, 260]
Stress oxydant	Patients SAOS	<ul style="list-style-type: none"> Augmentation de la production d'anions O_2^- Augmentation de l'expression NADPH oxydase plasmatique Diminution de la biodisponibilité du NO plasmatique Augmentation de la peroxydation des lipides et de l'ADN plasmatiques Diminution des capacités antioxydantes plasmatiques (vitamine A, superoxyde dismutase) 	[263, 299] [264, 266, 267] [266, 269-271] [273-276]
	Animaux exposés à l'HI	<ul style="list-style-type: none"> Augmentation de l'expression NADPH oxydase cardiaque Diminution de la biodisponibilité du NO cardiaque Augmentation de la peroxydation des lipides et de l'ADN dans le cœur ou le foie Diminution de l'expression de la superoxyde dismutase cardiaque 	[190, 265] [268] [268, 272] [190]
HIF-1	Patients SAOS	<ul style="list-style-type: none"> Augmentation l'ARNm HIF-1α dans la peau chez les patients SAOS sévères Augmentation de la protéine HIF-1α plasmatique chez les patients SAOS sévères 	[300] [301]
	Animaux exposés à l'HI	<ul style="list-style-type: none"> Augmentation de l'expression de HIF-1α dans le cœur, les vaisseaux, l'intestin, le cerveau, le foie ou les poumons Délétion partielle de HIF-1α abolit l'activation sympathique, l'inflammation et le stress oxydant 	[198, 258, 302-306] [258, 307]
	Cellules exposées à l'HI	<ul style="list-style-type: none"> Activation de HIF-1 plus importante en HI qu'en hypoxie continue Activation persistante de HIF-1 après un retour à la normoxie Activation de HIF-1 causée par le stress oxydant 	[293] [294] [282]

Figure 15 : Les mécanismes physiopathologiques du SAOS et de l'HI chronique

En conclusion de cette partie, parmi les conséquences du SAOS, l'HI est la conséquence la plus délétère pour le système cardiovasculaire. Notamment dans le contexte de l'infarctus du myocarde, que ce soit chez l'homme ou dans des modèles d'ischémie-reperfusion chez l'animal, l'HI semble fortement responsable d'une aggravation de la taille d'infarctus. L'activation persistante et chronique de HIF-1 aurait un rôle clé dans cette réponse délétère à l'HI chronique au niveau cardiaque. Nous avons vu que HIF-1 était étroitement lié aux mécanismes principaux du SAOS. Par ailleurs, les traitements ciblant l'activité sympathique, l'inflammation, le stress oxydant n'ont pas été montrés pour améliorer les conséquences du SAOS, et peu d'entre eux ont été étudiés dans le contexte de l'infarctus du myocarde. Ainsi, la compréhension de l'implication de HIF-1 et de nouveaux mécanismes en HI représente un enjeu majeur pour développer des thérapies complémentaires ou substitutives à la PPC et améliorer la prise en charge des patients SAOS, ayant un risque accru d'infarctus du myocarde.

3. Objectifs

L'objectif général de cette thèse est d'étudier les mécanismes induits par une exposition chronique à l'HI, susceptibles d'expliquer l'augmentation de la taille d'infarctus suite à une ischémie-reperfusion.

Ces dernières années, les traitements ciblant les mécanismes principaux du SAOS, que sont l'activité sympathique, l'inflammation et le stress oxydant, n'ont pas montré d'amélioration des pathologies associées au SAOS, notamment dans l'augmentation de la taille de l'infarctus. Ainsi, dans le contexte de l'HI chronique, une conséquence majeure du SAOS, nous nous sommes intéressés à HIF-1, un facteur de transcription clé de la réponse à l'hypoxie.

Par ailleurs, dans le contexte de l'infarctus du myocarde, notre intérêt s'est porté sur l'homéostasie de deux organites qui ont été peu étudiés dans le cadre de l'HI chronique, le RE et la mitochondrie.

Ce travail s'articule donc autour de trois études présentées dans ce manuscrit (1 en cours de soumission, 1 en cours de finalisation et 1 en cours de réalisation).

Dans la première étude, nous nous sommes intéressés au stress du RE, connu pour son rôle dans la vulnérabilité du myocarde à l'ischémie-reperfusion et ce, indépendamment de l'HI. Au démarrage de ce travail, quelques publications montraient que l'HI induisait un stress du RE dans le cœur [308, 309] et le cerveau [310-312]. Il avait également été montré que l'HI n'induit plus d'augmentation de l'expression cérébrale de HIF-1 α chez des souris dépourvues du gène codant pour un facteur pro-apoptotique de la réponse au stress du RE (CHOP^{-/-}). De plus, une étude du laboratoire (à laquelle j'ai participé en Master 2 et en début de thèse, présentée en Annexe) a mis en évidence que l'HI entraîne des perturbations de

l'homéostasie calcique liées à un stress du RE, lui-même responsable d'une activation de HIF-1 et d'une aggravation de la taille de l'infarctus suite à un protocole d'ischémie-reperfusion myocardique [313]. Ceci suggérait un lien probable entre HIF-1 et le stress du RE [312, 313]. Par ailleurs, quelques études rapportaient que HIF-1 était impliqué dans l'expression ou l'activation d'acteurs de l'homéostasie calcique tels que de VDAC1, SERCA, NCX1 [314-316]. De plus, il avait été montré que HIF-1 pouvait se fixer dans la région promotrice du gène codant pour CHOP et activer sa transcription [317]. Ainsi, HIF-1 pourrait être impliqué dans la genèse du stress du RE induit par l'HI, via une altération de l'homéostasie calcique, ce qui contribueraient à expliquer l'augmentation de la mort cellulaire suite à l'ischémie-reperfusion myocardique.

Dans cette première étude, les objectifs ont donc été de caractériser le rôle de HIF-1 dans l'augmentation de la taille d'infarctus induite par l'HI, en déterminant son implication dans des mécanismes connus pour être impliqués dans la mort cellulaire suite à une ischémie-reperfusion, tels que l'intégrité des MAM, les échanges calciques entre le RE et la mitochondrie et le stress du RE.

A travers les MAM, les altérations du RE sont susceptibles d'impacter le fonctionnement mitochondrial. Notre intérêt s'est donc ensuite porté sur la mitochondrie, bien connue pour son rôle dans la réponse à l'ischémie-reperfusion et peu étudiée dans le contexte de l'HI. Les quelques études effectuées rapportent une augmentation de la production mitochondriale d'ERO dans le cerveau [318-320] et les corps carotidiens [321] et une diminution de la biogénèse mitochondriale dans le muscle génioglosse [322]. En revanche, un rôle majeur de HIF-1 dans la réponse mitochondriale à l'hypoxie continue a été décrit [323] : adaptation de l'activité du complexe IV mitochondrial [324], activation du métabolisme glycolytique [325-327], réduction de la biogénèse et de la respiration mitochondriales [328-330] et déclenchement de la mitophagie [145].

Les objectifs de ce deuxième travail ont donc été de caractériser l'impact de l'HI sur la structure, la fonction, la dynamique et le renouvellement mitochondrial des cardiomyocytes ainsi que le rôle de HIF-1 dans ces altérations potentielles.

Pour terminer, en parallèle de ces travaux, nous avons initié une étude permettant de statuer sur le rôle majeur de HIF-1 dans la physiopathologie du SAOS. En effet, comme nous l'avons vu dans l'introduction et dans nos trois études précédentes, les mécanismes d'adaptations à l'HI sont étroitement liés à l'activation de HIF-1. Ainsi, nous avons voulu savoir si HIF-1 pouvait être en amont de ces mécanismes en utilisant un inhibiteur pharmacologique de son activité, la curcumine. De plus, plusieurs études ont démontré que la curcumine diminue l'expression de HIF-1 en conditions hypoxiques [331-339].

Cette dernière étude, en cours de réalisation, a donc pour objectif de montrer que HIF-1 joue un rôle central dans les mécanismes délétères de la réponse à l'HI, à savoir l'activation sympathique, l'inflammation, le stress oxydant, le stress du RE et les altérations mitochondriales.

MATERIEL ET METHODES

Dans cette partie, tout le matériel utilisé et toutes les méthodes auxquelles j'ai eu recours sont décrits. Néanmoins, dans la partie « résultat », avant chaque étude, le design expérimental de l'étude est rappelé et les méthodes sont référencées.

1. Design expérimentaux

a. Etude 1 : rôle de HIF-1 dans l'altération des MAM, le stress du RE et l'augmentation de la taille d'infarctus induits par l'HI chronique

Dans cette étude, des souris mâles Swiss/SV129, WT ou HIF-1 $\alpha^{+/-}$, âgés de 7 à 8 semaines, ont été exposées 21 jours à des cycles d'HI ou de N. A la fin de l'exposition, l'expression de HIF-1, les flux calciques inter-organites, l'intégrité des MAM, le stress du RE, et la taille d'infarctus après ischémie-reperfusion ont été évalués. Cette partie animale explore les mécanismes cellulaires et moléculaires de l'HI, et sont associés à l'évaluation de l'axe « HIF-1-stress du RE » sur des biopsies d'appendice d'auricule droit de patients atteints de maladie coronarienne avec ou sans *sleep disordered-breathing* (SDB).

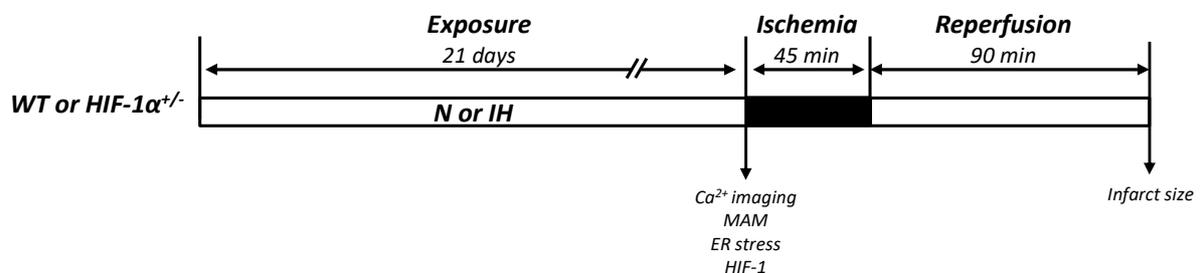


Figure 16 : Design expérimental de l'étude 1 : rôle de HIF-1 dans l'altération des MAM, le stress du RE et l'augmentation de la taille d'infarctus induits par l'HI chronique.

b. Etude 2 : rôle de HIF-1 dans les altérations mitochondriales induites par l'HI chronique

Cette étude a été réalisée avec le même design animal expérimental que l'étude précédente, soit des souris mâles Swiss/SV129 WT ou HIF-1 α ^{+/-}, âgés de 7 à 8 semaines, exposés 21 jours à des cycles d'HI ou de N. A la fin de l'exposition, la structure, la fonction, la dynamique et le renouvellement mitochondrial ont été investigués après prélèvements du cœur.

Nos résultats nous ont poussé à traiter des souris WT avec de la metformine (300 mg.kg⁻¹, Sigma-Aldrich, Etats-Unis), un activateur de l'AMP-activated protein kinase (AMPK) ou le véhicule (carboxyméthyl-cellulose sodium, CMC-Na 0,1%), par gavage, chaque jour pendant l'exposition en HI ou N. Ces souris ont été soumises à un protocole d'ischémie-reperfusion pour estimer la taille d'infarctus, ainsi qu'à des prélèvements cardiaques pour évaluer la dynamique et le renouvellement mitochondrial.

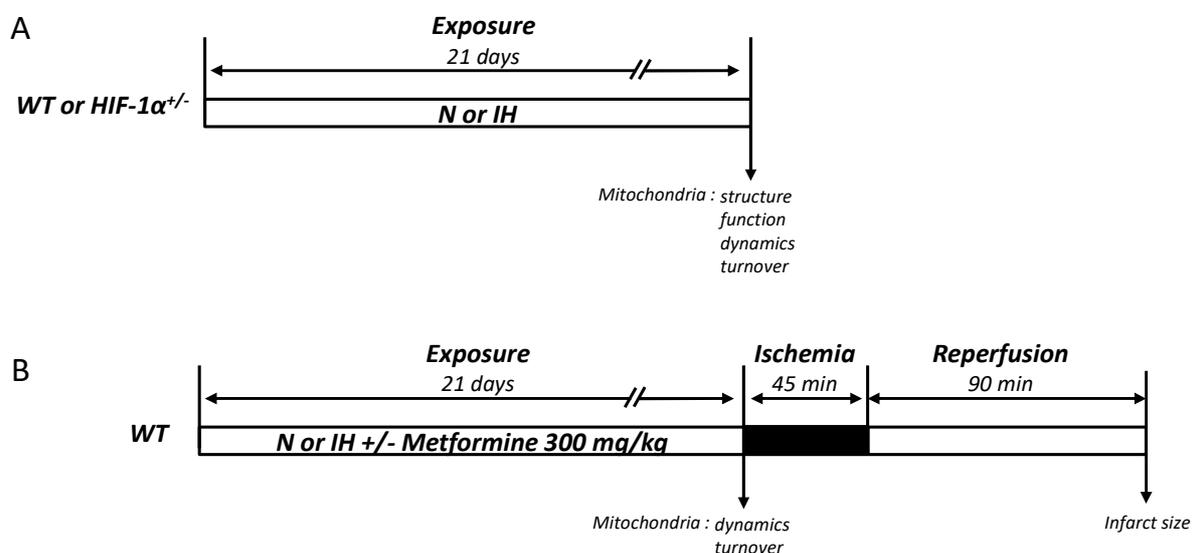


Figure 17 : Design expérimental de l'étude 2 : rôle de HIF-1 dans les altérations mitochondriales induites par l'HI chronique

c. Etude 3 préliminaire : rôle de HIF-1 dans les mécanismes d'adaptation délétères induits par l'HI chronique. Effets d'un inhibiteur de l'activité de HIF-1, la curcumine.

Pour cette étude menée en parallèle des trois précédentes, afin de confirmer le rôle majeur de HIF-1 dans les conséquences de l'HI, des souris Swiss/SV129, âgés de 7 à 8 semaines, ont été traitées avec de la curcumine (100 mg.kg⁻¹, Sigma-Aldrich, Etats-Unis), issue de la plante *Curcuma Longa*, un inhibiteur de la fixation de HIF-1 sur le HRE dans le promoteur des gènes cibles ou avec le véhicule (CMC-Na 0,1%, Sigma-Aldrich, Etats-Unis), par gavage, chaque jour, pendant l'exposition de 21 jours à l'HI ou à la N. A la fin de l'exposition, ces souris ont été soumises à un protocole d'ischémie-reperfusion pour mesurer la taille d'infarctus, ainsi qu'à des prélèvements cardiaques pour évaluer l'expression de HIF-1 et les marqueurs clés de l'activation sympathique, de l'inflammation et du stress oxydant, du stress du RE, des altérations mitochondriales. Cette étude étant en cours de réalisation, une seule partie a été réalisée et est présentée.

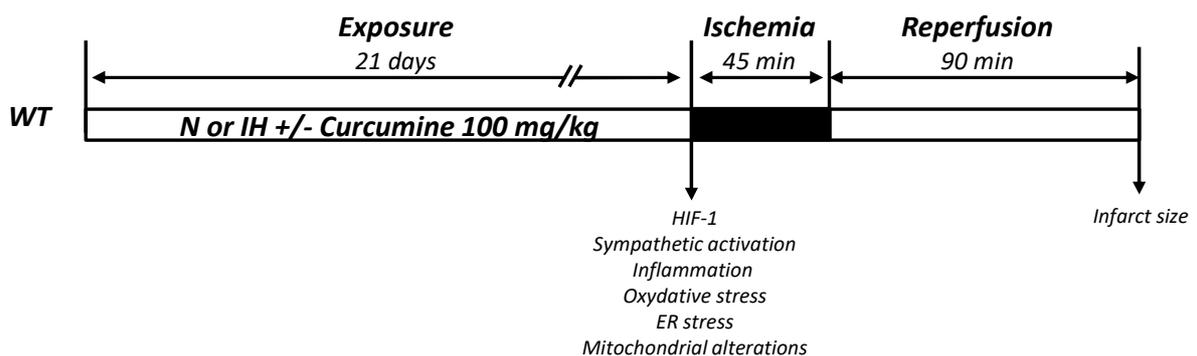


Figure 18 : Design expérimental de l'étude 3 préliminaire : rôle de HIF-1 dans les mécanismes d'adaptation délétères induits par l'HI chronique et effets d'un inhibiteur de l'activité de HIF-1, la curcumine.

2. Matériel

a. Patients atteints d'une maladie coronarienne avec ou sans apnées du sommeil

39 patients subissant un pontage coronarien ont été prospectivement inclus dans une étude approuvée par le comité d'éthique local, à l'Hôpital Universitaire de Regensburg (Allemagne). Les patients ont été informés et ont signé des consentements conformes à la déclaration d'Helsinki pour leur inclusion dans l'étude. Les biopsies d'appendice auriculaire droit ont été réalisées lors du pontage coronarien et la polysomnographie a eu lieu la nuit avant l'opération à l'aide du dispositif ApneaLink (ResMed Inc., Allemagne) en mesurant le débit nasal, la saturation en oxygène et les efforts thoraciques respiratoires. Les apnées sont définies comme une diminution du débit d'air de 80 % pendant plus de 10 s, une diminution du débit d'air entre 50-80 % par rapport à la base pendant 10 s ; la désaturation est définie par une diminution de 4 % de la saturation en oxygène ; le SDB est défini par un IAH \geq 15/h.

b. Animaux

Les études ont été approuvées par le Ministère Français de l'éducation nationale de l'enseignement supérieur et de la recherche (2015061813053181, 8956-2017020809146998). Les animaux ont été hébergés dans l'animalerie du laboratoire HP2 (numéro : A3851610006) avec des conditions réglementaires de température, d'hygrométrie, avec des cycles d'alternance jour/nuit de 12h. La nourriture et la boisson sont données ad libitum. Toutes les expérimentations respectent la « Convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques » (décret 2013-118 du 1^{er} février 2013). Pendant l'ensemble des études, le poids des souris a été suivi et l'hématocrite mesurée pour vérifier l'efficacité de l'hypoxie intermittente, décrite ci-dessous.

3. Méthodes

a. Modèle d'exposition à l'hypoxie intermittente

Le dispositif à hypoxie intermittente du laboratoire permet de mimer les épisodes répétitifs d'hypoxie-réoxygénation des patients atteints d'apnée du sommeil. Pour cela, l'appareil régule la fraction inspirée en oxygène (FiO_2) directement dans les cages d'hébergement des animaux. L'hypoxie est obtenue par l'injection d'azote dans les cages avec un système d'électrovannes. L'ouverture et la fermeture des électrovannes sont commandées par un système de pilotage informatisé programmable, permettant d'obtenir des cycles d'hypoxie/normoxie de courte durée. Les souris hypoxiques sont exposées à l'HI 8h par jour (de 6h à 14h) avec des cycles d'une minute, composé de 30 secondes d'hypoxie avec une FiO_2 à 5 % et 30 secondes de normoxie avec une FiO_2 à 21 % (figure 19). Ces cycles d'hypoxie intermittente induisent une désaturation correspondant aux apnées sévères chez des patients, avec une saturation artérielle en dioxygène d'environ 60 %. En parallèle, les souris normoxiques sont exposées aux mêmes flux d'air avec une FiO_2 à 21 %, et ont donc le même stress pour le bruit et les mouvements d'air que les souris soumise à l'HI.

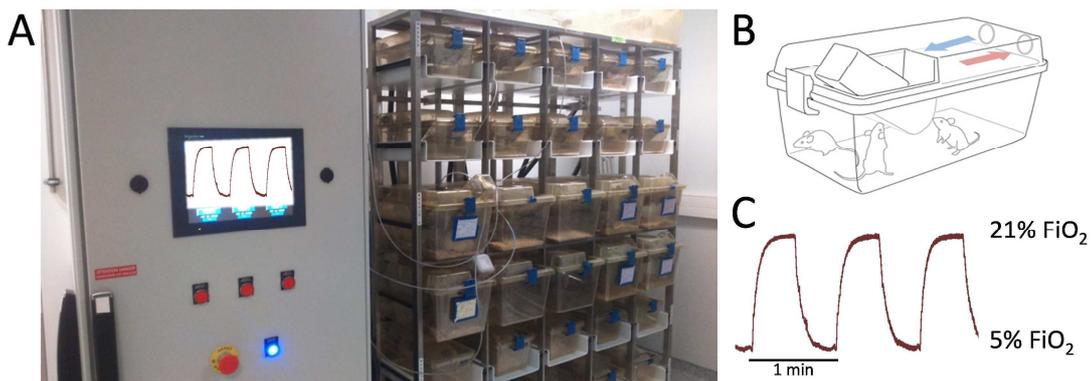


Figure 19 : Dispositif d'exposition à l'HI de rongeurs, présent au laboratoire HP2. Les cages sont placées dans un portoir ventilé (A) permettant de contrôler l'air injecté (flèche bleu) (B). La flèche rouge représente le flux d'air sortant (B). La fraction inspirée en oxygène (FiO_2) des animaux est modulée par un enrichissement en azote permettant d'obtenir les cycles d'HI, composés de 30 secondes d'hypoxie avec une FiO_2 à 5 % et 30 secondes de normoxie avec une FiO_2 à 21 % (C).

b. Ischémie-reperfusion *in vivo* et taille de l'infarctus

Les souris sont anesthésiées par une injection en intrapéritonéale de pentobarbital sodique (70 mg.kg^{-1}). La ventilation est maintenue par intubation (volume courant $170 \mu\text{l}$ avec de l'air ambiant). La température corporelle est régulée à 37°C par une sonde rectale reliée à une plaque chauffante. Après une thoracotomie gauche, l'artère coronaire gauche est ligaturée pendant 45 min, entraînant une ischémie, puis la ligature est relâchée pendant 90 min, déterminant la période de reperfusion. A la fin, la ligature est resserrée définitivement, une injection intraveineuse par la veine fémorale de colorant bleu Uniparse permet de colorer la zone non touchée par l'ischémie et donc de déterminer la zone à risque. Le cœur est prélevé, congelé et découpé en tranches pour être incubé 20 min dans du triphenyltetrazolium chloride (1 %) colorant en blanc la zone nécrosée. Les zones à risque et nécrosée sont mesurées par planimétrie sur Image J et rapportées au poids du cœur.

c. Isolation des cardiomyocytes de souris adultes

Les souris sont anesthésiées avec une injection en intrapéritonéale de pentobarbital sodique (70 mg.kg^{-1}), suivie d'une injection en intrapéritonéale d'héparine (50 UI.kg^{-1}) pour fluidifier le sang. Les cœurs sont rapidement prélevés et rétro-perfusés par l'aorte (méthode de Langendorff) avec un tampon de perfusion (PB contenant 113 mM NaCl , $4,7 \text{ mM KCl}$, $0,6 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, $1,2 \text{ mM MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,032 \text{ mM Phenol Rouge}$, 12 mM NaHCO_3 , 10 mM KHCO_3 , 10 mM HEPES , 30 mM Taurine , $10 \text{ mM Butanedione monoxime}$, $5,5 \text{ mM glucose}$, $\text{pH } 7,46$) à 37°C pendant 5 minutes. Les cœurs sont ensuite digérés avec un cocktail enzymatique appelé Liberase™ ($0,17 \text{ mg.mL}^{-1}$, Roche Diagnostics, France) pendant environ 20 minutes selon le débit coronaire. La digestion est arrêtée par incubation du cœur dans un tampon PB additionné de $12,5 \mu\text{M CaCl}_2$, 10 % sérum prémium de veau (PAA Cell Culture Company, Grande Bretagne). Les cardiomyocytes sont isolés par mouvement et aspiration, puis filtrés sur une membrane à $200 \mu\text{m}$. La remontée en concentration calcique se fait progressivement de 50 à $1000 \mu\text{M Ca}^{2+}$, ensuite les cellules sont transférées dans un milieu de culture (M199, Life Technologies, Etats-Unis) additionné de pénicilline-streptomycine (1 U.mL^{-1} , Life Technologies, Etats-Unis) et insuline-transferrine-sélénium (1 U.mL^{-1} , Sigma-

Aldrich, USA). Enfin, les cardiomyocytes sont fixés dans des chambres à lames en verre de Lab-Tek®, pré-coatées avec $1 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ de laminine (Sigma-Aldrich, Etats-Unis) pendant 2 h dans un incubateur humide à 5 % CO_2 - 95 % O_2 à 37 °C.

i. Flux calciques inter-organites

Les cardiomyocytes isolés sont transférés dans une solution de Tyrode (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 10 mM glucose) pendant 20 minutes à 37 °C avec du Fluo4-AM ($3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Life Technologies, Etats-Unis) et Rhod2-AM ($6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Life Technologies, Etats-Unis), ou du Fluo5-AM ($3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Life Technologies, Etats-Unis) et Rhod2-AM. Fluo4-AM, Fluo5-AM et Rhod2-AM sont des sondes fluorescentes indicatrices du calcium cytosolique, du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie, respectivement. Après 30 min d'incubation, la fluorescence est mesurée en utilisant un microscope confocal Zeiss LSM 710 couplé à un laser (x630 immersion à huile; *exciter laser scanning*, excitation 488 nm et émission Fluo4-AM 506 nm; Fluo5-AM 516 nm; Rhod2-AM 581 nm séparés par un mode spectral, HFT488 beamsplitter dichroïque). L'acquisition spectrale et la déconvolution ont été effectuées dans l'intervalle spectral spécifique en utilisant le spectre individuel de chaque sonde. La résolution est de 9,7 nm et la mesure des sondes est faite simultanément, afin d'éviter des erreurs de mesures dues aux mouvements cellulaires, en utilisant le détecteur de spectre Quasar (Carl Zeiss, Oberkoren, Allemagne). L'acquisition et l'analyse ont été réalisées avec l'aide d'un ingénieur Mr Grichine, à la plateforme du laboratoire IAB. Après enregistrement de la fluorescence basale, l'histamine (100 μM , Sigma-Aldrich, Etats-Unis) est ajoutée sur les cellules pour induire la vidange du calcium du réticulum endoplasmique par le récepteur IP3R, pour visualiser le passage du calcium du réticulum endoplasmique dans la mitochondrie. La fluorescence est normalisée par rapport à la fluorescence basale avant l'application de l'histamine ($F1/F0$) et la vitesse de fluorescence est calculée entre 250 et 50 secondes après l'application de l'histamine ($F1/F0 \text{ slope}_{250-50}$).

ii. Proximity Ligation Assay par la méthode Duolink[®]

La proximité entre deux protéines de moins de 40 nm est mesurée par la technique de Duolink[®] *Proximity Ligation Assay* (PLA, Sigma-Aldrich, Etats-Unis) sur des cardiomyocytes isolés fixés par du paraformaldéhyde 4 % et perméabilisés (0,1 % de Triton X-100). Les cellules sont incubées avec 2 µg de deux anticorps primaires, provenant de différentes espèces, toute la nuit à 4°C. Ensuite, les sondes PLA (1 h), les enzymes de ligation (30 min) et d'amplification (polymérase 100 min) sont successivement appliqués à 37 °C dans une chambre humide. Après montage avec un milieu contenant du DAPI marquant le noyau en bleu (DAPI mounting medium, Sigma-Aldrich, Etats-Unis), les spots rouges représentant les interactions ont été photographiés par un microscope à fluorescence utilisant l'axiocam et son logiciel (Zeiss, Allemagne, x400), et analysés par le logiciel BlobFinder (The Centre for Image Analysis, Suède). Le nombre d'interactions par cellule a été quantifié.

d. Isolation de mitochondries de cœur

Après le sacrifice de la souris par dislocation cervicale, le cœur est prélevé, coupé et broyé au potter verre-verre dans un tampon (50 mM Tris-Base, 10 mM EGTA, 1 mM EDTA, 70 mM saccharose, 210 mannitol, pH 7,4) à 4°C, auquel est rajouté de la subtilisine A (2,7 mg/g de cœur, Sigma-Aldrich, Etats-Unis). Après centrifugation de l'homogénat à 800 g (10 min, 4°C), les mitochondries se retrouvent dans le surnageant, centrifugé à 8000 g (10 min, 4°C). Les mitochondries sont alors dans le culot, puis resuspendues dans le tampon précédent, et centrifugées une dernière fois à 8000 g (10 min, 4°C). Après cette procédure standard de trois centrifugations différentielles, la quantité de protéines des mitochondries isolées est dosée par la méthode de Bradford (Réactif de Bradford, Sigma-Aldrich, Etats-Unis). Les mitochondries isolées sont utilisées fraîchement pour mesurer la consommation d'oxygène (O₂), la production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le potentiel de membrane et la capacité de rétention calcique (CRC). Ensuite, elles sont congelées et utilisées pour doser l'activité de la citrate synthase et l'activité des complexes mitochondriaux.

i. Consommation d'oxygène

La consommation d'oxygène est mesurée à 30°C avec une électrode de Clark (Hansatech Instruments, Grande Bretagne), dans une chambre fermée, agitée et contenant du tampon de respiration (125 mM KCl, 20 mM Tris-Base, 1 mM EGTA, 10 mM Pi, 0,15 % sérum bovin d'albumine BSA, pH 7,2) et 100 ou 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de mitochondries. Différents substrats ont été utilisés glutamate/malate (GM : 5/2,5 mM), succinate/roténone (S/Rot : 5/2 mM) ou du N'-tetraméthyl-p-phenylenediamine/ascorbate (TMPD/Asc : 0,5/2,5 mM) pour alimenter préférentiellement les complexes I, II ou IV, respectivement (état 2). Ensuite, de l'ADP (100 mM) est ajouté pour atteindre la respiration maximale couplée à la synthèse d'ATP (état 3), suivie de l'oligomycine ($4\mu\text{g.mL}^{-1}$, état 4) afin de vérifier le retour à l'état non phosphorylant. Les vitesses de consommation d'oxygène sont rapportées à la quantité de protéines mitochondriales. Le *respiratory control rate* (RCR) est le rapport de l'état 3 sur l'état 2. Il est calculé afin de d'évaluer l'état de couplage des mitochondries.

ii. Production de peroxyde d'hydrogène

La production de ROS est estimée à travers la production d' H_2O_2 , qui est évaluée à 30°C par un suivi de fluorescence par un spectrophotomètre (F-7000 FL; Hitachi, Etats-Unis), dans une chambre contenant du tampon de respiration avec une sonde fluorescente Amplex Red ($1\mu\text{M}$, excitation 560 nm, émission 584 nm), de la peroxydase de raifort (HRP 5 unités) et 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de mitochondries. Les mesures ont été faites avec les substrats des complexes I (GM : 5/2,5 mM) et II (S : 5 mM), puis ajout successif de roténone (3 μM) pour inhiber le flux reverse des électrons, et ensuite d'antimycine A (3 μM) pour inhiber le flux d'électrons après le complexe III. Les vitesses de production de H_2O_2 sont rapportées à la quantité de protéines mitochondriales.

iii. Potentiel de membrane

Le potentiel de membrane est mesuré à 30°C par un suivi de fluorescence de la sonde tétraméthylrodamine (TMRM, 0,2 μM , excitation 550 nm, émission 580 nm, Life technologie,

Etats-Unis) par un spectrophotomètre (F-7000 FL; Hitachi, Etats-Unis), dans une chambre contenant du tampon de respiration, $260 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de mitochondries et le substrat du complexe I (GM : 5/2,5 mM). Ensuite l'ADP (2 mM) est ajouté, puis le p-trifluorométhoxy-carbonyl-cyanide-phenyl hydrazone (FCCP : $3\mu\text{M}$) pour découpler les mitochondries. Le potentiel de membrane est exprimé en ratio de fluorescence (unité arbitraire) par rapport à la fluorescence basale (sans substrat et mitochondrie).

iv. Capacité de rétention calcique

La CRC est mesurée à 30°C par un suivi de fluorescence de la sonde Calcium Green-5N ($0,5 \mu\text{M}$, excitation 506 nm, émission 530 nm, Life technologie, Etats-Unis) par un spectrophotomètre (F-7000 FL; Hitachi, États-Unis), dans une chambre contenant du tampon spécifique de la mesure de CRC (20 mM Tris-Base, 150 mM saccharose, 50 mM KCl, 2 mM KH_2PO_4 , pH 7,2), , $260 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de mitochondries, le substrat du complexe II (S : 10 mM). Les mesures sont réalisées en présence ou non d'un inhibiteur de l'ouverture du pore de transition mitochondrial, la CsA ($2 \mu\text{M}$), puis plusieurs pulses de calcium (10 nmol/pulse) sont appliqués jusqu'au relargage du calcium par les mitochondries. La CRC est quantifiée par la quantité de calcium ajoutée rapportée à la quantité de mitochondrie.

v. Dosage de l'activité de la citrate synthase

Le dosage de la citrate synthase a été fait sur des mitochondries isolées, afin d'évaluer évaluer la qualité de l'extraction des mitochondries, respectivement. Les mitochondries isolées subissent 3 cycles de congélation-décongélation avant le dosage de la citrate synthase. Ce dosage est réalisé à 37°C avec un suivi d'absorbance à 412 nm par un spectrophotomètre. $4 \mu\text{g}$ de mitochondries isolées sont incubés dans un tampon (150 mM Tris-Base, 0,15 mM acide dithiobis-5,5'-nitro-2-benzoïque, 0,25 mM acétyl-CoA, 0,1 % Triton X100, pH 8). L'activité de la citrate synthase est mesurée par la différence de pente entre l'absorbance de base et après l'ajout d'oxaloacétate (10 mM), entraînant l'oxydation de l'acétyl-CoA, rapportée à la quantité de protéines mitochondriales.

vi. Dosage de l'activité des complexes mitochondriaux

A partir de mitochondries isolées (4-12 μg) ayant subies 3 cycles de congélation-décongélation, l'activité des complexes I, II, III et IV a été mesurée à 37°C avec un suivi d'absorbance par un spectrophotomètre.

L'activité du complexe I, NADH-ubiquinone oxydoréductase est évaluée en utilisant 0,1 μM de décyubiquinone (l'accepteur d'électrons), 0,1 μM de NADH (le donneur d'électrons) dans un tampon contenant 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ et 3,75 % BSA (pH 7,4). L'oxydation du NADH est quantifiée à 340 nm par la différence de pente entre l'absorbance de base et après l'ajout de roténone (0,01 μM), rapportée à la quantité de mitochondrie, évaluant l'activité spécifique de la partie sensible à la roténone, la caractéristique du complexe I.

L'activité du complexe II, succinate-ubiquinone réductase est estimée avec 0,05 mM de décyubiquinone, 30 mM de succinate (le donneur d'électrons), 0,0093 mM d'antimycine A, 0,005 mM de roténone, 0,1 mM de 2,6-dichlorophenolindophenol (DCIP, l'accepteur d'électrons), dans un tampon contenant 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ et 3,75 % BSA (pH 7,4). La pente décroissante de la réduction du DCIP à 600 nm permet de mesurer l'activité du complexe II, rapportée à la quantité de mitochondries.

L'activité du complexe III, coenzyme Q-cytochrome C-oxydoréductase est quantifiée en présence de 0,05 mM EDTA, 1 mM de KCN, 0,2 mM de décyubiquinone réduit avec de la dithionite (le donneur d'électrons) 0,1 mM de cytochrome C oxydé (l'accepteur d'électrons) dans un tampon contenant 150 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ et 0,1% BSA (pH 7,4). L'activité du complexe III, modélisé par la réduction du cytochrome C est quantifiée à 550 nm par la différence de pente entre l'absorbance de base et après l'ajout d'antimycine A (5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), rapportée à la quantité de mitochondries.

L'activité du complexe IV, coenzyme Q-cytochrome C-oxydase est mesurée à 550 nm par la pente décroissante, rapportée à la quantité de mitochondries, reflétant l'oxydation de 0,08 mM de cytochrome C (précédemment réduit avec de la dithionite, le donneur d'électrons) dans un tampon contenant 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7,4).

e. Histologie

Pour la suite des expériences, le cœur a été prélevé après le sacrifice des souris par dislocation cervicale.

i. Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission a été utilisée pour visualiser la structure des mitochondries, et réalisée par la plateforme du laboratoire IBS. Les cœurs ont été coupés en petites pièces d'environ 1 mm³, et fixés dans une solution de fixation (paraformaldéhyde 2 % / glutaraldéhyde 0,2 % dans 0,1 M de tampon PHEM contenant 60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 4 mM MgSO₄/7H₂O, pH : 7,2) durant 3 h à température ambiante. Ensuite les échantillons sont transférés 1 h sous agitation, dans une solution d'osmium (1 % osmium, 1,5 % potassium hexaferrocyanate dans 0,1 M de tampon PHEM). Après des rinçages à l'eau, les échantillons sont marqués avec de l'acétate d'uranyle (5 % dans l'eau) sous agitation. La déshydratation des échantillons est réalisée par une série de bains d'éthanol croissante (50 à 100 %) avant substitution et imprégnation dans la résine Embed 812 (EPON substitute, Electron Microscopy Sciences). Après 18 h de polymérisation à 65 °C, les blocs sont taillés et coupés avec un ultramicrotome UC7 (Laica) et une lame en diamant, DiATOME. Les coupes sont de 60 nm, recueillies sur des grilles de cuivre revêtues de formvar pour être observer avec du marquage citrate, en utilisant le microscope à transmission électronique FEI Tecnai G2 Spirit BioTwin (120 kV) et une camera Orius SC1000B CCD. L'analyse a été réalisée avec le logiciel Image J et une macro réalisée par Mr Usson du laboratoire IAB.

ii. Coloration au dihydroéthidium

La coloration au dihydroéthidium (DHE) est utilisée pour détecter la production d'anions superoxydes. Des morceaux de cœur ont été inclus dans un milieu de montage OCT (*Optimal*

Cutting Temperature). Les coupes de 14 μm ont été incubées avec 10 μM de DHE pendant 5 minutes dans une chambre humide, à l'abri de la lumière, à température ambiante. Après lavage, la réaction est arrêtée avec de l'acétone à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Les coupes ont été photographiées au microscope confocale (Zeiss, Allemagne) avec un signal fluorescent de la DHE. L'analyse a été réalisée avec le logiciel Image J et le signal de DHE est exprimé en pourcentage de la surface totale de tissus cardiaque.

iii. Immunohistochimie

Des morceaux de cœur ont été inclus dans un milieu de montage OCT, pour évaluer l'expression de HIF-1 α . Les coupes de 8 μm ont été fixées à l'acétone 100 %. Le marquage est réalisé dans une chambre humide, à l'abri de la lumière, à température ambiante. Le blocage des peroxydases endogènes a été réalisé avec du peroxyde d'hydrogène (3 %), celui des avidines-biotines avec un kit avidine-biotine (Vectorlab, Abcys, France), celui des fixations non-spécifiques avec du serum (10 %) dépendant de l'anticorps primaire. L'anticorps primaire de HIF-1 α (1/100, Abcam, Grande Bretagne), Grp78 (1/50, Covalab, France), CHOP (1/50, Santa-Cruz, Etats-Unis) ou NF- κB (1/1500, Abcam, Grande Bretagne) ont été incubé 30 min. Puis l'incubation de l'anticorps secondaire couplé à la biotine (1/200 ou 1/500, Vectorlab, Abcys, France) est réalisée pendant 30 min. Ensuite, les coupes ont été traitées avec le complexe d'amplification du signal avidine-biotine (AB, Vectorlab, Abcys, France) pendant 30 min, puis avec le substrat de révélation pendant 5 min (Histo Green, Abcys, France), pour une visualisation du marquage en vert. Un contre-marquage a été effectué avec une coloration des coupes à l'hématoxyline pour visualiser la structure globale des tissus (marquage des noyaux en violet et du cytoplasme en rose). La déshydratation des échantillons est réalisée par une série de bains d'éthanol (100%) et de xylène (100%). Les coupes ont été photographiées au microscope optique couplé à l'axiocam et son logiciel (x200, Zeiss, Allemagne) et analysé par le logiciel Image J. La quantité de marquage est exprimée en pourcentage par rapport la surface totale de tissus cardiaque.

f. Biologie des protéines

i. Extraction de protéines

Les protéines sont extraites pour réaliser des Western Blot, des co-immunoprécipitation ou le dosage de l'activité de HIF-1. 30 à 50 mg de cœur de souris ou 10 mg d'appendice auriculaire droit d'Homme ont été homogénéisés (Precellys® 24, 6000 rpm, 3X10s-5s, Bertin Technologies, France). Selon les protéines d'intérêt, l'extraction de protéines est soit totale, soit en fraction noyau et cytoplasmique. L'extraction de protéines totales est réalisée avec un tampon de lyse (1 % NP40, 20 mM Tris-HCl, 138 mM NaCl, 2,7 mM MgCl₂, 5 % glycerol, 5 EDTA, 1 Na₃VO₄, 20 NaF, 1 DTT, 1X inhibiteur de protéases (Sigma Aldrich, Etats-Unis), pH 8). L'extraction en fraction noyau et cytoplasmique est effectuée avec le kit Nuclear extract (Active Motif, Belgique). La concentration en protéines est évaluée avec un dosage de Bradford (réactif de Bradford, Sigma-Aldrich, Etats-Unis).

ii. Western Blot

Le Western Blot est une technique permettant de mesurer la quantité de protéines. Les échantillons protéiques (15-100 µg) sont séparés par un gel d'électrophorèse SDS-PAGE (8-12 %) et transférés sur des membranes nitrocellulose ou PVDF (polyvinylidene fluoride) avec le Trans Blot, transfert semi-sec (Bio-Rad, Etats-Unis). Selon l'anticorps primaire, les membranes sont bloquées pendant 1 h avec du lait ou de la BSA à 5 %. L'anticorps primaire (figure 20) est incubé sur la nuit à 4°C, puis l'incubation de l'anticorps secondaire couplé à une peroxydase de raifort (HRP) est réalisée pendant 1 h à température ambiante. Les bandes sont visualisées par chimiluminescence par l'ajout du substrat (ECL Western-Blot detection kit, Bio-Rad, Etats-Unis). Les images sont photographiées par le système ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad, Etats-Unis) et analysées sur le logiciel Image J. La quantification est exprimée en fonction du groupe contrôle (*fold increase*).

Anticorps	Fournisseur	Dilution
ACC	Cell signaling	1/250
phospho-ACC		1/1000
AMPK		
phospho-AMPK		
ATF4		
ATF6	Santa Cruz	1/250
Beclin-1	Cell signaling	1/500
BNIP3	Sigma-Aldrich	1/1000
caspase-3	Cell signaling	
caspase-3 clivée		1/500
cyclophiline D	Abcam	1/4000
Drp1	BD Biosciences	1/1000
eIF2 α	Cell signaling	1/500
phospho-eIF2 α		
Grp75	Santa Cruz	1/1000
Grp78		1/500
HIF-1 α		
IP3R1		
LC3I-II	Cell signaling	
MCU		
Mfn2	Sigma-Aldrich	
NCX1	Millipore	
OPA1	BD Biosciences	1/2000
OXPHOS	Abcam	1/4000
p62	Sigma-Aldrich	1/1000
Parkin	Cell signaling	
PERK	Santa Cruz	1/500
phospho-PERK		
PGC-1 α	Millipore	1/1000
PLB	Santa Cruz	
phospho-PLB (Ser 16)		
Serca2		
VDAC1	Abcam	
α -tubuline	Santa Cruz	1/2000

Figure 20 : Tableau des anticorps primaires utilisés en Western Blot.

iii. Co-immunoprécipitation

La co-immunoprécipitation permet d'identifier l'interaction entre deux protéines. 500 μ g de protéines totales sont incubées avec 2 μ g d'anticorps primaire de notre protéine d'intérêt dans du tampon de lyse, toute la nuit à 4°C, sous agitation. Ensuite des billes magnétiques (SureBeads™ Protein G Magnetic Beads, Bio-Rad, Etats-Unis) reconnaissant l'anticorps

primaire, sont ajoutées pendant 2h. Après séparation des billes, les échantillons contenant toutes les protéines liées à notre protéine d'intérêt peuvent être utilisés en Western blot pour détecter ces autres protéines.

g. Biologie moléculaire de l'ADN

i. Extraction de l'ARN

L'ARN total a été extrait à partir d'environ 10 mg de coeur en utilisant le protocole d'isolation d'ARN Tri Reagent® (Sigma-Aldrich, Etats-Unis).

ii. PCR quantitative en temps réel couplé à une transcription réverse (RT-qPCR)

Le RT-qPCR est une technique pour déterminer l'expression d'un gène (la quantité d'ARNm). 0,5 µg d'ARN est soumis à une transcription reverse avec une enzyme de retrotranscription (*iScript™ Reverse Transcription Supermix*, Bio-Rad, Etats-Unis), pour obtenir de l'ADN complémentaire, utilisé à son tour pour la *polymerase chain reaction* (PCR) quantitative en temps réel avec le *SYBR® Green Supermix* (Bio-Rad, Etats-Unis) et amplifié par la thermocycleur *CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection Systems* (Bio-Rad, Etats-Unis). Les différents couples d'amorces déterminant les gènes cibles sont :

XBP1s : 5'GAGTCCGCAGCAGGTG^{3'}/^{3'}GCGTCAGAATCCATGGGA^{5'},

HPRT : 5'TCTTTGCTGACCTGCTGGATTACAT^{3'}/^{3'}CCAGGGAAAGCAAAGTTTGCATT^{5'}

RN18S : 5'GGAAGAATAACTTCAGACCGCCC^{3'}/^{3'}TGCAGCGGACAGTGTCTTGTTT^{5'}.

La quantification de l'expression du gène est réalisée avec la méthode $2^{\Delta\Delta Ct}$.

h. Analyses statistiques

Les statistiques et les graphiques sont obtenus avec le logiciel Graph Pad Prism® (Etats-Unis). Les résultats des expériences animales sont exprimés en moyenne \pm SEM. Les analyses des expérimentations animales sont des ANOVA deux voies avec le post-hoc approprié ou des tests de Student. Les résultats des patients sont exprimés en médiane et en écart interquartile, et analysés par des tests de Student. L'analyse de la régression linéaire univariable mais aussi multivariable ajustée à l'IAH, l'âge, le taux de NT-proBNP a été réalisée pour confirmer le test de Student. Un résultat est significatif à partir de $p < 0,05$.

RESULTATS

1. Etude 1 :

Rôle de HIF-1 dans l'altération des MAM, le stress du RE et l'augmentation de la taille d'infarctus induits par l'HI chronique

Publication:

HIF-1 disrupts mitochondria-associated ER membranes leading to calcium homeostasis disturbance, ER stress and myocardial infarct size expansion under intermittent hypoxia.

Moulin S, Thomas A, Arnaud C, Arzt M, Wagner S, Maier L, Korichneva I, Tamisier R, Pépin J-L, Godin-Ribuot D, Belaidi E. *Int J Cardiol.*

International Journal of Cardiology. Soumis [4.034]

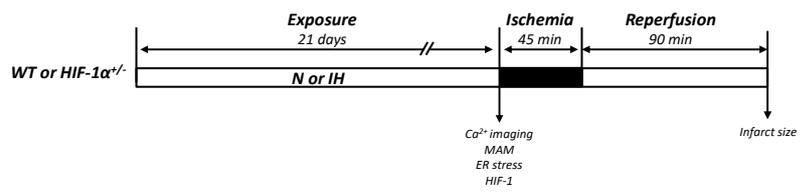
L'*hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1) est connu pour réguler l'expression de protéines impliquées dans l'homéostasie calcique et le stress du réticulum endoplasmique (RE), deux acteurs majeurs de la réponse à l'ischémie-reperfusion. Nous nous sommes intéressés en particulier aux *mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes* (MAM), parce que leur altération est susceptible d'engendrer un stress du RE, et surtout parce qu'il a récemment été démontré qu'ils régulaient la susceptibilité du myocarde à l'ischémie-reperfusion.

L'objectif de cette étude a donc été de déterminer le rôle potentiel de HIF-1 dans les effets de l'HI sur les échanges calciques entre le RE et la mitochondrie, l'intégrité des MAM et le stress du RE. Puis, son rôle a aussi été évalué dans l'augmentation de la taille d'infarctus induite par l'HI.

Des souris Swiss/SV129, HIF-1 α ^{+/-} et leurs contrôles WT, *wild-type* (WT) ont été exposées à 21 jours d'HI ou de normoxie (N). A la fin de l'exposition, l'enregistrement des flux calciques inter-organites et l'évaluation de l'intégrité des MAM ont été réalisés sur des cardiomyocytes isolés. L'expression de HIF-1, des protéines de l'homéostasie calcique et du stress du RE, ainsi que la taille d'infarctus suite à une ischémie-reperfusion *in vivo* ont aussi été quantifiées. L'expression de HIF-1 et de marqueurs du stress du RE a aussi été mesurée dans des biopsies d'appendice d'auricule droit de patients apnéiques atteints de maladie coronarienne.

L'HI entraîne une augmentation de l'accumulation calcique dans le RE et le cytosol suite à la vidange du RE, associée à une altération de l'intégrité des MAM et de l'expression des régulateurs majeurs de l'homéostasie calcique. Ces résultats sont liés à une activation d'un stress du RE pro-apoptotique et consécutivement, à l'augmentation de la taille d'infarctus. La délétion partielle de HIF-1 α abolit la grande majorité des effets de l'HI. De plus, l'activation myocardique de HIF-1 est corrélée positivement à l'index d'apnées-hypopnées (IAH) des patients apnéiques et les marqueurs clés du stress du RE sont augmentés chez ces patients.

En HI, l'activation chronique de HIF-1 joue un rôle majeur dans les perturbations de l'homéostasie calcique, contribuant à l'activation du stress du RE, ainsi qu'à la vulnérabilité du myocarde à l'ischémie-reperfusion. L'implication de HIF-1 et du stress du RE semblent être confirmée chez des patients à haut risque cardiovasculaire atteints d'apnée du sommeil.



Marqueur	Méthodes	
Taille d'infarctus	Ischémie-reperfusion <i>in vivo</i>	3.b
Imagerie calcique	Isolation cardiomyocytes Flux Ca ²⁺ inter-organites	3.c 3.c.i
MAM	Duolink® PLA Co-immunoprécipitation	3.c.ii 3.f.iii
Stress du RE	Extraction de l'ARN RT-qPCR Extraction de protéines Western blot	3.g.i 3.g.ii 3.f.i 3.f.ii
HIF-1	Immunohistochimie	3.e.iii

Figure 21 : Design expérimental et méthodologie de l'étude 1.

HIF-1 disrupts mitochondria-associated ER-membranes leading to calcium homeostasis disturbance, ER stress and myocardial infarct size expansion under intermittent hypoxia, a major feature of sleep apnoea.

Sophie Moulin^{a*}, Amandine Thomas^a, Claire Arnaud^a, Michael Arzt^b, Stefan Wagner^b, Lars S. Maier^b, Irina Korichneva^c, Renaud Tamisier^a, Jean-Louis Pépin^a, Diane Godin-Ribuot^{a*}, Elise Belaidi^{a*}

Corresponding author: Elise Belaidi, Université Grenoble Alpes-Inserm-Laboratoire HP2, Bâtiment Jean Rojet, Faculté de Médecine-Pharmacie, Domaine de la merci, 38042 Grenoble. Tel: +33 476 637 108, Fax: +33 476 637 178, E-mail: elise.belaidi-corsat@univ-grenoble-alpes.fr.

Acknowledgement of grant support: This study was supported by grants from “Agir pour les Maladies Chroniques Fondation”, “Fondation de France” and “French National Research Agency” in the framework of the “Investissements d’avenir” program (ANR-15-IDEX-02). S.W. is funded by Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) grants WA 2539/4-1, 5-1, Deutsche Stiftung für Herzforschung grant (F/35/15). S.W. and L.S.M. are funded by DZHK (Deutsches Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung - German Centre for Cardiovascular Research). L.S.M. is funded by DFG grant MA 1982/5-1, 7-1.

Conflict of interest

Authors report no relationships that could be construed as a conflict of interest in this study.

Keywords: hypoxia inducible factor-1; mitochondria-associated ER membranes; endoplasmic reticulum stress; myocardial infarction; chronic intermittent hypoxia; sleep-disordered breathing.

a Univ. Grenoble Alpes, Inserm, Laboratoire HP2, 38000 Grenoble; b Department of Internal Medicine I, University Hospital Regensburg, Regensburg, Germany; c Université Picardie Jules Verne, UFR Pharmacie, Amiens, France.

**These authors take responsibility for all aspects of the reliability and freedom from bias of the data presented and their discussed interpretation. Each author contributes to this study. Experimental acquisition: SM, EB, AT, MA, SW, LSM, IK; Data analysis: SM, EB, MA, SW, IK; Study conception: EB, CA, DGR
Manuscript preparation: SM, EB, AT, MA, SW, LSM, DGR, JLP, CA, RT, IK.*

Abstract

Chronic intermittent hypoxia (IH) is a hallmark of sleep-disordered breathing (SDB) leading to a higher risk of coronary artery disease. Chronic HIF-1 activation plays a major role in the deleterious cardiovascular consequences of IH notably via increasing myocardial infarct size. However, the mechanisms involved have not been elucidated. Thus, we aimed to clarify the impact of chronic HIF-1 activation, associated-calcium homeostasis disturbances, endoplasmic reticulum (ER) stress and myocardial infarct size in rodents subjected to IH, as well as the involvement of these mechanisms in heart biopsies from patients suffering of coronary artery disease with or without SDB.

Swiss/SV129 mice and HIF-1 α ^{+/-} mice were exposed to 21 days of normoxia or IH (21-5% O₂, 60 cycles/h, 8 h/day). IH alters ER-mitochondria calcium exchanges through mitochondria-associated ER membranes disruption along with a disturbance of calcium-regulators expression, probably explaining the increase in apoptotic ER stress markers and infarct size following ischemia-reperfusion. Interestingly, HIF-1 α partial deletion abolishes the effects listed above. Finally, we also demonstrate that HIF-1 expression is positively correlated with the apnoea-hypopnea index and that ER stress key-players are increased in right atrial appendage biopsies from patients suffering of coronary artery disease.

This study highlights the dark side of the HIF-1 transcription factor. Indeed, its chronic activation alters calcium homeostasis, induces ER stress and increases myocardial infarct size. Accordingly, myocardial HIF-1 α is associated with SDB severity. HIF-1 modulation should be a new target in order to improve therapeutic of SDB patients with a high cardiovascular risk.

Translational aspect of the work: translational perspective

This article provides both animals and human experimental evidences that intermittent hypoxia the hallmark of sleep-disordered breathing (SDB), profoundly disturbs calcium homeostasis and ER stress through activation of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1). HIF-1 axis inhibition might be an innovative therapeutic strategy in SDB patients at risk for coronary artery disease.

Keywords: hypoxia inducible factor-1; mitochondria-associated ER membranes; endoplasmic reticulum stress; myocardial infarction; chronic intermittent hypoxia; sleep-disordered breathing.

1. Introduction

Obstructive sleep apnoea is a common chronic sleep-related breathing disorder, recognized as an independent cardiovascular risk factor associated with an increased prevalence of coronary artery disease [1] and impaired infarct healing [2].

Chronic intermittent hypoxia (IH) is the major stimulus underlying the development of obstructive sleep apnoea-related cardiovascular morbidity. In SDB (sleep-disordered breathing) patients exhibiting myocardial infarction, the apnoea-hypopnea index (AHI) is positively related to infarct size expansion [2] and detrimental cardiac remodelling [3]. In animal models, IH exposure increases infarct size following myocardial ischemia-reperfusion (I/R) injury [4, 5].

IH activates the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) transcription factor pathway [5]. In rodents exposed to IH, HIF-1 chronic activation leads to detrimental cardiovascular consequences including vascular remodelling [6], hypertension [4]; and infarct size expansion [5]. We also recently demonstrated that HIF-1 activation induced by chronic IH increases myocardial infarct size by promoting endoplasmic reticulum (ER) stress [5]. In ischemic heart disease, ER stress is a well-known process associated with calcium (Ca^{2+}) homeostasis disruption and cell death [7].

Under IH, HIF-1 is known to promote intracellular calcium overload in neurons [8]. In view of the pivotal role of Ca^{2+} homeostasis in the response to myocardial I/R [9], we aimed to investigate the role of HIF-1 in myocardial Ca^{2+} homeostasis and in infarct size enlargement following IH. In particular, we hypothesized that HIF-1 alters mitochondria-associated ER membranes (MAM), disturbs ER-mitochondria Ca^{2+} exchanges, affects the expression of proteins involved in global calcium homeostasis and leads to an increase in infarct size following I/R. In the aim to find cellular pathways relevant for future alternative strategies,

IH: intermittent hypoxia, SDB: sleep-disordered breathing, ER: endoplasmic reticulum;
MAM: mitochondria-associated ER membranes

we took advantage of right atrial appendage biopsies from patients with coronary heart disease and investigate « HIF-1-ER stress » axis activation under presence of SDB.

2. Methods

2.1. Animals and intermittent hypoxia

Male Swiss/SV129 mice, partially deleted for the O₂-sensitive HIF-1 α subunit of HIF-1 (HIF-1 α ^{+/-}) and their wild-type (WT), aged 8-12 weeks were exposed to chronic intermittent hypoxia (IH) or normoxia (N) (Fig. S1), as described in the online supplemental material. The study was approved by the French minister (number: 2015061813053181). Animals were housed in the animal care facility of the HP2 laboratory (number: A38 516 10006). All experiments were performed in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (decree 2013-118 and orders of 1st February 2013).

2.2. Immunohistochemistry

HIF-1 α expression was performed by immunochemistry. Procedure details were presented in the online supplemental material.

2.3. Total RNA purification and real-time RT-qPCR

Splicing of X-box binding protein-1 (XBP1s) content was calculated relative to 18S ribosomal RNA (RN18S). Procedure details were presented in the online supplemental material.

2.4. Western blot

After total or nuclear protein extraction, western-blot of ER stress markers, HIF-1 α content and calcium homeostasis regulators were performed. Procedure details were presented in the online supplemental material.

2.5. Cardiomyocyte isolation

Adult mice cardiomyocytes were isolated and seeded as previously described ([5]). Procedure details were presented in the online supplemental material.

2.5.1. Inter-organelles calcium exchanges

Interorganelle calcium exchanges were measured using confocal microscopy and organelle-specific fluorescent probes, as previously described[5]. Procedure details were presented in the online supplemental material.

2.5.2. Mitochondria-Associated endoplasmic reticulum Membranes investigation

MAM integrity was assessed using Duolink ® Proximity Ligation Assay (PLA, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) and immunoprecipitation. Procedure details were presented in the online supplemental material.

2.6. In vivo Ischemia-reperfusion and infarct size

At the end of the N or IH exposure, mice were submitted to 45 min-ischemia following of 90 min-reperfusion as previously described ([5]). Area at risk (AAR) and area of necrosis (AN) were stained, measured and expressed relative to heart weight. Procedure details were presented in the online supplemental material.

2.7. Patients suffering coronary artery disease with or without SDB

Thirty-nine consecutive patients undergoing elective coronary artery bypass graft (CABG) were prospectively included at the University Hospital Regensburg (Germany) in a study approved by local ethics review board. Patients were informed and consents were obtained for the inclusion. This study was performed conform the declaration of Helsinki. Right atrial appendage biopsies were sampled from one randomly selected patient per working day, who underwent CABG surgery. In addition, assessment of SDB in clinical routine in the preoperative night was performed using the ApneaLink device (ResMed Inc., Martinsried, Germany) as described in the online supplemental material. The institutional ethics committee of the University of Göttingen approved the procedures and all patients involved in the study gave written consent. For the present analysis, patients were stratified in quartiles of apnoea-hypopnea index. According to our “moderate to severe” rodent model, the forth quartile with a moderate to severe degree of SDB (AHI 22.2 ± 0.6 /hour, SDB) was compared to the first quartile without SDB (AHI 4.6 ± 0.6 /hour, Control).

2.8. Statistical Analysis

Differences between experimental groups were determined by two-way ANOVA with subsequent Šídák comparison tests when statistically appropriate in order to evaluate the effects of IH in each strain. Considering the potential consequence of partial deficiency in HIF-1 α in mice, this was analysed as the second factor. Effects of knock-out are presented in figures but not described in the results section in order to clarify the message. However, this will be discussed in the appropriate section. Results are expressed as means \pm SEM.

Patient data expressed as median and interquartile range and were analysed using Student test. Univariable analysis but also multivariable linear regression adjusted for AHI, age and

NT-proBNP was performed to confirm the result from Student test (GraphPad Prism 6 Software, California, USA). Statistical significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. HIF-1 alters calcium exchange and mitochondria-associated ER membranes integrity upon intermittent hypoxia

In isolated cardiomyocytes from WT mice exposed to normoxia (WTN, Fig. 1A), histamine induced the release of Ca^{2+} from the ER (blue line) resulting in a cytosolic (green line) and mitochondrial (red line) Ca^{2+} accumulation. After histamine incubation, IH resulted in a higher cytosolic and ER Ca^{2+} overload (Cyto F1/F0 slope₂₅₀₋₅₀: 0.39 ± 0.05 vs. 0.21 ± 0.02 / ER F1/F0 slope₂₅₀₋₅₀: 0.21 ± 0.02 vs. 0.11 ± 0.02 in WTIH and WTN, $p < 0.05$) (fig. 1B-C). No difference was observed in mitochondria from N and IH cardiomyocytes (fig. 1D). Moreover, partial deletion of HIF-1 α completely abolished the IH-induced Ca^{2+} disturbances (Fig. 1B-C). These results indicate that IH impairs ER-mitochondria Ca^{2+} exchanges following histamine incubation, in a HIF-1 α dependent manner.

To elucidate the molecular mechanisms underlying this specific calcium disturbance, we next investigated MAM integrity (VDAC1/Grp75/IP3R1 complex) using PLA and protein immunoprecipitation. In WT, IH increased cytosolic Grp75 and mitochondrial VDAC1 interactions (50.8 ± 4.7 vs. 32.3 ± 2.4 interactions/cell, in WTIH and WTN groups, respectively, $p < 0.05$) (fig. 1E) as well as Grp75 and ER protein IP3R1 interactions (28.3 ± 0.1 vs. 18.1 ± 1.0 interactions/cell, in WTIH and WTN groups, respectively, $p < 0.01$) (fig. 1E). Nevertheless, IH disrupted MAM integrity by decreasing VDAC1/IP3R1 (20.3 ± 2.9 vs. 46.3 ± 7.5 interactions/cell, in WTIH and WTN groups, respectively, $p < 0.01$) (Fig. 1E) and mitochondrial CypD and Grp75 interactions (1.7 ± 1.2 vs. 42.1 ± 1.0 interactions/cell, in WTIH and WTN groups, respectively, $p < 0.0001$) (Fig. 1E).

MAM alteration could not be related to a lack of VDAC1, IP3R1 and CypD since we rather observed an increase in these protein contents (VDAC1: 1.18 ± 0.04 , $p < 0.05$, IP3R1: 2.14 ± 0.23 , $p < 0.05$, CypD: 1.52 ± 0.17 , $p < 0.05$, fold increase vs. WTN) (Fig. 1F). However, MAM disruption could be explained by a decrease in Grp75 content under IH (0.86 ± 0.02 fold increase vs. WTN, $p < 0.05$) (Fig. 1F). Except for the increase in Grp75/VDAC1 interactions, partial HIF-1 α deletion abolished the effect of IH on MAM disruption (Fig. 1E-F), suggesting that HIF-1 plays a major role in IH-induced MAM integrity alteration.

To further clarify calcium exchange alteration, we then examined expression of others major calcium actors. IH increased PLB phosphorylation, Serca2 and NCX1 contents (PPLB: 1.25 ± 0.06 , $p < 0.01$, Serca2: 1.38 ± 0.03 , $p < 0.001$, NCX1: 1.85 ± 0.29 , $p < 0.05$ and, fold increase vs. WTN) whereas MCU content was not modified (Fig. 1G). Partial HIF-1 α deletion abolished PLB and NCX1 modifications induced by IH (Fig. 1G). These results confirmed that HIF-1 plays a major role in global Ca²⁺ homeostasis disturbance induced by IH.

3.2. HIF-1 induces endoplasmic reticulum stress upon intermittent hypoxia

As ER stress is known to be triggered by calcium homeostasis alterations, we then investigated the unfolded protein response (UPR). IH induced myocardial ER stress, characterized by a significant increase in Grp78 content (1.22 ± 0.06 fold increase vs. WTN, $p < 0.05$), PERK and eIF2 α phosphorylation (1.61 ± 0.10 and 1.54 ± 0.06 fold increase vs. WTN respectively, $p < 0.01$) (Fig. 2A-C). IH also significantly increased ATF4 (2.23 ± 0.12 fold increase vs. WTN, $p < 0.0001$) and CHOP (1.68 ± 0.07 fold increase vs. WTN, $p < 0.001$) contents (Fig. 2D-E). ATF6 content and XBP-1s mRNA expression were unchanged under IH (Fig. 2F-G). Even if partial HIF-1 α deletion did not affect the IH-induced increase in Grp78 and ATF4 content, it completely abolished the effects of IH on PERK and eIF2 α phosphorylation (Fig. 2B-C) as well as on the pro-apoptotic ER stress terminal effector

CHOP (Fig. 2E). These results support that IH induced a pro-apoptotic ER stress mostly through HIF-1 α .

3.3. HIF-1 increases myocardial infarct size upon intermittent hypoxia

Regarding the role of HIF-1 in calcium homeostasis upon IH, we next determined its impact on IH-increased in infarct size following myocardial ischemia-reperfusion. Areas at risk (AAR/LV ratio) resulting from coronary ligation were the same in all groups. IH significantly increased infarct size in WT (AN/AAR ratio: 59.5 \pm 6.0 vs. 34.9 \pm 4.1 % in WTIH and WTN groups, respectively, p <0.001) (Fig. 2H). This effect was abolished by partial HIF-1 α deletion (AN/ARR ratio: 37.1 \pm 5.1 vs. 42.5 \pm 4.1% in HIF-1 α ^{+/-}IH and HIF-1 α ^{+/-}N groups, respectively) (Fig. 2H), suggesting a major role for HIF-1 α in the IH-induced an increase in infarct size.

3.4. HIF-1 α and endoplasmic reticulum stress markers are increased in heart biopsies of SDB patients

According to our previous results obtained in mice, we directly investigated HIF-1 and some ER stress markers (Grp78 sensor and pro-apoptotic factor CHOP) in heart biopsies of SDB patients. Anthropometrics and sleep data from both groups are depicted in Fig. 3A showing no significant differences between groups except by definition for AHI. In individuals with SDB, myocardial HIF-1 α content was significantly increased compared to controls (3.16 \pm 0.35 fold increase vs. control, p <0.0001), (Fig. 3B). Univariable linear regression demonstrated that HIF-1 α correlates with AHI (Fig. 3C). After accounting for age and NT-proBNP, this difference remained significant (p <0.001). Age and NT pro-BNP were not associated with HIF-1 α (p =0.85 and p =0.56 respectively). Interestingly and in accordance with the data obtained in mice, this increase in HIF-1 α was associated with an increase in ER stress markers: a higher Grp78 expression (1.43 \pm 0.23 fold increase vs. control) and a

significant increase in CHOP expression (1.41 ± 0.15 fold increase vs. control, $p < 0.05$) (Fig. 3D-E). These results confirm, in Humans, that the “HIF-1-ER stress” axis could play a major role in cardiovascular consequences of IH, a major consequence of SDB.

4. Discussion

The present study provides evidence that HIF-1 plays a pivotal role in MAM alterations, calcium homeostasis disturbances and ER stress induced by chronic IH. These experimental data provide a mechanistic basis to explain myocardial infarct size expansion in rodent models exposed to IH [4, 5] and the cardiovascular risk of SDB patients with $AHI > 15$ [2]. This study highlights that the dark side of HIF-1 must be considered in SDB.

Depending on the duration, depth and pattern of the hypoxic stimulus, HIF-1 activation can induce both beneficial and detrimental effects. Others and we have demonstrated that acute hypoxic stress as well as ischemic preconditioning or postconditioning reduces myocardial infarction [10-15]. For example, Ong et al. showed that acute HIF-1 α stabilization prevents myocardial injury following ischemia-reperfusion, in delaying permeability transition pore opening [16]. In contrast, long-term HIF-1 activation by HIF-1 inducers or prolyl 4-hydroxylase 2 inhibitors results in myocardial failure [17, 18]. The mechanisms involved in the switch from adaptive 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 [19]. Concerning intermittent hypoxia, beneficial or deleterious response to this stress 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 [10]. In contrast, we also observed that chronic IH activates HIF-1-related transcription of endothelin-1 gene, leading to a subsequent

increase in infarct size [4]. Others suggest that the switch from adaptive to maladaptive response depends of a transcriptional vs. a non-transcriptional activity of HIF-1 [19]; depends of a nuclear vs. a non-nuclear activity of HIF-1 [20]. In the present study, we did not state on differential activation of HIF-1 but we exploited chronic IH, a model of SDB to better understand the underlying mechanisms involved in HIF-1-maladaptive response.

4.1. HIF-1 promotes intermittent hypoxia-induced MAM disruption, calcium homeostasis alteration, endoplasmic reticulum stress and infarction

Calcium disruption was first characterized by challenging Ca^{2+} transfer between ER and mitochondria using histamine incubation as previously demonstrated in hepatocytes [21] and cardiomyocytes [5, 22]. Compared with normoxic mice, IH induced a cytosolic and ER Ca^{2+} accumulation after histamine-induced ER release, whereas mitochondrial levels were not different. This suggests that IH alters ER-mitochondria exchanges during histamine incubation.

In this study, deleterious ER stress was established by an increase in the pro-apoptotic Grp78, P-PERK, P-eIF2 α , ATF4, CHOP pathway, whereas the Xbp-1 splicing and ATF6 adaptive pathways [23] were unaffected. Other experimental studies evidenced both Ca^{2+} homeostasis disturbance [24] and an increase in ER stress markers in brain [25] or kidney[26] of rodents exposed to IH. Thus, we confirmed that ER stress is involved in cardiomyocyte damages following IH [5, 27]. Indeed, we previously demonstrated that pharmacological ER stress inhibition during IH protects against myocardial I/R injury [5]. Here, we also demonstrated that in HIF-1 $\alpha^{+/-}$ mice, IH failed to (i) alter ER-mitochondria Ca^{2+} exchanges (Fig. 4A) (ii) induce ER stress (Fig. 4B) as well (iii) increase infarct size (Fig. 4).

These data strongly support that chronic activation of HIF-1 is responsible for the IH-induced alterations in calcium homeostasis and associated ER stress thus promoting myocardial infarction (Fig. 4). The following discussion aims to dissect the mechanisms involved.

While the involvement of cytosolic, ER and mitochondrial Ca^{2+} in the context of myocardial injury is well described, it has recently been proposed that MAM are key-players in the fine regulation of calcium homeostasis. Briefly, MAM are macromolecular complexes characterized by ER-mitochondria protein interconnections that are particularly used for local Ca^{2+} signalling [28]. One of the MAM complexes associates the mitochondrial VDAC1 channel with the ER IP3R1 receptor through the cytosolic Grp75 protein [29]. Recently, the mitochondrial chaperone CypD, well-described to be involved in myocardial-reperfusion injury, has been shown to belong to the complex [22].

In the present study, we demonstrate that IH alters the structure of this MAM by decreasing the expression of Grp75 and by disrupting the VDAC1/Grp75/IP3R1 complex (Fig. 4C). Indeed, since Grp75 is necessary to form the bridge between ER and mitochondria, its decrease by IH could explain the disruption in VDAC1/IP3R1 proximity potentially resulting in cytosolic Ca^{2+} loading after ER leakage. Disruption of the VDAC1/IP3R1 complex was accompanied by reinforcement in Grp75/VDAC1 and Grp75/IP3R1 interactions that could be explained by an increase in VDAC1 and IP3R1 expression. Interestingly, HIF-1 appears to play a role in these MAM protein modifications since most of these effects were abolished by partial HIF-1 α deletion. HIF-1 has already been described to regulate VDAC1 expression under hypoxia [30] but this is the first report of its role on Grp75 and IP3R1 expression. In hypoxic mice, this could explain the deleterious role of HIF-1 in myocardial infarct size expansion following ischemia-reperfusion. Indeed, Grp75 by directly altering MAM structure, and IP3R1 overexpression by enhancing Ca^{2+} release from ER stores, could both

promote cytosolic Ca^{2+} accumulation leading to increase cell death following ischemia-reperfusion [9].

IH also decreased the interaction of Grp75 with CypD characterizing MAM alterations (Fig. 4C). This could participate to cytosolic Ca^{2+} accumulation following ER leakage. Indeed, acute detachment of CypD from the inner mitochondrial membrane is known to decrease ER-mitochondrial Ca^{2+} exchanges [22] potentially leading to cytosolic and ER overload. Moreover, IH also increased CypD expression under the control of HIF-1. This alone could explain the increased susceptibility to myocardial I/R since CypD is known to be a major determinant of mitochondrial permeability transition pore opening [31, 32].

Overall, ER-mitochondria interactions are important in determining the response to myocardial I/R. Two studies have shown that MAM disruption, through CypD and GSK3 β inhibition, is cardioprotective [22, 33]. Another one demonstrated that ER-mitochondria crosstalk has deleterious consequences in the context of myocardial post-conditioning [34].

We also explored calcium homeostasis major regulators in order to better understand the response histamine in IH mice. Chronic IH increased NCX1 target gene expression in a HIF-1 dependent manner [35] (Fig. 4D). Elevated myocardial NCX levels are known to predispose to ROS-mediated myocardial injury [36] and to induce left ventricular dysfunction during chronic IH [37]. Serca2 expression and activity (phospholamban phosphorylation) were also increased by IH, and its activation was abolished by partial HIF-1 α deletion (Fig. 4E). This agrees with a study showing that cardiac HIF-1 α overexpression promotes PLB phosphorylation and alters Ca^{2+} handling [38]. MCU expression was not altered by IH nor by HIF-1 α deletion and this is in accordance with our results regarding the absence of N vs. IH mitochondrial Ca^{2+} loading. Thus, along with MAM disruption, increased expression/activation of NCX1 and Serca2 could participate to cytosolic and ER calcium loading, respectively. The data from the present study support that MAM disruption mediated

by HIF-1 chronic activation during IH leads to Ca^{2+} homeostasis disturbance, ER stress and I/R injury.

4.2. “HIF-1-endoplasmic reticulum stress” axis in SDB patients

In line with our previous work, we report here that “HIF-1-ER stress” axis plays a major role in the increased infarction size induced by IH [5]. Data regarding HIF-1 and ER stress are scarce in clinical research studies in SDB patients. A single study has showed an increase in HIF-1 α mRNA in skin biopsies of severe SDB patients [39]. The current study provides the first evidence for a strong increase in nuclear expression of HIF-1 α (a HIF-1 activation marker) and cytosolic expression of CHOP (an ER stress-related pro-apoptotic marker) in right atrial appendage biopsies of patients with SDB and cardiovascular disease (compared to patients without SDB). Multivariate analysis confirmed that HIF-1 α increase was independent of possible confounders like age or presence of heart failure. These results provide a strong rationale for more deeper investigations in the role of HIF-1 in cardiovascular consequences of SDB and in particular in the context of SDB-related coronary artery disease [2] (Fig. 4).

4.3. Study limitations

HIF-1 α deficient mice

In the present study, we focused on the deleterious role of HIF-1 in response to chronic IH. Thus, we compared the response to IH in wild-type and HIF-1 $\alpha^{+/-}$ mice. In basal condition, HIF-1 $\alpha^{+/-}$ mice displayed abnormal response to several parameters measured in this study (ER stress markers, some Ca^{2+} homeostasis actors and particularly for MAM interactions, see two-way ANOVA, Fig. 1-2). This could be explained by the beneficial role of HIF-1 from cardiac development until its requirement in response to acute stress such as ischemia-

reperfusion [40]. Further studies using cardiomyocyte-specific HIF-1 deficiency would be a step in the understanding of tissue specific responses to IH.

4.4. Conclusions

To conclude, by dissecting the mechanisms responsible for the susceptibility to ischemia-reperfusion injury after IH, we will be able to provide therapeutic alternatives for the current standard treatment of sleep-disordered breathing (continuous positive airway pressure) which is inefficient and not well tolerated by patients. This study highlights that chronic HIF-1 activation profoundly alters cell signalling in heart characterized by myocardial MAM disruption, calcium homeostasis disturbance, ER stress and susceptibility to myocardial injury in rodents exposed to IH. In accordance, HIF-1 and ER stress markers were increased in patients with AHI>15 and cardiovascular disease. These pre-clinical results are the proof that “HIF-1 status” or the kind of HIF-1 activation deserves to be elucidated in cardiovascular pathologies. In SDB, further studies should consider chronic activation of HIF-1 as a target in severe SDB patients with a cardiovascular risk. Indeed stabilization, translocation and activation of HIF-1 could be modulated (respectively in regards to its potential beneficial role) by various drugs, such as camptothecin, Moracin O or Curcuma longa, respectively [41]. This could represent a valuable therapeutic approach and a major advance to improve life quality in SDB patients with a cardiovascular risk.

Acknowledgement

We are grateful to Pr. Peter Carmeliet, from the Vesalius Research Center and the Department of Oncology, University of Leuven, Belgium, for providing the HIF-1 $\alpha^{+/-}$ mice and their wild-type counterparts. We thank Alexei Grichine, Sebastien Bailly, Emeline Lemarie and Sandrine Brasseur for their technical assistance.

References

- [1] Javaheri S, Barbe F, Campos-Rodriguez F, Dempsey JA, Khayat R, Javaheri S, et al. Sleep Apnea: Types, Mechanisms, and Clinical Cardiovascular Consequences. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69:841-58.
- [2] Buchner S, Satz A, Debl K, Hetzenecker A, Luchner A, Husser O, et al. Impact of sleep-disordered breathing on myocardial salvage and infarct size in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2014;35:192-9.
- [3] Buchner S, Eglseer M, Debl K, Hetzenecker A, Luchner A, Husser O, et al. Sleep disordered breathing and enlargement of the right heart after myocardial infarction. *Eur Respir J*. 2015;45:680-90.
- [4] Belaidi E, Joyeux-Faure M, Ribuot C, Launois SH, Levy P, Godin-Ribuot D. Major role for hypoxia inducible factor-1 and the endothelin system in promoting myocardial infarction and hypertension in an animal model of obstructive sleep apnea. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53:1309-17.
- [5] Belaidi E, Thomas A, Bourdier G, Moulin S, Lemarie E, Levy P, 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;210:45-53.
- [6] Gras E, Belaidi E, Briancon-Marjollet A, Pepin JL, Arnaud C, Godin-Ribuot D. Endothelin-1 mediates the IH-induced inflammatory vascular remodelling through HIF-1 activation. *J Appl Physiol (1985)*. 2015:jap 00641 2015.
- [7] Wang X, Xu L, Gillette TG, Jiang X, Wang ZV. The unfolded protein response in ischemic heart disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2018;117:19-25.

- [8] Semenza GL, Prabhakar NR. Neural regulation of hypoxia-inducible factors and redox state drives the pathogenesis of hypertension in a rodent model of sleep apnea. *J Appl Physiol* (1985). 2015;119:1152-6.
- [9] Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Inseste J, Rodriguez-Sinovas A, Piper HM. Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovasc Res*. 2012;94:168-80.
- [10] Belaidi E, Beguin PC, Levy P, Ribuot C, Godin-Ribuot D. Prevention of HIF-1 activation and iNOS gene targeting by low-dose cadmium results in loss of myocardial hypoxic preconditioning in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294:H901-8.
- [11] Cai Z, Luo W, Zhan H, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is required for remote ischemic preconditioning of the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:17462-7.
- [12] Cai Z, Zhong H, Bosch-Marce M, Fox-Talbot K, Wang L, Wei C, et al. Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 alpha. *Cardiovasc Res*. 2008;77:463-70.
- [13] Forkel J, Chen X, Wandinger S, Keser F, Duschin A, Schwanke U, 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*. 2004;286:H545-51.
- [14] Heusch G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ Res*. 2015;116:674-99.
- [15] Zhao HX, Wang XL, Wang YH, Wu Y, Li XY, Lv XP, et al. Attenuation of myocardial injury by postconditioning: role of hypoxia inducible factor-1alpha. *Basic Res Cardiol*. 2010;105:109-18.
- [16] Ong SG, Lee WH, Theodorou L, Kodo K, Lim SY, Shukla DH, et al. HIF-1 reduces ischaemia-reperfusion injury in the heart by targeting the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res*. 2014;104:24-36.

- [17] Bekeredjian R, Walton CB, MacCannell KA, Ecker J, Kruse F, Outten JT, et al. Conditional HIF-1alpha expression produces a reversible cardiomyopathy. *PLoS One*. 2010;5:e11693.
- [18] Moslehi J, Minamishima YA, Shi J, Neuberg D, Charytan DM, Padera RF, et al. Loss of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity in cardiomyocytes phenocopies ischemic cardiomyopathy. *Circulation*. 2010;122:1004-16.
- [19] Heusch G. HIF-1alpha and paradoxical phenomena in cardioprotection. *Cardiovasc Res*. 2012;96:214-5; discussion 6-9.
- [20] Mylonis I, Kourti M, Samiotaki M, Panayotou G, Simos G. Mortalin-mediated and ERK-controlled targeting of HIF-1alpha to mitochondria confers resistance to apoptosis under hypoxia. *J Cell Sci*. 2017;130:466-79.
- [21] Rieusset J, Fauconnier J, Paillard M, Belaidi E, Tubbs E, Chauvin MA, et al. Disruption of cyclophilin D-mediated calcium transfer from the ER to mitochondria contributes to hepatic ER stress and insulin resistance. *Hepatology*. 2012.
- [22] Paillard M, Tubbs E, Thiebaut PA, Gomez L, Fauconnier J, Crola Da Silva C, et al. Depressing Mitochondria-Reticulum Interactions Protects Cardiomyocytes from Lethal Hypoxia-Reoxygenation Injury. *Circulation*. 2013.
- [23] Doroudgar S, Glembotski CC. New concepts of endoplasmic reticulum function in the heart: programmed to conserve. *J Mol Cell Cardiol*. 2013;55:85-91.
- [24] Yeung HM, Hung MW, Lau CF, Fung ML. Cardioprotective effects of melatonin against myocardial injuries induced by chronic intermittent hypoxia in rats. *J Pineal Res*. 2015;58:12-25.
- [25] Chou IP, Lin YY, Ding ST, Chen CY. Adiponectin receptor 1 enhances fatty acid metabolism and cell survival in palmitate-treated HepG2 cells through the PI3 K/AKT pathway. *Eur J Nutr*. 2014;53:907-17.

- [26] Ding W, Cai Y, Wang W, Ji L, Dong Y, Zhang X, et al. Adiponectin protects the kidney against chronic intermittent hypoxia-induced injury through inhibiting endoplasmic reticulum stress. *Sleep Breath*. 2016;20:1069-74.
- [27] Zhou S, Yin X, Zheng Y, Miao X, Feng W, Cai J, 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;227:113-23.
- [28] Eisner V, Csordas G, Hajnoczky G. Interactions between sarco-endoplasmic reticulum and mitochondria in cardiac and skeletal muscle - pivotal roles in Ca²⁺(+) and reactive oxygen species signaling. *J Cell Sci*. 2013;126:2965-78.
- [29] Vannuvel K, Renard P, Raes M, Arnould T. Functional and morphological impact of ER stress on mitochondria. *J Cell Physiol*. 2013;228:1802-18.
- [30] Brahim-Horn MC, Lacas-Gervais S, Adaixo R, Ilc K, Rouleau M, Notte A, et al. Local mitochondrial-endolysosomal microfusion cleaves voltage-dependent anion channel 1 to promote survival in hypoxia. *Mol Cell Biol*. 2015;35:1491-505.
- [31] Alam MR, Baetz D, Ovize M. Cyclophilin D and myocardial ischemia-reperfusion injury: a fresh perspective. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;78:80-9.
- [32] Hausenloy DJ, Lim SY, Ong SG, Davidson SM, Yellon DM. Mitochondrial cyclophilin-D as a critical mediator of ischaemic preconditioning. *Cardiovasc Res*. 2010;88:67-74.
- [33] Gomez L, Thibault H, Gharib A, Dumont JM, Vuagniaux G, Scalfaro P, et al. Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following acute myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293:H1654-61.
- [34] Dong S, Teng Z, Lu FH, Zhao YJ, Li H, Ren H, et al. Post-conditioning protects cardiomyocytes from apoptosis via PKC(epsilon)-interacting with calcium-sensing receptors

to inhibit endo(sarco)plasmic reticulum-mitochondria crosstalk. *Mol Cell Biochem.* 2010;341:195-206.

[35] Valsecchi V, Pignataro G, Del Prete A, Sirabella R, Matrone C, Boscia F, et al. NCX1 is a novel target gene for hypoxia-inducible factor-1 in ischemic brain preconditioning. *Stroke.* 2011;42:754-63.

[36] Wagner S, Seidler T, Picht E, Maier LS, Kazanski V, Teucher N, et al. Na(+)-Ca(2+) exchanger overexpression predisposes to reactive oxygen species-induced injury. *Cardiovasc Res.* 2003;60:404-12.

[37] Chen L, Lu XY, Li J, Fu JD, Zhou ZN, Yang HT. Intermittent hypoxia protects cardiomyocytes against ischemia-reperfusion injury-induced alterations in Ca²⁺ homeostasis and contraction via the sarcoplasmic reticulum and Na⁺/Ca²⁺ exchange mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;290:C1221-9.

[38] Holscher M, Schafer K, Krull S, Farhat K, Hesse A, Silter M, et al. Unfavourable consequences of chronic cardiac HIF-1alpha stabilization. *Cardiovasc Res.* 2012;94:77-86.

[39] Kaczmarek E, Bakker JP, Clarke DN, Csizmadia E, Kocher O, Veves A, et al. Molecular biomarkers of vascular dysfunction in obstructive sleep apnea. *PLoS One.* 2013;8:e70559.

[40] Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease. *Annu Rev Physiol.* 2014;76:39-56.

[41] Belaidi E, Morand J, Gras E, Pepin JL, Godin-Ribuot D. Targeting the ROS-HIF-1-endothelin axis as a therapeutic approach for the treatment of obstructive sleep apnea-related cardiovascular complications. *Pharmacol Ther.* 2016.

Figure legends

Fig. 1: HIF-1 is involved in IH-induced alterations in calcium flux, MAM integrity and other calcium-regulating proteins in wildtype (WT) or HIF-1 α +/- exposed to 21 days of normoxia (N) or intermittent hypoxia (IH) mice. Representative graphs of calcium exchanges during 250 s after ER leakage by histamine (A). Calcium alterations were evaluated by computing the slope of calcium fluorescence relative to basal fluorescence (F1/F0) recorded between 50 (a) and 250 (b) seconds after histamine incubation (slope₂₅₀₋₅₀). Cytosolic (green line), ER (blue line) and mitochondrial (red line) calcium content assessed using Fluo 4-AM (B), Fluo 5-AM (C) and Rhod 2-AM (D), respectively. Experiments were realized on isolated cardiomyocytes (n=7-8, 4 cells per mice). Interactions between Grp75/VDAC1, Grp75/IP3R1, VDAC1/IP3R1 and CypD/Grp75 were assessed by in situ proximity ligation assay on isolated cardiomyocytes from mice (mean quantification values from 2-5 mice, 5 cells per mice; and representative images, red spots: interactions, DAPI-blue: nucleus) and by specific immunoprecipitation (IP) pull-down of VDAC1, Grp75 and CypD (revelation by immunoblotting, IB) by Grp75 or IP3R1 (E). Others calcium homeostasis actors (n=3) were assessed by Western-blot: Grp75, VDAC1, IP3R1, CypD (F); phospho-PLB, Serca2, NCX1, MCU (G) relative to Tubulin or non-phosphorylated appropriate protein and expressed relative to WTN. Data are presented as means \pm SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 vs. corresponding N group; † p<0.05, ††p<0.01, ††††p<0.0001 HIF-1 α +/- vs. WT mice.

Color should be used for this figure.

Fig. 2: HIF-1 is involved in IH-induced ER stress and myocardial infarct size expansion. ER stress was assessed on myocardium samples by Western blot (n=3, 2-3 replicates per sample) of unfolded protein response markers: Grp78 (A), phospho-PERK (B), phospho-eIF2 α (C),

ATF4 (D), CHOP (E), ATF6 (F) relative to Tubulin or non-phosphorylated appropriate protein; and by RT-qPCR (n=3): XBP-1s (G) relative to Rn18s; and expressed relative to WTN. Infarct size (H) was assessed by colorimetry and planimetry following in vivo ischemia (45min)-reperfusion (90min). Area at risk (AAR) relative to left ventricle (LV) and area of necrosis (AN) relative to AAR (n=8) were represented. Wild-type (WT) or HIF-1 α ^{+/-} were exposed to 21 days of normoxia (N) or intermittent hypoxia (IH) mice. Data are presented as means \pm SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 vs. corresponding N group; † p<0.05, ††p<0.01 HIF-1 α ^{+/-} vs. WT mice.

Fig. 3: HIF-1 and ER stress markers in patients with or without sleep-disordered breathing (SDB) and admitted for a cardiac surgery (CAGB: coronary artery bypass graft surgery, VR: valve replacement) Patient characteristics and polysomnographic data (A). Quantification of nuclear HIF-1 α relative to Ponceau (B), her representative univariable linear regression with AHI (C), and Grp78 (D) and CHOP (E) contents relative to Ponceau were assessed by Western blot (n=9-10). Data are expressed relative to control as median and interquartile range *p<0.05, ****p<0.0001 vs. control.

Fig. 4: Central role of HIF-1 in myocardial infarct size expansion induced by IH in rodents and sleep-disordered breathing (SDB) patients admitted for cardiac surgery (right panel). Under HIF-1 control, IH alters calcium homeostasis (A) and induces ER stress (B). Specifically, IH disrupts MAM (C) characterized by VDAC/IP3R1 and Grp75/CypD remoteness; Grp75 decrease; Grp75/VDAC and Grp75/IP3R1 reinforcement. IH also induces Ca²⁺ handling protein modifications such as a higher expression of NCX1 (D) and PLB phosphorylation (E).

Color should be used for this figure.

Fig. S1: Partial deletion of HIF-1 α decreases HIF-1 α content, and abolishes the IH-induced increase in HIF-1 α expression (n=4-6); quantification using ImageJ after immunocytochemistry (x200). Data are expressed relative to WT and presented as means \pm SEM. *p<0.05 vs. corresponding N group; ††p<0.01 HIF-1 α ^{+/-} vs. WT mice.

Figure 1

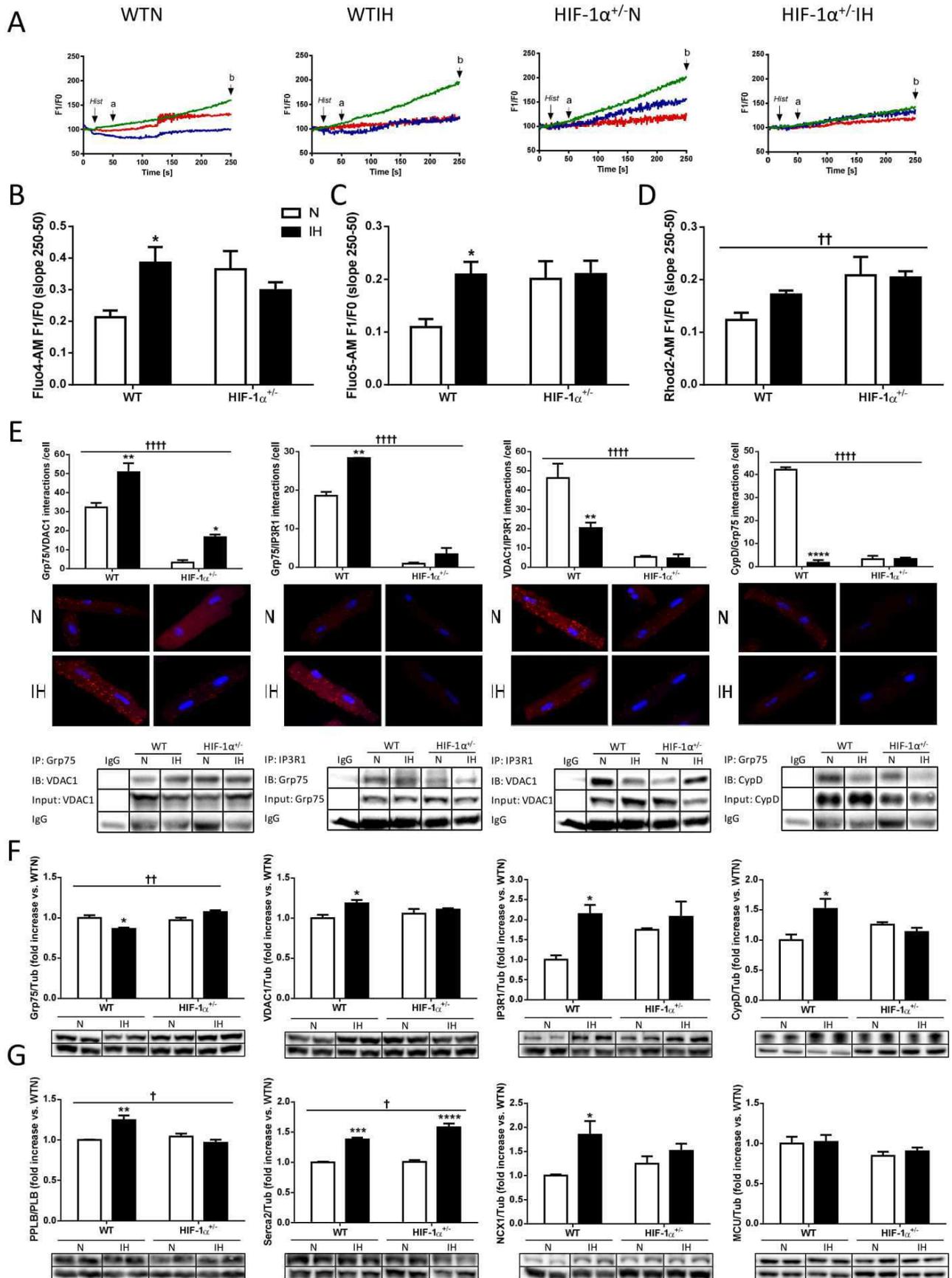


Figure 2

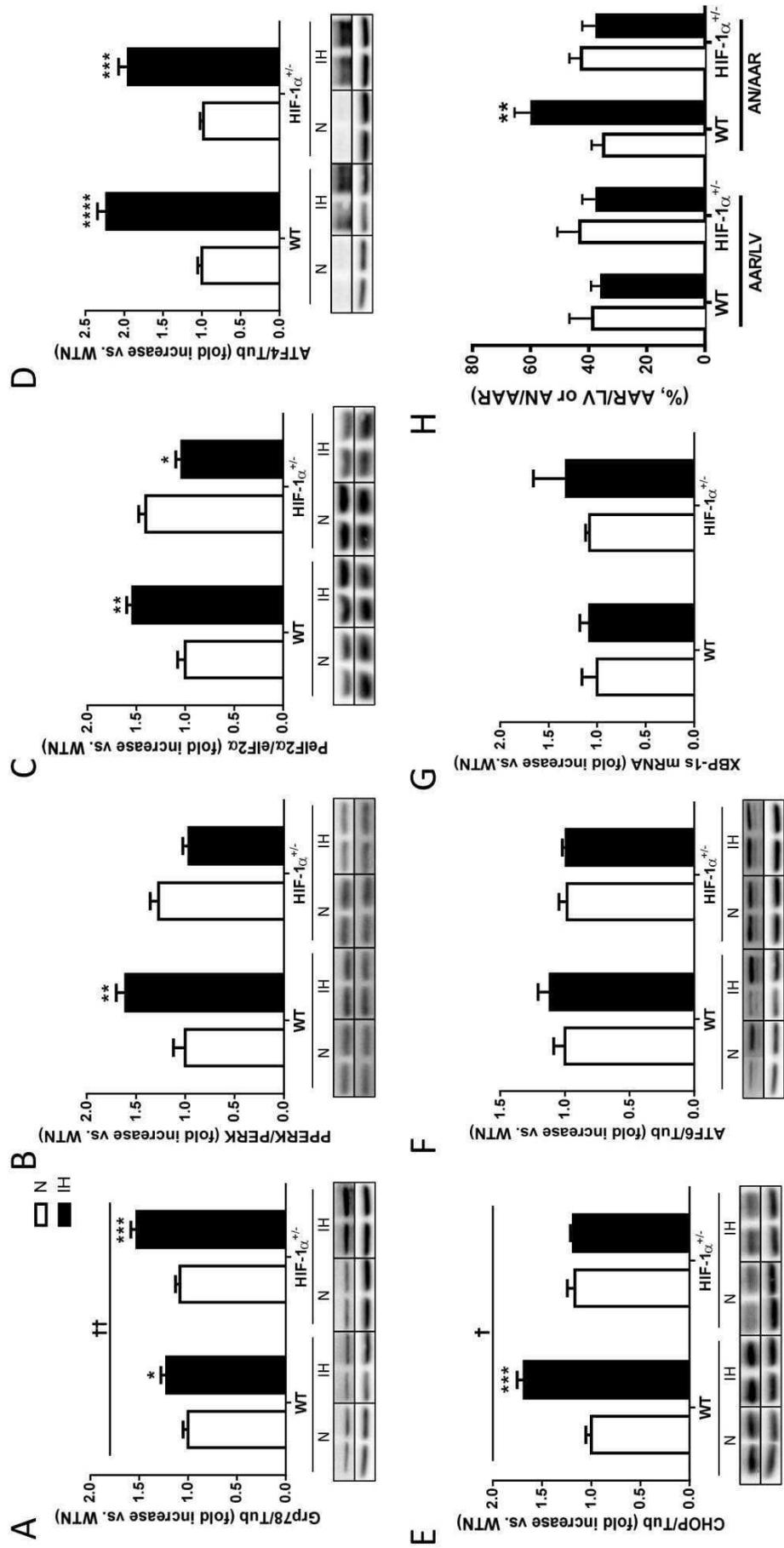


Figure 3

	Control	SDB	p value
Patient characteristics			
Number	10	10	
Age (year)	68.2±3.3	73.1±1.8	
Gender (M/F)	10/0	10/0	
Body-mass index (kg/m ²)	28.4±0.8	29.9±1.2	
Cardiac surgery	9/0/1	8/1/1	
(CAGB/VR/CAGB+VR)			
NT Pro-BNP (ng/ml)	1400±978	1000±372	
Polysomnographic data			
Apnea-hypopnea index (/h)	4.6±0.6	22.0±2.2	p<0.0001

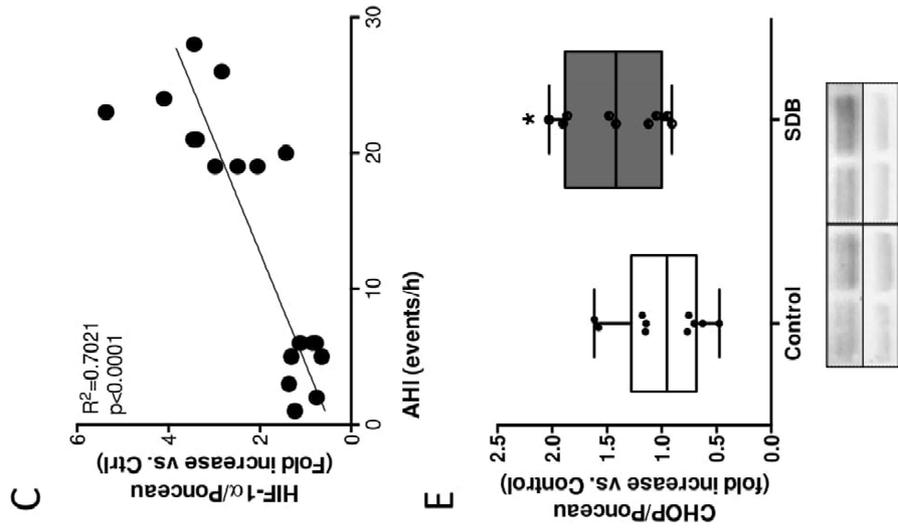
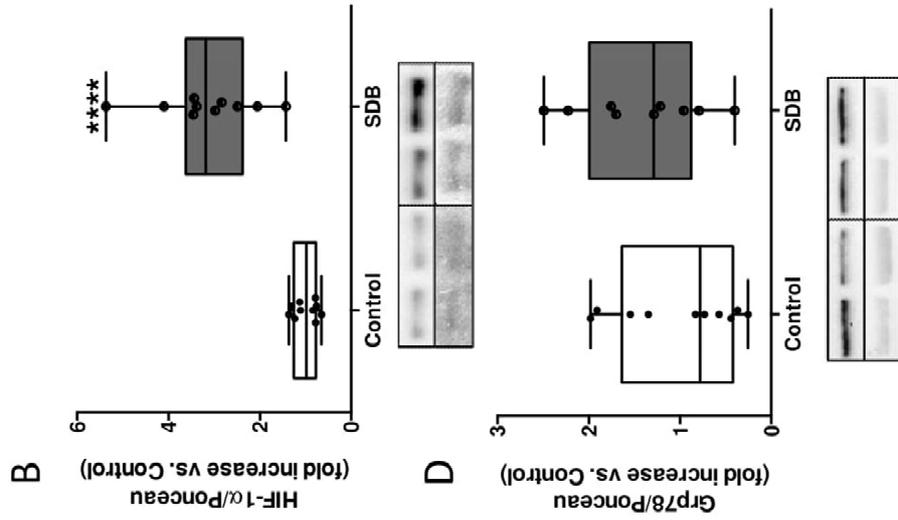


Figure 4

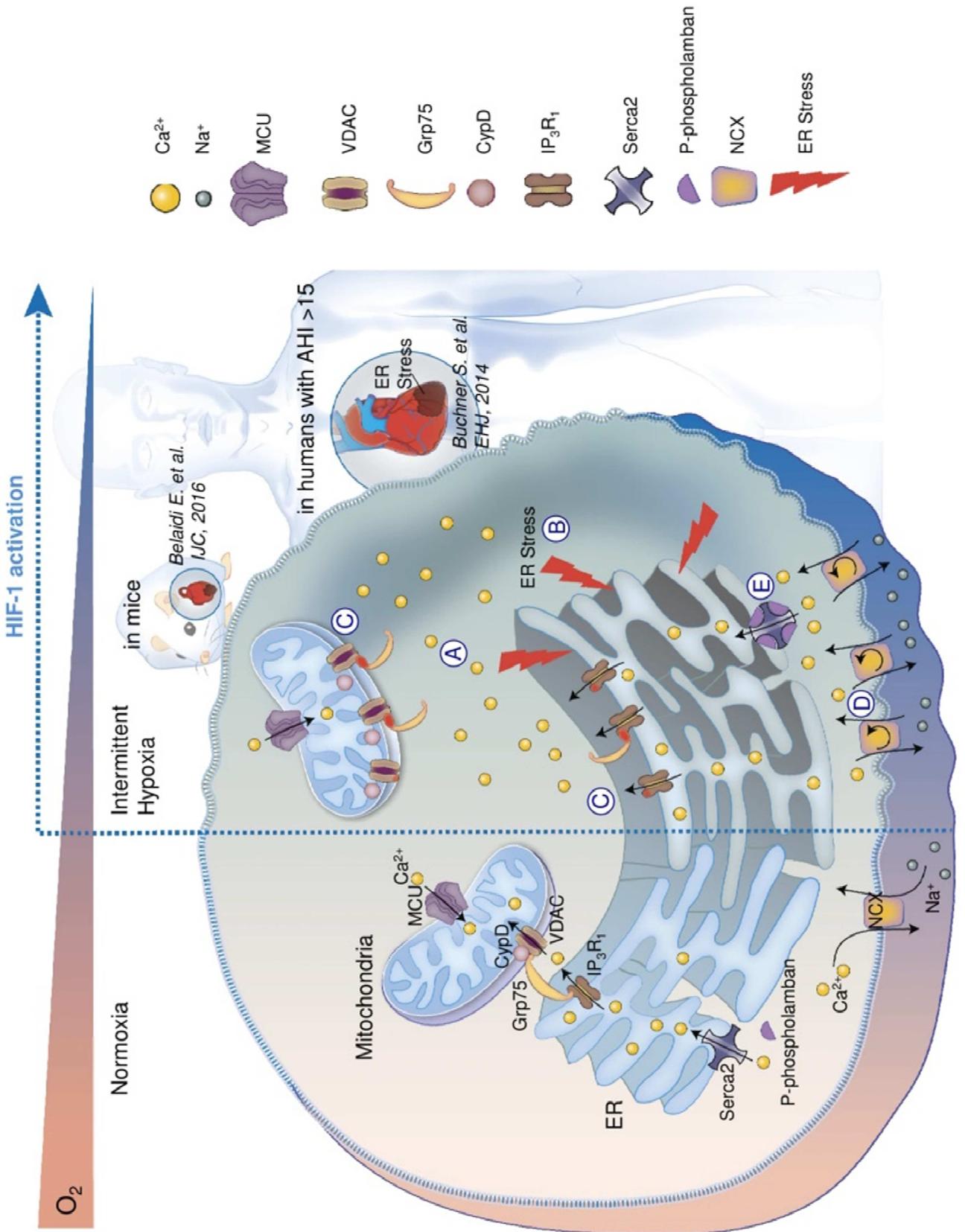
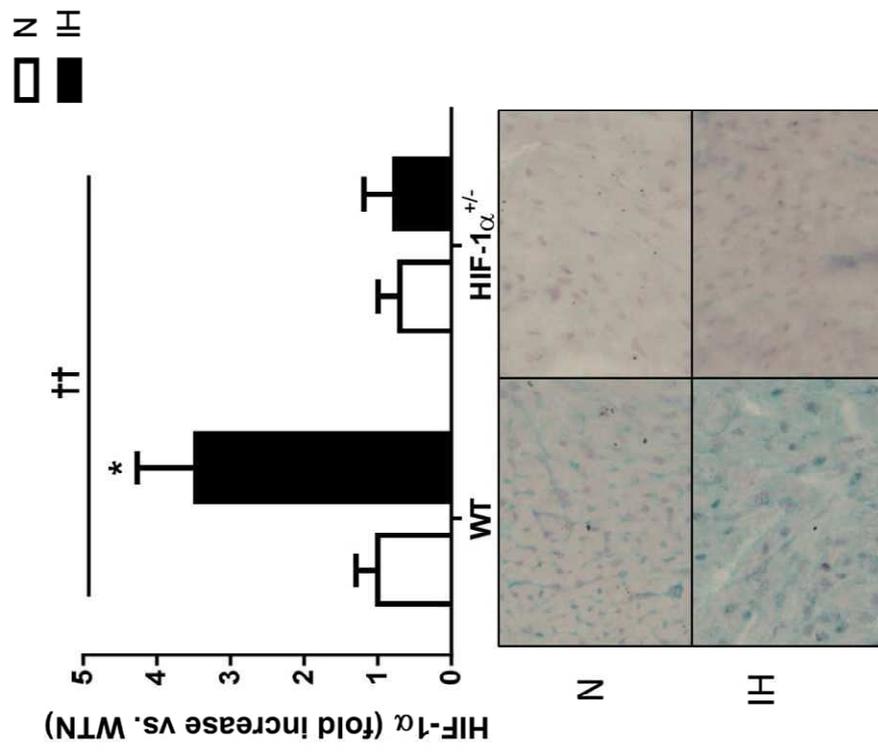


Figure S1



1. Online material supplement

1.1. Animals and exposition to intermittent hypoxia

Male Swiss/SV129 mice, partially deleted for the O₂-sensitive HIF-1 α subunit of HIF-1 (HIF-1 α ^{+/-}) and their wild-type (WT) were divided and exposed in their housing cages to 21 days of N or IH, 8 h per day during their sleeping period. The IH stimulus consisted in 60 s cycles alternating 30 s of hypoxia (hypoxic plateau at 5 % FiO₂) and 30 s of N (normoxic plateau at 21 % FiO₂). Normoxic mice were exposed to similar air-air cycles in order to control for noise and air turbulences related to gas flow.

1.2. Immunohistochemistry

Hearts were cryosliced into 8- μ m-thick short-axis sections. Slices were fixed in acetone 100% and blocked successively with hydrogen peroxide (3 %), avidin-biotin kit (Vectorlab, Abcys, Paris, France) and PBS-serum (10 %). Primary antibody (anti-HIF-1 α , 1/100, Abcam, Cambridge, United Kingdom) was incubated for 30 min, and secondary antibody-coupled to biotin (1/500, Vectorlab, Abcys, Paris, France), was incubated for 30 min. Slices were then treated with amplifying complex AB (Vectorlab, Abcys, Paris, France) and colorimetric-substrate was added for 5 min (Histo Green, Abcys, Paris, France). Slices were then stained with haematoxylin-eosin staining before dehydration. Vecta Mount Permanent medium (Vectorlab, Abcys, Paris, France) was used to mount the slides. Sections were acquired using the axiocam software (Zeiss, Göttingen, Germany, X200) and analysed using Image J software.

1.3. Total RNA purification and real-time RT-qPCR

Total RNA was extracted using the Tri Reagent® RNA isolation protocol (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Total RNA (0.5 μ g) was reverse-transcribed (iScript™ Reverse

Transcription Supermix, Bio-Rad, California, USA) and quantitative real-time PCR was then performed with SYBR® Green Supermix on a **CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection Systems** (Bio-Rad, California, USA). *Splicing* of X-box binding protein-1 (XBP1s) content was calculated relative to 18S ribosomal RNA (RN18S). Primers were 5'GAGTCCGCAGCAGGTG^{3'}/^{β'}GCGTCAGAATCCATGGGA^{5'} for XBP1s, 5'GGAAGAATAACTTCAGACCGCCC^{3'}/^{β'}TGCAGCGGACAGTGTCTTGTTT^{5'} for RN18S.

1.4. Western blot

Frozen biopsies were homogenised (Precellys® 24, 6000 rpm, 3X10s-5s, Bertin Technologies, Montigny le Bretonneux). Total proteins were extracted in lysis buffer (in mM : 1 % NP40, 20 Tris-HCl, 138 NaCl, 2.7 MgCl₂, 5 % glycerol, pH 8; with 5 EDTA, 1 Na₃VO₄, 20 NaF, 1 DTT, 1X protease inhibitor, Sigma Aldrich, Missouri, USA). Depending on protein of interest, cytosolic and nuclear extractions were also performed (Nuclear extract kit, Active Motif, La Hulpe, Belgium) according to the manufacturer's recommendations. Protein concentration was assayed (Bradford reagent, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) and expressed relative to bovine serum albumin (BSA) standard. Proteins (30-100 µg) were separated by SDS-PAGE (8-12 % acrylamide) and transferred to polyvinylidene fluoride membranes. Membranes were blocked with 5 % non-fat milk or BSA in Tris-buffered saline (TBS) with Tween 20 (0.05 %). Then, membranes were placed in TBS-Tween 20 (0.05 %)-1 % BSA or non-fat milk and incubated at 4 °C overnight with the following primary antibodies: sodium-calcium exchanger 1 (NCX1, 1:500, Millipore, Massachusetts, USA); activating transcription factor 4 (ATF-4, 1:1000), phospho-eukaryotic translation initiation factor 2A (PeIF2α), eIF2α, mitochondrial calcium uniporter (MCU, 1:500, Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA); voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1, 1:1000),

cyclophilin D (CypD, 1:2500, Abcam, Cambridge, United Kingdom); hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), activating transcription factor 6 (ATF6, 1:200), phospho- double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PPERK), PERK, C/EBP homologous protein (CHOP), 78 kDa glucose-regulated protein (Grp78), inositol 1,4,5-trisphosphate receptor 1 (IP3R1, 1:500), 75 kDa glucose-regulated protein (Grp75), sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 2 (Serca2), phosphorylation on serine 16 of phospholamban (PPLB), PLB (1:1000) and tubulin (1:2000) (Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA). Then, appropriate horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA) were incubated for 1 h at room temperature. Enhanced chemiluminescence was performed with the ECL Western-Blot detection kit (Bio-Rad, California, USA) according to the manufacturer's instructions and videoacquisition (ChemiDoc™ XRS+ System, Bio-Rad, California, USA). Equal loading was evaluated by tubulin or Ponceau S staining (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Density of protein bands was analysed by Image J software and expressed relative to the appropriate control group; experiments were replicated 2-3 times.

1.5. Cardiomyocyte isolation

Mice were anesthetized by an intraperitoneal (ip) injection of sodium pentobarbital (70 mg.kg⁻¹). Following ip. injection of heparin (50 UI.kg⁻¹), hearts were rapidly excised and immediately immersed in 4 °C perfusion buffer (PB in mM : 113 NaCl, 4.7 KCl, 0.6 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄-7H₂O, 0.032 Phenol Red, 12 NaHCO₃, 10 KHCO₃, 10 HEPES, 30 Taurine, 10 Butanedione monoxime, 5.5 glucose, pH 7.46). Hearts were retrogradely perfused in Langendorff mode for 5 min with PB at 37 °C and research grade Liberase™ (Roche Diagnostics, Meylan, France) was added for approximately 20 min. Digestion was stopped by incubating hearts in PB containing 12.5 μ M CaCl₂, 10 % bovine calf serum gold (PAA Cell

Culture Company, Cambridge, United Kingdom). Cells were isolated by stirring and successive aspirations and filtered on a 200µm membrane. PB calcium concentration was then gradually increased (from 50 to 1000 µM Ca²⁺). At the end, cells were suspended in culture medium (M199, Life Technologies, California, USA) supplemented with penicillin-streptomycin (1 U.mL⁻¹, Life Technologies, California, USA) and insulin-transferrin-selenium (1 U.mL⁻¹, Sigma-Aldrich, Missouri, USA). They were seeded on Lab-Tek® chambered coverglasses precoated with 1 µg.cm⁻² laminin (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) and incubated during 2 h in humidified 5 % CO₂ – 95 % O₂ at 37 °C.

1.5.1. Inter-organelles calcium exchanges

Isolated cardiomyocytes were loaded in Tyrode's solution (in mM: 130 NaCl, 5 KCl, 10 HEPES, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 glucose) for 20 min at 37°C with both Fluo4-AM (3 µmol.L⁻¹, Life Technologies, California, USA) and Rhod2-AM (6 µmol.L⁻¹, Life Technologies, California, USA), or both Fluo5-AM (3 µmol.L⁻¹, Life Technologies, California, USA) and Rhod2-AM. As previously described [1, 2], Fluo4-AM, Fluo5-AM and Rhod2-AM are fluorescence-based indicators of cytosolic, endoplasmic reticulum and mitochondrial calcium, respectively. After 30 min of probe incubation, fluorescence was measured using a Zeiss LSM 710 Exciter laser scanning confocal microscope (x63 oil immersion; excitation 488 nm and emission Fluo4-AM 506nm; Fluo5-AM 516nm; Rhod2-AM 581nm are separated by spectral mode, HFT488 dichroic beamsplitter). Spectral acquisition and deconvolution were performed in the specified spectral interval using the reference spectra of individual dyes. The resolution was 9.7 nm and the whole spectral stack was acquired simultaneously using Quasar spectral detector (Carl Zeiss, Oberkoren, Germany). Thus, both spectral cross-talk and spectral distortions due to the cellular movements were avoided. Following the baseline fluorescence recording, histamine (100 µM, Sigma-Aldrich) was added to the cells on the stage of the microscope to induce calcium release from the ER through IP3R, as previously

described [1, 2]. Fluorescence emission from Fluo4-AM, Fluo5-AM and Rhod2-AM (fluorescence-based indicators of cytosolic, endoplasmic reticulum and mitochondrial calcium, respectively) was normalized to baseline fluorescence before histamine application ($F1/F0$) and fluorescence slope was calculated between 250 s and 50 s after histamine application ($F1/F0$ slope₂₅₀₋₅₀). Results are mean values of 4 cells per heart.

1.5.2. Mitochondria-Associated endoplasmic reticulum Membranes investigation

Duolink[®] Proximity Ligation Assay (PLA, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) allows detecting proximity between two proteins, less than 40 nm. Isolated cardiomyocytes were fixed by 4 % paraformaldehyde on labtek[®] and permeabilised (Triton X-100 0.1 %). Cells were incubated with 2 primary antibodies, produced in different species overnight, at 4 °C: VDAC1, IP3R1, CypD (Abcam, Cambridge, United Kingdom, 1:200), and Grp75 (Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA, 1:200). Then PLA probes, ligase and polymerase were applied successively, at 37 °C, in humid chamber, according to recommendations from Sigma-Aldrich (Missouri, USA). Preparations were mounted in DAPI mounting medium (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Red spots are assessed with microscope using the axiocam software (Zeiss, Göttingen, Germany, X400), and analysed with BlobFinder software (The Centre for Image Analysis, Uppsala University, Sweden). Quantifications are expressed in number of interactions per cell (mean values of 5 fields per heart).

MAM interactions were also studied with protein immunoprecipitation. Total proteins (500 µg) were incubated with 2 µg of primary antibody (Grp75 or IP3R1, Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA) in lysis buffer (overnight, 4°C), under agitation. Then, SureBeads[™] Protein G Magnetic Beads (Bio-Rad, California, USA) were added for 2h at 4°C, under agitation. After 3 washing with lysis buffer, Western blot was realized to detect MAM interaction.

1.6. In vivo Ischemia-reperfusion and infarct size

At the end of the N or IH exposure, mice were anesthetized by pentobarbital (70 mg.kg^{-1} , ip), ventilation was maintained by intubation (tidal volume $170\mu\text{l}$; ambient air), body temperature was maintained at $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ using a rectal probe-connected to a heating plate. After a left thoracotomy, a 45 min myocardial ischemia was induced by ligation of the left coronary artery followed by 90 min of reperfusion, as previously described [1, 2]. At the end of the reperfusion period, the coronary artery was re-occluded and staining of area at risk (AAR) and area of necrosis (AN) was performed using Uniparse blue dye and 1 % triphenyltetrazolium chloride, respectively. AAR and AN were measured by planimetric analysis (Image J software) and expressed relative to heart weight.

1.7. SDB measurement

Assessment of SDB in clinical routine in the preoperative night was performed using the ApneaLink device (ResMed Inc., Martinsried, Germany) with measurement of nasal flow, pulse oximetry and thoracic breathing effort that has been validated in several studies [3], including patients with heart failure [4]. Comparing ApneaLink (using automatic scoring) to the gold standard polysomnography in patients without known heart disease, studies have reported a sensitivity of 73-94 % and a specificity of 85-95 % using an AHI cut-off value of 15/h [4]. Apnoea was defined as a $\geq 80 \%$ decrease in airflow for ≥ 10 seconds; apnoea was defined as a decrease in airflow by $\geq 50\text{-}80 \%$ versus baseline for ≥ 10 seconds; desaturation was defined as a $\geq 4\%$ decrease in oxygen saturation; SDB was defined as $\text{AHI} \geq 15/\text{h}$. If technically possible, right atrial appendage biopsies were collected during CABG.

References

- [1] Belaidi E, Thomas A, Bourdier G, Moulin S, Lemarie E, Levy P, 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;210:45-53.
- [2] Rieusset J, Fauconnier J, Paillard M, Belaidi E, Tubbs E, Chauvin MA, et al. Disruption of cyclophilin D-mediated calcium transfer from the ER to mitochondria contributes to hepatic ER stress and insulin resistance. *Hepatology.* 2012.
- [3] Erman MK, Stewart D, Einhorn D, Gordon N, Casal E. Validation of the ApneaLink for the screening of sleep apnea: a novel and simple single-channel recording device. *J Clin Sleep Med.* 2007;3:387-92.
- [4] Arzt M, Woehrle H, Oldenburg O, Graml A, Suling A, Erdmann E, et al. Prevalence and Predictors of Sleep-Disordered Breathing in Patients With Stable Chronic Heart Failure: The SchlaHF Registry. *JACC Heart Fail.* 2016;4:116-25.

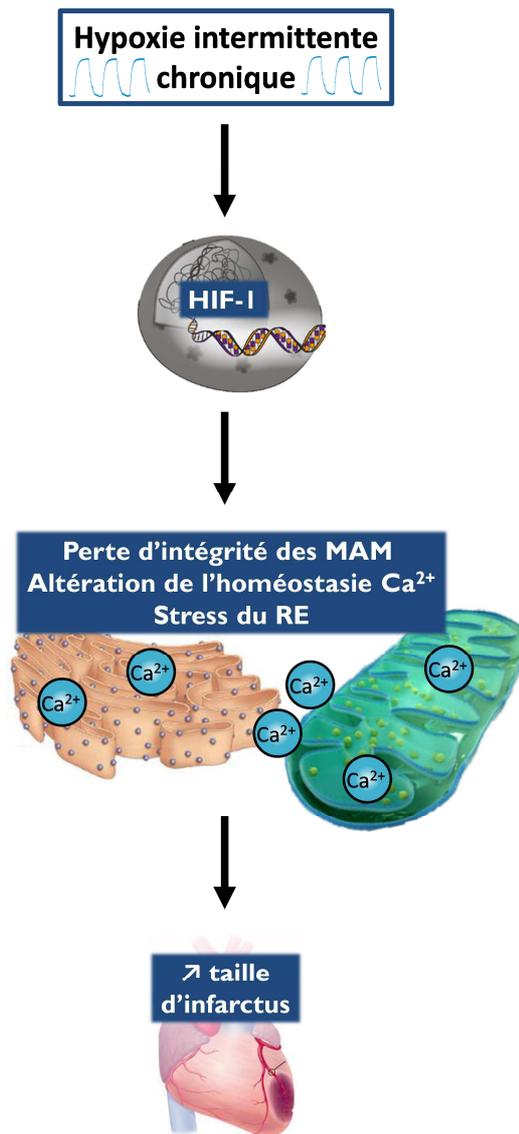


Figure 22 : Schéma de conclusion de l'étude 1 illustrant le rôle de HIF-1 dans l'altération des MAM, le stress du RE et l'augmentation de la taille d'infarctus induits par l'HI chronique.

2. Etude 2 :

Rôle de HIF-1 dans les altérations mitochondriales induites par l'HI chronique

La mitochondrie est l'organe le plus sensible à l'oxygène. Étonnamment, peu d'études se sont intéressées à la mitochondrie dans le contexte de l'hypoxie intermittente (HI). Celles-ci rapportent une augmentation de la production mitochondriale d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans le cerveau et les corps carotidiens de souris exposées à l'HI, ainsi qu'une diminution de la biogénèse mitochondriale dans le muscle génioglosse. L'*hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1) est, quant à lui, bien connu pour induire des adaptations mitochondriales en réponse à l'hypoxie continue, telle que l'activation d'un métabolisme glycolytique.

Cette étude a donc eu pour but de caractériser l'impact de l'HI sur la structure, la fonction, la dynamique et le renouvellement des mitochondries cardiaques, ainsi que le rôle de HIF-1 dans ces éventuelles altérations.

Des souris Swiss/SV129, HIF-1 α ^{+/-} et leurs contrôles, *wild type* (WT) ont été exposées à 21 jours d'HI ou de normoxie (N). La structure des mitochondries a été analysée par microscopie électronique à transmission. Sur des mitochondries cardiaques isolées, la fonction mitochondriale a été évaluée par la mesure de la consommation d'oxygène, de la production de peroxyde d'hydrogène, du potentiel de membrane et de la capacité de rétention calcique. Les marqueurs clés du cycle et la dynamique ont aussi été évalués. Suite aux résultats obtenus, nous avons observé les effets d'un activateur de l'*AMP-activated protein kinase* (AMPK), la metformine, (300 mg/kg/jr, gavage) ou de son véhicule (CMC-Na 0,1%), sur la dynamique et le renouvellement mitochondrial et sur la taille d'infarctus.

L'HI induit une diminution de la respiration et de la production d'ERO mitochondriales, une augmentation de la sensibilité des mitochondries au calcium et une mitophagie. Elle diminue également l'activité de l'AMPK myocardique. La délétion partielle de HIF-1 α abolit les altérations induites par l'HI. De plus, le traitement par la metformine prévient l'induction de la mitophagie et l'augmentation de la taille d'infarctus induites par l'HI.

En conclusion, l'activation chronique de HIF-1 est impliquée dans les altérations mitochondriales induites par l'HI qui semblent être fortement associées à une diminution de l'activité de l'AMPK.

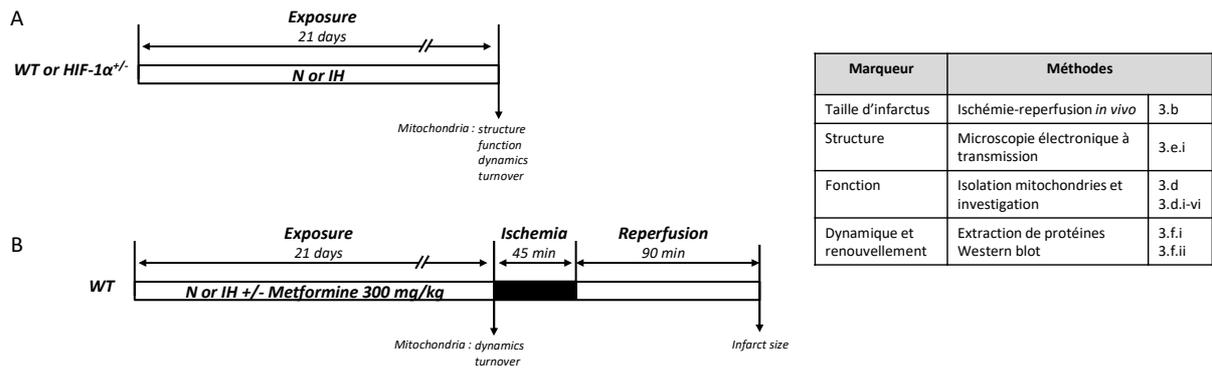


Figure 23 : Design expérimental et méthodologie de l'étude 2.

a. Dysfonction mitochondriale

L'hypoxie intermittente modifie la respiration mitochondriale chez les souris WT. Elle diminue la consommation maximale d'oxygène, dépendante de la phosphorylation oxydative, de 35 à 40% en complexe I (CI) et II (CII) (CI : $13,5 \pm 1,9$ vs. $21,6 \pm 2,3$ mmol d'O₂/min/mg et CII : $27,6 \pm 3,5$ vs. $42,1 \pm 3,9$ mmol d'O₂/min/mg, dans les groupes HI et N, respectivement), ainsi que le RCR (CI : $4,02 \pm 0,4$ vs. $5,72 \pm 0,5$ et CII : $2,42 \pm 0,1$ vs. $3,03 \pm 0,1$, dans les groupes HI et N, respectivement) (figure 24A, C). Ces effets sont abolis par la délétion de HIF-1 α . Les mêmes tendances sont observées lors de la mesure de la consommation d'oxygène en complexe IV (figure 24E).

Nous avons ensuite, avec les mêmes substrats, évalué la production d'ERO. Chez les souris WT, l'HI diminue la production de ERO mitochondriales de 45 % en complexe II uniquement (1917 ± 303 vs. 3504 ± 423 pmol d'H₂O₂/min/mg, dans les groupes HI et N, respectivement) (figure 24B, D), et cet effet est aboli par l'ajout de roténone. La production mitochondriale d'ERO n'est pas affectée par l'HI chez les souris HIF-1 α ^{+/-}.

Le potentiel de membrane mitochondrial n'est pas modifié par l'HI (figure 24F). Par contre le temps de repolarisation membranaire après ajout d'ADP, est multiplié par 1,5 chez les souris WT ($936,7 \pm 94,5$ vs. $622,3 \pm 46,7$ s dans les groupes HI et N, respectivement) et par 2 chez les souris HIF-1 α ^{+/-} ($745,6 \pm 134,9$ vs. $348,6 \pm 109,2$ s dans les groupes HI et N, respectivement) (figure 24G). Cette réponse à l'HI semble donc indépendante de HIF-1.

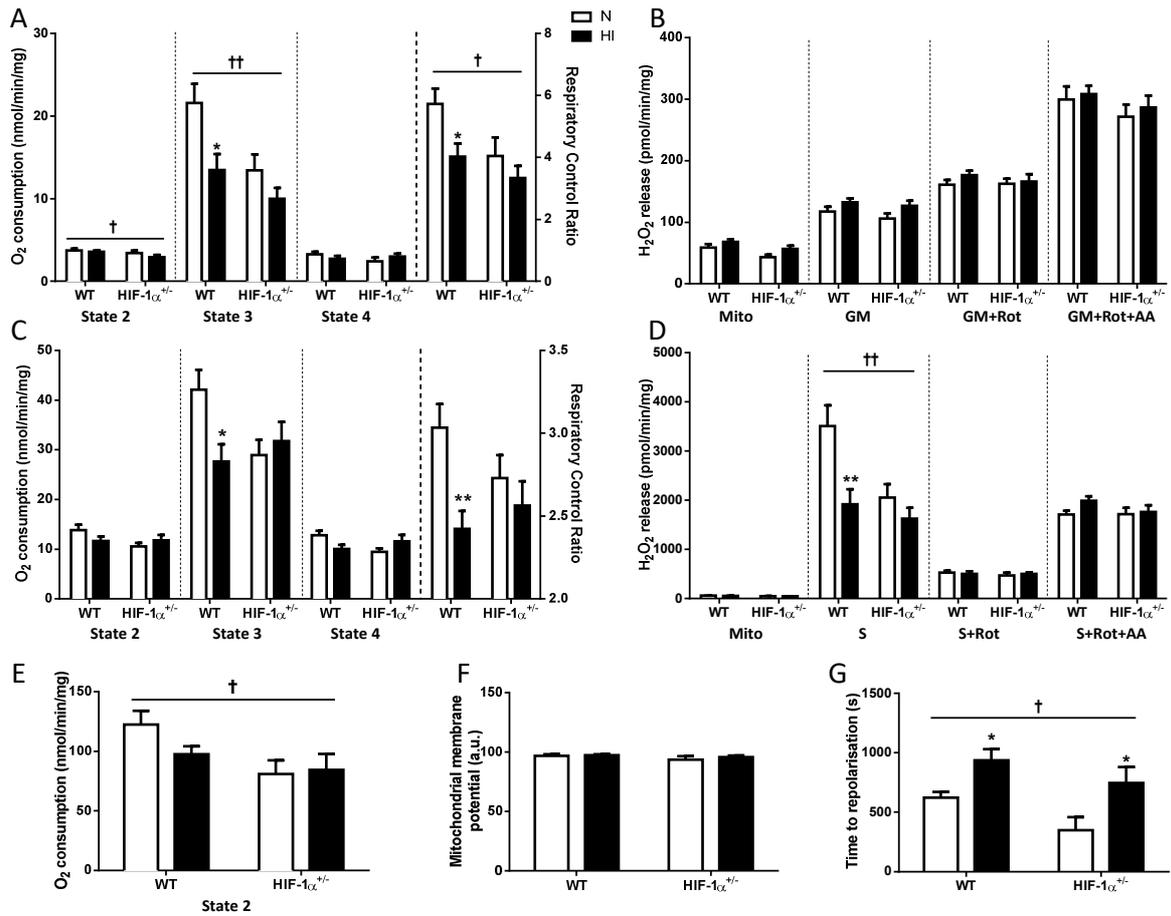


Figure 24 : HIF-1 est impliqué dans la diminution de la respiration mitochondriale et la production de ROS induits par l'hypoxie intermittente (HI) chronique. La consommation d'oxygène a été évaluée sur des mitochondries isolées de cœur de souris sauvage *wild-type* (WT) ou HIF-1α^{+/-} exposées à 21 jours d'HI ou de normoxie (N). Mesures effectuées en présence de glutamate/malate (A), de succinate (C) ou de TMPD-Asc (E) (State 2) suivi de l'ajout successif d'ADP (State 3) puis d'oligomycine (State 4). Le *respiratory control ratio* est le rapport de l'état 3 sur l'état 2 (State 3/State 2). La production de ROS (B et D) a été mesurée en basal (Mito) puis en présence de glutamate/malate (GM) ou de succinate (S) avec ajout successif de roténone (Rot) et antimycine A (AA), en utilisant la sonde Amplex Red. Le potentiel de membrane basal des mitochondries (F) ainsi que le temps de repolarisation après ajout d'ADP (G) ont été quantifiés en présence de glutamate/malate avec la sonde TMRM. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (n=7-12). *p<0.05, **p<0.01 HI vs. N ; † p<0.05, ††p<0.01 souris HIF-1α^{+/-} vs. WT.

Enfin, la capacité de rétention calcique basale tend à être diminuée par l'exposition à l'HI (figure 25A). Cette différence est exacerbée (diminution de 30%) lorsque la mesure est effectuée en présence de CsA (figure 25B). Ces effets sont abolis par la délétion de HIF-1 α .

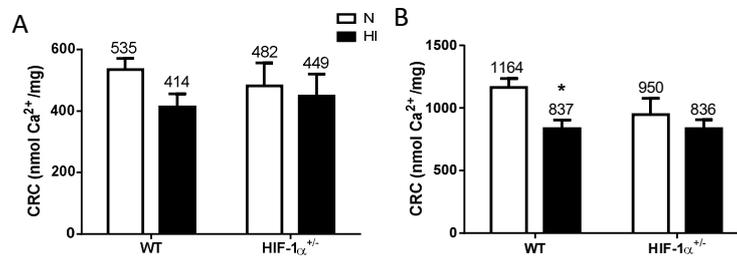


Figure 25 : HIF-1 est impliqué dans la diminution de la capacité de rétention calcique (CRC) induite par l'hypoxie intermittente (HI) chronique. Sur des mitochondries isolées de cœur de souris sauvage *wild-type* (WT) ou HIF-1 α ^{+/-} exposées à 21 jours d'HI ou de normoxie (N), la CRC a été évaluée avec des pics de calcium de 10 nmol en présence de succinate seul (A) ou avec de la cyclosporine A (B), en utilisant la sonde Calcium Green-5N. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (n=7-11). *p<0.05 HI vs. N.

En parallèle de ces altérations de la chaîne respiratoire globale, l'expression des complexes de la chaîne de respiration n'est pas modifiée par l'HI (figure 26). En revanche, chez les souris WT, les activités individuelles des complexes I et II (CI : 2862 \pm 164 vs. 2373 \pm 119 et CII : 1741 \pm 85 vs. 1552 \pm 48 mmol d'O₂/min/mg, dans les groupes HI et N, respectivement) sont augmentées de 15-20 % par l'HI (figure 27A, B) alors que les activités des autres complexes et de la citrate synthase mitochondriale ne sont pas modifiées (figure 27C-E). Ces modifications d'activité sont abolies par la délétion partielle de HIF-1 α .

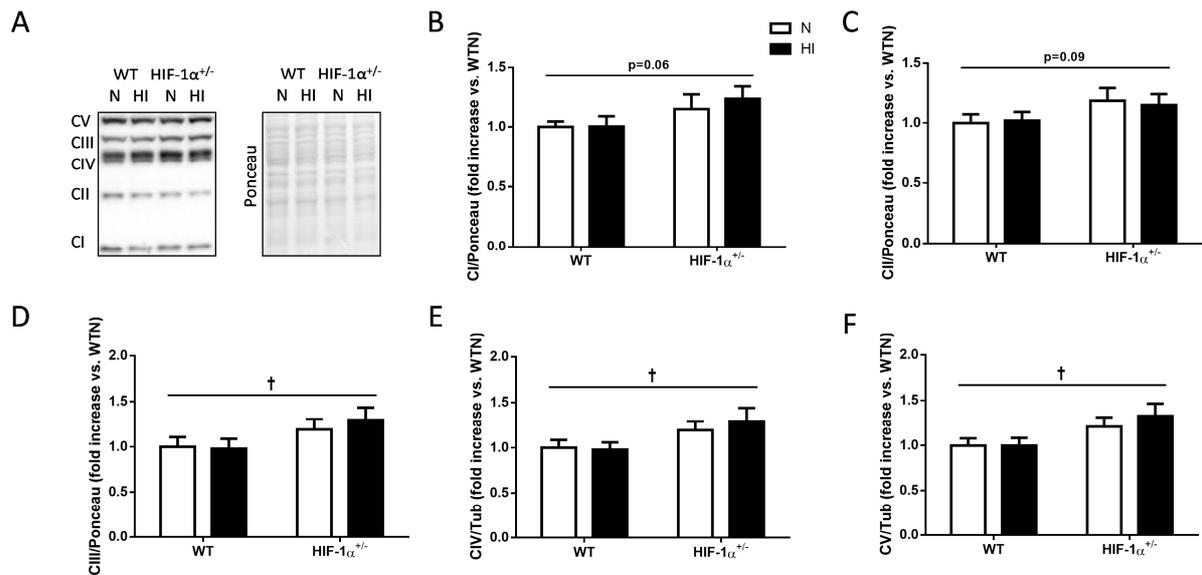


Figure 26 : L'expression des complexes mitochondriaux n'est pas modifiée par l'hypoxie intermittente (HI) chronique. Sur des extraits protéiques de cœur de souris sauvage *wild-type* (WT) ou HIF-1α^{+/-} exposées à 21 jours d'HI ou de normoxie (N), l'expression des complexes CI (B), CII (C), CIII (D), CIV (E) et CV (F) de la chaîne de respiration mitochondriale a été évaluée par Western blot et rapportée au Ponceau (blots représentatifs en A). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (n=5-6). † p<0.05 souris HIF-1α^{+/-} vs. WT.

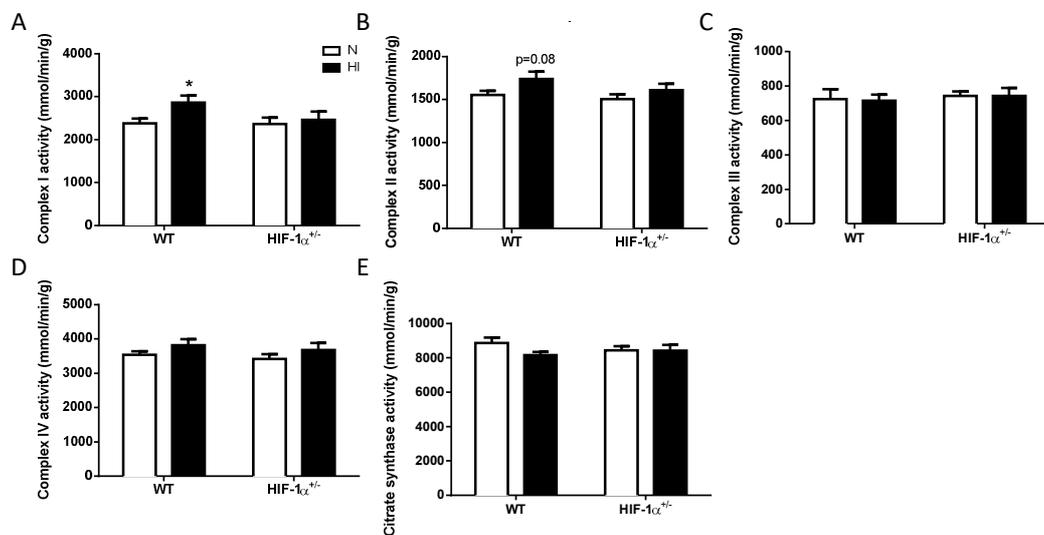


Figure 27 : HIF-1 est impliqué dans l'augmentation de l'activité des complexes I et II de la mitochondrie, induite par l'hypoxie intermittente (HI) chronique. Sur des mitochondries isolées de cœur de souris sauvage *wild-type* (WT) ou HIF-1α^{+/-} exposées à 21 jours à d'HI ou de normoxie (N), l'activité de chaque complexe CI (A), CII (B), CIII (C) et CIV (D) de la chaîne de respiration mitochondriale et de la citrate synthase (E) ont été évaluée en présence de substrats spécifiques. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (n=7-11). *p<0.05 HI vs. N

b. Altérations de la dynamique et du renouvellement des mitochondries

Sur des extraits protéiques nucléaires de cœur, nous avons évalué un marqueur clé de la biogénèse mitochondriale, le facteur de transcription PGC-1 α , non modifié par l'HI (figure 28A). Ensuite, sur des extraits protéiques cytoplasmiques de cœur, chez les souris WT, l'HI n'altère pas l'expression d'OPA1 (figure 28B), diminue l'expression de Mfn2 (HI : 0,84 \pm 0,04 *fold increase* vs. WTN, figure 28C), deux marqueurs de la fusion mitochondriale. L'HI ne modifie pas l'expression de Drp1, une protéine majeure de la fission mitochondriale (figure 28D). Chez les souris HIF-1 α ^{+/-}, l'HI n'a aucun impact sur ces marqueurs de biogénèse et de dynamique mitochondriales (figure 28).

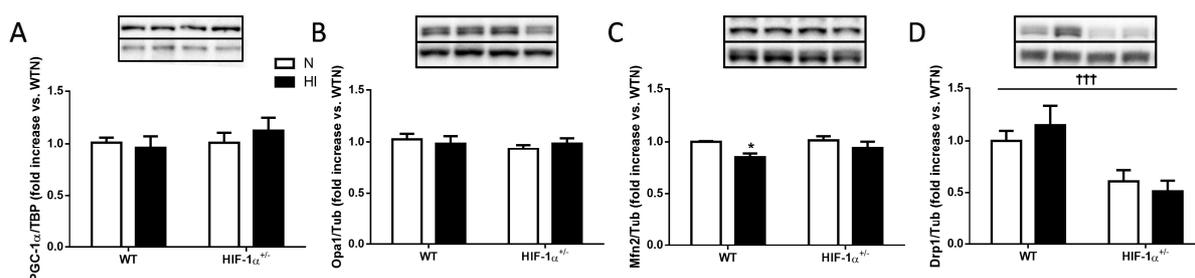


Figure 28 : L'hypoxie intermittente (HI) chronique n'altère pas la biogénèse et la dynamique mitochondriales. Sur des extraits protéiques de cœur de souris *wild-type* (WT) ou HIF-1 α ^{+/-} exposées à 21 jours d'HI ou de normoxie (N), la biogénèse mitochondriale, la fusion et la fission sont évalués par Western blot avec les marqueurs PGC1 α rapporté à la TBP (A), OPA1 (B), Mfn2 (C), Drp1 (D) rapporté à la tubuline. Les valeurs sont exprimées en moyenne par rapport au groupe WTN, \pm SEM (n=5-6). *p<0.05 HI vs. N ; ††p<0.01 souris HIF-1 α ^{+/-} vs. WT.

Le renouvellement des mitochondries a également été étudié avec la mitophagie et plus globalement avec l'autophagie. Chez les souris WT, l'HI diminue l'expression de p62 (HI : 0,79 \pm 0,04 *fold increase* vs. WTN, figure 29A), et augmente la quantité des protéines BNIP3, et Parkin (BNIP3 : 1,3 \pm 0,09, Parkin : 1,4 \pm 0,08, *fold increase* vs. WTN, figure 29D, E), sans modifications significatives de Beclin1 et du rapport LC3II/I (figure 29B, C). Ces effets de l'HI sont abolis chez les souris HIF-1 α ^{+/-} (figure 29).

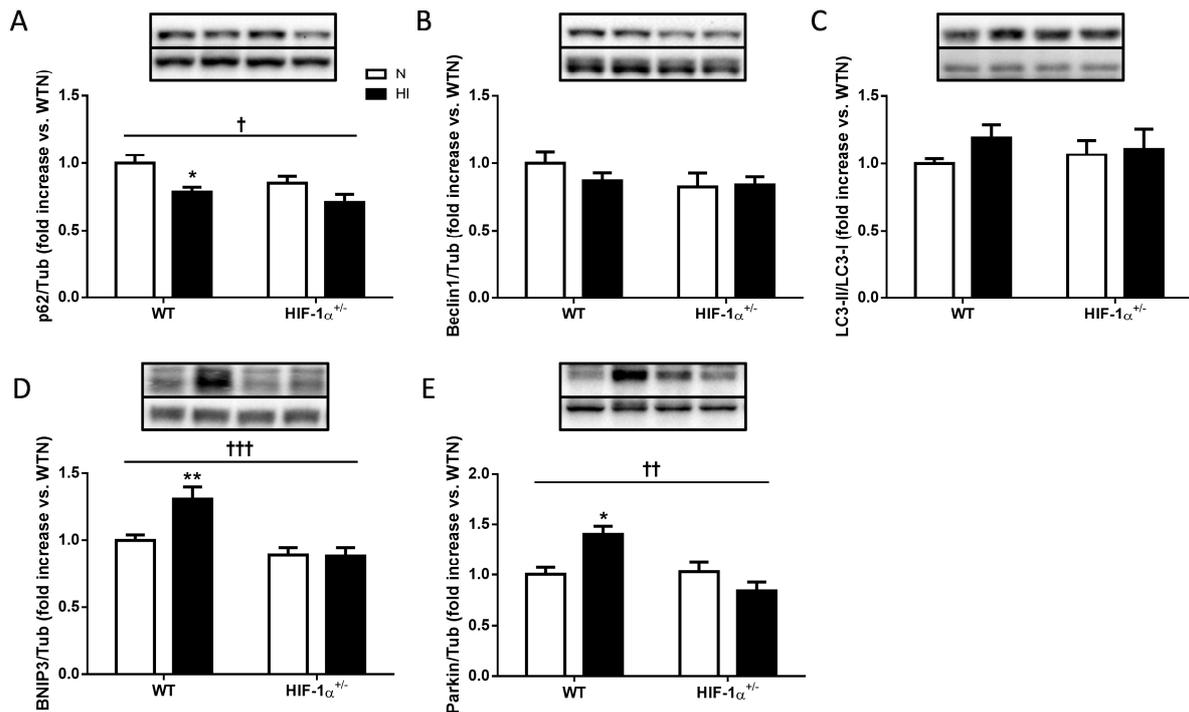


Figure 29: HIF-1 est impliqué dans l'activation de la mitophagie induite par l'hypoxie intermittente (HI) chronique. Sur des extraits protéiques de cœur de souris *wild-type* (WT) ou HIF-1 $\alpha^{+/-}$ exposées à 21 jours d'HI ou de normoxie (N), la mitophagie est évaluée par Western blot avec les marqueurs p62 (A), Beclin1 (B), LC3II/LC3I (C), BNIP3 (D), Parkin (E), rapporté à la tubuline. Les valeurs sont exprimées en moyenne par rapport au groupe WTN, \pm SEM (n=5-6). *p<0.05, **p<0.01 HI vs. N ; † p<0.05, ††p<0.01, †††p<0.001 souris HIF-1 $\alpha^{+/-}$ vs. WT.

Par conséquent, l'HI diminue la respiration et la production d'ERO mitochondriale, mais les activités des complexes I et II sont augmentées. Ces résultats suggèrent que la mitochondrie tente d'augmenter le fonctionnement de sa chaîne respiratoire sans s'y parvenir. L'apport en substrats pourrait donc être insuffisant. L'un des régulateurs majeurs de l'apport en substrat est l'AMPK. Nos résultats nous ont poussés à aller évaluer cette protéine au niveau myocardique, qui avait déjà été quantifié dans le muscle au sein du laboratoire.

c. Activation de l'AMPK et effet bénéfique de la metformine

Au niveau de la régulation de l'apport de substrat mitochondrial, chez les souris WT, l'HI diminue la phosphorylation de l'AMPK (HI : $0,80 \pm 0,06$ fold increase vs. WTN, figure 30A), mais la phosphorylation d'ACC n'est pas modifiée significativement (figure 31B). La délétion partielle de HIF-1 α empêche l'effet de l'HI sur la phosphorylation d'AMPK. De plus, le traitement avec la metformine, un activateur de l'AMPK, pendant l'HI, diminue la taille d'infarctus induite par l'HI ($32,0 \pm 4,0$ vs. $54,1 \pm 3,4$ % dans les groupes MetHI et VehHI, respectivement, figure 30C). La metformine prévient l'effet de l'HI sur la fusion mitochondriale et la mitophagie, à travers l'expression de Mfn2 et p62, BNIP3, Parkin (Mfn2 : $1,2 \pm 0,09$ vs. $0,84 \pm 0,04$, p62 : $0,70 \pm 0,07$ vs. $0,79 \pm 0,04$, BNIP3 : $0,86 \pm 0,04$ vs. $1,3 \pm 0,09$, Parkin : $0,83 \pm 0,26$ vs. $1,4 \pm 0,08$, fold increase vs. WTN, dans les groupes MetHI et VehHI, respectivement) (figure 31A-B, 32A-C).

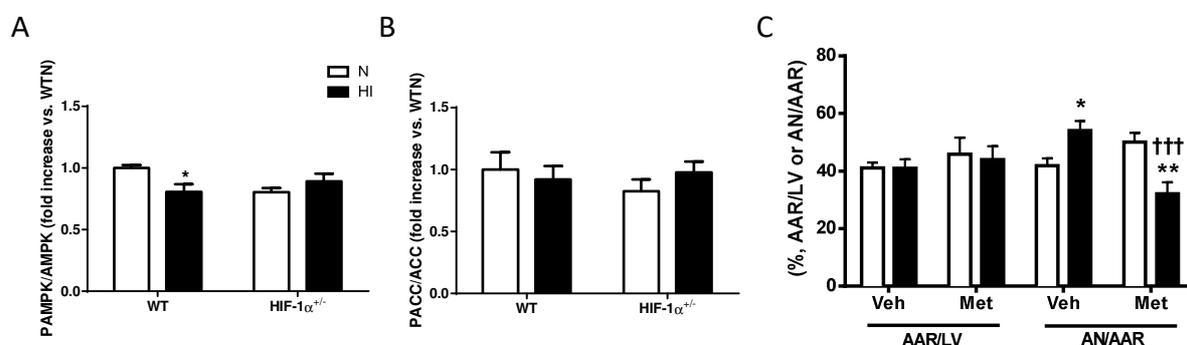


Figure 30 : HIF-1 est impliqué dans la diminution d'activité de l'AMPK induite par l'hypoxie intermittente (HI) chronique, et son activation par la metformine, protège des lésions myocardiques induite par l'HI. Sur des extraits protéiques de cœur de souris *wild-type* (WT) ou HIF-1 α ^{+/-} exposées à 21 jours d'HI ou de normoxie (N), les activités de l'AMPK (A) et de l'ACC (B) ont été mesurées par Western blot avec le rapport de la quantité phosphorylation et totale (n=5-6). Sur des souris *wild-type* (WT) traitées à la metformine (Met, 300 mg.kg⁻¹) ou le véhicule (Veh, CMC-Na 0,1 %) et exposées 21 jours à l'hypoxie intermittente (HI) ou à la normoxie (N), la taille d'infarctus a été mesurée par colorimétrie et planimétrie, suite à un protocole d'ischémie (45 min) et de reperfusion (90 min) *in vivo*. zone nécrosée (AN), zone à risque (AAR), ventricule gauche (LV) (n=8-11). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. *p<0.05, **p<0.01 HI vs. N ; †††p<0.001 souris Met vs. Veh.

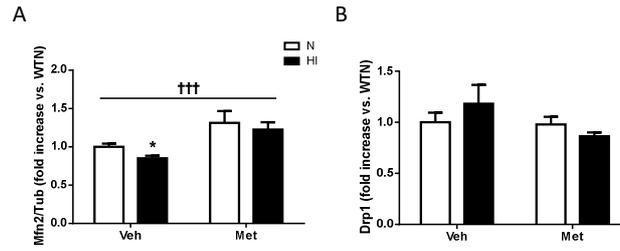


Figure 31 : La metformine prévient les effets de l'hypoxie intermittente (HI) chronique sur la dynamique mitochondriale. Sur des extraits protéiques de cœur de souris *wild-type* (WT) traitées à la metformine (Met, 300 mg.kg⁻¹) ou le véhicule (Veh, CMC-Na 0,1 %) et exposées à 21 jours d'HI ou de normoxie (N), la dynamique est évaluée par Western blot avec les marqueurs Mfn2 (A) et Drp1 (B) rapporté à la tubuline. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (n=3-6). *p<0.05 HI vs. N ; †p<0.05, ††p<0.01 souris Met vs. Veh.

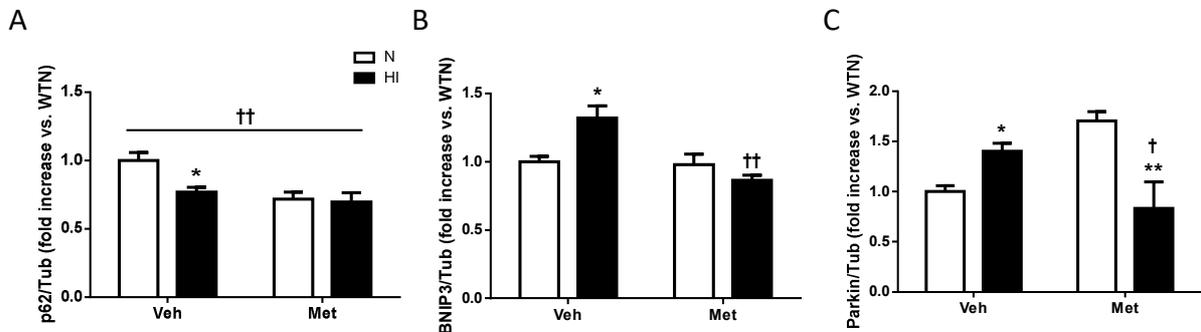


Figure 32 : La metformine prévient les effets de l'hypoxie intermittente (HI) chronique sur la mitophagie. Sur des extraits protéiques de cœur de souris *wild-type* (WT) traitées à la metformine (Met, 300 mg.kg⁻¹) ou le véhicule (Veh, CMC-Na 0,1 %) et exposées à 21 jours d'HI ou de normoxie (N), la mitophagie est évaluée par Western blot avec les marqueurs p62 (A), BNIP3 (B), Parkin (C), rapporté à la tubuline. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (n=3-6). *p<0.05 HI vs. N ; †p<0.05, ††p<0.01 souris Met vs. Veh.

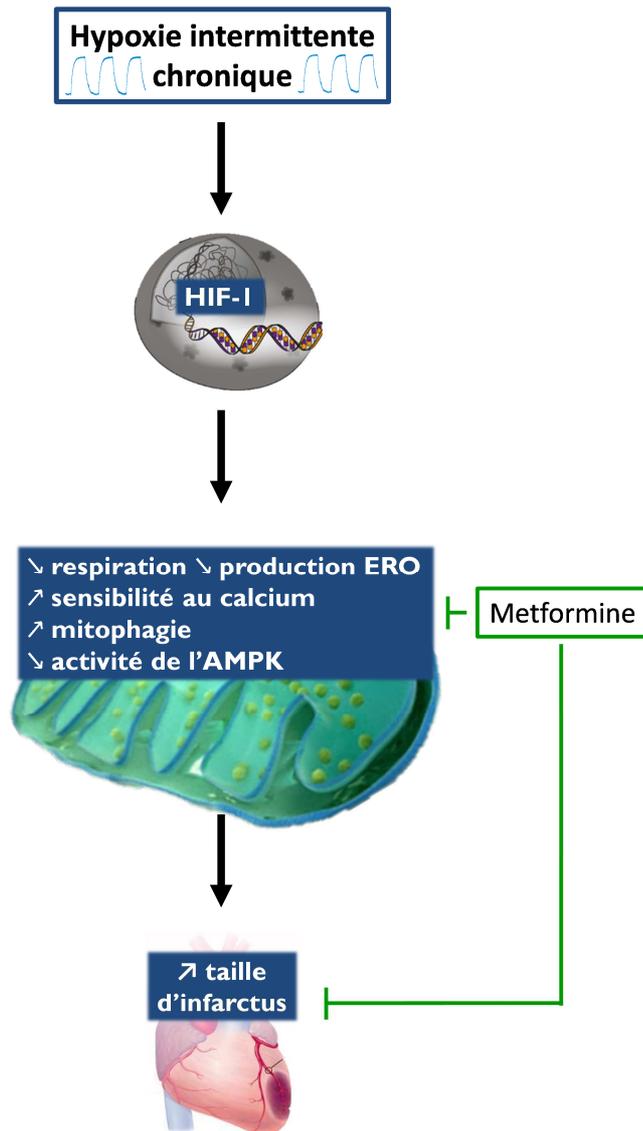


Figure 33 : Schéma de conclusion de l'étude 2 illustrant le rôle de HIF-1 dans les altérations mitochondriales induites par l'HI chronique.

3. Etude 3 :

Rôle de HIF-1 dans les mécanismes d'adaptation délétères induits par l'HI chronique. Effets d'un inhibiteur de l'activité de HIF-1, la curcumine.

Les traitements ciblant les principaux mécanismes délétères du syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS), que sont l'activation sympathique, l'inflammation et le stress oxydant, n'ont pas mis en évidence une amélioration des pathologies associées au SAOS. Même si différentes études montrent un lien entre l'*hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1) et ces mécanismes, il apparaît encore aujourd'hui difficile d'élucider clairement le cheminement qui mène aux conséquences délétères de l'hypoxie intermittente (HI) chronique. De plus, à travers les 3 précédentes études, nous avons pu également voir que HIF-1 est impliqué dans « deux nouveaux mécanismes » myocardiques de l'HI : le stress du réticulum endoplasmique (RE) et les altérations mitochondriales.

L'objectif de cette étude est de montrer que HIF-1 joue un rôle central dans la réponse à l'HI, en amont de l'activation sympathique, l'inflammation, le stress oxydant, le stress du RE, et les altérations mitochondriales.

Les souris Swiss/SV129 ont été exposées à 21 jours d'HI ou de normoxie (N) et traitées avec la curcumine (100 mg/kg/jr, gavage), un inhibiteur pharmacologique de l'activation de HIF-1, ou le véhicule (CMC-Na 0,1%). Sur ces souris, l'expression myocardique de HIF-1, les marqueurs clés des mécanismes de l'HI et la taille d'infarctus suite à une ischémie-reperfusion *in vivo* ont été mesurées.

La curcumine prévient l'aggravation de la taille d'infarctus, induite par l'HI. De plus, la curcumine rétablit les augmentations de l'expression de HIF-1, de production d'anions superoxydes, de l'expression de NF-κB, Grp78 et CHOP, induites par l'HI.

En conclusion, l'activation chronique de HIF-1 est essentielle pour les mécanismes d'adaptations à l'HI, et pourrait représenter une potentielle cible thérapeutique pour prévenir les dommages myocardiques chez les patients SAOS. Cependant il reste des expérimentations complémentaires à réaliser pour ces mécanismes, ainsi que pour l'activation sympathique et les altérations mitochondriales.

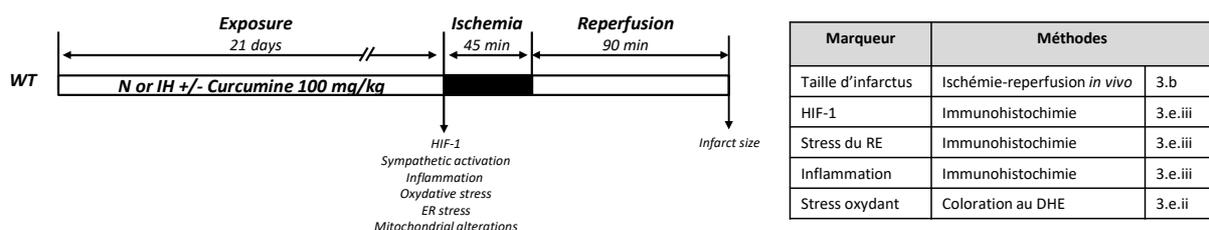


Figure 34 : Design expérimental et méthodologie de l'étude 3.

a. Curcumine et taille de l'infarctus

L'HI augmente la taille d'infarctus dans le groupe traité au véhicule (54,1±3,4 vs. 45,4±4,0 % dans les groupes HI et N, respectivement, figure 35), alors que le gavage avec la curcumine durant l'exposition abolit l'augmentation des lésions myocardiques induite par l'HI (45,1±4,0 vs. 54,1±3,4 %, dans les groupes CurcHI et VehHI, respectivement, figure 35).

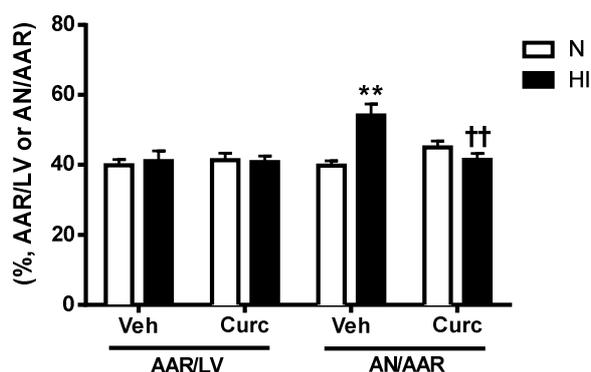


Figure 35 : La curcumine prévient l'augmentation de la taille d'infarctus induite par l'hypoxie intermittente (HI) chronique. Sur des souris *wild-type* (WT) traitées avec de la curcumine (Curc, 100 mg.kg⁻¹) ou le véhicule (CMC-Na 0,1 %) et exposées à 21 jours d'HI ou de normoxie (N), la taille d'infarctus a été mesurée par colorimétrie et planimétrie, suite à un protocole d'ischémie (45 min) et de reperfusion (90 min) *in vivo*. zone nécrosée (AN), zone à risque (AAR), ventricule gauche (LV). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (n=9-11). **p<0.01 vs. le groupe N correspondant ; ††p<0.01 souris Curc vs. Veh.

b. Curcumine et mécanismes délétères de l'HI

Chez les souris WT, l'HI augmente l'expression de HIF-1 (4,0±1,0 vs. 2,14±0,45 %, dans les groupes HI et N, respectivement, figure 36A), la production de stress oxydant (5,1±0,9 vs. 2,1±0,3 %, dans les groupes HI et N, respectivement, figure 36B), l'expression de NF-κB (4,7±1,1 vs. 2,3±0,5 %, dans les groupes HI et N, respectivement, figure 36C), un marqueur de l'inflammation, et l'expression de Grp78 et CHOP (Grp78 : 5,3±1,7 vs. 1,6±0,6 %, CHOP : 4,5±0,6 vs. 0,7±0,4 %, dans les groupes HI et N, respectivement, figure 36D-E), deux marqueurs clés du stress du RE. Le traitement à la curcumine prévient l'augmentation de HIF-1, la production d'anions superoxyde, l'augmentation de l'expression de NF-κB, de Grp78 et CHOP (HIF-1 : 0,38±0,4 vs. 4,0±1,0 %, DHE : 1,3±0,3 vs. 5,1±0,9 %, NF-κB : 0,43±0,3

vs. $4,7 \pm 1,1$ %, Grp78 : $0,1 \pm 0,1$ vs. $5,3 \pm 1,7$ %, CHOP : $1,8 \pm 1,2$ vs. $4,5 \pm 0,6$ %, dans les groupes CurcHI et VehHI, respectivement) (figure 36).

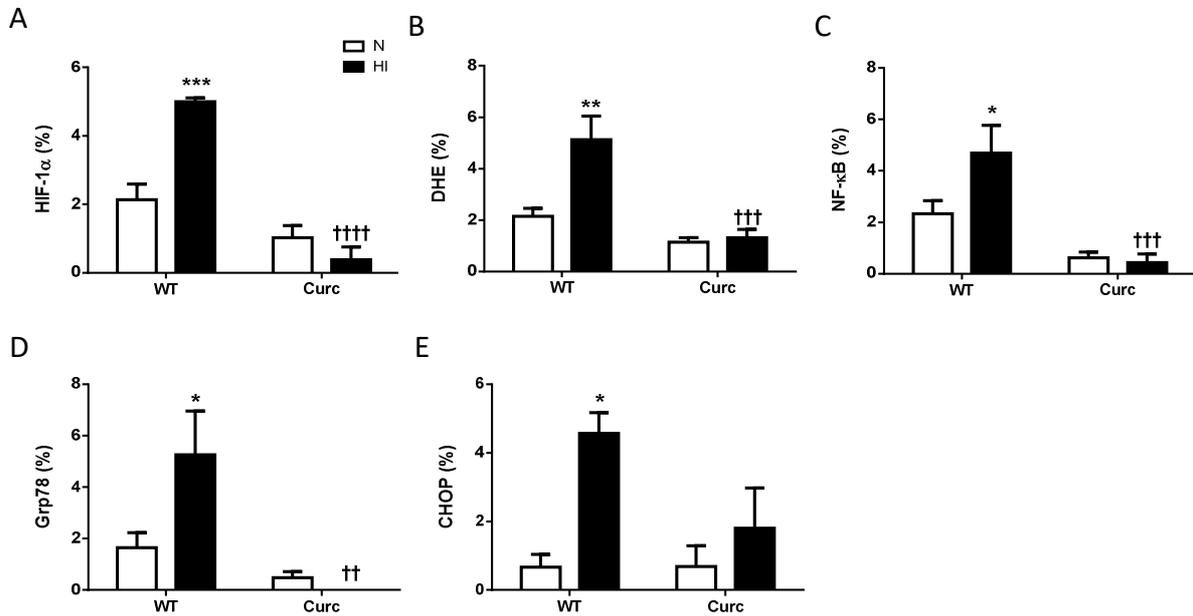


Figure 36 : La curcumine prévient les augmentations de HIF-1 et des marqueurs du stress oxydant, du stress du RE, et de l'inflammation, induites par l'hypoxie intermittente (HI) chronique. Sur coupes de cœur des souris *wild-type* (WT) traitées ou pas avec de la curcumine (Curc, 100 mg.kg^{-1}) et exposées à 21 jours d'HI ou de normoxie (N), HIF-1 (A), NF- κ B (C), Grp78 (D) et CHOP (E) ont été quantifié par immunohistochimie, ainsi que la production d'anions superoxydes (B) par une coloration au DHE. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (n=9-11). **p<0.01, *p<0.001 vs. le groupe N correspondant ; ††p<0.01, †††p<0.001 souris Curc vs. WT.**

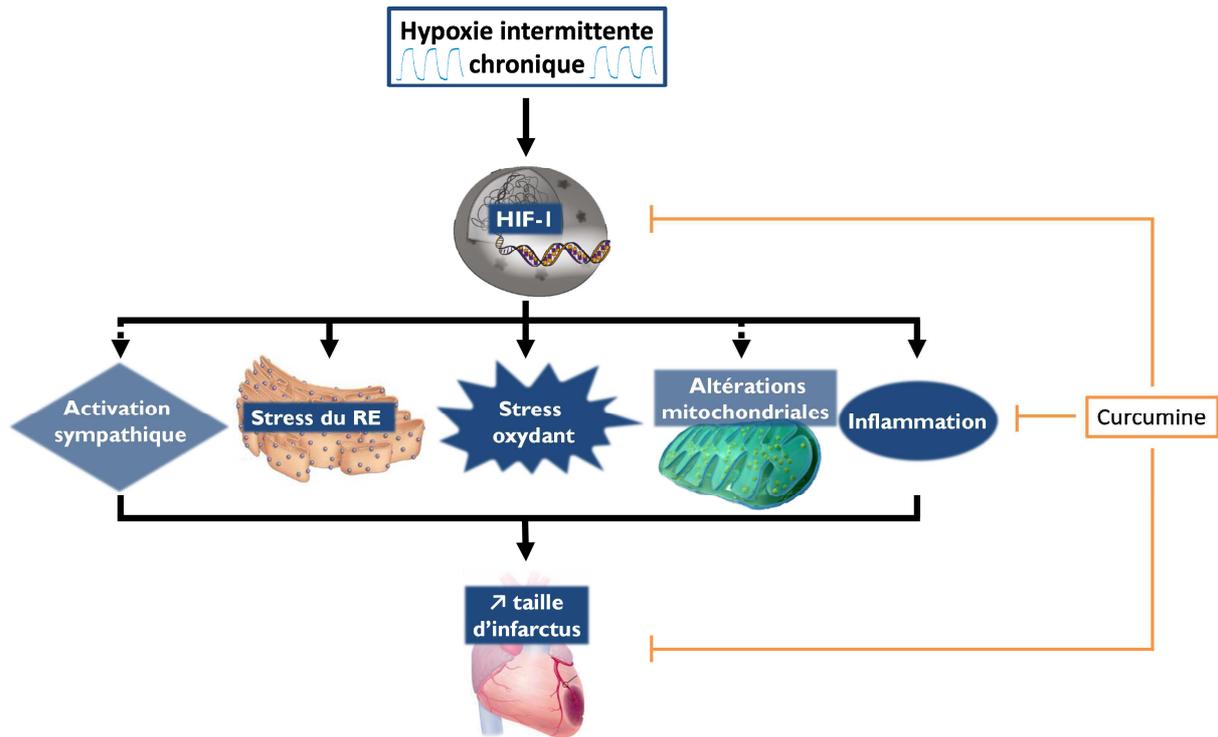


Figure 37 : Schéma de conclusion de l'étude 3 préliminaire illustrant le rôle de HIF-1 dans les mécanismes d'adaptation délétères induits par l'HI chronique et les effets d'un inhibiteur de l'activité de HIF-1, la curcumine.

DISCUSSION

Les maladies cardiovasculaires restent la première cause mondiale de morbidité et mortalité. Parmi elles, l'infarctus du myocarde (IM) dont l'incidence est souvent associée à d'autres pathologies, telles que le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS). Le SAOS est d'ailleurs aujourd'hui considéré comme un facteur de risque indépendant de la survenue d'un infarctus [4]. En effet, la présence de cette maladie peut altérer le fonctionnement des cardiomyocytes, expliquant l'augmentation de la sévérité et du nombre d'évènements cardiovasculaires chez les patients apnéiques [231]. Bien que ces dernières années, la connaissance de la physiopathologie du SAOS s'est améliorée, les traitements, visant les mécanismes principaux découverts jusqu'ici, n'ont pas montré d'amélioration de la maladie. De plus, peu de ces traitements ont été testés dans le contexte de l'augmentation de la susceptibilité du myocarde à l'ischémie-reperfusion. Grace à des modèles expérimentaux, mes travaux ont mis en évidence l'implication de nouveaux acteurs de la réponse à l'hypoxie intermittente (HI), tels qu'un stress du réticulum endoplasmique (RE), une perturbation de l'homéostasie calcique sans doute associée à une altération des *mitochondria-associated ER membranes* (MAM), ainsi que des atteintes mitochondriales. Surtout l'ensemble de ce travail souligne l'importance de l'activation myocardique de l'*hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1), comme conséquence délétère de l'HI, responsable de la vulnérabilité accrue du myocarde à l'ischémie-reperfusion.

1. Axe « HIF-1 - stress du RE » en HI chronique

a. HI, stress du RE

En premier, notre intérêt s'est porté sur le stress du RE. D'une part, le stress du RE est impliqué dans de nombreuses pathologies associées au SAOS, telles que l'athérosclérose [340], l'obésité ou le diabète [341]. D'autre part, comme l'HI, le stress du RE a un rôle ambivalent dans la réponse à l'IM. En effet, alors que 4h d'HI est cardioprotecteur en termes de taille d'infarctus [232], l'exposition chronique d'animaux à l'HI augmente la susceptibilité du myocarde à l'ischémie-reperfusion [198, 233]. De la même manière, pour le stress du RE, l'utilisation de nombreux modèles génétiques a permis de mettre en évidence un rôle cardioprotecteur du stress du RE dans la réponse à l'ischémie-reperfusion, à travers l'activation de certaines protéines de la réponse UPR, telles que Grp78 [61], ATF6 [64] et XBP1s [58]. A l'opposé, grâce à l'activation pharmacologique du stress du RE, celui-ci a été montré pour être délétère en termes de taille d'infarctus [69].

Dans l'étude 1, nous montrons que 21 jours d'HI entraînent un stress du RE myocardique, caractérisé par une augmentation de l'expression de Grp78, de la phosphorylation de PERK, d'eIF2 α , de l'expression d'ATF4 et de CHOP, alors que les expressions d'ATF6 ou de XBP1s n'étaient pas modifiées. Donc, l'HI induit un stress du RE délétère avec l'activation de la voie pro-apoptotique PERK-ATF4-CHOP, au détriment de l'activation des voies de sauvetage du RE comprenant les protéines ATF6 et XBP1s, permettant de réduire la synthèse protéique, ou d'activer celle responsable de la réparation ou de la dégradation des protéines mal-conformées. Ceci est en accord avec deux précédentes études du laboratoire montrant un stress du RE myocardique après une exposition de 14 jours à l'HI chez des souris [313] et 21 jours d'HI chez des rats [342], ainsi qu'avec la littérature, puisque assez récemment, l'induction d'un stress du RE par l'HI a aussi été montré dans divers organes : le cœur [308, 309, 343], les vaisseaux [344], le cerveau [310-312, 345, 346], le foie [347], le tissu adipeux [348], et le rein [349].

Donc, l'HI provoque un stress du RE myocardique.

a. HI, HIF-1, stress du RE

Par ailleurs, nous avons déjà montré que l'HI est responsable d'une activation myocardique chronique et persistante de HIF-1 [313]. Ce facteur de transcription est aussi délétère en termes de taille de l'infarctus dans le contexte de l'HI chronique suivie d'une ischémie-reperfusion. Par exemple, HIF-1, en se fixant sur le *hypoxia response element* (HRE) du gène de l'endothéline 1 (ET-1), active l'expression de l'ET-1, qui elle-même est responsable de l'augmentation de la taille d'infarctus induite par l'HI [198]. De plus, d'après la littérature, HIF-1 pourrait cibler des gènes de réponse au stress du RE, notamment par sa fixation sur un HRE de CHOP [317]. Ainsi, dans l'étude 1, nous avons étudié si HIF-1 était impliqué dans l'activation du stress du RE en HI.

Chez les souris HIF-1 $\alpha^{+/-}$, excepté pour les expressions de Grp78 et ATF4, tous les autres marqueurs du stress du RE ne sont plus surexprimés en réponse à l'HI (étude 1), traduisant que l'HI provoque donc un stress du RE délétère dépendant de HIF-1 (figure 39A). La protéine Grp78 est la protéine senseur et déclencheur du stress du RE. Pour autant, l'augmentation ou la diminution de l'expression de cette protéine n'est pas forcément le reflet de la présence ou l'absence du stress du RE, respectivement. En effet, il a été montré que l'inhibition du stress du RE par la surexpression de Grp78 protège le myocarde des lésions d'une ischémie-reperfusion [61, 350], et que l'activation d'un stress du RE délétère est associée à une réduction de l'expression de la Grp78 [65]. Ainsi, le maintien de son expression chez les souris HIF-1 $\alpha^{+/-}$ exposées à l'HI n'est pas en désaccord avec le rôle de HIF-1 dans l'induction du stress du RE. Par ailleurs, comme pour les autres marqueurs de la voie PERK-ATF4-CHOP, nous nous attendions à une diminution de l'expression d'ATF4 chez les souris HIF-1 $\alpha^{+/-}$ soumises à l'HI. Cependant, la régulation d'ATF4 en hypoxie peut impliquer d'autres voies de signalisation que le stress du RE. En effet, la protéine p300 est capable d'inhiber la dégradation d'ATF4 [351], or l'activation de cette protéine est augmentée en HI [293], suggérant que la dégradation d'ATF4 pourrait être inhibée par p300 en HI, expliquant ainsi les résultats obtenus chez les souris HIF-1 $\alpha^{+/-}$.

Donc, HIF-1 est impliqué dans l'induction du stress du RE myocardique par l'HI (figure 39A).

b. HI, HIF-1, stress du RE, taille de l'infarctus

Dans l'étude 1, la délétion partielle de HIF-1 α abolit l'augmentation de la taille d'infarctus induite par l'HI, reflétant le rôle délétère de HIF-1 dans l'augmentation de la taille d'infarctus (étude 1) (figure 39). Nous avons déjà montré que l'inhibition du stress du RE par le traitement au TUDCA pendant l'exposition abolit l'augmentation de la taille d'infarctus induite par l'HI [313]. Ceci met en évidence que le stress du RE généré lors de l'HI participe à l'augmentation de la taille de l'infarctus après l'ischémie-reperfusion, chez les animaux hypoxiques. Dans le contexte de l'HI, l'effet délétère du stress du RE a aussi été montré dans le cœur, avec d'autres traitements pharmacologique [308, 309, 343] ou avec l'exercice physique [342], puisque ces thérapeutiques ont montré que parallèlement à la diminution des lésions cellulaires suite à l'ischémie-reperfusion, l'expression des marqueurs pro-apoptotique de l'UPR était aussi réduite. En revanche, notre étude est la première à utiliser un inhibiteur direct du stress du RE [313].

Donc, l'HI induit une activation de HIF-1, responsable du stress du RE, et consécutivement de la susceptibilité accrue du myocarde à l'ischémie-reperfusion (figure 39A).

c. SAOS, HIF-1, stress du RE

L'activation de l'axe « HIF-1-stress du RE » a été confirmé sur un petit échantillon de biopsies d'appendice auriculaire droit de patients atteints d'apnées du sommeil et de maladies coronaires. En effet, chez les patients apnéiques, une augmentation de l'expression de HIF-1 α et de CHOP, et une tendance à l'augmentation de l'expression de Grp78 sont observées au niveau myocardique (étude 1). De plus, nous avons montré qu'indépendamment des facteurs confondants, l'activation de HIF-1 est corrélée positivement à l'index d'apnées-hypopnées (IAH), suggérant l'implication majeure de ce facteur de transcription dans cette pathologie. Ces résultats sont en accord avec un récent article de Lu et al, montrant une augmentation de l'expression de HIF-1 α sérique chez les patients atteints d'un SAOS sévère par rapport au groupe contrôle ou SAOS modéré, ainsi qu'une corrélation entre l'expression

de HIF-1 et l'IAH [301].

Donc, l'activation myocardique de HIF-1 est aussi présente chez les patients apnéiques atteints de maladie coronaire.

D'un point de vue thérapeutique, en ce qui concerne le stress du RE, certains inhibiteurs comme le TUDCA ont été testés chez l'homme dans le cadre de pathologies hépatiques [352] et ophtalmiques [353]. Même si cet inhibiteur semble bien toléré, il n'a encore pas été utilisé en clinique dans le cadre de l'ischémie-reperfusion seule [56]. Néanmoins, pour mon travail de thèse, nous avons plutôt choisi d'améliorer la compréhension du rôle délétère de HIF-1 dans les mécanismes induits par l'HI et ce, afin d'éventuellement proposer de nouvelles cibles thérapeutiques.

2. Rôle de HIF-1 dans l'altération des MAM et de l'homéostasie calcique induite par l'HI chronique

a. HI, MAM, homéostasie calcique

Le stress du RE est connu pour être activé par une altération de l'homéostasie calcique [40]. Les MAM sont un lieu d'échanges calciques de haute intensité entre le RE et la mitochondrie. De ce fait, l'état du RE régule ces points de contact. Par exemple, lors de la phase précoce du stress du RE, les points de contacts RE-mitochondries sont renforcés [74]. De plus, les MAM ont récemment été montrés comme impliqués dans la réponse à l'ischémie-reperfusion [95, 97]. L'HI induisant un stress du RE délétère, responsable de l'augmentation de la taille d'infarctus, nous nous sommes intéressés à l'intégrité des MAM en HI. Pour cela, comme décrit dans d'autres études, nous avons enregistré les flux calciques entre le RE, la mitochondrie et le cytosol, après une stimulation à l'histamine [89, 95].

Deux-cent-cinquante secondes après la vidange du RE, l'HI induit une rapide accumulation calcique dans le RE et le cytosol par rapport à la condition normoxique, témoignant d'une

altération de l'homéostasie calcique probablement à l'origine du stress du RE [40]. Par conséquent, ceci est susceptible d'expliquer l'augmentation de la taille d'infarctus, induite par l'HI. En revanche, bien qu'une surcharge de calcium mitochondrial aurait pu aisément expliquer la susceptibilité du myocarde à l'ischémie-reperfusion [354], nous ne l'avons pas observé après l'incubation de l'histamine.

Afin de mieux comprendre les altérations des échanges inter-organites, nous avons évalué l'intégrité des MAM et l'expression de régulateurs majeurs de l'homéostasie calcique.

Un des complexes des MAM connu pour réguler les échanges calciques est composé du canal IP3R1 de la membrane du réticulum endoplasmique, du canal VDAC1 de la membrane externe de la mitochondrie, et de la protéine cytosolique Grp75, reliant la protéine VDAC1 et IP3R1 [77]. Récemment, la protéine mitochondriale CypD a été montrée comme appartenant à ce complexe [95]. Dans l'étude 1, l'HI augmente les interactions entre Grp75/IP3R1 et Grp75/VDAC1, signifiant que la protéine cytosolique est proche de ses partenaires directs. Cependant, l'HI diminue les interactions entre IP3R1/VDAC1 et Grp75/CypD, reflétant un éloignement entre le RE et la mitochondrie.

En effet, nous avons observé une diminution de l'expression de la Grp75, la protéine pont entre le RE et la mitochondrie, ce qui peut expliquer la perte d'intégrité des MAM. De plus, il a été montré, dans le vieillissement cardiaque et l'hypertrophie cardiaque, qu'un éloignement du RE et de la mitochondrie est à l'origine d'altérations du métabolisme mitochondrial et de l'homéostasie calcique, mettant en évidence l'importance de l'intégrité des MAM [355, 356].

Les expressions de VDAC1 et IP3R1 sont quant à elles, augmentées en HI. Nous pouvons donc penser que ces augmentations de l'expression des autres acteurs des MAM en HI seraient potentiellement une compensation pour rétablir les points de contacts RE-mitochondrie, essentiels au fonctionnement cardiaque.

Par ailleurs, la diminution des interactions entre Grp75 et CypD témoigne d'une absence de la CypD dans les MAM [95], ce qui participe probablement à l'absence de modification du calcium au niveau de la mitochondrie en HI.

Donc, l'HI entraîne une perturbation des flux calciques inter-organites et une altération des MAM, susceptible d'expliquer l'augmentation de la taille d'infarctus.

A l'interface des MAM et des acteurs classiques de l'homéostasie calcique, on trouve la CypD. De la même manière que pour les autres composants des MAM, l'expression de CypD est augmentée après 21 jours d'HI (étude 1). Cette protéine étant aussi connue pour son rôle dans la réponse à l'ischémie-reperfusion, en induisant l'ouverture du PTPm, ce résultat peut à lui seul expliquer l'augmentation de la mort cellulaire après une ischémie-reperfusion [31]. Cette hypothèse est en accord avec la diminution la capacité de rétention calcique (CRC) des mitochondries induite par l'HI, qui est accentuée en présence de la CsA (inhibiteur de la CypD), reflétant une augmentation de la sensibilité au calcium du PTPm (étude 1).

En ce qui concerne les autres acteurs de l'homéostasie calcique, l'HI augmente la phosphorylation du phospholamban et l'expression de SERCA (étude 1). Ces deux modifications traduisent une activité accrue de la pompe SERCA, pouvant expliquer la surcharge du RE en calcium, suite à sa vidange, dans les cardiomyocytes isolés de souris soumises à l'HI. L'expression du NCX1 est aussi augmentée en HI (étude 1), ce qui avait déjà été observée chez des souris exposées 8 sem à l'HI [239]. Or, la surexpression de NCX1 est délétère pour le myocarde [357]. Ainsi, un fonctionnement inverse du NCX1 [357] pourrait participer à la surcharge calcique cytosolique après la vidange du RE. De plus, l'expression du MCU, permettant le transfert de calcium de l'espace inter-membranaire vers la matrice mitochondriale, n'est pas modifiée par l'HI. Ceci est en accord avec l'absence de modification du calcium au niveau de la mitochondrie.

Donc, l'HI engendre une perturbation des flux calciques inter-organites, des MAM, et des autres acteurs majeurs de l'homéostasie calcique, susceptible d'expliquer la vulnérabilité myocardique à l'ischémie-reperfusion.

b. HI, HIF-1, MAM, homéostasie calcique

Pour ce qui est de HIF-1, la délétion partielle de la sous-unité α abolit la plupart des effets de l'HI sur les flux calciques et l'intégrité des MAM (figure 39B). Le rôle de HIF-1 dans la régulation de l'homéostasie calcique est encore peu étudié. Néanmoins, de récents articles montrent qu'en hypoxie, Grp75 interagit avec HIF-1 α pour induire la localisation du complexe à la membrane mitochondriale externe, ce qui entrainerait la coupure de VDAC1 puis son activation [358]. Le lien entre HIF-1 et la forme tronquée de VDAC1 a d'ailleurs déjà été montré dans le contexte de cellules cancéreuses résistantes à l'apoptose [315]. En revanche, notre étude serait la première à mettre en évidence un lien entre HIF-1 et les expressions de IP3R1 et CypD.

A propos des autres acteurs de l'homéostasie calcique, bien que HIF-1 ait déjà été montré pour réguler la transcription du gène codant pour SERCA [316], dans notre contexte d'HI, cela ne semble pas être le cas, puisque la surexpression de SERCA est aussi présente chez les souris HIF-1 α ^{+/-} hypoxiques. Par contre, la délétion partielle de HIF-1 α abolit les effets de l'HI sur la phosphorylation du phospholamban et sur l'expression de NCX1. Ceci est en accord avec la littérature puisque la stabilisation de HIF-1 α augmente la phosphorylation du phospholamban [359] et que HIF-1 peut se fixer sur le HRE dans le promoteur du gène codant pour NCX1 [314, 360].

Donc, l'HI induit une activation de HIF-1, contribuant à la perte d'intégrité des MAM, associée à des perturbations des flux calciques inter-organites et de l'expression des acteurs majeurs de l'homéostasie calcique. Ceci peut expliquer le rôle de HIF-1 dans l'induction du stress du RE par l'HI et par conséquent dans l'augmentation de la susceptibilité du myocarde à l'ischémie-reperfusion (figure 39A-B).

Il convient de préciser que nous avons mesuré des modifications relatives des charges de calcium intra-organites (assez tardivement après l'incubation de l'histamine). Nous pourrions par la suite utiliser des sondes ratiométriques, a minima, pour attester d'une surcharge calcique intra-cytosolique qui pourrait expliquer les atteints myocardiques

induites par l'HI chronique.

Pour continuer à comprendre l'implication de HIF-1 dans les conséquences de l'HI, nous avons continué à étudier les conséquences de son activation et ce, au niveau de la mitochondrie.

3. Rôle de HIF-1 dans la dysfonction mitochondriale et la mitophagie induites par l'HI chronique

a. HI, fonction mitochondriale

Illustré notamment à travers les MAM, un lien étroit existe entre le RE et la mitochondrie, donc l'altération du fonctionnement de l'un, a des conséquences sur le fonctionnement de l'autre. De ce fait après avoir étudié le stress du RE, nous nous sommes intéressés à la mitochondrie. L'étude 2 révèle que l'HI diminue la respiration mitochondriale à travers tous les complexes. Une seule étude a aussi montré une diminution de la consommation en oxygène dans le cerveau après 14 jours d'HI [319]. Pourtant, l'hypoxie est bien connue pour réduire la respiration mitochondriale, et ainsi adapter le fonctionnement de la chaîne respiratoire à la diminution d'O₂ [361].

Ensuite, l'HI diminue la production myocardique d'ERO mitochondriales lorsque le complexe II est alimenté en substrat. Cette différence est abolie par l'ajout de roténone (un inhibiteur du complexe I), suggérant que l'HI altère le flux reverse des électrons vers le complexe I. En effet, au cours de l'activité de la chaîne respiratoire, la production d'anions O₂⁻ a lieu essentiellement au niveau du complexe I, via le flux reverse des électrons et au niveau du complexe III [101, 102]. Ces diminutions de respiration et production d'ERO mitochondriales sont en accord avec un ralentissement du fonctionnement de la mitochondrie, observé lors de la mesure du potentiel de membrane. En effet, lors de cette expérience, après l'ajout d'ADP, le temps de retour au potentiel de membrane est plus long en HI qu'en normoxie.

Donc, l'HI diminue la respiration et la production d'ERO mitochondriales.

b. HI, HIF-1, fonction mitochondriale

Chez les souris HIF-1 $\alpha^{+/-}$, la respiration et la production d'ERO mitochondriales ne sont pas modifiées par l'HI (étude 2). En hypoxie continue, Zhang et al. ont en effet démontré que les diminutions de respiration et de production d'ERO mitochondriales étaient dépendantes de HIF-1 [145, 330]. Ainsi, HIF-1 serait aussi impliquée dans la réduction de la respiration et la production d'ERO mitochondriales en HI (figure 39C).

Donc, HIF-1 est impliqué dans la diminution de respiration et production d'ERO mitochondriales induite par l'HI (figure 39C).

En revanche, il apparaît intéressant de discuter ces résultats, car l'HI est bien connue pour produire des ERO [320, 362, 363]. D'ailleurs, dans le myocarde, nous avons observé une augmentation la production d'ERO tissulaire en HI, uniquement chez les souris WT (figure 39). De plus, une étude avec un modèle semblable d'HI (1,5 % pendant 15 s puis 21 % pendant 5 min) a mis en évidence une augmentation de la production d'ERO mitochondriale dans le cerveau, chez des rats exposés 10 jours à l'HI [318]. Néanmoins, il a été suggéré qu'une réduction de production d'ERO mitochondriale est nécessaire en hypoxie continue quand celle-ci est prolongée dans le temps, afin de permettre la survie cellulaire [145]. Ainsi notre stimulus étant plus long que l'étude précédente, la diminution de production d'ERO mitochondriale pourrait être une adaptation à la chronicité de l'HI, pour réduire le stress oxydant tissulaire. Par ailleurs, la production d'ERO peut provenir du cytosol, produite par exemple, par la NADPH oxydase, dont l'expression myocardique est augmentée en HI [190, 265]. De plus, les défenses antioxydantes sont diminuées en HI [190, 364], ce qui peut aggraver le stress oxydant.

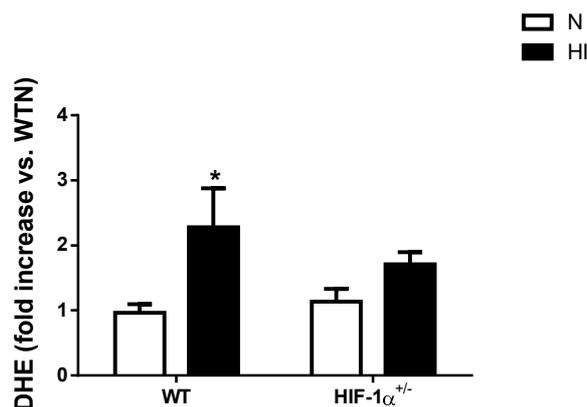


Figure 38 : HIF-1 est impliqué dans l'augmentation du stress oxydant induite par l'hypoxie intermittente (HI) chronique. Sur des coupes de cœur de souris wild-type (WT) ou HIF-1 α ^{+/-} exposées à 21 jours d'HI ou de normoxie (N), la production d'anions superoxydes (B) a été évaluée par une coloration au DHE. Les valeurs sont exprimées en moyenne par rapport au groupe WTN, \pm SEM (n=7-8). *p<0.05 vs. N.

c. HI, biogénèse et dynamique

Les mitochondries sont dotées d'une dynamique et d'un renouvellement mitochondrial, susceptible d'expliquer les modifications de la fonction mitochondriale [105, 107]. La biogénèse mitochondriale, dont l'évaluation a été réalisée à travers le marqueur clé PCG1- α [365], ne semble pas être altérée par l'HI (étude 2).

Pour ce qui est de la dynamique [109], l'acteur majeur de la fusion, à savoir OPA1 n'est pas modifié en HI, mais l'HI diminue l'expression de la Mfn2, suggérant peut être que l'HI limite la fusion mitochondriale (étude 2). La fusion mitochondriale sert à améliorer la synthèse d'ATP et à diminuer la production d'ERO. Il est aussi intéressant de noter que comme décrit en introduction, la Mfn2 a aussi un rôle dans les MAM [79]. Dans l'étude 1, nous avons vu que l'HI induit une perte d'intégrité des MAM. Ainsi la diminution de Mfn2 induite par l'HI pourrait aussi expliquer l'altération des MAM.

En revanche, l'HI tend à augmenter l'expression de Drp1 (étude 2), la protéine principale de la fission mitochondriale, qui pour mémoire permet de créer deux petites mitochondries à partir d'une, dont l'une est fonctionnelle, et l'autre, endommagée, est facilement dégradable par mitophagie [109]. En accord avec un récent article, l'exposition de 6 sem à l'HI chez le rat a montré une augmentation de la fission et une diminution de la fusion au niveau du myocarde, caractérisées par une augmentation du nombre de mitochondries

fragmentées, une diminution de l'expression de Mfn2 et une augmentation de Drp1 [366]. Cette altération de la dynamique mitochondriale contribuerait à une augmentation de la mort cellulaire, et consécutivement à un dysfonctionnement cardiaque [366]. Nous pouvons donc penser que les modifications de la dynamique pourraient contribuer à expliquer la dysfonction mitochondriale et la susceptibilité du myocarde à l'ischémie-reperfusion. En revanche, les modifications observées ne sont pas aussi soutenues que celles observées dans l'étude de Han et al.. Notre exposition n'est peut-être pas assez longue pour visualiser des modifications significatives de la dynamique mitochondriale. Dans les cardiomyocytes adultes, une double délétion cardiaque de Mfn1 et Mfn2 induit les premières modifications de la dynamique au bout de 16 jours [367], or notre stimulus étant moins délétère qu'une modification génétique, l'adaptation du cycle fusion/fission pourrait prendre plus de 21 jours en HI. A l'avenir, nous pourrions aussi nous intéresser à d'autres protéines de la fission, comme la protéine Fis1 ou l'état de phosphorylation de la protéine Drp1.

Donc, l'HI pourrait altérer la dynamique mitochondriale.

d. HI, HIF-1, dynamique

Même s'il est difficile de conclure précisément sur l'effet de l'HI dans la dynamique, chez les souris HIF-1 α ^{+/-}, l'HI n'a pas d'effet. Cela suggère que si l'étude de la dynamique est approfondie, HIF-1 pourrait être important pour ces adaptations à l'HI (figure 39C). Cette hypothèse est confortée par la mise en évidence que HIF-1 est responsable d'une augmentation de la fission mitochondriale en induisant la phosphorylation de Drp1, dans différents modèles d'activation de HIF-1 (hypoxie continue, exposition au chlorure de cobalt ou monocrotaline) [368]. En revanche, la relation entre HIF-1 et Mfn2 n'a pas encore été étudiée.

Donc, HIF-1 pourrait être impliqué dans les altérations éventuelles de la dynamique mitochondriale, induites par l'HI (figure 39C).

e. HI, mitophagie

Dans la continuité nous avons évalué, quelques marqueurs de l'autophagie, qui est un mécanisme complexe, mettant en jeu de nombreuses protéines [369]. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux protéines de l'autophagie, contribuant à l'induction de la mitophagie, une autophagie spécifique de la mitochondrie, telles que Beclin1 (une protéine initiatrice de l'autophagie), p62 (un marqueur du flux autophagique) et la conversion de LC3I en LC3II (un marqueur de la formation des autophagosomes). Ainsi, l'HI diminue l'expression de p62, alors que l'expression de Beclin1 et la conversion de LC3I en LC3II ne sont pas modifiées (étude 2). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que lors d'une hypoxie simulée (cobalt sur des myotubes C2C12), la diminution de p62 apparaît plus précocement que l'augmentation de la conversion LC3I en LC3II dans l'activation de l'autophagie [370]. Pour ce qui est de la mitophagie, l'HI augmente les expressions de Bnip3 et Parkin. Alors que Bnip3 a d'abord été découvert pour induire la mort cellulaire, il a été récemment mis en évidence que Bnip3 active la mitophagie, en interagissant avec LC3 [371]. De plus, cette mitophagie médiée par Bnip3 a été montrée pour induire une diminution de respiration et de production d'ERO mitochondriales en hypoxie continue [145], suggérant que la mitophagie permettrait d'adapter la fonction mitochondriale à l'HI. Par ailleurs, la protéine majeure dans l'induction de la mitophagie est Parkin. Quelques travaux rapportent un lien étroit entre Bnip3 et Parkin pour induire la mitophagie, avec l'implication essentielle ou facultative de Pink1 [372, 373]. Un article montre aussi que l'induction par Bnip3 de la mitophagie est dépendante de la présence d'une fission médiée par Drp1 et du recrutement de Parkin [147]. Ainsi, il pourrait être intéressant de déterminer l'implication de Pink1 ou Drp1 dans la mitophagie médiée par Bnip3 et Parkin en HI, via la quantification de l'expression de Pink1 ou l'utilisation d'un traitement inhibiteur de Drp1, la mdivi1.

Donc, l'HI induit une mitophagie médiée par Bnip3 et Parkin, susceptible d'expliquer la dysfonction mitochondriale.

f. HI, HIF-1, mitophagie

Par ailleurs, en hypoxie continue chronique, Zhang et al. ont démontré que HIF-1 induisait une mitophagie dépendante de Bnip3 [145]. D'ailleurs, chez les souris HIF-1 α ^{+/-}, l'HI n'altère pas l'expression des protéines de l'autophagie et de la mitophagie (étude 3)(figure 39C). Alors que la régulation de p62 et Parkin par HIF-1 est peu étudiée, celle de Bnip3 est bien connue. En effet, la présence d'un HRE dans le promoteur du gène de Bnip3 signifie que Bnip3 est une cible transcriptionnelle directe de HIF-1 [144]. De ce fait, en HI, HIF-1 pourrait activer directement la mitophagie par son activité transcriptionnelle sur Bnip3, afin d'adapter la fonction mitochondriale à l'HI.

De plus, la fonction mitochondriale est bien connue pour être impliquée dans la réponse à l'ischémie-reperfusion, ne serait-ce qu'à travers l'ouverture du PTPm. Détaillé auparavant, l'étude 2 révèle que l'HI induit une augmentation de la sensibilité au calcium du PTPm, dépendante de HIF-1. Ainsi, la dysfonction mitochondriale est susceptible d'expliquer l'augmentation des lésions cellulaires suite à une ischémie-reperfusion, induite par l'HI.

Donc, HIF-1 est impliqué dans l'induction de la mitophagie, susceptible d'expliquer la dysfonction mitochondriale et l'augmentation de la susceptibilité du myocarde à l'ischémie-reperfusion (figure 39C).

Ainsi, l'étude de la dynamique et du renouvellement mitochondrial nécessite d'être approfondie, afin d'apporter des informations plus précises sur l'implication de HIF-1 dans les altérations mitochondriales induites par l'HI. Notamment, la microscopie électronique à transmission pourrait permettre de déterminer si le nombre de mitochondries est diminué en HI par la mitophagie, ou la proportion de grosses ou petites mitochondries.

4. HI chronique et altérations mitochondriales, effets protecteurs de la metformine

a. HI, AMPK

Afin d'expliquer la diminution de la respiration et la production d'ERO mitochondriales, nous nous avons mesuré l'expression et à l'activité des complexes de la chaîne respiratoire. De façon intrigante, alors que l'expression des complexes n'est pas atteinte pas l'HI, l'activité des complexes I et II est augmentée. Par ailleurs, le potentiel de membrane n'est pas altéré par l'HI, suggérant un bon couplage de la phosphorylation oxydative et de la chaîne de transport d'électrons. Nous avons donc pensé que l'augmentation de l'activité des complexes I et II pourrait être une compensation afin de maintenir la production d'ATP. En particulier, la contractilité cardiaque est permise grâce à une capacité importante du cardiomyocyte à réguler le statut énergétique cellulaire, afin d'adapter l'apport en substrats en fonction de la demande. Ainsi, nous nous sommes intéressés à l'AMPK, connue pour détecter un stress énergétique, et induire une réponse métabolique capable de maintenir un niveau d'énergie nécessaire pour le fonctionnement cellulaire [374]. De plus, indépendamment d'une exposition à l'hypoxie, l'AMPK est aussi impliqué dans la réponse à l'ischémie-reperfusion, en préservant l'équilibre métabolique en ischémie et l'intégrité mitochondriale à la reperfusion [374].

Ainsi, nous avons évalué le niveau d'activation myocardique de l'AMPK en HI. L'HI induit une diminution de la phosphorylation de l'AMPK et tend à diminuer la phosphorylation d'ACC, une des protéines cible de l'AMPK (étude 2). Ce résultat est en accord avec une étude récente, qui a mis en évidence que l'HI diminue la phosphorylation de l'AMPK myocardique, chez des rats exposés 8 sem à l'HI [375]. Ces modifications sont abolies par la délétion de HIF-1 (étude 2)(figure 39C). Ainsi, l'HI réduit l'activité myocardique de l'AMPK sous le contrôle de HIF-1, alors que l'on sait qu'en hypoxique, HIF-1 oriente les cellules vers un métabolisme glycolytique [282]. Ces résultats attestent d'un stress énergétique myocardique induit par l'HI chronique. Cette réduction d'activation de l'AMPK, à elle seule, est susceptible d'expliquer la mauvaise récupération à l'ischémie-reperfusion, puisque l'utilisation de

modèle animaux génétiquement modifiés a montré les effets cardioprotecteurs de l'activation de l'AMPK [376-378].

Donc, l'HI diminue l'activation myocardique de l'AMPK.

b. HI, metformine, taille de l'infarctus

Ces résultats nous ont donc amenés à traiter les animaux à la metformine (un activateur de l'AMPK) pendant l'exposition à l'HI ou la normoxie. Nous avons observé que la metformine abolit l'augmentation de la mort cellulaire suite à l'ischémie-reperfusion chez les animaux exposés à l'HI seulement (étude 2) (figure 39D). La metformine étant un antidiabétique, c'est avec des modèles animaux diabétiques qu'elle a été testée en chronique pour son effet potentiellement cardioprotecteur. De ce fait, seulement deux études suggèrent une réduction de la taille d'infarctus par le traitement chronique de 2 et 4 sem de la metformine (300mg/kg) chez le rat [379, 380]. En revanche, notre résultat est spécifique de l'HI, puisque la metformine n'a pas d'effet chez les animaux normoxiques. Ceci n'est pas en désaccord avec les résultats cardioprotecteurs controversés de la metformine. Mais cela pourrait aussi s'expliquer par le fait qu'afin de s'affranchir d'un effet aigu de la metformine, nos souris n'ont pas été traitées le jour des expérimentations.

Donc, la metformine prévient l'augmentation de la vulnérabilité du myocarde à l'ischémie-reperfusion, induite par l'HI (figure 39D).

c. HI, metformine, dynamique et mitophagie

En ce qui concerne la dynamique mitochondriale, la metformine prévient les modifications d'expression de Mfn2 et Drp1, induites par l'HI (étude 2) (figure 39D). Dans des fibroblastes fœtaux humains, il a été observé que la metformine rétablit la fusion, en empêchant la diminution de Mfn2 et OPA1 [381]. La metformine a aussi été montrée pour inhiber la fission médiée par Drp1 chez des souris diabétiques [382, 383]. Ainsi, l'approfondissement de l'étude

de la dynamique en HI pourrait confirmer l'effet de la metformine sur celle-ci, dont la littérature se résume aux trois études citées précédemment.

Ensuite, la metformine abolit la diminution de p62 et les augmentations de l'expression de Bnip3 et de Parkin induites par l'HI (étude 2), signifiant que la metformine prévient l'induction de la mitophagie en HI (figure 39D). Généralement, l'activation d'AMPK est associée à une autophagie bénéfique. En effet, Xie et al., ont montré que l'activation de l'AMPK par l'AICAR, induit une autophagie responsable d'une réduction de la mort cellulaire, dans des cellules H9C2 exposées à 5 jours d'HI [375]. De plus, en hypoxie continue couplée à une restriction en acides aminés, l'AMPK induit la dégradation de Bnip3 par autophagie, en inhibant mTORC1 et en activant la phosphorylation de ULK1 [384]. De ce fait, en activant l'AMPK, la metformine pourrait induire une autophagie bénéfique pour le myocarde, empêchant ainsi l'induction de la mitophagie médiée par Bnip3 et Parkin en l'HI chronique.

Donc, la metformine prévient la mitophagie et consécutivement la susceptibilité du myocarde à l'ischémie-reperfusion, induites par l'HI (figure 39D).

Etant donné que cette étude sur l'AMPK est préliminaire, il convient d'énoncer quelques perspectives à ce travail.

La metformine active l'AMPK, de manière indirecte, en inhibant le complexe I mitochondrial [385, 386], ce qui suggère que la metformine pourrait aussi prévenir la dysfonction mitochondriale et l'augmentation de l'activité du complexe I, induites par l'HI. De ce fait, l'effet de la metformine sur la fonction mitochondriale en HI sera étudié.

De plus, la metformine étant un activateur indirect de l'AMPK, son action sur la phosphorylation de l'AMPK et ses cibles, telles qu'ACC, ULK1, mTOR est à évaluer. Pour contrôler le rôle de la metformine, en tant qu'inhibiteur spécifique de l'AMPK cardiaque, nous pourrions vérifier l'absence de son effet chez des souris exposées à l'HI avec une délétion myocardique de l'isoforme AMPK α 2 (isoforme spécifique cardiaque).

Cette étude sur l'AMPK a permis d'explorer une nouvelle cible thérapeutique, ainsi nous pourrions réaliser une étude rétrospective pour évaluer l'incidence et la fréquence des infarctus du myocarde chez des patients apnéiques traités ou non avec la metformine. Par ailleurs, en conditions hypoxiques, la metformine a été montrée pour diminuer l'activation de HIF-1 [387-393]. De ce fait, l'AMPK et HIF-1 pourrait être intimement liés en HI, et la

metformine pourrait agir sur l'activation de HIF-1, ce qui pourrait expliquer les effets cardioprotecteurs en termes de taille d'infarctus de la metformine.

5. Rôle pivot de HIF-1 dans la susceptibilité myocardique à l'ischémie-reperfusion, induite par l'HI chronique

a. Mécanismes de l'HI

A travers ces travaux de thèse, nous avons confirmé que l'HI chronique pendant 21 jours est délétère pour la réponse à l'ischémie-reperfusion. Ceci avait déjà été démontré chez des rongeurs, après une exposition à l'HI de 7 jours [394], 12 jours [395], 14 jours [190, 198, 265, 313, 394], 21 jours [342] et 5 sem [233]. Pour rappel, les mécanismes induits par le SAOS et/ou l'HI sont l'activation sympathique, le stress oxydant et l'inflammation. Les études 1 et 2 ont permis de mettre en évidence de nouveaux mécanismes, susceptibles d'expliquer l'augmentation de la vulnérabilité cardiaque, à savoir le stress du RE éventuellement causé par une perturbation des MAM et de l'homéostasie calcique, ainsi que les altérations mitochondriales.

Alors qu'une précédente étude du laboratoire montrait que l'HI induit une activation de HIF-1, impliquée dans la susceptibilité accrue du myocarde [198]. Ces travaux ont permis de mettre en évidence son rôle essentiel dans les deux nouveaux mécanismes sus-cités et dans l'augmentation de la taille d'infarctus, induits par l'HI chronique. Jusqu'ici, l'activation de HIF-1 a surtout été décrit comme une conséquence du stress oxydant généré par l'HI [363] et en relation étroite avec l'activation sympathique [307] ou l'inflammation vasculaire [258] induits par l'HI. Pourtant, l'inhibition partielle génétique de HIF-1 α dans les études 1 et 2 suggère que HIF-1 est aussi impliqué dans l'induction du stress du RE et des altérations mitochondriale consécutifs à l'HI.

De ce fait dans l'étude 3, nous avons décidé d'inhiber HIF-1 avec un outil pharmacologique, afin d'une part d'appuyer l'importance de son activation dans les conséquences du SAOS et/ou de l'HI, et d'autre part, d'observer si son inhibition pharmacologique pouvait améliorer la réponse à l'ischémie-reperfusion. Pour cela, nous avons choisi un inhibiteur de l'activation nucléaire de HIF-1, la curcumine qui est connue pour induire la dégradation protéosomale de HIF-1 β [396]. Comme pour la metformine, afin de s'affranchir d'un effet éventuellement bénéfique aigu de la curcumine, les souris n'ont pas été traitées avant d'être soumises aux expérimentations.

b. HI, curcumine, HIF-1

Tout d'abord, la curcumine prévient l'augmentation de l'expression myocardique de HIF-1 α , induite par l'HI (étude 3)(figure 39E). En effet, la curcumine a été montrée pour réduire l'expression de HIF-1 dans plusieurs modèles de cancer, mais aussi dans d'autres pathologies chroniques comme la fibrose hépatique et l'obésité [331-339]. En revanche, cette étude est la première à montrer l'effet de la curcumine sur l'expression de HIF-1 dans le myocarde.

Ensuite, dans l'étude 4, nous montrons que l'inhibition pharmacologique de HIF-1 abolit le stress oxydant et l'inflammation, induits par l'HI (figure 39E). Indépendamment de l'HI, la curcumine est bien connue pour son activité antioxydante et anti-inflammatoire [397].

De plus, le traitement à la curcumine empêche l'augmentation de l'expression des protéines clés du stress du RE induite par l'HI (étude 3)(figure 39E). Ceci est en accord avec l'inhibition d'un stress du RE-pro-apoptotique par la curcumine, démontrée dans le cas d'une myocardite aiguë [398].

Des expériences complémentaires telles que l'analyse de la variabilité de la fréquence cardiaque (pour l'activation sympathique) ou l'évaluation de la fonction mitochondriale restent à réaliser pour terminer cette étude. Néanmoins, dans la littérature, il a été montré que la curcumine diminue l'activité sympathique dans un modèle de rats obèses [399]. De la même façon, plusieurs études ont mis en évidence que la curcumine rétablit le fonctionnement mitochondrial, notamment dans un modèle d'ischémie-reperfusion [400]. Enfin, la curcumine est aussi capable d'activer l'AMPK dans les pathologies chroniques, telle que le cancer, le diabète ou l'athérosclérose [401].

Donc, l'inhibition de l'activation de HIF-1 pourrait prévenir toutes les conséquences délétères de l'HI (figure 39E).

a. HI, curcumine, taille de l'infarctus

D'ailleurs, le traitement par la curcumine pendant l'exposition abolit l'augmentation de la taille d'infarctus induite par l'HI seulement (étude 3)(figure 39E). Ceci est en accord avec l'effet bénéfique de la curcumine sur les lésions cérébrales induite par l'HI [402] et aussi sur les effets cardioprotecteurs de la curcumine vis-à-vis de l'ischémie-reperfusion seule [403].

Donc, cette étude suggère que la curcumine pourrait être en mesure de prévenir l'ensemble des mécanismes de l'HI, en prévenant l'activation myocardique de HIF-1, responsable de l'augmentation de la vulnérabilité du myocarde à l'ischémie-reperfusion (figure 39E).

Ce traitement pharmacologique avec la curcumine présente cependant des limites, puisque comme évoqué précédemment la curcumine n'est pas un inhibiteur spécifique de HIF-1.

De par sa formulation chimique, la curcumine est un antioxydant. De plus, la curcumine, en déstabilisant HIF-1 β , peut empêcher la régulation de la transcription des gènes dépendant de HIF-1, mais aussi de HIF-2 ou HIF-3. Au laboratoire, une étude parallèle a été mise en place afin de trouver des analogues de la curcumine plus spécifique de la modulation de HIF-1, qui seront d'abord testés sur un modèle de mort cellulaire, puis sur des cellules exposées à l'HI, et enfin chez des rongeurs exposés à l'HI. Par ailleurs, la curcumine est testée dans plusieurs pathologies comme le cancer, chez l'animal et chez l'homme, mais sa biodisponibilité étant très faible, des encapsulations et des dérivés sont aussi essayés pour améliorer son efficacité [404].

L'utilisation des souris partiellement délétées pour HIF-1 α est un bon outil pour étudier le rôle de HIF-1 dans les mécanismes de l'HI, par rapport à la pharmacologie moins spécifique de HIF-1. En revanche, en accord avec le rôle basal de HIF-1, ces souris présentent des altérations cellulaires en basal, touchant l'intégrité des MAM, la respiration et la production

d'ERO mitochondriales. Pour réduire ces compensations, il serait intéressant d'évaluer les conséquences de l'HI chez des souris dont la délétion de HIF-1 α est réalisée au moment de l'exposition à l'HI. De plus, la comparaison d'une délétion cardiaque ou totale apporterait des informations, sur l'importance de l'activation myocardique chronique de HIF-1 α dans les effets systémiques de l'HI. Le recours au modèle cellulaire récemment développé au laboratoire pourrait nous permettre de répondre plus rapidement à des questions concernant les différentes voies impliquées, en utilisant par exemple des siRNA ciblant directement HIF-1 ou les protéines altérées par l'HI comme la Grp75, Bnip3, AMPK...

6. Conclusion

Le SAOS est une maladie sous-diagnostiquée, qui est considéré comme un facteur de risque indépendant de la survenue d'une pathologie coronaire. En effet, la présence de cette pathologie accroît la sévérité et le nombre d'évènements cardiovasculaires. Par ailleurs, le traitement de référence du SAOS, la PPC ne prévient que partiellement ses conséquences, faisant de cette maladie un problème majeur de santé publique. La conséquence du SAOS considérée comme étant la plus délétère pour le système cardiovasculaire est l'HI chronique. Ainsi la compréhension des mécanismes sous-jacents impliqués dans cette pathologie et induits par l'HI, représente un enjeu majeur pour développer des thérapeutiques complémentaires ou substitutives à la PPC, et améliorer la prise en charge des patients SAOS.

Ces travaux de thèse ont confirmé que l'HI chronique est délétère pour le myocarde, en augmentant la susceptibilité à l'ischémie-reperfusion, et ce, à travers l'activation de HIF-1. En effet, l'inhibition de HIF-1 par la génétique (étude 1) et la pharmacologie directe (curcumine, étude 3) est cardioprotectrice en termes de taille d'infarctus. Afin d'expliquer cette réponse à l'ischémie-reperfusion en HI, nous avons mis en évidence deux nouveaux acteurs de l'HI, à savoir, le stress du RE (potentiellement associé à l'altération des MAM et de l'homéostasie calcique) et les perturbations mitochondriales (étude 1-2). L'inhibition génétique de HIF-1 a permis de montrer que ce facteur de transcription joue un rôle central dans l'induction de ces deux nouveaux mécanismes (étude 1 et 2). A l'aide de l'inhibition pharmacologique de HIF-1 (étude 3), nous avons conforté le rôle de HIF-1 à l'origine de l'ensemble des mécanismes délétères de l'HI.

Parallèlement à cela, nous avons mis en évidence une augmentation de son activation myocardique corrélée à l'IAH chez les patients apnéiques atteints d'une maladie coronarienne (comparativement aux non apnéiques). Ainsi, l'activation de HIF-1 pourrait correspondre à un marqueur de diagnostic de la sévérité du SAOS chez les patients à haut risque cardiovasculaire. De plus, dans cette même population, HIF-1 pourrait être une cible importante pour le développement de nouvelles thérapeutiques complémentaires ou substitutives aux traitements actuels, et ce, dans le but de réduire la gravité de la survenue d'un évènement coronarien.

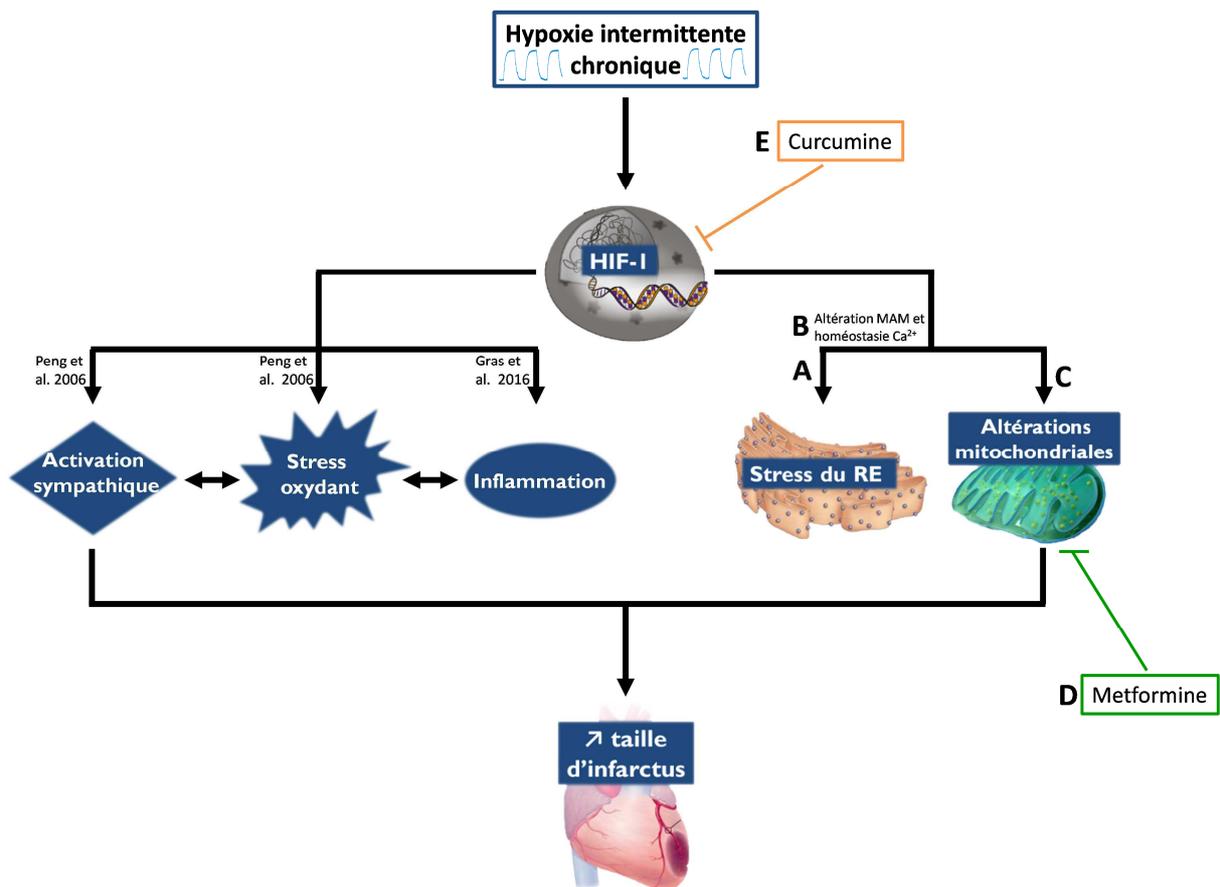


Figure 39 : Schéma de conclusion de la thèse illustrant le rôle central de HIF-1 dans la susceptibilité myocardique à l'ischémie-reperfusion induite par l'HI chronique ; en activant le stress du RE (A) via une altération des MAM et de l'homéostasie calcique (B) ; et en induisant des altérations mitochondriales (C) prévenues par un traitement à la metformine. Le traitement à la curcumine (E), en inhibant l'activation de HIF-1, prévient l'augmentation de la taille d'infarctus induite par l'HI chronique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Reed GW, Rossi JE, Cannon CP. Acute myocardial infarction. *Lancet*. 2017;389:197-210.
- [2] Wagner A, Ruidavets J-B, Montaye M, Bingham A, Ferrières J, Amouyel P, et al. Évolution de la maladie coronaire en France de 2000 à 2007. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*. 2011;BEH 40-41.
- [3] Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*. 1998;97:1837-47.
- [4] Javaheri S, Barbe F, Campos-Rodriguez F, Dempsey JA, Khayat R, Javaheri S, et al. Sleep Apnea: Types, Mechanisms, and Clinical Cardiovascular Consequences. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69:841-58.
- [5] Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36:959-69.
- [6] Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *Glob Heart*. 2012;7:275-95.
- [7] Frangogiannis NG. Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Compr Physiol*. 2015;5:1841-75.
- [8] Nicotera P, Melino G. Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene*. 2004;23:2757-65.
- [9] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008;132:27-42.
- [10] Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest*. 2013;123:92-100.
- [11] Redfors B, Shao Y, Omerovic E. Myocardial infarct size and area at risk assessment in mice. *Exp Clin Cardiol*. 2012;17:268-72.
- [12] Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*. 1977;56:786-94.
- [13] Seiler C. Assessment and impact of the human coronary collateral circulation on myocardial ischemia and outcome. *Circ Cardiovasc Interv*. 2013;6:719-28.
- [14] Gabriel-Costa D. The pathophysiology of myocardial infarction-induced heart failure. *Pathophysiology*. 2018.
- [15] Jennings RB, Steenbergen C, Jr. Nucleotide metabolism and cellular damage in myocardial ischemia. *Annu Rev Physiol*. 1985;47:727-49.
- [16] Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301:H1723-41.
- [17] Aiello EA, Petroff MG, Mattiazzi AR, Cingolani HE. Evidence for an electrogenic Na⁺-HCO₃⁻ symport in rat cardiac myocytes. *J Physiol*. 1998;512 (Pt 1):137-48.
- [18] Solaro RJ, Lee JA, Kentish JC, Allen DG. Effects of acidosis on ventricular muscle from adult and neonatal rats. *Circ Res*. 1988;63:779-87.
- [19] Van Eyk JE, Powers F, Law W, Larue C, Hodges RS, Solaro RJ. Breakdown and release of myofilament proteins during ischemia and ischemia/reperfusion in rat hearts: identification of degradation products and effects on the pCa-force relation. *Circ Res*. 1998;82:261-71.

- [20] Steenbergen C, Hill ML, Jennings RB. Volume regulation and plasma membrane injury in aerobic, anaerobic, and ischemic myocardium in vitro. Effects of osmotic cell swelling on plasma membrane integrity. *Circ Res.* 1985;57:864-75.
- [21] Manning AS, Coltart DJ, Hearse DJ. Ischemia and reperfusion-induced arrhythmias in the rat. Effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol. *Circ Res.* 1984;55:545-8.
- [22] Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest.* 1974;54:1496-508.
- [23] Bolli R, Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev.* 1999;79:609-34.
- [24] Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 1998;38:291-300.
- [25] Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med.* 2007;357:1121-35.
- [26] Lemasters JJ, Bond JM, Chacon E, Harper IS, Kaplan SH, Ohata H, et al. The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *EXS.* 1996;76:99-114.
- [27] Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2004;61:481-97.
- [28] Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res.* 2004;61:372-85.
- [29] Javadov S, Jang S, Parodi-Rullan R, Khuchua Z, Kuznetsov AV. Mitochondrial permeability transition in cardiac ischemia-reperfusion: whether cyclophilin D is a viable target for cardioprotection? *Cell Mol Life Sci.* 2017;74:2795-813.
- [30] Morciano G, Bonora M, Campo G, Aquila G, Rizzo P, Giorgi C, et al. Mechanistic Role of mPTP in Ischemia-Reperfusion Injury. *Adv Exp Med Biol.* 2017;982:169-89.
- [31] Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature.* 2005;434:658-62.
- [32] Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, Chalabreysse L, Loufouat J, Robert D, et al. Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;38:367-74.
- [33] Alam MR, Baetz D, Ovize M. Cyclophilin D and myocardial ischemia-reperfusion injury: a fresh perspective. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;78:80-9.
- [34] Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2008;359:473-81.
- [35] Cung TT, Morel O, Cayla G, Rioufol G, Garcia-Dorado D, Angoulvant D, et al. Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med.* 2015;373:1021-31.
- [36] Reddish FN, Miller CL, Gorkhali R, Yang JJ. Calcium Dynamics Mediated by the Endoplasmic/Sarcoplasmic Reticulum and Related Diseases. *Int J Mol Sci.* 2017;18.
- [37] Glembotski CC. Endoplasmic reticulum stress in the heart. *Circ Res.* 2007;101:975-84.
- [38] Lievremont JP, Rizzuto R, Hendershot L, Meldolesi J. BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca²⁺. *J Biol Chem.* 1997;272:30873-9.
- [39] Carreras-Sureda A, Pihan P, Hetz C. Calcium signaling at the endoplasmic reticulum: fine-tuning stress responses. *Cell Calcium.* 2018;70:24-31.

- [40] Krebs J, Agellon LB, Michalak M. Ca(2+) homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;460:114-21.
- [41] Kane C, Couch L, Terracciano CM. Excitation-contraction coupling of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Front Cell Dev Biol.* 2015;3:59.
- [42] Groenendyk J, Sreenivasaiah PK, Kim DH, Agellon LB, Michalak M. Biology of endoplasmic reticulum stress in the heart. *Circ Res.* 2010;107:1185-97.
- [43] Groenendyk J, Agellon LB, Michalak M. Coping with endoplasmic reticulum stress in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:49-67.
- [44] Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods.* 2005;35:373-81.
- [45] Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.* 2000;2:326-32.
- [46] Mori K. Signalling pathways in the unfolded protein response: development from yeast to mammals. *J Biochem.* 2009;146:743-50.
- [47] Calton M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, et al. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature.* 2002;415:92-6.
- [48] Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell.* 2002;3:99-111.
- [49] Hong M, Luo S, Baumeister P, Huang JM, Gogia RK, Li M, et al. Underglycosylation of ATF6 as a novel sensing mechanism for activation of the unfolded protein response. *J Biol Chem.* 2004;279:11354-63.
- [50] Wang XZ, Lawson B, Brewer JW, Zinszner H, Sanjay A, Mi LJ, et al. Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Mol Cell Biol.* 1996;16:4273-80.
- [51] 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.* 2001;21:1249-59.
- [52] Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, et al. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell.* 2007;129:1337-49.
- [53] Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, et al. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science.* 2003;300:135-9.
- [54] Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol.* 2000;150:887-94.
- [55] 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.* 2002;277:34287-94.
- [56] Wang S, Binder P, Fang Q, Wang Z, Xiao W, Liu W, et al. Endoplasmic reticulum stress in the heart: insights into mechanisms and drug targets. *Br J Pharmacol.* 2018;175:1293-304.
- [57] Azfer A, Niu J, Rogers LM, Adamski FM, Kolattukudy PE. Activation of endoplasmic reticulum stress response during the development of ischemic heart disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291:H1411-20.

- [58] Thuerlauf DJ, Marcinko M, Gude N, Rubio M, Sussman MA, Glembotski CC. Activation of the unfolded protein response in infarcted mouse heart and hypoxic cultured cardiac myocytes. *Circ Res.* 2006;99:275-82.
- [59] Tao J, Zhu W, Li Y, Xin P, Li J, Liu M, et al. Apelin-13 protects the heart against ischemia-reperfusion injury through inhibition of ER-dependent apoptotic pathways in a time-dependent fashion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301:H1471-86.
- [60] Wang X, Bi X, Zhang G, Deng Y, Luo X, Xu L, et al. Glucose-regulated protein 78 is essential for cardiac myocyte survival. *Cell Death Differ.* 2018.
- [61] Bi X, Zhang G, Wang X, Nguyen C, May HI, Li X, et al. Endoplasmic Reticulum Chaperone GRP78 Protects Heart From Ischemia/Reperfusion Injury Through Akt Activation. *Circ Res.* 2018;122:1545-54.
- [62] Qi X, Vallentin A, Churchill E, Mochly-Rosen D. deltaPKC participates in the endoplasmic reticulum stress-induced response in cultured cardiac myocytes and ischemic heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;43:420-8.
- [63] Sawada T, Minamino T, Fu HY, Asai M, Okuda K, Isomura 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;48:1280-9.
- [64] Martindale JJ, Fernandez R, Thuerlauf D, Whittaker R, Gude N, Sussman MA, et al. Endoplasmic reticulum stress gene induction and protection from ischemia/reperfusion injury in the hearts of transgenic mice with a tamoxifen-regulated form of ATF6. *Circ Res.* 2006;98:1186-93.
- [65] Doroudgar S, Thuerlauf DJ, Marcinko MC, Belmont PJ, Glembotski CC. Ischemia activates the ATF6 branch of the endoplasmic reticulum stress response. *J Biol Chem.* 2009;284:29735-45.
- [66] Miyazaki Y, Kaikita K, Endo M, Horio E, Miura M, Tsujita K, et al. C/EBP homologous protein deficiency attenuates myocardial reperfusion injury by inhibiting myocardial apoptosis and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:1124-32.
- [67] Szegezdi E, Duffy A, O'Mahoney ME, Logue SE, Mylotte LA, O'Brien T, et al. ER stress contributes to ischemia-induced cardiomyocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;349:1406-11.
- [68] Wang X, Xu L, Gillette TG, Jiang X, Wang ZV. The unfolded protein response in ischemic heart disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2018;117:19-25.
- [69] Zhang C, Tang Y, Li Y, Xie L, Zhuang W, Liu J, et al. Unfolded protein response plays a critical role in heart damage after myocardial ischemia/reperfusion in rats. *PLoS One.* 2017;12:e0179042.
- [70] Caspersen C, Pedersen PS, Treiman M. The sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase 2b is an endoplasmic reticulum stress-inducible protein. *J Biol Chem.* 2000;275:22363-72.
- [71] Zhang PL, Lun M, Teng J, Huang J, Blasick TM, Yin L, et al. Preinduced molecular chaperones in the endoplasmic reticulum protect cardiomyocytes from lethal injury. *Ann Clin Lab Sci.* 2004;34:449-57.
- [72] Yang W, Wu F, Luo T, Zhang Y. CCAAT/enhancer binding protein homologous protein knockdown alleviates hypoxia-induced myocardial injury in rat cardiomyocytes exposed to high glucose. *Exp Ther Med.* 2018;15:4213-22.
- [73] Xue A, Lin J, Que C, Yu Y, Tu C, Chen H, et al. Aberrant endoplasmic reticulum stress mediates coronary artery spasm through regulating MLCK/MLC2 pathway. *Exp Cell Res.* 2018;363:321-31.

- [74] Bravo R, Vicencio JM, Parra V, Troncoso R, Munoz JP, Bui M, et al. Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. *J Cell Sci.* 2011;124:2143-52.
- [75] Stenger RJ, Spiro D. The Ultrastructure of Mammalian Cardiac Muscle. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961;9:325-51.
- [76] Hayashi T, Fujimoto M. Detergent-resistant microdomains determine the localization of sigma-1 receptors to the endoplasmic reticulum-mitochondria junction. *Mol Pharmacol.* 2010;77:517-28.
- [77] Szabadkai G, Bianchi K, Varnai P, De Stefani D, Wieckowski MR, Cavagna D, et al. Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J Cell Biol.* 2006;175:901-11.
- [78] Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, et al. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature.* 2011;476:341-5.
- [79] de Brito OM, Scorrano L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature.* 2008;456:605-10.
- [80] Stoica R, De Vos KJ, Paillusson S, Mueller S, Sancho RM, Lau KF, et al. ER-mitochondria associations are regulated by the VAPB-PTPIP51 interaction and are disrupted by ALS/FTD-associated TDP-43. *Nat Commun.* 2014;5:3996.
- [81] Burte F, Carelli V, Chinnery PF, Yu-Wai-Man P. Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol.* 2015;11:11-24.
- [82] Sutendra G, Dromparis P, Wright P, Bonnet S, Haromy A, Hao Z, et al. The role of Nogo and the mitochondria-endoplasmic reticulum unit in pulmonary hypertension. *Sci Transl Med.* 2011;3:88ra55.
- [83] Williams A, Hayashi T, Wolozny D, Yin B, Su TC, Betenbaugh MJ, et al. The non-apoptotic action of Bcl-xL: regulating Ca²⁺ signaling and bioenergetics at the ER-mitochondrion interface. *J Bioenerg Biomembr.* 2016;48:211-25.
- [84] Giacomello M, Drago I, Bortolozzi M, Scorzeto M, Gianelle A, Pizzo P, et al. Ca²⁺ hot spots on the mitochondrial surface are generated by Ca²⁺ mobilization from stores, but not by activation of store-operated Ca²⁺ channels. *Mol Cell.* 2010;38:280-90.
- [85] Rizzuto R, Brini M, Murgia M, Pozzan T. Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science.* 1993;262:744-7.
- [86] Csordas G, Varnai P, Golenar T, Roy S, Purkins G, Schneider TG, et al. Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface. *Mol Cell.* 2010;39:121-32.
- [87] Csordas G, Thomas AP, Hajnoczky G. Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *EMBO J.* 1999;18:96-108.
- [88] Galluzzi L, Kepp O, Trojel-Hansen C, Kroemer G. Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circ Res.* 2012;111:1198-207.
- [89] Rieusset J, Fauconnier J, Paillard M, Belaidi E, Tubbs E, Chauvin MA, et al. Disruption of calcium transfer from ER to mitochondria links alterations of mitochondria-associated ER membrane integrity to hepatic insulin resistance. *Diabetologia.* 2016;59:614-23.
- [90] van Vliet AR, Verfaillie T, Agostinis P. New functions of mitochondria associated membranes in cellular signaling. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1843:2253-62.
- [91] Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J, Voeltz GK. ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science.* 2011;334:358-62.

- [92] Lewis SC, Uchiyama LF, Nunnari J. ER-mitochondria contacts couple mtDNA synthesis with mitochondrial division in human cells. *Science*. 2016;353:aaf5549.
- [93] Wu Q, Luo CL, Tao LY. Dynamin-related protein 1 (Drp1) mediating mitophagy contributes to the pathophysiology of nervous system diseases and brain injury. *Histol Histopathol*. 2017;32:551-9.
- [94] Lopez-Crisosto C, Pennanen C, Vasquez-Trincado C, Morales PE, Bravo-Sagua R, Quest AFG, et al. Sarcoplasmic reticulum-mitochondria communication in cardiovascular pathophysiology. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14:342-60.
- [95] Paillard M, Tubbs E, Thiebaut PA, Gomez L, Fauconnier J, Da Silva CC, et al. Depressing mitochondria-reticulum interactions protects cardiomyocytes from lethal hypoxia-reoxygenation injury. *Circulation*. 2013;128:1555-65.
- [96] Javadov S, Chapa-Dubocq X, Makarov V. Different approaches to modeling analysis of mitochondrial swelling. *Mitochondrion*. 2018;38:58-70.
- [97] Gomez L, Thiebaut PA, Paillard M, Ducreux S, Abrial M, Crola Da Silva C, et al. The SR/ER-mitochondria calcium crosstalk is regulated by GSK3beta during reperfusion injury. *Cell Death Differ*. 2016;23:313-22.
- [98] Hall AR, Burke N, Dongworth RK, Kalkhoran SB, Dyson A, Vicencio JM, et al. Hearts deficient in both Mfn1 and Mfn2 are protected against acute myocardial infarction. *Cell Death Dis*. 2016;7:e2238.
- [99] Neubauer S. The failing heart--an engine out of fuel. *N Engl J Med*. 2007;356:1140-51.
- [100] Rich PR, Marechal A. The mitochondrial respiratory chain. *Essays Biochem*. 2010;47:1-23.
- [101] Brand MD. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol*. 2010;45:466-72.
- [102] Brookes PS. Mitochondrial H(+) leak and ROS generation: an odd couple. *Free Radic Biol Med*. 2005;38:12-23.
- [103] Hassanpour SH, Dehghani MA, Karami SZ. Study of respiratory chain dysfunction in heart disease. *J Cardiovasc Thorac Res*. 2018;10:1-13.
- [104] Nsiah-Sefaa A, McKenzie M. Combined defects in oxidative phosphorylation and fatty acid beta-oxidation in mitochondrial disease. *Biosci Rep*. 2016;36.
- [105] Liesa M, Shirihai OS. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab*. 2013;17:491-506.
- [106] Wang W, Fernandez-Sanz C, Sheu SS. Regulation of mitochondrial bioenergetics by the non-canonical roles of mitochondrial dynamics proteins in the heart. *Biochim Biophys Acta*. 2018;1864:1991-2001.
- [107] Suarez-Rivero JM, Villanueva-Paz M, de la Cruz-Ojeda P, de la Mata M, Cotan D, Oropesa-Avila M, et al. Mitochondrial Dynamics in Mitochondrial Diseases. *Diseases*. 2016;5.
- [108] Ishihara N, Otera H, Oka T, Mihara K. Regulation and physiologic functions of GTPases in mitochondrial fusion and fission in mammals. *Antioxid Redox Signal*. 2013;19:389-99.
- [109] Ni HM, Williams JA, Ding WX. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox Biol*. 2015;4:6-13.
- [110] Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol*. 2003;160:189-200.

- [111] Le Page S, Niro M, Fauconnier J, Cellier L, Tamarelle S, Gharib A, et al. Increase in Cardiac Ischemia-Reperfusion Injuries in Opa1+/- Mouse Model. *PLoS One*. 2016;11:e0164066.
- [112] Cipolat S, Martins de Brito O, Dal Zilio B, Scorrano L. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:15927-32.
- [113] Anand R, Wai T, Baker MJ, Kladt N, Schauss AC, Rugarli E, et al. The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *J Cell Biol*. 2014;204:919-29.
- [114] Wai T, Garcia-Prieto J, Baker MJ, Merkwirth C, Benit P, Rustin P, et al. Imbalanced OPA1 processing and mitochondrial fragmentation cause heart failure in mice. *Science*. 2015;350:aad0116.
- [115] Twig G, Shirihai OS. The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14:1939-51.
- [116] Zhu PP, Patterson A, Stadler J, Seeburg DP, Sheng M, Blackstone C. Intra- and intermolecular domain interactions of the C-terminal GTPase effector domain of the multimeric dynamin-like GTPase Drp1. *J Biol Chem*. 2004;279:35967-74.
- [117] Mears JA, Lackner LL, Fang S, Ingerman E, Nunnari J, Hinshaw JE. Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nat Struct Mol Biol*. 2011;18:20-6.
- [118] Loson OC, Song Z, Chen H, Chan DC. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell*. 2013;24:659-67.
- [119] Hall AR, Hausenloy DJ. The shape of things to come: mitochondrial fusion and fission in the adult heart. *Cardiovasc Res*. 2012;94:391-2.
- [120] Lee YJ, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL, Youle RJ. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell*. 2004;15:5001-11.
- [121] Otera H, Wang C, Cleland MM, Setoguchi K, Yokota S, Youle RJ, et al. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol*. 2010;191:1141-58.
- [122] Palmer CS, Osellame LD, Laine D, Koutsopoulos OS, Frazier AE, Ryan MT. MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Rep*. 2011;12:565-73.
- [123] Zhao J, Liu T, Jin S, Wang X, Qu M, Uhlen P, et al. Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission. *EMBO J*. 2011;30:2762-78.
- [124] Taguchi N, Ishihara N, Jofuku A, Oka T, Mihara K. Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem*. 2007;282:11521-9.
- [125] Knott AB, Bossy-Wetzl E. Impairing the mitochondrial fission and fusion balance: a new mechanism of neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1147:283-92.
- [126] Karbowski M, Neutzner A, Youle RJ. The mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 is required for Drp1 dependent mitochondrial division. *J Cell Biol*. 2007;178:71-84.
- [127] Harder Z, Zunino R, McBride H. Sumo1 conjugates mitochondrial substrates and participates in mitochondrial fission. *Curr Biol*. 2004;14:340-5.
- [128] Koopman WJ, Distelmaier F, Smeitink JA, Willems PH. OXPHOS mutations and neurodegeneration. *EMBO J*. 2013;32:9-29.

- [129] Zorzano A, Liesa M, Sebastian D, Segales J, Palacin M. Mitochondrial fusion proteins: dual regulators of morphology and metabolism. *Semin Cell Dev Biol.* 2010;21:566-74.
- [130] Santel A, Frank S, Gaume B, Herrler M, Youle RJ, Fuller MT. Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci.* 2003;116:2763-74.
- [131] Zhang Y, Xu H. Translational regulation of mitochondrial biogenesis. *Biochem Soc Trans.* 2016;44:1717-24.
- [132] Vega RB, Kelly DP. Cardiac nuclear receptors: architects of mitochondrial structure and function. *J Clin Invest.* 2017;127:1155-64.
- [133] Fan W, Evans R. PPARs and ERRs: molecular mediators of mitochondrial metabolism. *Curr Opin Cell Biol.* 2015;33:49-54.
- [134] Zhang F, Qi Y, Zhou K, Zhang G, Linask K, Xu H. The cAMP phosphodiesterase Prune localizes to the mitochondrial matrix and promotes mtDNA replication by stabilizing TFAM. *EMBO Rep.* 2015;16:520-7.
- [135] Zhang F, Zhang L, Qi Y, Xu H. Mitochondrial cAMP signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73:4577-90.
- [136] Gottlieb RA, Thomas A. Mitophagy and Mitochondrial Quality Control Mechanisms in the Heart. *Curr Pathobiol Rep.* 2017;5:161-9.
- [137] Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J, et al. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol.* 2010;8:e1000298.
- [138] Geisler S, Holmstrom KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol.* 2010;12:119-31.
- [139] Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, Sarraf SA, Wang C, Burman JL, et al. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature.* 2015;524:309-14.
- [140] Strappazzon F, Nazio F, Corrado M, Cianfanelli V, Romagnoli A, Fimia GM, et al. AMBRA1 is able to induce mitophagy via LC3 binding, regardless of PARKIN and p62/SQSTM1. *Cell Death Differ.* 2015;22:419-32.
- [141] Chu CT, Bayir H, Kagan VE. LC3 binds externalized cardiolipin on injured mitochondria to signal mitophagy in neurons: implications for Parkinson disease. *Autophagy.* 2014;10:376-8.
- [142] Quinsay MN, Thomas RL, Lee Y, Gustafsson AB. Bnip3-mediated mitochondrial autophagy is independent of the mitochondrial permeability transition pore. *Autophagy.* 2010;6:855-62.
- [143] Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouyssegur J, et al. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol.* 2009;29:2570-81.
- [144] Bruck RK. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:9082-7.
- [145] Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, et al. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem.* 2008;283:10892-903.
- [146] Liu L, Feng D, Chen G, Chen M, Zheng Q, Song P, et al. Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat Cell Biol.* 2012;14:177-85.

- [147] Lee Y, Lee HY, Hanna RA, Gustafsson AB. Mitochondrial autophagy by Bnip3 involves Drp1-mediated mitochondrial fission and recruitment of Parkin in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301:H1924-31.
- [148] Ding WX, Ni HM, Li M, Liao Y, Chen X, Stolz DB, et al. Nix is critical to two distinct phases of mitophagy, reactive oxygen species-mediated autophagy induction and Parkin-ubiquitin-p62-mediated mitochondrial priming. *J Biol Chem*. 2010;285:27879-90.
- [149] Boland ML, Chourasia AH, Macleod KF. Mitochondrial dysfunction in cancer. *Front Oncol*. 2013;3:292.
- [150] Ong SB, Subrayan S, Lim SY, Yellon DM, Davidson SM, Hausenloy DJ. Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2010;121:2012-22.
- [151] Papanicolaou KN, Ngoh GA, Dabkowski ER, O'Connell KA, Ribeiro RF, Jr., Stanley WC, et al. Cardiomyocyte deletion of mitofusin-1 leads to mitochondrial fragmentation and improves tolerance to ROS-induced mitochondrial dysfunction and cell death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;302:H167-79.
- [152] Papanicolaou KN, Khairallah RJ, Ngoh GA, Chikando A, Luptak I, O'Shea KM, et al. Mitofusin-2 maintains mitochondrial structure and contributes to stress-induced permeability transition in cardiac myocytes. *Mol Cell Biol*. 2011;31:1309-28.
- [153] Chen L, Liu T, Tran A, Lu X, Tomilov AA, Davies V, et al. OPA1 mutation and late-onset cardiomyopathy: mitochondrial dysfunction and mtDNA instability. *J Am Heart Assoc*. 2012;1:e003012.
- [154] Piquereau J, Caffin F, Novotova M, Prola A, Garnier A, Mateo P, et al. Down-regulation of OPA1 alters mouse mitochondrial morphology, PTP function, and cardiac adaptation to pressure overload. *Cardiovasc Res*. 2012;94:408-17.
- [155] Zaja I, Bai X, Liu Y, Kikuchi C, Dosenovic S, Yan Y, et al. Cdk1, PKCdelta and calcineurin-mediated Drp1 pathway contributes to mitochondrial fission-induced cardiomyocyte death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;453:710-21.
- [156] Sharp J, Farha S, Park MM, Comhair SA, Lundgrin EL, Tang WH, et al. Coenzyme Q supplementation in pulmonary arterial hypertension. *Redox Biol*. 2014;2:884-91.
- [157] Din S, Mason M, Volkers M, Johnson B, Cottage CT, Wang Z, et al. Pim-1 preserves mitochondrial morphology by inhibiting dynamin-related protein 1 translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:5969-74.
- [158] Manechote C, Palee S, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Roles of mitochondrial dynamics modulators in cardiac ischaemia/reperfusion injury. *J Cell Mol Med*. 2017;21:2643-53.
- [159] Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest*. 2000;106:847-56.
- [160] Arany Z, He H, Lin J, Hoyer K, Handschin C, Toka O, et al. Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab*. 2005;1:259-71.
- [161] Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, Schaeffer PJ, Wende AR, Boudina S, et al. PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol*. 2005;3:e101.
- [162] Mutikainen M, Tuomainen T, Naumenko N, Huusko J, Smirin B, Laidinen S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha1 induces a cardiac excitation-contraction coupling phenotype without metabolic remodelling. *J Physiol*. 2016;594:7049-71.

- [163] Kubli DA, Zhang X, Lee Y, Hanna RA, Quinsay MN, Nguyen CK, et al. Parkin protein deficiency exacerbates cardiac injury and reduces survival following myocardial infarction. *J Biol Chem*. 2013;288:915-26.
- [164] Kubli DA, Quinsay MN, Gustafsson AB. Parkin deficiency results in accumulation of abnormal mitochondria in aging myocytes. *Commun Integr Biol*. 2013;6:e24511.
- [165] Song M, Mihara K, Chen Y, Scorrano L, Dorn GW, 2nd. Mitochondrial fission and fusion factors reciprocally orchestrate mitophagic culling in mouse hearts and cultured fibroblasts. *Cell Metab*. 2015;21:273-86.
- [166] Song S, Jang S, Park J, Bang S, Choi S, Kwon KY, et al. Characterization of PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) mutations associated with Parkinson disease in mammalian cells and *Drosophila*. *J Biol Chem*. 2013;288:5660-72.
- [167] Bousquet J, Dahl R, Khaltayev N. Global Alliance against Chronic Respiratory Diseases. *Eur Respir J*. 2007;29:233-9.
- [168] Levy P, Kohler M, McNicholas WT, Barbe F, McEvoy RD, Somers VK, et al. Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15015.
- [169] Senaratna CV, Perret JL, Lodge CJ, Lowe AJ, Campbell BE, Matheson MC, et al. Prevalence of obstructive sleep apnea in the general population: A systematic review. *Sleep Med Rev*. 2017;34:70-81.
- [170] McNicholas WT, Bonsignore MR, Management Committee of ECAB. Sleep apnoea as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence, basic mechanisms and research priorities. *Eur Respir J*. 2007;29:156-78.
- [171] Pepin JL, Tamisier R, Levy P. Obstructive sleep apnoea and metabolic syndrome: put CPAP efficacy in a more realistic perspective. *Thorax*. 2012;67:1025-7.
- [172] Berry RB, Budhiraja R, Gottlieb DJ, Gozal D, Iber C, Kapur VK, et al. Rules for scoring respiratory events in sleep: update of the 2007 AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events. Deliberations of the Sleep Apnea Definitions Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. *J Clin Sleep Med*. 2012;8:597-619.
- [173] Dematteis M, Godin-Ribuot D, Arnaud C, Ribouot C, Stanke-Labesque F, Pepin JL, et al. Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding the human disease. *ILAR J*. 2009;50:262-81.
- [174] Thompson SR, Ackermann U, Horner RL. Sleep as a teaching tool for integrating respiratory physiology and motor control. *Adv Physiol Educ*. 2001;25:101-16.
- [175] Iftikhar IH, Kline CE, Youngstedt SD. Effects of exercise training on sleep apnea: a meta-analysis. *Lung*. 2014;192:175-84.
- [176] Araghi MH, Chen YF, Jagielski A, Choudhury S, Banerjee D, Hussain S, et al. Effectiveness of lifestyle interventions on obstructive sleep apnea (OSA): systematic review and meta-analysis. *Sleep*. 2013;36:1553-62, 62A-62E.
- [177] Ferguson KA, Cartwright R, Rogers R, Schmidt-Nowara W. Oral appliances for snoring and obstructive sleep apnea: a review. *Sleep*. 2006;29:244-62.
- [178] Zimmerman ME, Arnedt JT, Stanchina M, Millman RP, Aloia MS. Normalization of memory performance and positive airway pressure adherence in memory-impaired patients with obstructive sleep apnea. *Chest*. 2006;130:1772-8.
- [179] Gay P, Weaver T, Loube D, Iber C, Positive Airway Pressure Task F, Standards of Practice C, et al. Evaluation of positive airway pressure treatment for sleep related breathing disorders in adults. *Sleep*. 2006;29:381-401.
- [180] Marin JM, Agusti A, Villar I, Forner M, Nieto D, Carrizo SJ, et al. Association between treated and untreated obstructive sleep apnea and risk of hypertension. *JAMA*. 2012;307:2169-76.

- [181] Bazzano LA, Khan Z, Reynolds K, He J. Effect of nocturnal nasal continuous positive airway pressure on blood pressure in obstructive sleep apnea. *Hypertension*. 2007;50:417-23.
- [182] Guo J, Sun Y, Xue LJ, Huang ZY, Wang YS, Zhang L, et al. Effect of CPAP therapy on cardiovascular events and mortality in patients with obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *Sleep Breath*. 2016;20:965-74.
- [183] McEvoy RD, Antic NA, Heeley E, Luo Y, Ou Q, Zhang X, et al. CPAP for Prevention of Cardiovascular Events in Obstructive Sleep Apnea. *N Engl J Med*. 2016;375:919-31.
- [184] Young T, Blustein J, Finn L, Palta M. Sleep-disordered breathing and motor vehicle accidents in a population-based sample of employed adults. *Sleep*. 1997;20:608-13.
- [185] Peppard PE, Young T, Palta M, Skatrud J. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N Engl J Med*. 2000;342:1378-84.
- [186] Fletcher EC, Lesske J, Qian W, Miller CC, 3rd, Unger T. Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats. *Hypertension*. 1992;19:555-61.
- [187] Dematteis M, Julien C, Guillermet C, Sturm N, Lantuejoul S, Mallaret M, et al. Intermittent hypoxia induces early functional cardiovascular remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177:227-35.
- [188] Tamisier R, Pepin JL, Remy J, Baguet JP, Taylor JA, Weiss JW, et al. 14 nights of intermittent hypoxia elevate daytime blood pressure and sympathetic activity in healthy humans. *Eur Respir J*. 2011;37:119-28.
- [189] Hoyos CM, Melehan KL, Liu PY, Grunstein RR, Phillips CL. Does obstructive sleep apnea cause endothelial dysfunction? A critical review of the literature. *Sleep Med Rev*. 2015;20:15-26.
- [190] Totoson P, Fhayli W, Faury G, Korichneva I, Cachot S, Baldazza M, et al. Atorvastatin protects against deleterious cardiovascular consequences induced by chronic intermittent hypoxia. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2013;238:223-32.
- [191] Friedman JK, Nitta CH, Henderson KM, Codianni SJ, Sanchez L, Ramiro-Diaz JM, et al. Intermittent hypoxia-induced increases in reactive oxygen species activate NFATc3 increasing endothelin-1 vasoconstrictor reactivity. *Vascul Pharmacol*. 2014;60:17-24.
- [192] Allahdadi KJ, Walker BR, Kanagy NL. Augmented endothelin vasoconstriction in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension*. 2005;45:705-9.
- [193] Osmond JM, Gonzalez Bosc LV, Walker BR, Kanagy NL. Endothelin-1-induced vasoconstriction does not require intracellular Ca²⁺(+) waves in arteries from rats exposed to intermittent hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014;306:H667-73.
- [194] Allahdadi KJ, Duling LC, Walker BR, Kanagy NL. Eucapnic intermittent hypoxia augments endothelin-1 vasoconstriction in rats: role of PKCdelta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294:H920-7.
- [195] Lefebvre B, Godin-Ribuot D, Joyeux-Faure M, Caron F, Bessard G, Levy P, et al. Functional assessment of vascular reactivity after chronic intermittent hypoxia in the rat. *Respir Physiol Neurobiol*. 2006;150:278-86.
- [196] Guo QH, Tian YL, Wang Z, Li AY, Ma ZH, Guo YJ, et al. Endothelin receptors in augmented vasoconstrictor responses to endothelin-1 in chronic intermittent hypoxia. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2013;40:449-57.
- [197] Wang Z, Li AY, Guo QH, Zhang JP, An Q, Guo YJ, et al. Effects of cyclic intermittent hypoxia on ET-1 responsiveness and endothelial dysfunction of pulmonary arteries in rats. *PLoS One*. 2013;8:e58078.
- [198] Belaidi E, Joyeux-Faure M, Ribuot C, Launois SH, Levy P, Godin-Ribuot D. Major role for hypoxia inducible factor-1 and the endothelin system in promoting myocardial

- infarction and hypertension in an animal model of obstructive sleep apnea. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53:1309-17.
- [199] Schoen T, Aeschbacher S, Leuppi JD, Miedinger D, Werthmuller U, Estis J, et al. Subclinical sleep apnoea and plasma levels of endothelin-1 among young and healthy adults. *Open Heart.* 2017;4:e000523.
- [200] Gjorup PH, Sadauskiene L, Wessels J, Nyvad O, Strunge B, Pedersen EB. Abnormally increased endothelin-1 in plasma during the night in obstructive sleep apnea: relation to blood pressure and severity of disease. *Am J Hypertens.* 2007;20:44-52.
- [201] Karkoulas K, Lykouras D, Sampsonas F, Drakatos P, Canova S, Tsoukalas G, et al. The role of Endothelin-1 in obstructive sleep apnea syndrome and pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and Endothelin-1 antagonists. *Curr Med Chem.* 2010;17:1059-66.
- [202] Phillips BG, Narkiewicz K, Pesek CA, Haynes WG, Dyken ME, Somers VK. Effects of obstructive sleep apnea on endothelin-1 and blood pressure. *J Hypertens.* 1999;17:61-6.
- [203] Saarelainen S, Seppala E, Laasonen K, Hasan J. Circulating endothelin-1 in obstructive sleep apnea. *Endothelium.* 1997;5:115-8.
- [204] Zamarron C, Riveiro A, Gude F. Circulating levels of vascular endothelial markers in obstructive sleep apnoea syndrome. Effects of nasal continuous positive airway pressure. *Arch Med Sci.* 2011;7:1023-8.
- [205] Anunciato IF, Lobo RR, Coelho EB, Verri WA, Jr., Eckeli AL, Evora PR, et al. Big endothelin-1 and nitric oxide in hypertensive elderly patients with and without obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Arq Bras Cardiol.* 2013;101:344-51.
- [206] Capone C, Faraco G, Coleman C, Young CN, Pickel VM, Anrather J, et al. Endothelin 1-dependent neurovascular dysfunction in chronic intermittent hypoxia. *Hypertension.* 2012;60:106-13.
- [207] Kanagy NL, Walker BR, Nelin LD. Role of endothelin in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension.* 2001;37:511-5.
- [208] Peng YJ, Nanduri J, Zhang X, Wang N, Raghuraman G, Seagard J, et al. Endothelin-1 mediates attenuated carotid baroreceptor activity by intermittent hypoxia. *J Appl Physiol (1985).* 2012;112:187-96.
- [209] Baguet JP, Hammer L, Levy P, Pierre H, Launois S, Mallion JM, et al. The severity of oxygen desaturation is predictive of carotid wall thickening and plaque occurrence. *Chest.* 2005;128:3407-12.
- [210] Drager LF, Bortolotto LA, Lorenzi MC, Figueiredo AC, Krieger EM, Lorenzi-Filho G. Early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:613-8.
- [211] Minoguchi K, Yokoe T, Tazaki T, Minoguchi H, Tanaka A, Oda N, et al. Increased carotid intima-media thickness and serum inflammatory markers in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:625-30.
- [212] Hayashi M, Fujimoto K, Urushibata K, Uchikawa S, Imamura H, Kubo K. Nocturnal oxygen desaturation correlates with the severity of coronary atherosclerosis in coronary artery disease. *Chest.* 2003;124:936-41.
- [213] Friedlander AH, Yueh R, Littner MR. The prevalence of calcified carotid artery atheromas in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *J Oral Maxillofac Surg.* 1998;56:950-4.
- [214] Arnaud C, Bouyon S, Recoquillon S, Brasseur S, Lemarie E, Briancon-Marjollet A, et al. Nonmuscle Myosin Light Chain Kinase: A Key Player in Intermittent Hypoxia-Induced Vascular Alterations. *J Am Heart Assoc.* 2018;7.

- [215] Castro-Grattoni AL, Alvarez-Buve R, Torres M, Farre R, Montserrat JM, Dalmases M, et al. Intermittent Hypoxia-Induced Cardiovascular Remodeling Is Reversed by Normoxia in a Mouse Model of Sleep Apnea. *Chest*. 2016;149:1400-8.
- [216] Arnaud C, Poulain L, Levy P, Dematteis M. Inflammation contributes to the atherogenic role of intermittent hypoxia in apolipoprotein-E knock out mice. *Atherosclerosis*. 2011;219:425-31.
- [217] Arnaud C, Beguin PC, Lantuejoul S, Pepin JL, Guillermet C, Pelli G, et al. The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184:724-31.
- [218] Gami AS, Olson EJ, Shen WK, Wright RS, Ballman KV, Hodge DO, et al. Obstructive sleep apnea and the risk of sudden cardiac death: a longitudinal study of 10,701 adults. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:610-6.
- [219] Gami AS, Howard DE, Olson EJ, Somers VK. Day-night pattern of sudden death in obstructive sleep apnea. *N Engl J Med*. 2005;352:1206-14.
- [220] Somers VK, White DP, Amin R, Abraham WT, Costa F, Culebras A, 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;118:1080-111.
- [221] Mehra R, Benjamin EJ, Shahar E, Gottlieb DJ, Nawabit R, Kirchner HL, et al. Association of nocturnal arrhythmias with sleep-disordered breathing: The Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:910-6.
- [222] May AM, Van Wagoner DR, Mehra R. OSA and Cardiac Arrhythmogenesis: Mechanistic Insights. *Chest*. 2017;151:225-41.
- [223] Morand J, Arnaud C, Pepin JL, Godin-Ribuot D. Chronic intermittent hypoxia promotes myocardial ischemia-related ventricular arrhythmias and sudden cardiac death. *Sci Rep*. 2018;8:2997.
- [224] Bober SL, Ciriello J, Jones DL. Atrial Arrhythmias and Autonomic Dysfunction in Rats Exposed to Chronic Intermittent Hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018.
- [225] Arzt M, Hetzenecker A, Steiner S, Buchner S. Sleep-Disordered Breathing and Coronary Artery Disease. *Can J Cardiol*. 2015;31:909-17.
- [226] Kuniyoshi FH, Garcia-Touchard A, Gami AS, Romero-Corral A, van der Walt C, Pusalavidyasagar S, et al. Day-night variation of acute myocardial infarction in obstructive sleep apnea. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:343-6.
- [227] Buchner S, Satz A, Debl K, Hetzenecker A, Luchner A, Husser O, et al. Impact of sleep-disordered breathing on myocardial salvage and infarct size in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2014;35:192-9.
- [228] Lee CH, Khoo SM, Chan MY, Wong HB, Low AF, Phua QH, et al. Severe obstructive sleep apnea and outcomes following myocardial infarction. *J Clin Sleep Med*. 2011;7:616-21.
- [229] Leao S, Conde B, Fontes P, Calvo T, Afonso A, Moreira I. Effect of Obstructive Sleep Apnea in Acute Coronary Syndrome. *Am J Cardiol*. 2016;117:1084-7.
- [230] Garcia-Rio F, Alonso-Fernandez A, Armada E, Mediano O, Lores V, Rojo B, et al. CPAP effect on recurrent episodes in patients with sleep apnea and myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2013;168:1328-35.

- [231] Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, Agusti AG. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet*. 2005;365:1046-53.
- [232] Beguin PC, Belaidi E, Godin-Ribuot D, Levy P, Ribuot C. Intermittent hypoxia-induced delayed cardioprotection is mediated by PKC and triggered by p38 MAP kinase and Erk1/2. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42:343-51.
- [233] Joyeux-Faure M, Stanke-Labesque F, Lefebvre B, Beguin P, Godin-Ribuot D, Ribuot C, et al. Chronic intermittent hypoxia increases infarction in the isolated rat heart. *J Appl Physiol (1985)*. 2005;98:1691-6.
- [234] Roca GQ, Redline S, Claggett B, Bello N, Ballantyne CM, Solomon SD, et al. Sex-Specific Association of Sleep Apnea Severity With Subclinical Myocardial Injury, Ventricular Hypertrophy, and Heart Failure Risk in a Community-Dwelling Cohort: The Atherosclerosis Risk in Communities-Sleep Heart Health Study. *Circulation*. 2015;132:1329-37.
- [235] Aslan K, Deniz A, Cayli M, Bozdemir H, Sarica Y, Seydaoglu G. Early left ventricular functional alterations in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Cardiol J*. 2013;20:519-25.
- [236] Hedner J, Ejnell H, Caidahl K. Left ventricular hypertrophy independent of hypertension in patients with obstructive sleep apnoea. *J Hypertens*. 1990;8:941-6.
- [237] Parker JD, Brooks D, Kozar LF, Render-Teixeira CL, Horner RL, Douglas Bradley T, et al. Acute and chronic effects of airway obstruction on canine left ventricular performance. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:1888-96.
- [238] Hayashi T, Yamashita C, Matsumoto C, Kwak CJ, Fujii K, Hirata 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:H2197-203.
- [239] Chen L, Zhang J, Hu X, Philipson KD, Scharf SM. The Na⁺/Ca²⁺ exchanger-1 mediates left ventricular dysfunction in mice with chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol (1985)*. 2010;109:1675-85.
- [240] Shahar E, Whitney CW, Redline S, Lee ET, Newman AB, Nieto FJ, et al. Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: cross-sectional results of the Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163:19-25.
- [241] Khayat R, Jarjoura D, Porter K, Sow A, Wannemacher J, Dohar R, et al. Sleep disordered breathing and post-discharge mortality in patients with acute heart failure. *Eur Heart J*. 2015;36:1463-9.
- [242] Lin YS, Liu PH, Chu PH. Obstructive Sleep Apnea Independently Increases the Incidence of Heart Failure and Major Adverse Cardiac Events: A Retrospective Population-Based Follow-Up Study. *Acta Cardiol Sin*. 2017;33:656-63.
- [243] Bradley TD, Floras JS. Sleep apnea and heart failure: Part I: obstructive sleep apnea. *Circulation*. 2003;107:1671-8.
- [244] Scala O, Paolillo S, Formisano R, Pellegrino T, Rengo G, Gargiulo P, et al. Sleep-disordered breathing, impaired cardiac adrenergic innervation and prognosis in heart failure. *Heart*. 2016.
- [245] Li S, Feng J, Wei S, Qian X, Cao J, Chen B. Delayed neutrophil apoptosis mediates intermittent hypoxia-induced progressive heart failure in pressure-overloaded rats. *Sleep Breath*. 2016;20:95-102.
- [246] Bisogni V, Pengo MF, Maiolino G, Rossi GP. The sympathetic nervous system and catecholamines metabolism in obstructive sleep apnoea. *J Thorac Dis*. 2016;8:243-54.
- [247] Mansukhani MP, Kara T, Caples SM, Somers VK. Chemoreflexes, sleep apnea, and sympathetic dysregulation. *Curr Hypertens Rep*. 2014;16:476.

- [248] Carlson JT, Hedner J, Elam M, Ejnell H, Sellgren J, Wallin BG. Augmented resting sympathetic activity in awake patients with obstructive sleep apnea. *Chest*. 1993;103:1763-8.
- [249] Ryan S, Ward S, Heneghan C, McNicholas WT. Predictors of decreased spontaneous baroreflex sensitivity in obstructive sleep apnea syndrome. *Chest*. 2007;131:1100-7.
- [250] Prabhakar NR, Kumar GK, Peng YJ. Sympatho-adrenal activation by chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* (1985). 2012;113:1304-10.
- [251] Usui K, Bradley TD, Spaak J, Ryan CM, Kubo T, Kaneko Y, et al. Inhibition of awake sympathetic nerve activity of heart failure patients with obstructive sleep apnea by nocturnal continuous positive airway pressure. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:2008-11.
- [252] Ohga E, Tomita T, Wada H, Yamamoto H, Nagase T, Ouchi Y. Effects of obstructive sleep apnea on circulating ICAM-1, IL-8, and MCP-1. *J Appl Physiol* (1985). 2003;94:179-84.
- [253] De Luca Canto G, Pacheco-Pereira C, Aydinov S, Major PW, Flores-Mir C, Gozal D. Diagnostic capability of biological markers in assessment of obstructive sleep apnea: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Sleep Med*. 2015;11:27-36.
- [254] Minoguchi K, Tazaki T, Yokoe T, Minoguchi H, Watanabe Y, Yamamoto M, et al. Elevated production of tumor necrosis factor-alpha by monocytes in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Chest*. 2004;126:1473-9.
- [255] Arnaud C, Dematteis M, Pepin JL, Baguet JP, Levy P. Obstructive sleep apnea, immuno-inflammation, and atherosclerosis. *Semin Immunopathol*. 2009;31:113-25.
- [256] Bouloukaki I, Mermigkis C, Tzanakis N, Kallergis E, Moniaki V, Mauroudi E, et al. Evaluation of Inflammatory Markers in a Large Sample of Obstructive Sleep Apnea Patients without Comorbidities. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:4573756.
- [257] Greenberg H, Ye X, Wilson D, Htoo AK, Hendersen T, Liu SF. Chronic intermittent hypoxia activates nuclear factor-kappaB in cardiovascular tissues in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;343:591-6.
- [258] Gras E, Belaidi E, Briancon-Marjollet A, Pepin JL, Arnaud C, Godin-Ribuot D. Endothelin-1 mediates intermittent hypoxia-induced inflammatory vascular remodeling through HIF-1 activation. *J Appl Physiol* (1985). 2016;120:437-43.
- [259] Murphy AM, Thomas A, Crinion SJ, Kent BD, Tambuwala MM, Fabre A, et al. Intermittent hypoxia in obstructive sleep apnoea mediates insulin resistance through adipose tissue inflammation. *Eur Respir J*. 2017;49.
- [260] Carreras A, Zhang SX, Almendros I, Wang Y, Peris E, Qiao Z, et al. Resveratrol attenuates intermittent hypoxia-induced macrophage migration to visceral white adipose tissue and insulin resistance in male mice. *Endocrinology*. 2015;156:437-43.
- [261] Dumitrascu R, Heitmann J, Seeger W, Weissmann N, Schulz R. Obstructive sleep apnea, oxidative stress and cardiovascular disease: lessons from animal studies. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:234631.
- [262] Schulz R, Mahmoudi S, Hattar K, Sibelius U, Olschewski H, Mayer K, et al. Enhanced release of superoxide from polymorphonuclear neutrophils in obstructive sleep apnea. Impact of continuous positive airway pressure therapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:566-70.
- [263] Dyugovskaya L, Lavie P, Lavie L. Increased adhesion molecules expression and production of reactive oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:934-9.
- [264] Del Ben M, Fabiani M, Loffredo L, Polimeni L, Carnevale R, Baratta F, et al. Oxidative stress mediated arterial dysfunction in patients with obstructive sleep apnoea

- and the effect of continuous positive airway pressure treatment. *BMC Pulm Med.* 2012;12:36.
- [265] Ramond A, Godin-Ribuot D, Ribuot C, Totoson P, Koritchneva I, Cachot S, et al. Oxidative stress mediates cardiac infarction aggravation induced by intermittent hypoxia. *Fundam Clin Pharmacol.* 2013;27:252-61.
- [266] Alonso-Fernandez A, Garcia-Rio F, Arias MA, Hernanz A, de la Pena M, Pierola J, et al. Effects of CPAP on oxidative stress and nitrate efficiency in sleep apnoea: a randomised trial. *Thorax.* 2009;64:581-6.
- [267] Varadharaj S, Porter K, Pleister A, Wannemacher J, Sow A, Jarjoura D, et al. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling: a novel pathway in OSA induced vascular endothelial dysfunction. *Respir Physiol Neurobiol.* 2015;207:40-7.
- [268] Yuan X, Zhu D, Guo XL, Deng Y, Shang J, Liu K, et al. Telmisartan attenuates myocardial apoptosis induced by chronic intermittent hypoxia in rats: modulation of nitric oxide metabolism and inflammatory mediators. *Sleep Breath.* 2015;19:703-9.
- [269] Lavie L, Vishnevsky A, Lavie P. Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. *Sleep.* 2004;27:123-8.
- [270] Xie J, Jiang J, Shi K, Zhang T, Zhu T, Chen H, et al. DNA damage in peripheral blood lymphocytes from patients with OSAHS. *Sleep Breath.* 2014;18:775-80.
- [271] Monneret D, Pepin JL, Godin-Ribuot D, Ducros V, Baguet JP, Levy P, et al. Association of urinary 15-F_{2t}-isoprostane level with oxygen desaturation and carotid intima-media thickness in nonobese sleep apnea patients. *Free Radic Biol Med.* 2010;48:619-25.
- [272] Li J, Savransky V, Nanayakkara A, Smith PL, O'Donnell CP, Polotsky VY. Hyperlipidemia and lipid peroxidation are dependent on the severity of chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol (1985).* 2007;102:557-63.
- [273] Christou K, Moulas AN, Pastaka C, Gourgoulianis KI. Antioxidant capacity in obstructive sleep apnea patients. *Sleep Med.* 2003;4:225-8.
- [274] Faure P, Tamisier R, Baguet JP, Favier A, Halimi S, Levy P, et al. Impairment of serum albumin antioxidant properties in obstructive sleep apnoea syndrome. *Eur Respir J.* 2008;31:1046-53.
- [275] Barcelo A, Barbe F, de la Pena M, Vila M, Perez G, Pierola J, et al. Antioxidant status in patients with sleep apnoea and impact of continuous positive airway pressure treatment. *Eur Respir J.* 2006;27:756-60.
- [276] Wysocka E, Cofta S, Cymerys M, Gozdzik J, Torlinski L, Batura-Gabryel H. The impact of the sleep apnea syndrome on oxidant-antioxidant balance in the blood of overweight and obese patients. *J Physiol Pharmacol.* 2008;59 Suppl 6:761-9.
- [277] Shi J, Yuan Y, Deng X, Pan Y, He M, Liu G, et al. Metoprolol has a similar therapeutic effect as amlodipine on BP lowering in hypertensive patients with obstructive sleep apnea. *Sleep Breath.* 2018.
- [278] Wolf J, Drozdowski J, Czechowicz K, Winklewski PJ, Jassem E, Kara T, et al. Effect of beta-blocker therapy on heart rate response in patients with hypertension and newly diagnosed untreated obstructive sleep apnea syndrome. *Int J Cardiol.* 2016;202:67-72.
- [279] Tingting X, Danming Y, Xin C. Non-surgical treatment of obstructive sleep apnea syndrome. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2018;275:335-46.
- [280] Farias JG, Herrera EA, Carrasco-Pozo C, Sotomayor-Zarate R, Cruz G, Morales P, et al. Pharmacological models and approaches for pathophysiological conditions associated with hypoxia and oxidative stress. *Pharmacol Ther.* 2016;158:1-23.

- [281] Semenza GL, Koury ST, Nejfelt MK, Gearhart JD, Antonarakis SE. Cell-type-specific and hypoxia-inducible expression of the human erythropoietin gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:8725-9.
- [282] Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology (Bethesda)*. 2009;24:97-106.
- [283] Semenza GL. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda)*. 2004;19:176-82.
- [284] Hirota K, Semenza GL. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 by prolyl and asparaginyl hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;338:610-6.
- [285] Lieb ME, Menzies K, Moschella MC, Ni R, Taubman MB. Mammalian EGLN genes have distinct patterns of mRNA expression and regulation. *Biochem Cell Biol*. 2002;80:421-6.
- [286] Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999;399:271-5.
- [287] Okumura F, Matsuzaki M, Nakatsukasa K, Kamura T. The Role of Elongin BC-Containing Ubiquitin Ligases. *Front Oncol*. 2012;2:10.
- [288] Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev*. 2001;15:2675-86.
- [289] Schodel J, Oikonomopoulos S, Ragoussis J, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR. High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood*. 2011;117:e207-17.
- [290] Koyasu S, Kobayashi M, Goto Y, Hiraoka M, Harada H. Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: Two decades of knowledge. *Cancer Sci*. 2018;109:560-71.
- [291] Tian YM, Yeoh KK, Lee MK, Eriksson T, Kessler BM, Kramer HB, et al. Differential sensitivity of hypoxia inducible factor hydroxylation sites to hypoxia and hydroxylase inhibitors. *J Biol Chem*. 2011;286:13041-51.
- [292] Liu YV, Semenza GL. RACK1 vs. HSP90: competition for HIF-1 alpha degradation vs. stabilization. *Cell Cycle*. 2007;6:656-9.
- [293] Yuan G, Nanduri J, Bhasker CR, Semenza GL, Prabhakar NR. Ca²⁺/calmodulin kinase-dependent activation of hypoxia inducible factor 1 transcriptional activity in cells subjected to intermittent hypoxia. *J Biol Chem*. 2005;280:4321-8.
- [294] Yuan G, Nanduri J, Khan S, Semenza GL, Prabhakar NR. Induction of HIF-1alpha expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca²⁺ signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR. *J Cell Physiol*. 2008;217:674-85.
- [295] Belaidi E, Morand J, Gras E, Pepin JL, Godin-Ribuot D. Targeting the ROS-HIF-1-endothelin axis as a therapeutic approach for the treatment of obstructive sleep apnea-related cardiovascular complications. *Pharmacol Ther*. 2016;168:1-11.
- [296] Cahan C, Decker MJ, Arnold JL, Goldwasser E, Strohl KP. Erythropoietin levels with treatment of obstructive sleep apnea. *J Appl Physiol (1985)*. 1995;79:1278-85.
- [297] Ciftci TU, Kokturk O, Demirtas S, Gulbahar O, Bukan N. Consequences of hypoxia-reoxygenation phenomena in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Ann Saudi Med*. 2011;31:14-8.
- [298] Gozal D, Lipton AJ, Jones KL. Circulating vascular endothelial growth factor levels in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep*. 2002;25:59-65.

- [299] Schulz R, Hummel C, Heinemann S, Seeger W, Grimminger F. Serum levels of vascular endothelial growth factor are elevated in patients with obstructive sleep apnea and severe nighttime hypoxia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:67-70.
- [300] Kaczmarek E, Bakker JP, Clarke DN, Csizmadia E, Kocher O, Veves A, et al. Molecular biomarkers of vascular dysfunction in obstructive sleep apnea. *PLoS One.* 2013;8:e70559.
- [301] Lu D, Li N, Yao X, Zhou L. Potential inflammatory markers in obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Bosn J Basic Med Sci.* 2017;17:47-53.
- [302] Belaidi E, Beguin PC, Levy P, Ribuot C, Godin-Ribuot D. Prevention of HIF-1 activation and iNOS gene targeting by low-dose cadmium results in loss of myocardial hypoxic preconditioning in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294:H901-8.
- [303] Guo H, Cao J, Li J, Yang X, Jiang J, Feng J, et al. Lymphocytes from intermittent hypoxia-exposed rats increase the apoptotic signals in endothelial cells via oxidative and inflammatory injury in vitro. *Sleep Breath.* 2015;19:969-76.
- [304] Wu J, Sun X, Wu Q, Li H, Li L, Feng J, et al. Disrupted intestinal structure in a rat model of intermittent hypoxia. *Mol Med Rep.* 2016;13:4407-13.
- [305] Wang ZF, Kang J, Dai B. [Expression and activation of hypoxia inducible factor-1alpha and iNOS in the brain of rats with chronic intermittent hypoxia]. *Zhonghua Jie He Hu Xi Za Zhi.* 2009;32:739-43.
- [306] da Rosa DP, Forgiarini LF, Baronio D, Feijo CA, Martinez D, Marroni NP. Simulating sleep apnea by exposure to intermittent hypoxia induces inflammation in the lung and liver. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:879419.
- [307] Peng YJ, Yuan G, Ramakrishnan D, Sharma SD, Bosch-Marce M, Kumar GK, 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;577:705-16.
- [308] Ding W, Zhang X, Huang H, Ding N, Zhang S, Hutchinson SZ, et al. Adiponectin protects rat myocardium against chronic intermittent hypoxia-induced injury via inhibition of endoplasmic reticulum stress. *PLoS One.* 2014;9:e94545.
- [309] Zhou S, Yin X, Zheng Y, Miao X, Feng W, Cai J, 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;227:113-23.
- [310] Cai XH, Li XC, Jin SW, Liang DS, Wen ZW, Cao HC, et al. Endoplasmic reticulum stress plays critical role in brain damage after chronic intermittent hypoxia in growing rats. *Exp Neurol.* 2014;257:148-56.
- [311] Zhu Y, Fenik P, Zhan G, Sanfillipo-Cohn B, Naidoo N, Veasey SC. Eif-2a protects brainstem motoneurons in a murine model of sleep apnea. *J Neurosci.* 2008;28:2168-78.
- [312] Chou YT, Zhan G, Zhu Y, Fenik P, Panossian L, Li Y, et al. C/EBP homologous binding protein (CHOP) underlies neural injury in sleep apnea model. *Sleep.* 2013;36:481-92.
- [313] Belaidi E, Thomas A, Bourdier G, Moulin S, Lemarie E, Levy P, 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;210:45-53.
- [314] Valsecchi V, Pignataro G, Del Prete A, Sirabella R, Matrone C, Boscia F, et al. NCX1 is a novel target gene for hypoxia-inducible factor-1 in ischemic brain preconditioning. *Stroke.* 2011;42:754-63.
- [315] Brahimi-Horn MC, Ben-Hail D, Ilie M, Gounon P, Rouleau M, Hofman V, et al. Expression of a truncated active form of VDAC1 in lung cancer associates with hypoxic

cell survival and correlates with progression to chemotherapy resistance. *Cancer Res.* 2012;72:2140-50.

[316] Ronkainen VP, Skoumal R, Tavi P. Hypoxia and HIF-1 suppress SERCA2a expression in embryonic cardiac myocytes through two interdependent hypoxia response elements. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;50:1008-16.

[317] Yoo W, Noh KH, Ahn JH, Yu JH, Seo JA, Kim SG, et al. HIF-1 α expression as a protective strategy of HepG2 cells against fatty acid-induced toxicity. *J Cell Biochem.* 2014;115:1147-58.

[318] Khan SA, Nanduri J, Yuan G, Kinsman B, Kumar GK, Joseph J, et al. NADPH oxidase 2 mediates intermittent hypoxia-induced mitochondrial complex I inhibition: relevance to blood pressure changes in rats. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14:533-42.

[319] Douglas RM, Ryu J, Kanaan A, Del Carmen Rivero M, Dugan LL, Haddad GG, et al. Neuronal death during combined intermittent hypoxia/hypercapnia is due to mitochondrial dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010;298:C1594-602.

[320] Shan X, Chi L, Ke Y, Luo C, Qian S, Gozal D, et al. Manganese superoxide dismutase protects mouse cortical neurons from chronic intermittent hypoxia-mediated oxidative damage. *Neurobiol Dis.* 2007;28:206-15.

[321] Peng YJ, Overholt JL, Kline D, Kumar GK, Prabhakar NR. 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;100:10073-8.

[322] Huang H, Jiang X, Dong Y, Zhang X, Ding N, Liu J, et al. Adiponectin alleviates genioglossal mitochondrial dysfunction in rats exposed to intermittent hypoxia. *PLoS One.* 2014;9:e109284.

[323] Semenza GL. Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *N Engl J Med.* 2011;365:537-47.

[324] Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell.* 2007;129:111-22.

[325] Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, et al. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev.* 1998;12:149-62.

[326] Lum JJ, Bui T, Gruber M, Gordan JD, DeBerardinis RJ, Covello KL, et al. The transcription factor HIF-1 α plays a critical role in the growth factor-dependent regulation of both aerobic and anaerobic glycolysis. *Genes Dev.* 2007;21:1037-49.

[327] Seagroves TN, Ryan HE, Lu H, Wouters BG, Knapp M, Thibault P, et al. Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 2001;21:3436-44.

[328] Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* 2006;3:187-97.

[329] Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 2006;3:177-85.

[330] Zhang H, Gao P, Fukuda R, Kumar G, Krishnamachary B, Zeller KI, et al. HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell.* 2007;11:407-20.

[331] Bae MK, Kim SH, Jeong JW, Lee YM, Kim HS, Kim SR, et al. Curcumin inhibits hypoxia-induced angiogenesis via down-regulation of HIF-1. *Oncol Rep.* 2006;15:1557-62.

- [332] Lou S, Wang Y, Yu Z, Guan K, Kan Q. Curcumin induces apoptosis and inhibits proliferation in infantile hemangioma endothelial cells via downregulation of MCL-1 and HIF-1alpha. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97:e9562.
- [333] Khan MN, Haggag YA, Lane ME, McCarron PA, Tambuwala MM. Polymeric Nano-Encapsulation of Curcumin Enhances its Anti-Cancer Activity in Breast (MDA-MB231) and Lung (A549) Cancer Cells Through Reduction in Expression of HIF-1alpha and Nuclear p65 (Rel A). *Curr Drug Deliv*. 2018;15:286-95.
- [334] Du Y, Long Q, Zhang L, Shi Y, Liu X, Li X, et al. Curcumin inhibits cancer-associated fibroblast-driven prostate cancer invasion through MAOA/mTOR/HIF-1alpha signaling. *Int J Oncol*. 2015;47:2064-72.
- [335] Zhao Y, Ma X, Wang J, He X, Hu Y, Zhang P, et al. Curcumin protects against CCl4-induced liver fibrosis in rats by inhibiting HIF-1alpha through an ERK-dependent pathway. *Molecules*. 2014;19:18767-80.
- [336] Duan W, Chang Y, Li R, Xu Q, Lei J, Yin C, et al. Curcumin inhibits hypoxia inducible factor1alpha-induced epithelialmesenchymal transition in HepG2 hepatocellular carcinoma cells. *Mol Med Rep*. 2014;10:2505-10.
- [337] Shan B, Schaaf C, Schmidt A, Lucia K, Buchfelder M, Losa M, et al. Curcumin suppresses HIF1A synthesis and VEGFA release in pituitary adenomas. *J Endocrinol*. 2012;214:389-98.
- [338] Ye MX, Zhao YL, Li Y, Miao Q, Li ZK, Ren XL, et al. Curcumin reverses cis-platin resistance and promotes human lung adenocarcinoma A549/DDP cell apoptosis through HIF-1alpha and caspase-3 mechanisms. *Phytomedicine*. 2012;19:779-87.
- [339] Priyanka A, Anusree SS, Nisha VM, Raghu KG. Curcumin improves hypoxia induced dysfunctions in 3T3-L1 adipocytes by protecting mitochondria and down regulating inflammation. *Biofactors*. 2014;40:513-23.
- [340] Scull CM, Tabas I. Mechanisms of ER stress-induced apoptosis in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:2792-7.
- [341] Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. 2004;306:457-61.
- [342] 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*. 2016;310:H279-89.
- [343] Zhou X, Tang S, Hu K, Zhang Z, Liu P, Luo Y, et al. DL-Propargylglycine protects against myocardial injury induced by chronic intermittent hypoxia through inhibition of endoplasmic reticulum stress. *Sleep Breath*. 2018.
- [344] Ren J, Liu W, Deng Y, Li GC, Pan YY, Xie S, et al. Losartan attenuates aortic endothelial apoptosis induced by chronic intermittent hypoxia partly via the phospholipase C pathway. *Sleep Breath*. 2017;21:679-89.
- [345] Xu LH, Xie H, Shi ZH, Du LD, Wing YK, Li AM, et al. Critical Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Chronic Intermittent Hypoxia-Induced Deficits in Synaptic Plasticity and Long-Term Memory. *Antioxid Redox Signal*. 2015;23:695-710.
- [346] Lam CS, Tipoe GL, So KF, Fung ML. Neuroprotective mechanism of Lycium barbarum polysaccharides against hippocampal-dependent spatial memory deficits in a rat model of obstructive sleep apnea. *PLoS One*. 2015;10:e0117990.
- [347] Hou Y, Yang H, Cui Z, Tai X, Chu Y, Guo X. Tauroursodeoxycholic acid attenuates endoplasmic reticulum stress and protects the liver from chronic intermittent hypoxia induced injury. *Exp Ther Med*. 2017;14:2461-8.

- [348] Khalyfa A, Qiao Z, Gileles-Hillel A, Khalyfa AA, Akbarpour M, Popko B, et al. Activation of the Integrated Stress Response and Metabolic Dysfunction in a Murine Model of Sleep Apnea. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2017;57:477-86.
- [349] Ding W, Cai Y, Wang W, Ji L, Dong Y, Zhang X, et al. Adiponectin protects the kidney against chronic intermittent hypoxia-induced injury through inhibiting endoplasmic reticulum stress. *Sleep Breath*. 2016;20:1069-74.
- [350] Fu HY, Minamino T, Tsukamoto O, Sawada T, Asai M, Kato H, et al. Overexpression of endoplasmic reticulum-resident chaperone attenuates cardiomyocyte death induced by proteasome inhibition. *Cardiovasc Res*. 2008;79:600-10.
- [351] Ameri K, Harris AL. Activating transcription factor 4. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40:14-21.
- [352] Kars M, Yang L, Gregor MF, Mohammed BS, Pietka TA, Finck BN, et al. Tauroursodeoxycholic Acid may improve liver and muscle but not adipose tissue insulin sensitivity in obese men and women. *Diabetes*. 2010;59:1899-905.
- [353] Fernandez-Sanchez L, Bravo-Osuna I, Lax P, Arranz-Romera A, Maneu V, Esteban-Perez S, et al. Controlled delivery of tauroursodeoxycholic acid from biodegradable microspheres slows retinal degeneration and vision loss in P23H rats. *PLoS One*. 2017;12:e0177998.
- [354] Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13:566-78.
- [355] Fernandez-Sanz C, Ruiz-Meana M, Miro-Casas E, Nunez E, Castellano J, Loureiro M, et al. Defective sarcoplasmic reticulum-mitochondria calcium exchange in aged mouse myocardium. *Cell Death Dis*. 2014;5:e1573.
- [356] Gutierrez T, Parra V, Troncoso R, Pennanen C, Contreras-Ferrat A, Vasquez-Trincado C, et al. Alteration in mitochondrial Ca(2+) uptake disrupts insulin signaling in hypertrophic cardiomyocytes. *Cell Commun Signal*. 2014;12:68.
- [357] Wagner S, Seidler T, Picht E, Maier LS, Kazanski V, Teucher N, et al. Na(+)-Ca(2+) exchanger overexpression predisposes to reactive oxygen species-induced injury. *Cardiovasc Res*. 2003;60:404-12.
- [358] Mylonis I, Kourti M, Samiotaki M, Panayotou G, Simos G. Mortalin-mediated and ERK-controlled targeting of HIF-1alpha to mitochondria confers resistance to apoptosis under hypoxia. *J Cell Sci*. 2017;130:466-79.
- [359] Holscher M, Schafer K, Krull S, Farhat K, Hesse A, Silter M, et al. Unfavourable consequences of chronic cardiac HIF-1alpha stabilization. *Cardiovasc Res*. 2012;94:77-86.
- [360] Hudecova S, Lencesova L, Csaderova L, Sirova M, Cholujova D, Cagala M, et al. Chemically mimicked hypoxia modulates gene expression and protein levels of the sodium calcium exchanger in HEK 293 cell line via HIF-1alpha. *Gen Physiol Biophys*. 2011;30:196-206.
- [361] Fuhrmann DC, Brune B. Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia. *Redox Biol*. 2017;12:208-15.
- [362] Yuan G, Adhikary G, McCormick AA, Holcroft JJ, Kumar GK, Prabhakar NR. Role of oxidative stress in intermittent hypoxia-induced immediate early gene activation in rat PC12 cells. *J Physiol*. 2004;557:773-83.
- [363] Peng Y, Yuan G, Overholt JL, Kumar GK, Prabhakar NR. Systemic and cellular responses to intermittent hypoxia: evidence for oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Adv Exp Med Biol*. 2003;536:559-64.
- [364] Yuan G, Peng Y, Reddy VD, Makarenko VV, Nanduri J, Khan SA, et al. Mutual antagonism between hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha regulates oxygen

- sensing and cardio-respiratory homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:E1788-96.
- [365] Finck BN, Gropler MC, Chen Z, Leone TC, Croce MA, Harris TE, et al. Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1 α /PPAR α regulatory pathway. *Cell Metab*. 2006;4:199-210.
- [366] Han Q, Li G, Ip MS, Zhang Y, Zhen Z, Mak JC, et al. Haemin attenuates intermittent hypoxia-induced cardiac injury via inhibiting mitochondrial fission. *J Cell Mol Med*. 2018;22:2717-26.
- [367] Chen Y, Liu Y, Dorn GW, 2nd. Mitochondrial fusion is essential for organelle function and cardiac homeostasis. *Circ Res*. 2011;109:1327-31.
- [368] Marsboom G, Toth PT, Ryan JJ, Hong Z, Wu X, Fang YH, et al. Dynamin-related protein 1-mediated mitochondrial mitotic fission permits hyperproliferation of vascular smooth muscle cells and offers a novel therapeutic target in pulmonary hypertension. *Circ Res*. 2012;110:1484-97.
- [369] Kroemer G, Marino G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*. 2010;40:280-93.
- [370] Chen R, Jiang T, She Y, Xu J, Li C, Zhou S, et al. Effects of Cobalt Chloride, a Hypoxia-Mimetic Agent, on Autophagy and Atrophy in Skeletal C2C12 Myotubes. *Biomed Res Int*. 2017;2017:7097580.
- [371] Hanna RA, Quinsay MN, Orogo AM, Giang K, Rikka S, Gustafsson AB. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy. *J Biol Chem*. 2012;287:19094-104.
- [372] Kubli DA, Cortez MQ, Moyzis AG, Najor RH, Lee Y, Gustafsson AB. PINK1 Is Dispensable for Mitochondrial Recruitment of Parkin and Activation of Mitophagy in Cardiac Myocytes. *PLoS One*. 2015;10:e0130707.
- [373] Zhang T, Xue L, Li L, Tang C, Wan Z, Wang R, et al. BNIP3 Protein Suppresses PINK1 Kinase Proteolytic Cleavage to Promote Mitophagy. *J Biol Chem*. 2016;291:21616-29.
- [374] Daskalopoulos EP, Dufeys C, Beauloye C, Bertrand L, Horman S. AMPK in Cardiovascular Diseases. *EXS*. 2016;107:179-201.
- [375] Xie S, Deng Y, Pan YY, Ren J, Jin M, Wang Y, et al. Chronic intermittent hypoxia induces cardiac hypertrophy by impairing autophagy through the adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase pathway. *Arch Biochem Biophys*. 2016;606:41-52.
- [376] Russell RR, 3rd, Li J, Coven DL, Pypaert M, Zechner C, Palmeri M, et al. AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *J Clin Invest*. 2004;114:495-503.
- [377] Zarrinpashneh E, Carjaval K, Beauloye C, Ginion A, Mateo P, Pouleur AC, et al. Role of the α 2-isoform of AMP-activated protein kinase in the metabolic response of the heart to no-flow ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291:H2875-83.
- [378] Carvajal K, Zarrinpashneh E, Szarszoi O, Joubert F, Athea Y, Mateo P, et al. Dual cardiac contractile effects of the α 2-AMPK deletion in low-flow ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H3136-47.
- [379] Oidor-Chan VH, Hong E, Perez-Severiano F, Montes S, Torres-Narvaez JC, Del Valle-Mondragon L, et al. Fenofibrate plus Metformin Produces Cardioprotection in a Type 2 Diabetes and Acute Myocardial Infarction Model. *PPAR Res*. 2016;2016:8237264.

- [380] Whittington HJ, Hall AR, McLaughlin CP, Hausenloy DJ, Yellon DM, Mocanu MM. Chronic metformin associated cardioprotection against infarction: not just a glucose lowering phenomenon. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2013;27:5-16.
- [381] Izzo A, Nitti M, Mollo N, Paladino S, Procaccini C, Faicchia D, et al. Metformin restores the mitochondrial network and reverses mitochondrial dysfunction in Down syndrome cells. *Hum Mol Genet.* 2017;26:1056-69.
- [382] Li A, Zhang S, Li J, Liu K, Huang F, Liu B. Metformin and resveratrol inhibit Drp1-mediated mitochondrial fission and prevent ER stress-associated NLRP3 inflammasome activation in the adipose tissue of diabetic mice. *Mol Cell Endocrinol.* 2016;434:36-47.
- [383] Wang Q, Zhang M, Torres G, Wu S, Ouyang C, Xie Z, et al. Metformin Suppresses Diabetes-Accelerated Atherosclerosis via the Inhibition of Drp1-Mediated Mitochondrial Fission. *Diabetes.* 2017;66:193-205.
- [384] Park CW, Hong SM, Kim ES, Kwon JH, Kim KT, Nam HG, et al. BNIP3 is degraded by ULK1-dependent autophagy via MTORC1 and AMPK. *Autophagy.* 2013;9:345-60.
- [385] El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Averet N, Rigoulet M, Leverve X. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem.* 2000;275:223-8.
- [386] Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J.* 2000;348 Pt 3:607-14.
- [387] Tyszka-Czochara M, Lasota M, Majka M. Caffeic Acid and Metformin Inhibit Invasive Phenotype Induced by TGF-beta1 in C-4I and HTB-35/SiHa Human Cervical Squamous Carcinoma Cells by Acting on Different Molecular Targets. *Int J Mol Sci.* 2018;19.
- [388] Qi X, Xu W, Xie J, Wang Y, Han S, Wei Z, et al. Metformin sensitizes the response of oral squamous cell carcinoma to cisplatin treatment through inhibition of NF-kappaB/HIF-1alpha signal axis. *Sci Rep.* 2016;6:35788.
- [389] Li X, Li J, Wang L, Li A, Qiu Z, Qi LW, et al. The role of metformin and resveratrol in the prevention of hypoxia-inducible factor 1alpha accumulation and fibrosis in hypoxic adipose tissue. *Br J Pharmacol.* 2016;173:2001-15.
- [390] Wang JC, Li GY, Li PP, Sun X, Li WM, Li Y, et al. Suppression of hypoxia-induced excessive angiogenesis by metformin via elevating tumor blood perfusion. *Oncotarget.* 2017;8:73892-904.
- [391] Guimaraes TA, Farias LC, Santos ES, de Carvalho Fraga CA, Orsini LA, de Freitas Teles L, et al. Metformin increases PDH and suppresses HIF-1alpha under hypoxic conditions and induces cell death in oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7:55057-68.
- [392] Zhou X, Chen J, Yi G, Deng M, Liu H, Liang M, et al. Metformin suppresses hypoxia-induced stabilization of HIF-1alpha through reprogramming of oxygen metabolism in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7:873-84.
- [393] Tadakawa M, Takeda T, Li B, Tsuiji K, Yaegashi N. The anti-diabetic drug metformin inhibits vascular endothelial growth factor expression via the mammalian target of rapamycin complex 1/hypoxia-inducible factor-1alpha signaling pathway in ELT-3 cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;399:1-8.
- [394] Park AM, Suzuki YJ. Effects of intermittent hypoxia on oxidative stress-induced myocardial damage in mice. *J Appl Physiol (1985).* 2007;102:1806-14.
- [395] 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.* 2011;111:1939-50.

- [396] Choi H, Chun YS, Kim SW, Kim MS, Park JW. Curcumin inhibits hypoxia-inducible factor-1 by degrading aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator: a mechanism of tumor growth inhibition. *Mol Pharmacol*. 2006;70:1664-71.
- [397] Zhou H, Beevers CS, Huang S. The targets of curcumin. *Curr Drug Targets*. 2011;12:332-47.
- [398] Mito S, Watanabe K, Harima M, Thandavarayan RA, Veeraveedu PT, Sukumaran V, et al. Curcumin ameliorates cardiac inflammation in rats with autoimmune myocarditis. *Biol Pharm Bull*. 2011;34:974-9.
- [399] Pongchaidecha A, Lailerd N, Boonprasert W, Chattipakorn N. Effects of curcuminoid supplement on cardiac autonomic status in high-fat-induced obese rats. *Nutrition*. 2009;25:870-8.
- [400] Xu P, Yao Y, Guo P, Wang T, Yang B, Zhang Z. Curcumin protects rat heart mitochondria against anoxia-reoxygenation induced oxidative injury. *Can J Physiol Pharmacol*. 2013;91:715-23.
- [401] Soltani A, Salmaninejad A, Jalili-Nik M, Soleimani A, Javid H, Hashemy SI, et al. 5'-Adenosine monophosphate-activated protein kinase: A potential target for disease prevention by curcumin. *J Cell Physiol*. 2018.
- [402] Wang B, Li W, Jin H, Nie X, Shen H, Li E, et al. Curcumin attenuates chronic intermittent hypoxia-induced brain injuries by inhibiting AQP4 and p38 MAPK pathway. *Respir Physiol Neurobiol*. 2018;255:50-7.
- [403] Mokhtari-Zaer A, Marefati N, Atkin SL, Butler AE, Sahebkar A. The protective role of curcumin in myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Cell Physiol*. 2018.
- [404] Liu W, Zhai Y, Heng X, Che FY, Chen W, Sun D, et al. Oral bioavailability of curcumin: problems and advancements. *J Drug Target*. 2016;24:694-702.

ANNEXE

Annexe 1 :

Etude réalisée pendant mon Master 2 et finalisée au début de ma thèse

Rôle du stress du réticulum endoplasmique dans l'activation de HIF-1 et l'augmentation de la taille d'infarctus induits par l'HI chronique

Publication:

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.

Belaidi E, Thomas A*, Bourdier G*, **Moulin S**, Lemarié E, Levy P, Pépin JL, Korichneva I, Godin-Ribuot D, Arnaud C.

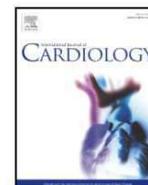
International Journal of Cardiology. 2016 May 1;210:45-53. [4.034]

L'hypoxie intermittente (HI) chronique augmente la taille de l'infarctus du myocarde après ischémie-reperfusion. De plus, Belaidi E et al. ont montré une activation du facteur de transcription *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1) dans le myocarde d'animaux soumis à l'HI. Un des mécanismes susceptibles d'expliquer la vulnérabilité du cœur à l'ischémie-reperfusion est le stress du réticulum endoplasmique (RE). D'ailleurs, les résultats d'une étude sur l'impact de l'HI au niveau cérébral suggèrent un lien entre le stress du RE et HIF-1. Les objectifs de ce travail ont donc été de déterminer si l'HI entraîne des altérations de l'homéostasie calcique liées à un stress du RE myocardique, mais également d'identifier si ce stress du RE peut être à l'origine d'une activation de HIF-1. Enfin, l'implication de ces mécanismes cellulaires dans l'augmentation de la taille d'infarctus par l'HI a été évaluée.

Des souris C57bl6/j et Swiss/SV129 (HIF-1 α ^{+/-} et leurs contrôles *wild-type*, WT), ont été exposées à 14 jours d'HI ou de normoxie (N). L'activation de HIF-1, les flux calciques inter-organites sur cardiomyocytes isolés, le stress du RE et la taille d'infarctus suite à une ischémie-reperfusion *in vivo* ont été mesurés. Les effets de l'acide tauroursodésoxycholique (TUDCA, 75 mg/kg/jour, injection intrapéritonéale) sur la taille de l'infarctus et l'activation de HIF-1 ont également été évalués. Chez les souris HIF-1 α ^{+/-}, la taille d'infarctus a été quantifiée.

L'HI exacerbe l'accumulation de calcium dans le RE suite à sa vidange et elle induit un stress du RE et une activation de HIF-1 associés à une augmentation de la taille d'infarctus. Le traitement au TUDCA et la délétion partielle de HIF-1 α abolissent l'effet délétère de l'HI en termes de taille d'infarctus. De plus, le traitement au TUDCA empêche l'activation de HIF-1 par l'HI.

En conclusion, l'HI entraîne des perturbations de l'homéostasie calcique liées à un stress du RE, lui-même responsable d'une activation de HIF-1 et d'une aggravation de la taille de l'infarctus suite à un protocole d'ischémie-reperfusion myocardique.



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

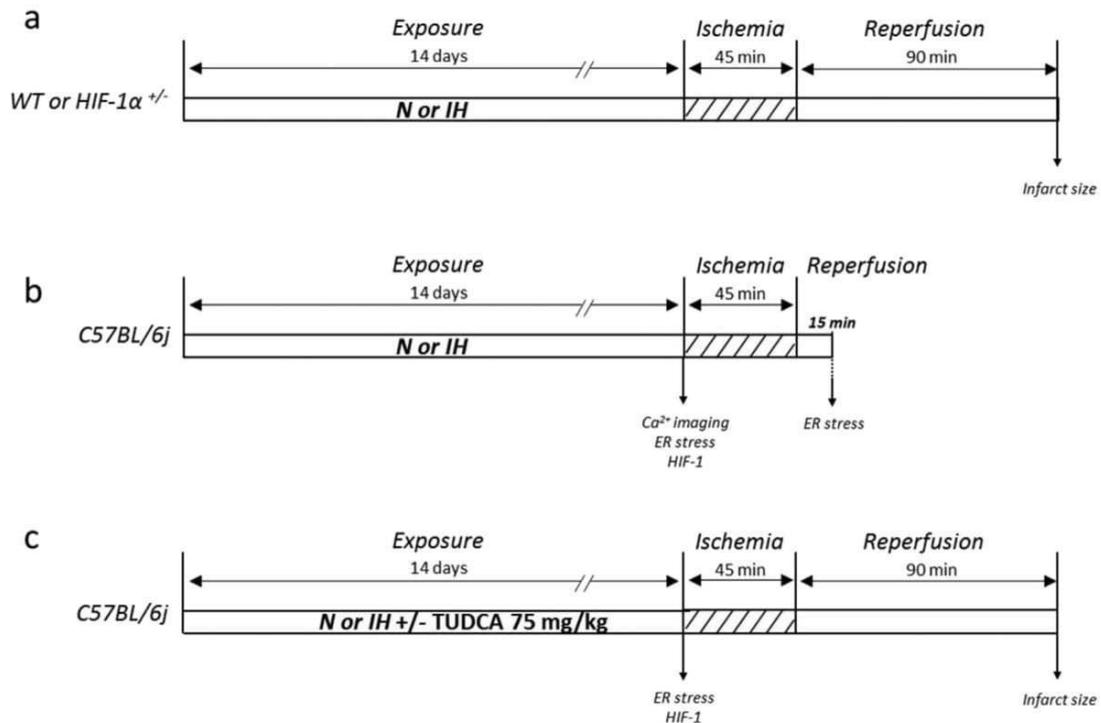


Fig. 1. Experimental design. (a) Wild-type (WT) and HIF-1 α ^{+/-} mice were randomly submitted to intermittent hypoxia (IH) or air (N) during 14 days, followed by an *in vivo* ischemia (45 min)-reperfusion (90 min) (I/R) protocol to measure infarct size. (b, c) C57BL/6j mice were exposed to 14 days 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'GTGCAGGCCAGTTGTACC3'/3'TCTGGGTAGACCTCTGGGAG5' for total Xbp1, 5'CAGACTATGTGCACCTCTGC3'/3'TCTGGGTAGACCTCTGGGAG5' for unspliced Xbp1, 5'ACGATGAACATCAAGTCAGCAACG3'/3'TCACAAATCAGCACCAGCAG5' for HIF-1 α and 5'TCTTTGCTGACCTGCTGGATTACAT3'/3'CCAGGGAAAGCAAAGTTTGCATT5' 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

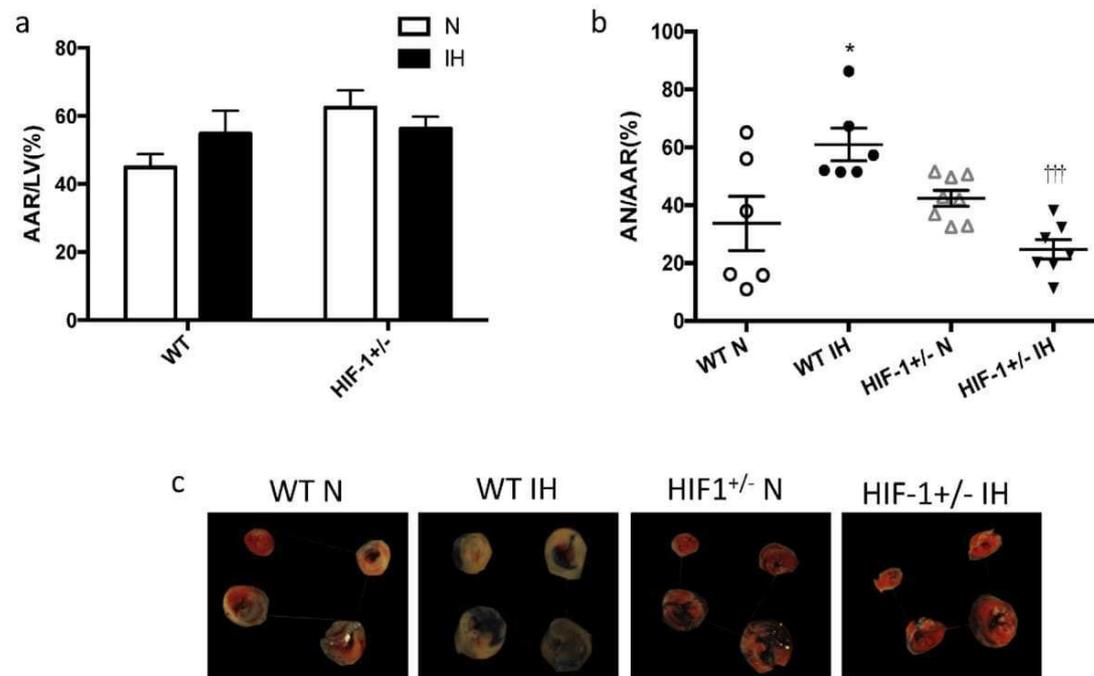


Fig. 2. HIF-1 is involved in chronic intermittent hypoxia (IH)-induced increase in myocardial infarct size. *In vivo* ischemia (45 min)-reperfusion (90 min) was performed in wild-type (WT) and HIF-1 α ^{+/-} mice, submitted to IH or N. (a) Area at risk (AAR) relative to left ventricle (LV) and (b) area 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. S1a–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. S2c, 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.

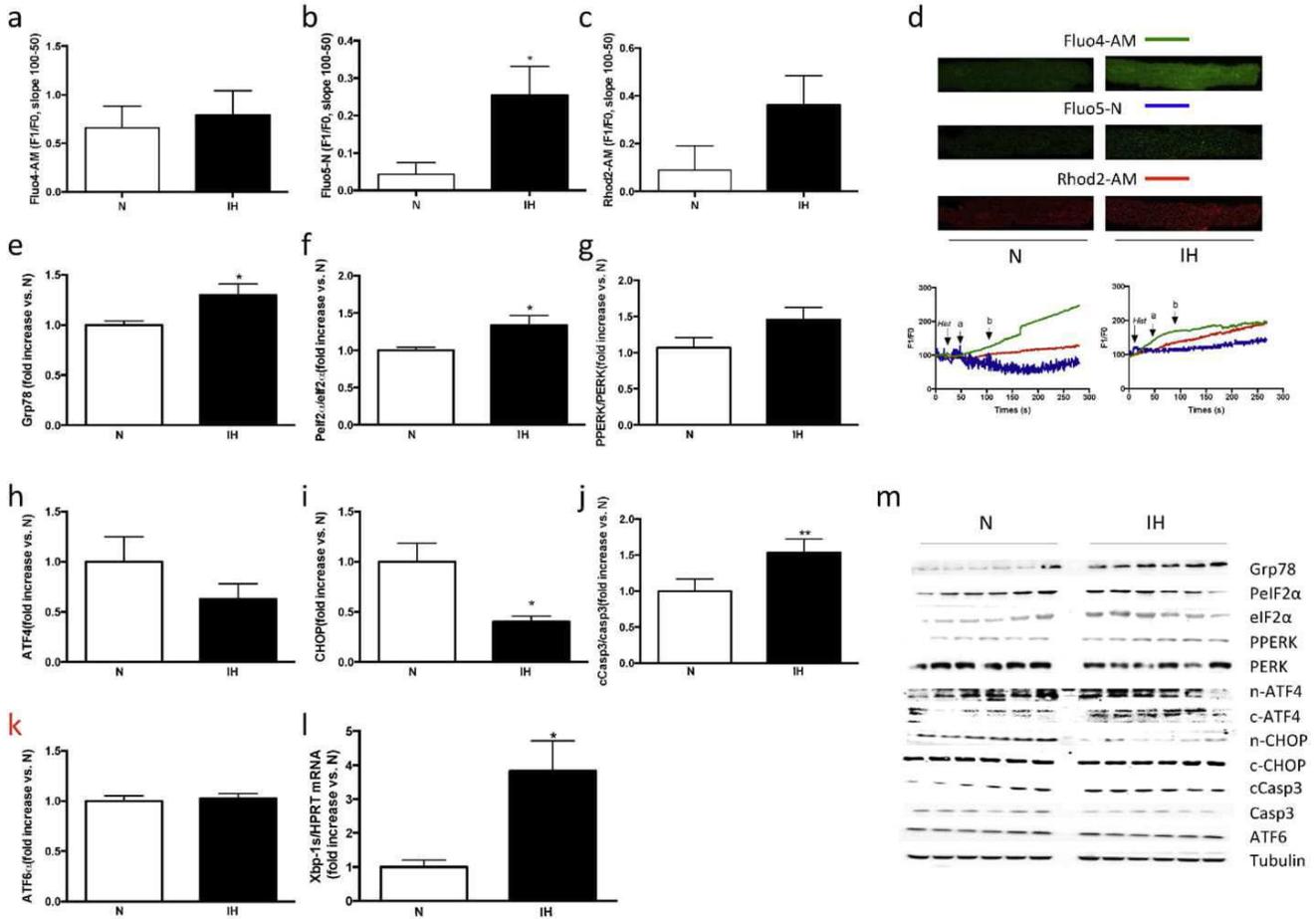


Fig. 3. Intermittent hypoxia (IH) induces Ca^{2+} homeostasis disturbances and myocardial ER stress. (a–d) Inter-organelle Ca^{2+} exchanges were analyzed on isolated cardiomyocytes from mice exposed to IH or N. Ca^{2+} slopes (100–50 s) were determined after ER leakage with histamine (10 μ M) in (a) 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 O₂ 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

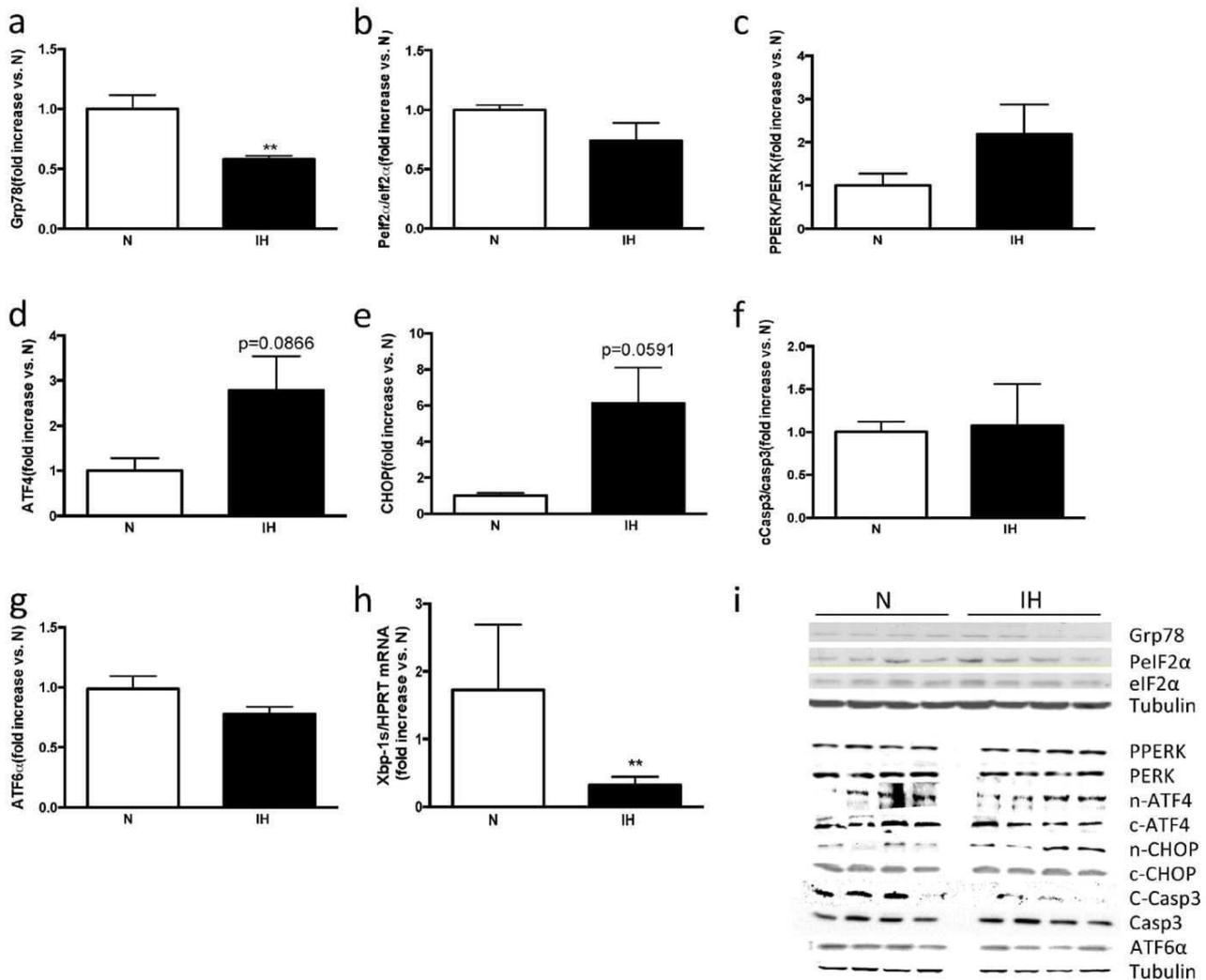


Fig. 4. The association of intermittent hypoxia (IH) and ischemia–reperfusion induces a severe myocardial ER stress. ER stress was assessed in mice exposed to IH or N for 14 days followed by an *in vivo* ischemia (45 min)/reperfusion(90 min) protocol. (a) Grp78 relative to tubulin, (b) phospho-eIF2 α 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-caspase 3 (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

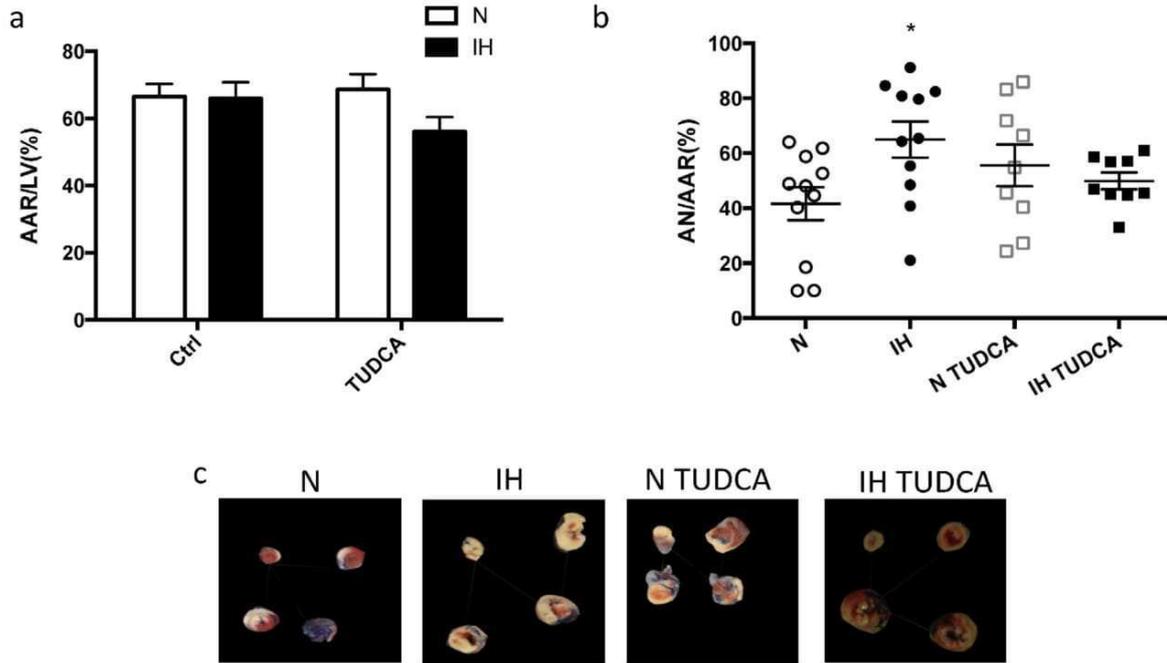


Fig. 5. ER stress inhibition during intermittent hypoxia (IH) prevents the increase in infarct size. *In vivo* ischemia (45 min)–reperfusion (90 min) was performed in C57bl6 mice exposed to IH or air (N), and treated or not with tauroursodeoxycholic acid (TUDCA, 75 mg·kg⁻¹ i.p., 5 days per week). (a) 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,

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

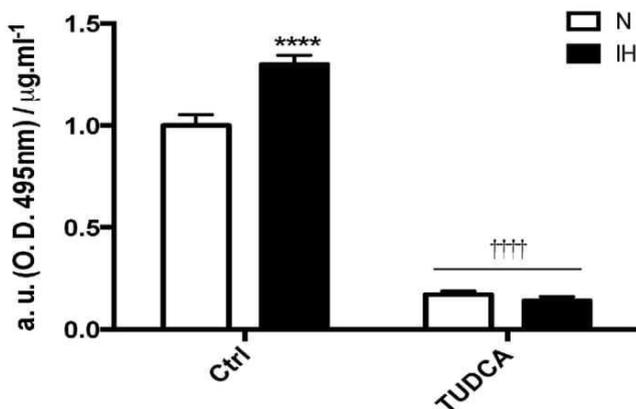


Fig. 6. ER stress inhibition abolishes the increase in HIF-1 activity induced by intermittent hypoxia (IH). HIF-1 activity (arbitrary units of optic density, a. u. of O. D._{495 nm}, per μg·ml⁻¹ of protein) was performed using enzymatic linked immunoabsorbant assay in mice exposed to IH or N and treated (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).

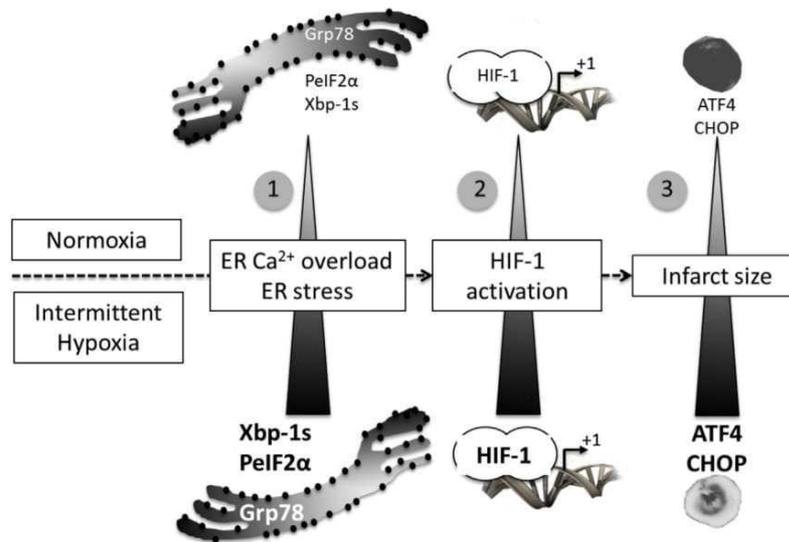


Fig. 7. Schematic summary of the study. IH-induced ER stress leads to HIF-1 activation and increased susceptibility to myocardial ischemia–reperfusion. IH induces a moderate increase in ER stress markers such as Grp78, phosphorylation of eIF2 and splicing of Xbp-1s (step 1). ER stress is responsible 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. Ribaut, 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. Ribaut, 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-lzu, 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. Totoson, 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. Totoson, 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. Sreenivasiah, 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. Sanfilippo-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 weaning 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. Covinhes, C. Lafont, F. Cransac, S. Combes, et al., Delayed postconditioning in the murine 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. Decorps, 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. Forke, X. Chen, S. Wandinger, F. Keser, A. Duschnig, 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. Bekeredjian, 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. Cszimadia, 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. Thuerlauf, M.C. Marcinko, P.J. Belmont, C.C. Glembofski, 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. Szegezdi, 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. Glembofski, 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

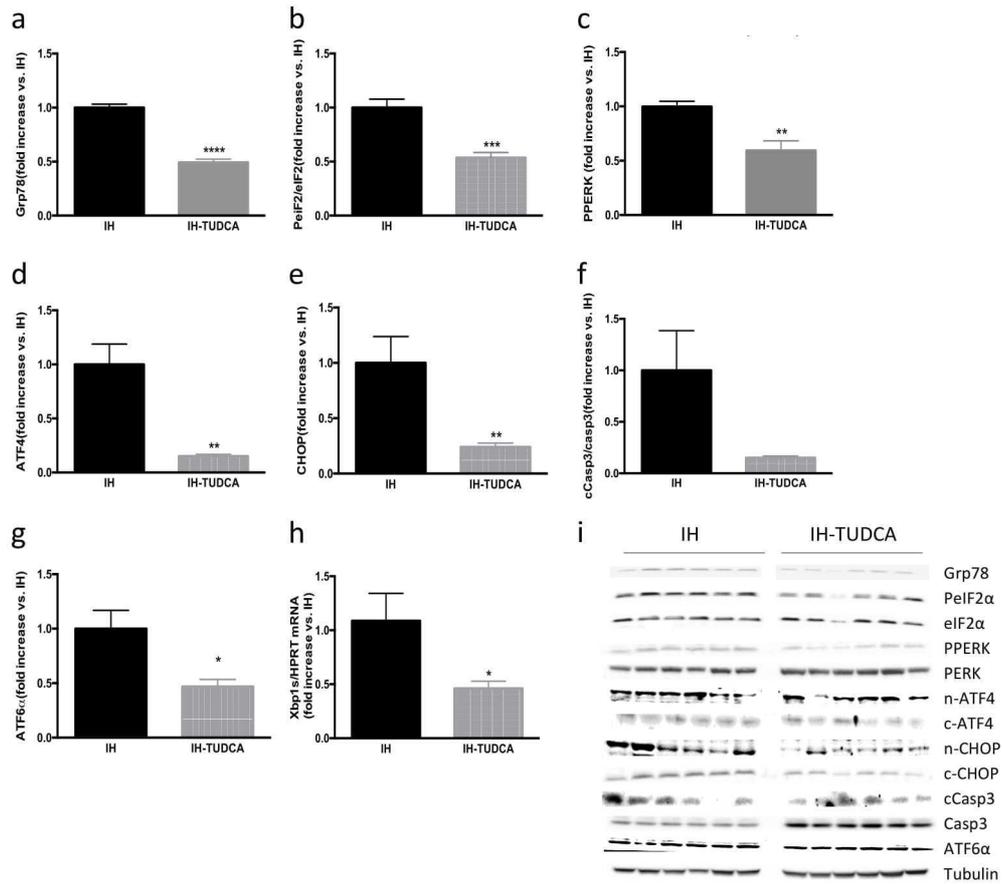
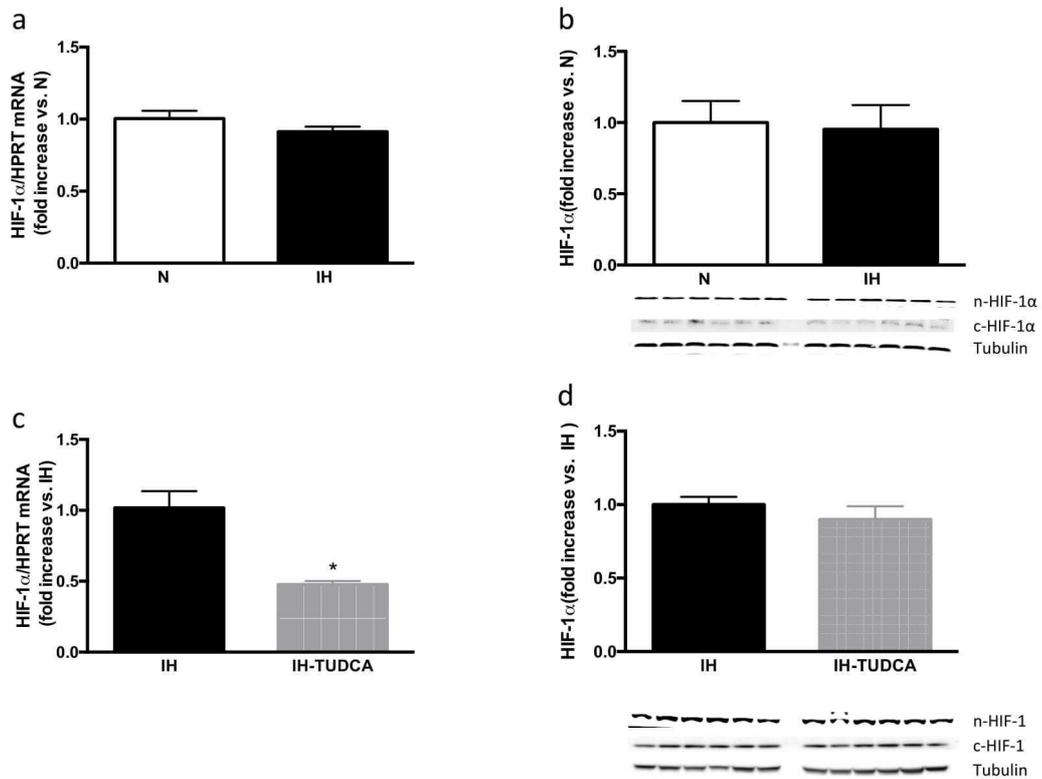


Figure s2



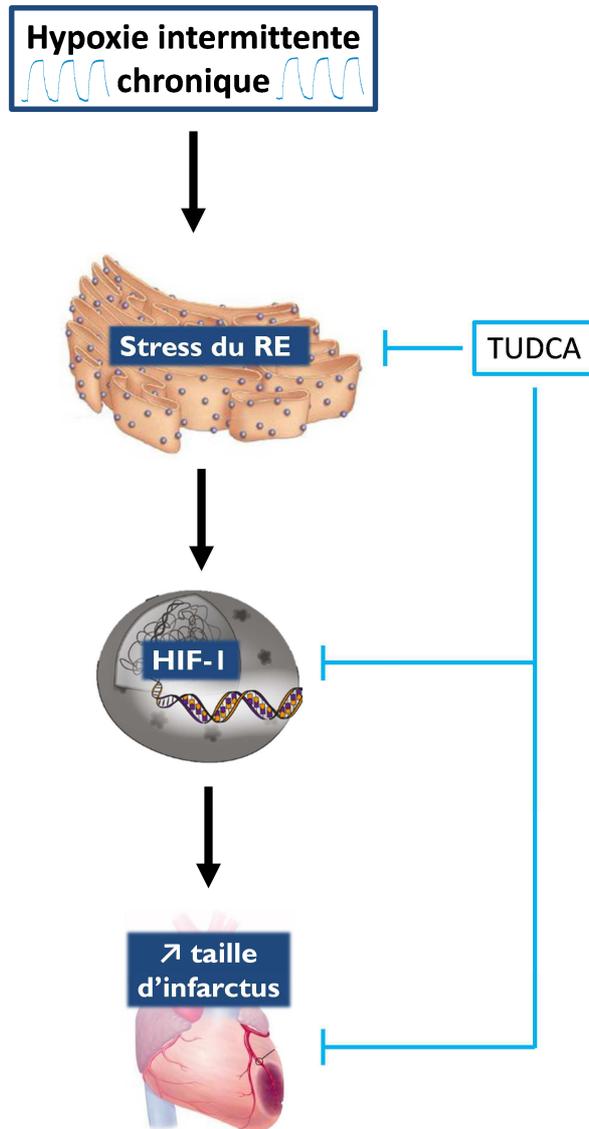


Figure 40: Schéma de conclusion de l'étude en annexe illustrant le rôle du stress du réticulum endoplasmique dans l'activation de HIF-1 et l'augmentation de la taille d'infarctus induite par l'HI chronique.

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS :

- **Moulin S**, Thomas A, Arnaud C, Arzt M, Wagner S, Maier L, Korichneva I, Tamisier R, Pépin J-L, Godin-Ribuot D, Belaidi E. HIF-1 disrupts mitochondria-associated ER membranes leading to calcium homeostasis disturbance, ER stress and myocardial infarct size expansion under intermittent hypoxia. *Int J Cardiol.* [4.034] [soumis]
- Thomas A, Belaidi E, **Moulin S**, Horman S, van der Zon GC, Viollet B, Levy P, Bertrand L, Pepin JL, Godin-Ribuot D, Guigas B. Chronic Intermittent Hypoxia Impairs Insulin Sensitivity but Improves Whole-Body Glucose Tolerance by Activating Skeletal Muscle AMPK. *Diabetes.* 2017 Dec;66(12):2942-2951. doi: 10.2337/db17-0186 [7.273]
- Belaidi E, Thomas A*, Bourdier G*, **Moulin S**, Lemarié E, Levy P, Pépin JL, Korichneva I, Godin-Ribuot D, Arnaud C. Endoplasmic reticulum stress as a novel inducer of hypoxia inducible factor-1 activity: its role in the susceptibility to myocardial ischemia-reperfusion induced by chronic intermittent hypoxia. *Int J Cardiol.* 2016 May 1;210:45-53. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.02.096 [4.034]

COMMUNICATIONS ORALES :

- Résultats de 3^{ème} année de Thèse (Anglais) - GRRC (Groupe de réflexion sur la recherche cardiovasculaire), Montpellier, 2017
- Résultats de thèse (Anglais), Gottlieb Laboratory, Etats-Unis, 2017
- Résultats de 1^{ère} année de Thèse - GRRC, Dijon, 2016

COMMUNICATIONS AFFICHEES :

- Résultats 3^{ème} année de Thèse (Anglais) - International Society for Heart Research
Amsterdam, 2018
- GRRC, Montpellier, 2018
- Résultats de 2^{ème} année de Thèse (Anglais) - American Thoracic Society, Etats-Unis, 2017
- Journée des doctorants, Grenoble, 2017
- GRRC, Nantes, 2017
- Résultats de 1^{ère} année de Thèse (Anglais) - New Frontiers in Basic Cardiovascular Research,
Paris, 2016
- GRRC, Dijon, 2016
- Résultats de Master 2 - GRRC, Toulouse, 2015