



HAL
open science

Syndrome d'apnées obstructives du sommeil et métabolisme lipidique : étude animale et étude clinique préliminaire

Laetitia van Noolen

► **To cite this version:**

Laetitia van Noolen. Syndrome d'apnées obstructives du sommeil et métabolisme lipidique : étude animale et étude clinique préliminaire. Physiologie [q-bio.TO]. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAV035 . tel-02169204

HAL Id: tel-02169204

<https://theses.hal.science/tel-02169204>

Submitted on 1 Jul 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 COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Physiologie – Physiopathologies - Pharmacologie**

Arrêté ministériel : 25 Mai 2016

Présentée par

Laetitia VAN NOOLEN

Thèse codirigée par

Pr. Françoise STANKE-LABESQUE

Pr. Patrice FAURE

préparée au sein du **Laboratoire Hypoxie et Physiopathologies
cardiovasculaires et respiratoires (HP2 – INSERM U1042)**
dans l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

Syndrome d'apnées obstructives du sommeil et métabolisme lipidique : étude animale et étude clinique préliminaire

Thèse soutenue publiquement le **9 Novembre 2018**,
devant le jury composé de :

Pr. Renaud TAMISIER

PU-PH, Université Grenoble-Alpes (Président)

Pr. Didier BORDERIE

PU-PH, Université Paris-Descartes (Rapporteur)

Pr. Jean Marc LESSINGER

PU-PH, Université de Strasbourg (Rapporteur)

Pr. Nathalie BERNOUD-HUBAC

Professeur, INSA Lyon (Examinateur)

Pr. Françoise STANKE-LABESQUE

PU-PH, Université Grenoble-Alpes (Co-Directrice)

Pr. Patrice FAURE

PU-PH, Université Grenoble-Alpes (Co-Directeur)



Table des matières

Résumé	5
Abstract	6
Liste des figures	7
Liste des abréviations	8
1ère partie : Revue de la littérature	9
1. Syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS)	9
1.1. Définition	9
1.2. Epidémiologie	11
1.3. Physiopathologie : mécanisme des apnées obstructives	12
2. SAOS et composante cardiovasculaire	13
2.1. Morbi-mortalité cardiovasculaire du SAOS	13
2.1.1. Hypertension artérielle	13
2.1.2. Accident vasculaire cérébral (AVC)	13
2.1.3. Insuffisance coronarienne	14
2.1.4. Arythmies	14
2.1.5. Insuffisance cardiaque	14
2.2. Mécanismes impliqués dans les complications cardiovasculaires du SAOS	15
2.2.1. Stress oxydant	15
2.2.2. Activation sympathique	15
2.2.3. Hypercoagulabilité	16

2.2.4.	Dysfonction endothéliale, dysfonction vasculaire et athérosclérose	16
2.2.5.	Inflammation	17
2.2.6.	Dysrégulation métabolique	19
3.	SAOS et métabolisme lipidique	20
3.1.	Acides gras oméga-3 (AG <i>n</i> -3)	20
3.1.1.	Classification, métabolisme et propriétés	20
3.1.2.	AG <i>n</i> -3 et sphère cardiovasculaire	25
3.1.3.	Athérosclérose, inflammation, SAOS et potentiel des AG <i>n</i> -3	26
3.2.	Métabolisme des AG : la bêta-oxydation mitochondriale	30
3.2.1.	Définition et rôle de la bêta-oxydation des AG	30
3.2.2.	Exploration du métabolisme de la bêta-oxydation : le profil des acylcarnitines (ACs)	34
3.2.3.	Pathologies cardiovasculaires, maladies chroniques, SAOS et bêta-oxydation des AG	36
4.	Traitement et prise en charge du SAOS	38
2^{ème}	partie : Travaux de thèse	40
1.	Objectifs des travaux de thèse	40
2.	Matériel et méthode	42
2.1.	Etudes expérimentales	42
2.2.	Etudes cliniques	43
2.3.	Dosages biologiques spécifiques	45
2.3.1.	Profil des acides gras	45
2.3.2.	Profil des acylcarnitines	46
3.	Résultats et publications	48

3.1. Etude expérimentale : supplémentation en AG <i>n</i> -3 et prévention de l'athérosclérose induite par l'hypoxie intermittente chronique	48
Article original N°1	49
« Docosahexaenoic acid supplementation modifies fatty acid incorporation in tissues and prevents hypoxia induced-atherosclerosis progression in apolipoprotein-E deficient mice »	
Revue N°2	59
« Could thromboxane A2 pathway be a potential therapeutic target for the treatment of OSA-induced atherosclerosis? »	
3.2. Etude clinique préliminaire : AG érythrocytaires chez les patients atteints d'un SAOS et marqueurs du remodelage vasculaire	69
3.2.1. Résultats	70
3.2.2. Discussion	73
3.3. Métabolisme des AG (AC), SAOS et risque cardiovasculaire	75
Article original N°3	76
« Acylcarnitines profiling, atherosclerosis and OSA syndrome »	
Discussion générale	98
Conclusion	103
Références bibliographiques	104

Résumé

Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) est une pathologie caractérisée par des épisodes d'hypoxie intermittente (HI) nocturnes et est un problème de santé publique par sa prévalence dans la population générale (5-20%) et ses nombreuses complications métaboliques et cardiovasculaires. La répétition des épisodes d'HI est considérée comme le facteur principal responsable de cette morbidité cardiovasculaire dont l'athérosclérose fait partie. Le traitement de référence du SAOS par la pression positive continue présente dans certains cas une efficacité limitée, en particulier sur les conséquences cardiovasculaires qui nécessitent d'autres thérapeutiques plus spécifiques. Les mécanismes reliant SAOS et athérosclérose ne sont pas encore totalement connus. Cependant, des perturbations du métabolisme des acides gras (AG) en lien avec le processus athéromateux ont déjà été rapportées au cours du SAOS. Elles concernent en particulier le métabolisme de l'acide arachidonique (AG *n*-6) avec une augmentation d'eicosanoïdes pro-inflammatoires. Par ailleurs, les AG *n*-3 peuvent avoir une influence sur le développement et la progression des maladies cardiovasculaires, notamment grâce à une modification de la balance AG *n*-6 / AG *n*-3. Ainsi l'objectif de ce travail a donc été dans un premier temps de caractériser expérimentalement l'effet d'une supplémentation en AG *n*-3 sur le développement de l'athérosclérose dans le contexte d'HIC, et d'évaluer cliniquement la distribution AG *n*-6 / AG *n*-3 au niveau érythrocytaire chez des patients atteints d'un SAOS. Nous avons démontré que la supplémentation en AG *n*-3 permet de prévenir l'accélération de l'athérosclérose dans le contexte de l'HIC et est associée à une modulation de l'expression de certains médiateurs inflammatoires. Ces résultats prometteurs incitent à envisager une étude interventionnelle chez les patients SAOS. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés au métabolisme des AG, via la β -oxydation mitochondriale, et aux métabolites intermédiaires produits, les acylcarnitines (ACs). Ces métabolites sont de plus en plus étudiés dans le contexte des pathologies cardiovasculaires. Nous avons étudié l'impact du SAOS sur la β -oxydation et ses conséquences sur la fonction vasculaire. L'étude de ces métabolites semble prometteuse et permettra peut-être l'émergence de marqueurs biologiques en relation avec l'état cardiovasculaire des patients.

Mots clés : syndrome d'apnées obstructives du sommeil – athérosclérose – eicosanoïdes - acide gras oméga 3 – acylcarnitines – hypoxie

Abstract

Obstructive sleep apnea (OSA) syndrome is a disease characterized by recurrent episodes of nocturnal intermittent hypoxia (IH). OSA is a major public health problem due to its frequency in general population (5 to 20%) and its numerous metabolic and cardiovascular complications. Repetitive apneas lead to IH which is responsible of early atherosclerosis and cardiovascular complications. Gold standard treatment of OSA, that is to say continuous positive airway pressure, has poor effects on OSA cardiovascular consequences in some patients, underlining the need of alternative therapeutic strategies. Underlying mechanisms linking OSA to atherosclerosis are still poorly understood. Nevertheless, a link between polyunsaturated fatty acids (PUFAs) metabolism changes and atheromatous process has already been report during OSA syndrome. Arachidonic acid (*n*-6 PUFA) metabolism leads to increased biosynthesis of pro-inflammatory eicosanoids during OSA. Moreover, *n*-3 PUFAs influence cardiovascular complications progression especially by modifying *n*-6 FA / *n*-3 FA balance. The aim of this work was first to evaluate the influence of *n*-3 PUFAs supplementation on a CIH induced atherosclerosis progression model, and to clinically evaluate erythrocyte *n*-6 PUFA / *n*-3 PUFA distribution in OSA patients. We have shown that *n*-3 PUFAs supplementation prevents atherosclerosis acceleration in CIH exposed mice and is associated with a modulation of inflammatory mediators. These promising results encourage us to consider an interventional clinical study in OSA patients. In a second time, we have studied FA mitochondrial β -oxidation metabolism via acylcarnitines (ACs) metabolites. These ACs are increasingly studied especially in cardiovascular diseases context. OSA impact on β -oxidation metabolism and its vascular function consequences have been evaluated. ACs study is promising and will perhaps allow biological markers emergence in relation to cardiovascular pattern.

Key words: sleep apnea syndrome – atherosclerosis – eicosanoids – omega 3 fatty acid – acylcarnitines – hypoxia

Liste des figures

Figure 1: Exemple d'enregistrement polysomnographique d'un patient présentant des apnées obstructives du sommeil _____	10
Figure 2: Voies métaboliques des acides gras insaturés <i>n-6</i> et <i>n-3</i>) _____	22
Figure 3 : Effets physiologiques des dérivés des AG <i>n-6</i> et <i>n-3</i> _____	24
Figure 4 : Effets métaboliques et vasculaires d'une supplémentation en AG <i>n-3</i> _____	28
Figure 5: Cycle de la carnitine _____	32
Figure 6 : Cycle de la bêta-oxydation mitochondriale _____	33
Figure 7: Application de la spectrométrie de masse en tandem au profil des ACs (mode Precursor Ion Scan) _____	35
Figure 8: Traitement par PPC : appareillage _____	38
Figure 9 : Représentation du dispositif à hypoxie _____	43
Figure 10 : Exemple de profil des acides gras chez un sujet sain _____	46
Figure 11 : Exemple de profil d'acylcarnitines plasmatiques chez un sujet sain _____	47

Liste des abréviations

AA : acide arachidonique
ACFA : arythmie cardiaque par fibrillation auriculaire
AVC : accident vasculaire cérébral
AC : acylcarnitine
AG : acide gras
AG *n*-3 : acide gras oméga 3
AG *n*-6 : acide gras oméga 6
AGPI : acide gras polyinsaturé
COX : cyclooxygénase
DHA : acide docosahéxaénoïque
DGLA : acide dihomo- γ -linoléinique
EPA : acide eicosapentaénoïque
EIM : épaisseur intima média
FiO₂ : fraction partielle en oxygène
FMD : flow mediated dilatation
HI : hypoxie intermittente
HIC : hypoxie intermittente chronique
HTA : hypertension artérielle
IAH : index apnée-hypopnée
LT : leucotriène
LTB₄ : leucotriène B₄
MMP : métalloprotéinase matricielle
PPC : pression positive continue
SAOS : syndrome d'apnées obstructives du sommeil
TXA₂ : thromboxane A₂
VOP : vitesse de l'onde de pouls

1ère partie : Revue de la littérature

1. Syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS)

1.1. Définition

Le SAOS est caractérisé par la survenue récurrente d'épisodes de collapsus du pharynx durant le sommeil, entraînant une réduction (hypopnée) ou un arrêt (apnée) de la ventilation malgré les efforts respiratoires (1). Ces interruptions respiratoires conduisent à une perturbation intermittente des échanges gazeux (hypercapnie, hypoxémie) et à une activation du système sympathique. Le SAOS est typiquement associé à des ronflements bruyants et en général, la phase aigüe de l'épisode respiratoire est associée avec un micro-réveil. Ces événements respiratoires fragmentent le sommeil et font osciller le patient entre éveil et sommeil.

Le diagnostic de SAOS est basé sur la polysomnographie (Figure 1), examen de référence, qui met en évidence plus de cinq épisodes respiratoires obstructifs par heure de sommeil, épisodes définis selon des critères précis de l'American Academy of Sleep Medicine. Les épisodes obstructifs peuvent conduire à des apnées, correspondant à une cessation complète de la ventilation pendant plus de 10 secondes associée à la persistance de mouvements thoraciques et abdominaux ; ou à des hypopnées, épisodes respiratoires de plus de 10 secondes définis par une réduction de la ventilation de plus de 50% de sa valeur basale ou si moins de 50% associés à une désaturation en oxygène de plus de 3% ou à un micro-réveil (2).

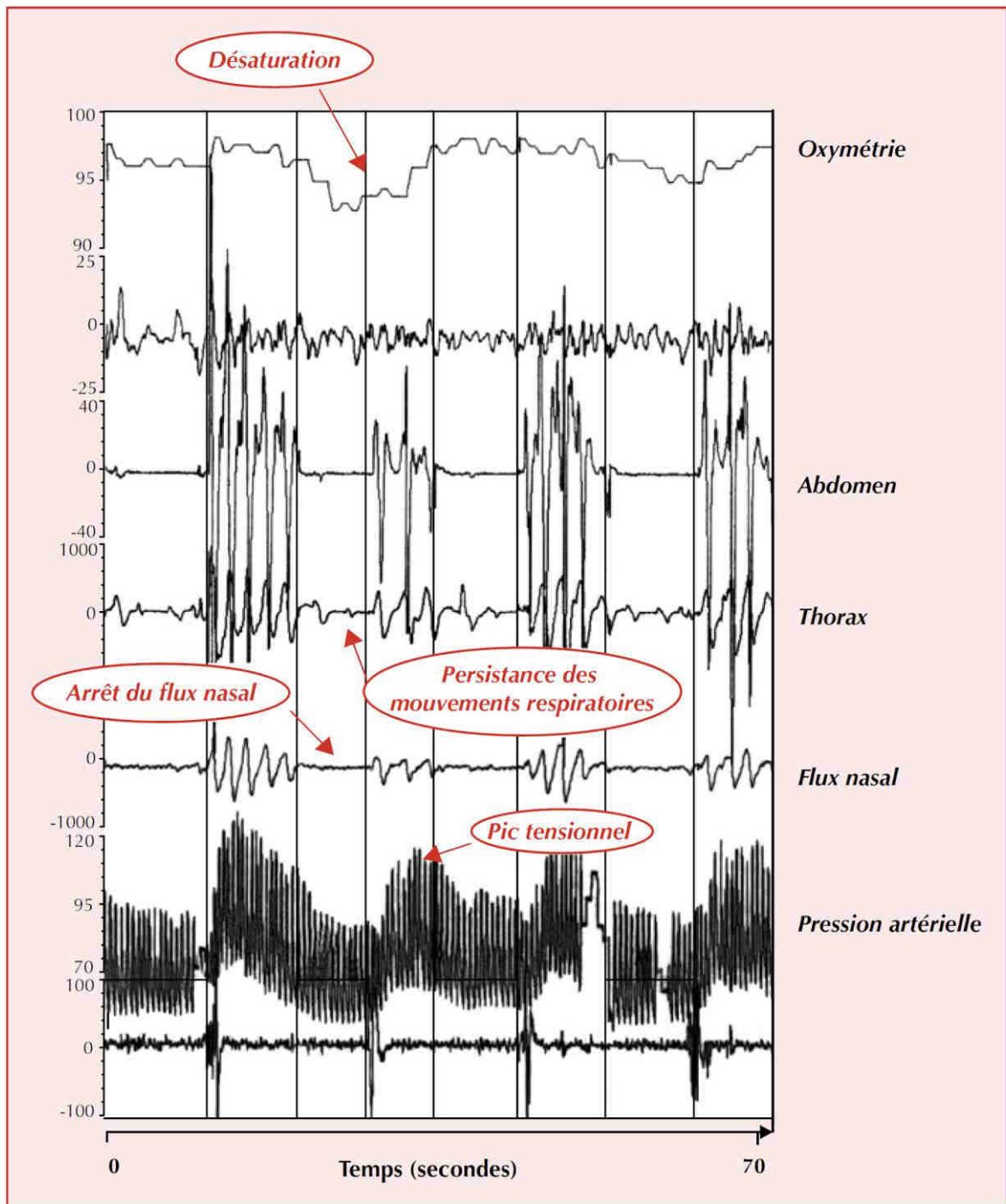


Figure 1: Exemple d'enregistrement polysomnographique d'un patient présentant des apnées obstructives du sommeil (d'après Milleron. O (3))

Les critères diagnostics du SAOS associent des épisodes respiratoires obstructifs nocturnes avec ou sans signes cliniques (4). Le diagnostic peut être réalisé s'il associe au moins 5 épisodes respiratoires obstructifs comme définis ci-dessus et un des signes cliniques ou comorbidités suivants: somnolence diurne excessive, sommeil non réparateur, fatigue ou insomnie, réveil en sursaut, sensation d'étouffement nocturne, ronflement, pauses respiratoires, et hypertension, trouble de l'humeur, dysfonction cognitive, coronaropathie, accident vasculaire cérébral, insuffisance cardiaque, fibrillation atriale ou diabète de type 2.

De façon alternative, ce diagnostic peut également être posé si le patient présente plus de 15 épisodes respiratoires obstructifs par heure de sommeil sans signes cliniques et/ou comorbidités associés.

La sévérité du SAOS peut être évaluée grâce à l'index apnée-hypopnée (IAH) correspondant au nombre d'apnées et/ou hypopnées par heure de sommeil. On distingue 3 classes de sévérité : léger (IAH compris entre 5 et 15), modéré (IAH compris entre 15 et 30) et sévère (IAH supérieur à 30) (2).

1.2. Epidémiologie

Le SAOS est la pathologie respiratoire chronique la plus répandue. Depuis les années 1990 et l'apparition de la polysomnographie, de nombreuses études ont tenté d'estimer la prévalence du SAOS au sein de la population générale mais la comparaison des résultats reste limitée par les différentes méthodologies utilisées. La prévalence est globalement comprise entre 5 et 26% chez les hommes et 1 à 15% chez les femmes (4). Il est à noter que celle-ci est plus élevée dans certaines catégories de populations telles que les obèses ou encore les personnes âgées. Au total, cette prévalence est élevée dans le monde entier et fait de cette pathologie un réel enjeu de santé publique.

Enfin, le SAOS est fréquemment associé à des comorbidités telles que des anomalies cardiovasculaires ou métaboliques qui sont retrouvées chez 50% des patients atteints d'un SAOS (4).

1.3. Physiopathologie : mécanisme des apnées obstructives

Chez le sujet indemne de SAOS, lors de l'inspiration, les muscles dilatateurs du pharynx s'opposent au collapsus des voies aériennes supérieures lié à la dépression thoracique. Lors du sommeil, il existe une diminution physiologique du tonus de ces muscles. L'association de facteurs morphologiques (obésité, anomalies anatomiques des voies aériennes, hypertrophie amygdalienne ou linguale, œdème et inflammation chronique dus au tabac, obstruction nasale) ou fonctionnels (prise d'alcool ou de benzodiazépines, dette de sommeil chronique qui accentuent la chute du tonus des muscles des voies aériennes supérieures) peut conduire à une obstruction partielle (hypopnée) ou totale (apnée) des voies aériennes supérieures lors de l'inspiration.

Lorsque ces épisodes se produisent, ils se terminent fréquemment par des micro-réveils qui permettent au patient d'activer les muscles dilatateurs du pharynx et ainsi rétablir la perméabilité des voies aériennes (3). Ces événements peuvent se répéter jusqu'à 50 à 100 fois par heure, entraînant une fragmentation du sommeil et permettant de définir la sévérité du SAOS.

2. SAOS et composante cardiovasculaire

Le SAOS est reconnu comme étant un facteur de risque indépendant pour le développement de maladies cardiovasculaires (5). De nombreuses études ont montré chez les patients atteints d'un SAOS une mortalité cardiovasculaire augmentée (6, 7).

Les épisodes d'apnée obstructive conduisent à l'activation de mécanismes contribuant à l'initiation ou la progression de pathologies cardiaques, vasculaires et métaboliques (8).

2.1. Morbi-mortalité cardiovasculaire du SAOS

2.1.1. Hypertension artérielle

Le SAOS contribue de façon significative à l'hypertension artérielle et ceci indépendamment des facteurs confondants habituels (âge, indice de masse corporelle, tabagisme) (9). Le SAOS est ainsi la cause la plus courante d'hypertension secondaire (10). Environ 50% des patients présentant un SAOS ont également une hypertension et environ 30% des patients hypertensifs pourraient également être porteurs d'un SAOS non diagnostiqué (11).

Concernant l'effet du traitement du SAOS sur l'hypertension artérielle essentielle, les patients non traités ont un plus grand risque de développer une hypertension artérielle alors que ceux qui suivent un traitement par pression positive continue (PPC) ont une diminution de la pression artérielle même si celle-ci reste relativement modeste (environ 2 mm Hg) (12).

2.1.2. Accident vasculaire cérébral (AVC)

De nombreuses études ont démontré que le SAOS est associé à un risque d'AVC de façon plus importante que les autres pathologies cardiovasculaires (13). On retrouve ainsi une prévalence d'environ 60% de SAOS (avec IAH > 10) et d'environ 30 à 35% (avec IAH > 30) chez les patients ayant présenté un AVC (14).

Le bénéfice du traitement par PPC reste discuté, cependant une étude montre une réduction de la mortalité à 5 ans lorsque le traitement par PPC (commencé 2 mois après l'AVC) est bien toléré et que les patients restent observants (par rapport à ceux qui ne l'ont pas toléré) (15).

2.1.3. Insuffisance coronarienne

Le SAOS est associé à une augmentation du risque relatif de coronaropathie. Ainsi, une étude suédoise montre qu'indépendamment des autres facteurs de risque, le SAOS sévère multiplie par 5 le risque d'accident coronarien, alors qu'un traitement efficace du SAOS diminuerait ce risque par 3 (16). De nombreuses études montrent une prévalence d'environ 30% de SAOS (index IAH > 10) chez les porteurs d'une coronaropathie (14). Chez les patients coronariens, le traitement du SAOS par PPC pourrait améliorer le pronostic, ainsi des études observationnelles montrent que les risques de nouvel accident cardiovasculaire et de mortalité sont diminués chez les patients bénéficiant d'un traitement par PPC (3, 17).

2.1.4. Arythmies

Le SAOS favorise la survenue d'une arythmie cardiaque par fibrillation auriculaire (AC/FA) qui constitue le trouble du rythme le plus fréquent. Ainsi, la prévalence du SAOS est élevée chez les patients ayant présenté une AC/FA (18) et le risque relatif de présenter une arythmie chez un patient SAOS sévère (IAH>30) est quatre fois plus élevé (19). Enfin, le traitement par PPC semble être bénéfique chez les patients SAOS même si de nombreuses limitations à l'interprétation des données restent présentes (critères diagnostic SAOS, évaluation de la compliance au traitement par PPC, groupe témoin...) (voir la revue de Nalliah *et al.* (20)).

2.1.5. Insuffisance cardiaque

Les patients SAOS sévères (IAH>30) ont une augmentation de risque de 58% de développer une insuffisance cardiaque par rapport à des sujets indemnes de SAOS dans une cohorte de sujets âgés de plus de 40 ans, comme le rapporte la Sleep Heart Health Study (21). Ainsi la prévalence du SAOS dans l'insuffisance cardiaque (qu'elle soit systolique ou diastolique) est élevée, de l'ordre de 65 à 75% pour un IAH>10 (14). Une récente étude clinique (SERVE-HF) montre par ailleurs que les patients ayant un SAOS, traités par PPC et présentant une insuffisance cardiaque (diminution de la fraction d'éjection ventriculaire gauche), ont un risque accru de mortalité cardiovasculaire (34%) par rapport aux patients non traités (22).

2.2. Mécanismes impliqués dans les complications cardiovasculaires du SAOS

2.2.1. Stress oxydant

Le SAOS est responsable d'épisodes d'hypoxie-réoxygénation qui se répètent au cours de la nuit. Ce phénomène entraîne une augmentation du ratio pro-oxydant/antioxydant qui peut être attribué à la disponibilité plus réduite de l'oxygène pendant les épisodes d'apnée et la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) pendant la phase de réoxygénation quand la respiration reprend (23). L'augmentation de la production de ROS associée à l'hypoxie est attribuée à la dysfonction mitochondriale, l'activation de la NADPH oxydase et de la xanthine oxydase et au découplage de la NO synthase (24). Ces ROS vont être responsables de l'initiation de la peroxydation lipidique qui va contribuer à la dysfonction cellulaire et aux maladies cardiovasculaires (24). Les marqueurs les plus étudiés de cette peroxydation lipidique sont les isoprostanes, les TBARS (thiobarbituric acid - reactive species), le MDA (malonyldaldéhyde) et les oxLDL (Oxidized Low Density Lipoprotein). De nombreuses études ont montré que ces différents marqueurs du stress oxydant sont élevés chez les patients SAOS et associés à une dysfonction endothéliale (disponibilité du NO altérée), une augmentation de l'épaisseur intima media des carotides et une hypertension (24). Enfin le traitement par PPC semble atténuer ces marqueurs du stress oxydant et améliorer la fonction endothéliale (25).

2.2.2. Activation sympathique

La répétition des apnées obstructives au cours du sommeil, est responsable de variations importantes de l'activité du système sympathique. En effet, la désaturation artérielle en oxygène induit une brusque augmentation du système sympathique. L'évaluation de cette réponse sympathique peut se faire par la mesure des catécholamines qui seront augmentées et par microneurographie, technique d'évaluation dynamique à court terme des modifications de l'activité sympathique (26). Cette réponse sympathique a pour conséquences une augmentation de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque ainsi qu'une diminution de volume d'éjection systolique (3).

2.2.3. Hypercoagulabilité

Chez les patients porteurs d'un SAOS, les épisodes répétés d'hypoxie nocturne semblent entraîner un état d'hypercoagulabilité qui prédispose les patients à un état prothrombotique. En effet, de nombreuses études montrent une activation plaquettaire, une augmentation de la viscosité sanguine ou encore une augmentation du fibrinogène (molécule prothrombotique) chez les patients SAOS (27) (voir la revue de Liak *et al.* (28)). Les mécanismes permettant d'expliquer ce phénomène ne sont pas encore totalement élucidés, une des explications avancées pourrait être la libération accrue de catécholamines (noradrénaline) au cours du SAOS qui serait à l'origine de l'activation plaquettaire (28).

2.2.4. Dysfonction endothéliale, dysfonction vasculaire et athérosclérose

Le SAOS est associé à des dysfonctions vasculaires. Tout d'abord, la fonction endothéliale est détériorée. L'endothélium vasculaire correspond à une monocouche active de cellules qui tapissent la membrane interne des vaisseaux (intima). Les cellules endothéliales produisent du NO, puissant agent vasodilatateur local, inhibiteur de l'agrégation plaquettaire, de l'adhésion monocytaire et de la prolifération de cellules musculaires lisses, et qui protège ainsi les vaisseaux de l'athérosclérose. Aussi la dysfonction endothéliale est un des marqueurs les plus précoces du processus athéromateux. Différentes techniques sont utilisées pour mesurer la dysfonction endothéliale tant au niveau des vaisseaux de gros calibre qu'au niveau de la micro-circulation. La plus connue au niveau des vaisseaux de gros calibre étant la dilatation médiée par le flux (FMD pour flow mediated dilatation) (29). Des études ont en ce sens, montré que la fonction endothéliale est altérée chez des patients SAOS (index IAHD>10) par rapport à des patients non SAOS (30). Le traitement par PPC chez ces patients semble de plus améliorer la dysfonction endothéliale (31, 32).

Le SAOS est également associé à une rigidité artérielle plus importante, un des premiers signes du remodelage vasculaire, qui correspond à une perte d'élasticité des vaisseaux. Cette rigidité artérielle peut être objectivée par la mesure de la vitesse de l'onde de pouls (VOP) et est un indicateur précoce et indépendant de morbidité et mortalité cardiovasculaire. Des études ont montré que le SAOS est associé à une augmentation de la rigidité artérielle via la mesure de la

VOP et ceci indépendamment des facteurs confondants classiques par rapport au groupe contrôle (33).

Ainsi, de nombreuses études ont démontré une altération des fonctions vasculaires chez les patients SAOS (29). Cette altération semble corrélée à la sévérité du SAOS et l'effet d'un traitement par pression positive continue semble avoir un effet bénéfique sur ces fonctions (33-35).

Le développement de l'athérosclérose précoce liée au SAOS via la mesure de l'épaisseur intima média (EIM) et du diamètre carotidien a été démontrée par des études utilisant des cohortes de patients atteints d'un SAOS et indemnes de toute comorbidité cardiovasculaire (36, 37). De plus il a ensuite été démontré que le traitement par PPC (durée 4 mois) chez des patients atteints d'un SAOS sévère avait un effet sur la réduction de l'EIM et améliorait ainsi les signes précoces de l'athérosclérose (38).

2.2.5. Inflammation

Le SAOS est associé à une inflammation chronique de bas grade. Les cellules sanguines des patients SAOS présentent un phénotype pro-inflammatoire et pro-thrombotique qui pourrait favoriser l'altération de l'endothélium, la dysfonction endothéliale, l'athérosclérose et la thrombose (4).

On retrouve ainsi des concentrations circulantes élevées de médiateurs de l'inflammation (cytokines pro-inflammatoires : IL-8, IL-6, TNF α , CRP et molécules d'adhésion : ICAM-1, VCAM-1) chez les patients SAOS par rapport à des sujets contrôles et ceci indépendamment de l'obésité (voir la revue de Ryan *et al.* à ce sujet (39)). Pour exemple, les travaux concernant le TNF α ont montré que la concentration de cette cytokine pro-inflammatoire est plus élevée chez les patients SAOS par rapport aux sujets contrôles et est de plus significativement abaissée avec le traitement par PPC (40-42).

Cette inflammation systémique est également associée à une inflammation vasculaire. Ainsi, chez les animaux, des études ont montré que l'hypoxie intermittente chronique (HIC) conduisait à une augmentation significative (par rapport à un groupe contrôle) d'interactions entre les cellules endothéliales et les leucocytes comme le roulement et l'adhésion leucocytaire (43, 44). Chez les patients ayant un SAOS, des études ont montré que les monocytes adhèrent

plus fermement aux cellules endothéliales que chez les sujets contrôle, avec une augmentation de l'expression de molécules d'adhésion par ces cellules et que ce processus est atténué par le traitement par PPC (45). Au total, ce processus conduit à la dysfonction endothéliale, au remodelage vasculaire et in fine à l'athérosclérose (39, 44, 46).

Par ailleurs, des travaux antérieurs réalisés au sein de notre laboratoire, ont montré que le métabolisme de l'acide arachidonique est largement perturbé au cours du SAOS. On retrouve ainsi une majoration des concentrations de leucotriènes B₄ (LTB₄) (47, 48), des cystéinyls leucotriènes (48) ou d'isoprostanes (49). Nous développerons l'implication de ces eicosanoïdes dans les conséquences vasculaires du SAOS dans le chapitre suivant.

Enfin, parmi les mécanismes pouvant expliquer la pathogenèse du processus inflammatoire dans le SAOS, il semble que les facteurs de transcription NFκB et HIF-1 puissent avoir un rôle central. En effet, le facteur NFκB qui joue un rôle dans la régulation des gènes de l'inflammation, est activé par l'HI, (voir la revue d'Arnaud *et al.* (46)) et contribue ainsi à l'activation de la cascade inflammatoire. De la même façon HIF-1, un facteur de transcription majeur impliqué dans la réponse à l'hypoxie, est également impliqué dans la réponse inflammatoire induite par l'HI puisqu'il interagit directement avec le facteur NFκB (50).

Il demeure important de noter que le rôle de l'augmentation des marqueurs inflammatoires dans la prédiction de la morbidité cardiovasculaire chez les patients ayant un SAOS reste encore non élucidé et des études cliniques prospectives et sur le long terme sont nécessaires (39).

2.2.6. Dysrégulation métabolique

Chez les patients atteints d'un SAOS, la dysrégulation métabolique touche à la fois le métabolisme glucidique et le métabolisme lipidique.

Le métabolisme glucidique va être altéré avec une augmentation de l'insulino-résistance (et d'intolérance au glucose). Cette observation est retrouvée chez les patients obèses et les non-obèses (51).

Par ailleurs, il a été démontré que l'hypoxie intermittente induit des anomalies sur le bilan lipidique telles qu'une augmentation du cholestérol et des phospholipides, une augmentation de

la biosynthèse des triglycérides et des phospholipides et une inhibition de la capture des triglycérides par le foie, et ceci chez l'animal et chez l'homme (52), ces anomalies pouvant être possiblement impliquées dans le processus d'athérogenèse.

Le chapitre suivant est consacré au métabolisme lipidique et en particulier au métabolisme des acides gras (AG).

3. SAOS et métabolisme lipidique

Des études animales (53, 54) et plus récemment cliniques (55) ont clairement identifié que la dérégulation du métabolisme lipidique était un potentiel médiateur important de l'accélération de l'athérogenèse dans le SAOS. Fort de ces constatations, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'impact cardiovasculaire du métabolisme des AG selon deux approches distinctes : la répartition des acides gras polyinsaturés (AGPI) et en particulier le rôle des acides gras oméga-3 (AG *n*-3) et le catabolisme des AG via la β -oxydation mitochondriale.

3.1. Acides gras oméga-3 (AG *n*-3)

3.1.1. Classification, métabolisme et propriétés

Les AG sont des molécules organiques comprenant une chaîne carbonée terminée par un groupement carboxylique. Lorsque la chaîne carbonée est dépourvue de toute double liaison, les acides gras sont dits saturés, par contre lorsque celle-ci présente une ou plusieurs double(s) liaison(s), les AG sont alors désignés sous le terme de monoinsaturés ou polyinsaturés.

Les AG insaturés sont constitués de quatre familles décrites sous les termes ω 9, ω 7, ω 6 et ω 3 ou *n*-9, *n*-7, *n*-6 et *n*-3 (ce chiffre correspondant à la position du premier atome de carbone de la première double liaison en partant du radical méthyle). Chaque famille dérive d'un chef de file. Les conversions métaboliques ne peuvent se faire qu'à l'intérieur d'une même famille, par élongation (deux atomes de carbone de plus dans la chaîne qui s'allonge à partir du radical carboxyle) ou par désaturation (addition de doubles liaisons supplémentaires). Concernant les familles *n*-6 et *n*-3, leurs précurseurs à savoir pour les *n*-6 : acide linoléique (C18:2*n*-6) et pour les *n*-3 : acide alpha-linolénique (C18:3*n*-3) sont essentiels et doivent être apportés par l'alimentation (56).

L'acide linoléique (C18:2*n*-6) est apporté par de nombreuses huiles végétales (tournesol, maïs, pépin de raisin). Son métabolisme est composé d'une première désaturation en Δ 6 qui conduit à la formation d'acide γ -linolénique (C18:3*n*-6) qui subit à son tour une élongation pour former l'acide dihomogamma-linolénique (DGLA) (C20:3*n*-6). La dernière désaturation en Δ 5 permet la synthèse de l'acide arachidonique (C20:4*n*-6) (AA) (Figure 2).

L'acide α -linoléique (C18:3 n -3) est présent dans certaines huiles végétales (soja, colza, noix). Comme son homologue, l'acide linoléique, il est transformé après désaturation en Δ 6 en acide stéaridonique (C18:4 n -3) qui subit à son tour une élongation pour former l'acide eicosatétraénoïque (C20:4 n -3). La dernière désaturation en Δ 5 conduit à la formation d'acide eicosapentaénoïque (C20:5 n -3) (EPA). L'EPA peut subir des désaturations et élongations supplémentaires pour aboutir à la formation d'acide docosahexaénoïque (C22:6 n -3) (DHA) (Figure 2) (56).

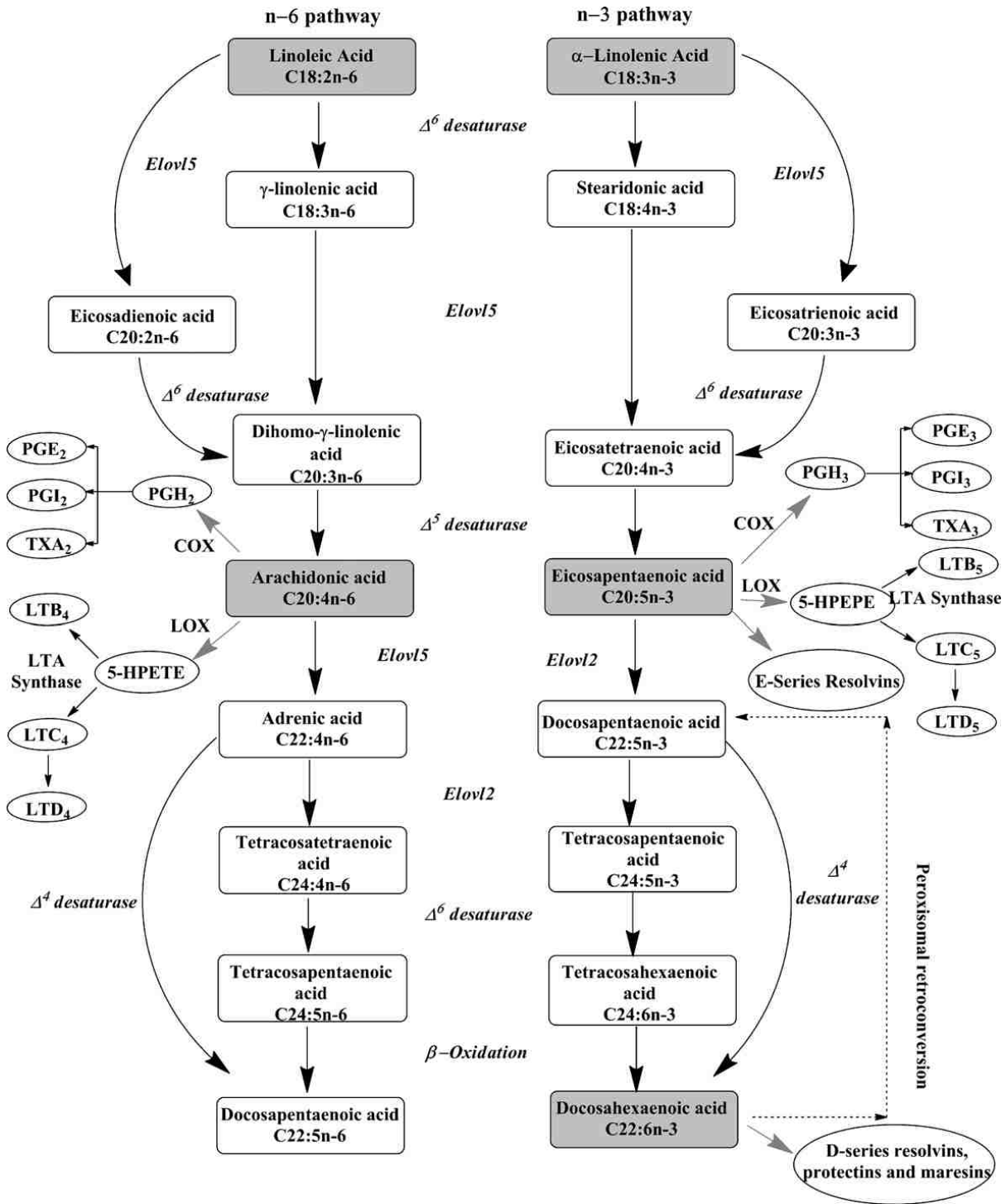


Figure 2: Voies métaboliques des acides gras insaturés n-6 et n-3 (d'après Poudyal *et al.* (57))

PGE= prostaglandines ; PGI= prostacyclines ; LT= leucotriènes ; TX= thromboxane ; 5-HPETE= acide 5-hydroperoxyeicosatétranoïque ; 5-HPEPE= acide 5-hydroperoxyeicosapentanoïque

Ainsi les deux précurseurs sont en compétition pour leur métabolisme puisqu'ils utilisent les mêmes enzymes. Par ailleurs, chez l'homme, les désaturations en $\Delta 6$ et $\Delta 5$ ainsi que les élongations sont des étapes métaboliques dont le rendement est relativement faible. Aussi, même si le DHA peut être synthétisé par l'organisme humain, il est aujourd'hui considéré comme un AG indispensable, car le taux de conversion de l'EPA en DHA est extrêmement faible (58). L'EPA et le DHA sont essentiellement fournis par les produits de la mer : poissons gras, coquillages, crustacés, huiles marines.

Les AG polyinsaturés (tels que l'acide linoléique, le DGLA, l'AA, l'EPA et le DHA) rentrent dans la composition des membranes phospholipidiques où leurs proportions sont fonction de leur apport (régime), des processus métaboliques, du type tissulaire / cellulaire et de la nature des phospholipides présents (car chaque type de phospholipide a une composition lipidique différente) (59).

L'AA et l'EPA peuvent être métabolisés via les voies de la lipoxygénase (LOX) et de la cyclooxygénase (COX). L'action de ces enzymes conduit à la formation d'une large famille de dérivés appelés les eicosanoïdes. Ceux-ci incluent les prostaglandines (PG), les thromboxanes (TX), les leucotriènes (LT), les époxydes et les oxylipines (57) (Figure 2).

Ainsi à partir de l'AA, la voie de la LOX conduit à la formation de LT de la série 4 et la voie de la COX à la formation de PG et TX de la série 2. Ces mêmes actions à partir de l'EPA conduisent à la formation de LT de la série 5 et de PG et TX de la série 3.

Ces composés présentent des propriétés différentes voire le plus souvent antagonistes. En effet, les métabolites issus de l'AA vont présenter des propriétés pro-inflammatoires, avec des effets proarythmiques, vasoconstrictifs, activateurs plaquettaires (60). On peut citer par exemple le TXA_2 , prostanoïde synthétisé essentiellement par les plaquettes suite à l'activation de la COX-1 puis de la thromboxane synthase. Ce prostanoïde en se fixant à son récepteur TP, possède des propriétés proathérogènes puisqu'il est capable d'activer les plaquettes, d'induire la contraction et la prolifération des cellules musculaires lisses ou encore de promouvoir l'expression de molécules d'adhésion (61). Par opposition, les métabolites issus de l'EPA et du DHA auront des propriétés anti-inflammatoires, antiarythmiques, vasodilatatrices (60). La Figure 3 résume l'ensemble de ces propriétés.

Par ailleurs, un groupe de médiateurs lipidiques pro-résolutifs, de découverte plus récente, est également métabolisé à partir de l'EPA et du DHA. Ce groupe inclut les résolvines produites à partir de l'EPA (série E) et du DHA (série D) et les protectines et marésines produites à partir du DHA. On parle également de neuroprotectines lorsque celles-ci sont produites au niveau du tissu neural. La synthèse de ces médiateurs implique les voies de la COX et de la LOX et en fonction de la présence ou non d'aspirine, les épimères générés ne sont pas les mêmes (62). Les médiateurs produits agissent via leur récepteur (par exemple le récepteur ALX/FPR2 pour la résolvine D1, le récepteur ChemR23 pour la résolvine E1) (62). Les effets biologiques de ces résolvines, protectines et marésines ont été largement étudiés in vitro et in vivo chez l'animal dans des modèles inflammatoires. Il apparaît ainsi que ces médiateurs sont anti-inflammatoires et résolutifs en cas d'inflammation (voir les revues de Weylandt *et al.* (63) et de Serhan (64)).

n-3 and n-6 fatty acid derived messengers				
	Arachidonic acid (n-6) derived messengers	←—————→		EPA and DHA (n-3) derived messengers
		Physiological effects	Physiological effects	
Prostaglandins	PGD ₂			PGD ₃
	PGE ₂	Pro-arrhythmic	Anti-arrhythmic	PGE ₃
	PGF ₂			PGF ₃
	PGI ₂	Pro-arrhythmic	Anti-arrhythmic	PGI ₃
Thromboxanes	TXA ₂	Platelat activator	Platelat inhibitor	TXA ₃
	TXB ₂	Vasoconstriction	Vasodilatation	TXB ₃
Leukotrienes	LTA ₄			LTA ₅
	LTB ₄	Pro-inflammatory	Anti-inflammatory	LTB ₅
	LTC ₄			LTC ₅
	LTD ₄			LTD ₅
	LTE ₄			LTE ₅
Epoxyeicosatri-enoic derivatives	5,6-EET			
	8,9-EET			
	11,12-EET	Inflammatory		
	14,15-EET			
Hydroxyleicosatetra-enoic derivatives	5-HETE			
	12-HETE			
	15-HETE			
Lipoxins	LXA ₄			
Resolvins			Anti-inflammatory	RVE1
			Anti-inflammatory	RVD
Neuroprotectin			Anti-inflammatory	NPD1

Figure 3 : Effets physiologiques des dérivés des AG n-6 et n-3
(d'après Schmitz et al. (60))

3.1.2. AG *n*-3 et sphère cardiovasculaire

Les maladies cardiovasculaires sont depuis longtemps reconnues comme étant une cause majeure de décès dans les pays industrialisés. Au cours des dernières années, de nombreuses études ont démontré que les AG *n*-3 (en particulier via des interventions nutritionnelles) peuvent avoir une influence sur le développement et la progression des maladies cardiovasculaires (voir les revues de Yanai *et al.* (65) et Burke *et al.* (66)). Il est important toutefois de noter que les résultats des différentes études sur le devenir cardiovasculaire sont variables avec des bénéfices cliniques ou un effet neutre. Les éléments à prendre en compte pour l'interprétation correcte de ces résultats sont la grande hétérogénéité des protocoles cliniques utilisés : supplémentation en AG *n*-3 en prévention primaire ou secondaire, population avec ou sans coronaropathie ou antécédent cardiovasculaire, dose utilisée, rapport EPA / DHA variable (67, 68).

L'histoire des AG *n*-3 a débuté dans le milieu des années 1970, avec les observations de Bang *et al.* (69) et de Dyerberg *et al.* (70) chez les Esquimaux du Groenland. En effet dans ces populations, l'athérosclérose était plus rare et la mortalité par infarctus du myocarde était plus faible que dans nos pays industrialisés, cette faible mortalité observée pouvait s'expliquer par la différence majeure entre l'alimentation des esquimaux et celle des populations industrialisées avec un apport quotidien en AG *n*-3 dix à vingt fois supérieur chez les esquimaux.

Depuis, des études épidémiologiques et interventionnelles ont démontré que la consommation d'AG *n*-3 réduit le risque de mortalité cardiovasculaire dans les pays occidentaux (71, 72). Leurs actions sont multiples, ils influencent favorablement un certain nombre de facteurs impliqués dans le développement de l'athérosclérose, suggérant qu'ils agissent en ralentissant la progression de la maladie. Tout d'abord, les études montrent qu'ils ont un impact sur le profil lipidique en diminuant la concentration en triglycérides sériques chez les sujets avec hypertriglycéridémie mais également chez des sujets avec une triglycéridémie normale (73, 74), ainsi qu'en augmentant la concentration en cholestérol-HDL (73) et la taille des particules de LDL (75). La supplémentation en AG *n*-3 peut aussi réduire la pression artérielle essentielle (76), abaisser le rythme cardiaque (77), diminuer l'agrégation plaquettaire et ainsi la formation de thrombus (78). De plus les AG *n*-3 ont une action anti-inflammatoire (62, 79) ce qui pourrait aider

à stabiliser les plaques d'athérosclérose et ainsi prévenir leur rupture comme rapporté dans l'étude clinique de Thies *et al.* (80).

3.1.3. Athérosclérose, inflammation, SAOS et potentiel des AG *n*-3

Comme nous l'avons vu précédemment, le SAOS présente une entité inflammatoire. Pour évaluer le rôle potentiel des AG *n*-3 dans ce contexte, il n'est pas possible, dans un premier temps, de les dissocier des AG *n*-6. En effet, le rôle des eicosanoïdes (issus du métabolisme des AG polyinsaturés) dans cette inflammation a été largement décrit par des travaux antérieurs menés au sein de notre laboratoire. Les études ont porté sur le métabolisme de l'AA et ont montré que les productions de leucotriènes B₄ (47, 48), des cystéinyls leucotriènes (48) et d'isoprostanes (49), sont augmentées et corrélées à la sévérité de l'hypoxie. De plus, il est intéressant de noter que ces médiateurs pro-inflammatoires (en particulier les LTB₄) sont également associés aux marqueurs de remodelage vasculaire précoce chez les patients apnéiques (47, 81).

Ainsi, l'AA est le substrat majeur pour la synthèse des eicosanoïdes (via la LOX et la COX) dans ce contexte ; il est issu de la membrane phospholipidique des cellules impliquées dans la réponse inflammatoire et est libéré de la membrane par l'action de la phospholipase A2 qui est elle-même activée par un stimulus inflammatoire (62).

De ce fait, puisque l'augmentation des apports en AG *n*-3 augmente leur incorporation dans les membranes phospholipidiques des cellules inflammatoires (62), on pourrait s'attendre à une variation de la production de médiateurs pro-inflammatoires issus de l'AA. Des études *in vitro* ont démontré que la supplémentation en DHA induisait une augmentation de la proportion de AG *n*-3 dans la composition de la membrane phospholipidique des polynucléaires neutrophiles et était corrélé à une augmentation du ratio LTB₅/LTB₄ (82). De même, d'autres études *in vivo* ont également mis en évidence qu'une supplémentation en AG *n*-3 de quelques semaines à quelques mois entraînait une diminution de PG de la série 2 et de LT de la série 4 chez des volontaires sains et dans certaines maladies chroniques (polyarthrite rhumatoïde, rectocolite ulcéro-hémorragique) (voir la revue de Calder à ce sujet (62)). Enfin, de récents travaux sur le modèle murin montrent le potentiel effet protecteur d'une supplémentation en EPA sur

l'athérosclérose via la production de médiateurs pro-résolutifs (précurseurs de la résolvine E1) capables de réguler le récepteur ERV1/ChemR23 de la résolvine E1 (83). La figure 4 résume parfaitement les effets métaboliques et vasculaires d'une supplémentation en AG *n*-3 (d'après Bäck M (67)).

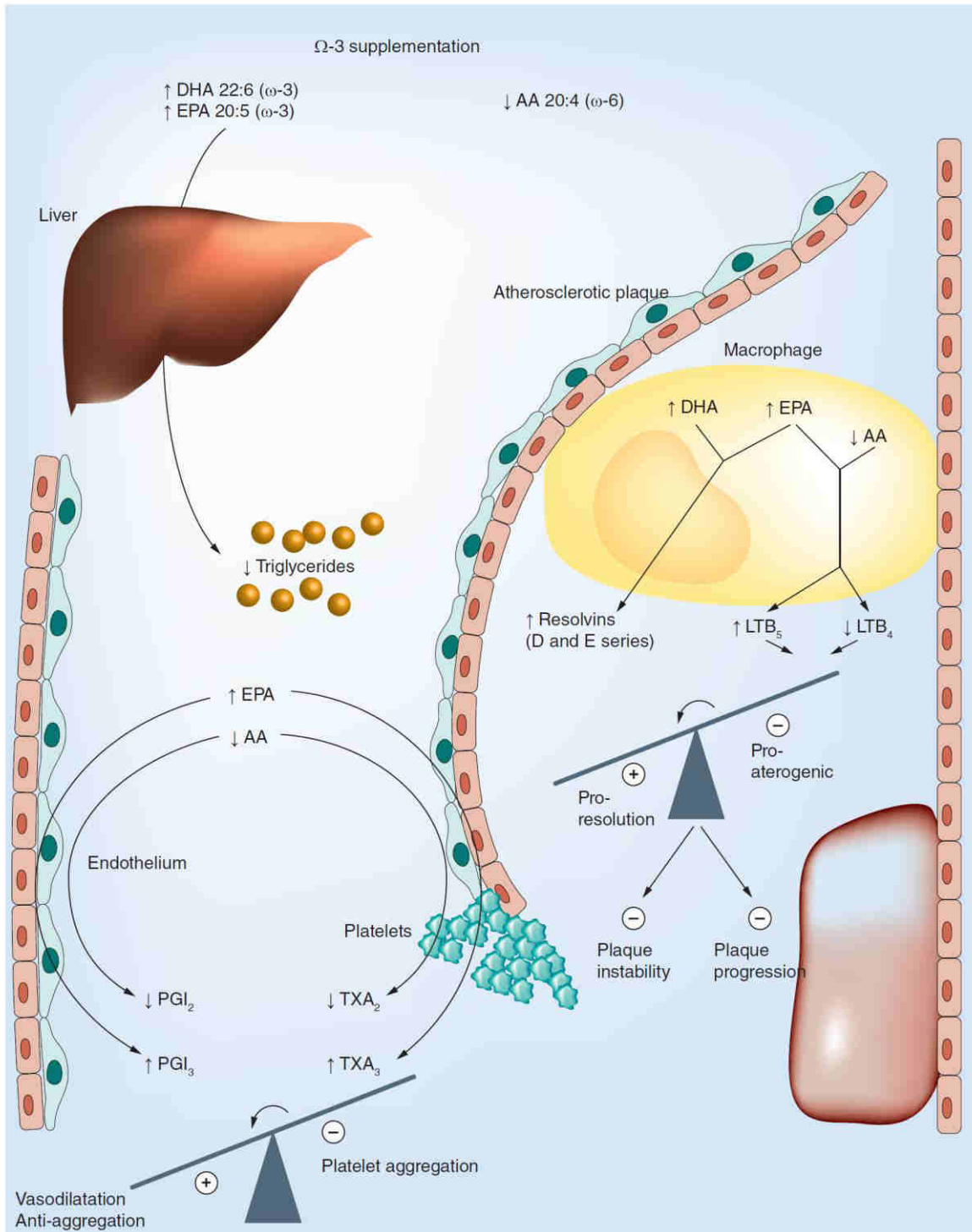


Figure 4 : Effets métaboliques et vasculaires d'une supplémentation en AG n -3 (d'après Bäck M (67))

Par ailleurs, nous avons déjà vu que le SAOS est associé à l'augmentation de cytokines inflammatoires (46, 84, 85). Des études antérieures ont montré que in vitro EPA et DHA

inhibaient la production d'IL-6 et IL-8 par les cellules endothéliales humaines (86, 87) ainsi que la production de TNF par les monocytes (88). De même des études expérimentales animales ont montré une diminution de la production de TNF, IL-1 β et IL-6 par les macrophages (89, 90) et au niveau circulant (91). Résultats également retrouvés chez l'homme (volontaires sains) dans certaines études (92, 93). L'un des mécanismes impliqués dans la down-régulation des cytokines inflammatoires par les AG *n*-3 serait la modulation de l'activation du facteur de transcription NF κ B, qui lui-même régule l'expression génique des cytokines inflammatoires. Cette modulation de l'activation pourrait se faire via l'activation de PPAR- γ (peroxisome proliferator activated receptor) qui interagit physiquement avec NF κ B et prévient sa translocation nucléaire ; via l'interaction avec le TLR4 (Toll Like Receptor 4) (le TLR4 est un récepteur à l'origine d'une cascade qui potentiellement aboutie à l'activation du NF κ B) ; ou enfin via l'interaction avec la GPR120 (protéine G couplée à un récepteur membranaire) qui génère une cascade anti-inflammatoire inhibant l'activation de NF κ B (62).

Enfin les métalloprotéinases matricielles (MMP) sont un groupe d'endopeptidases impliquées dans le métabolisme de la matrice extracellulaire et dans le clivage de certaines protéines. Ces enzymes, au nombre de 28, sont catégorisées en fonction de leur structure ou de leur affinité à différents substrats, on parle donc de collagénases, gélatinases, stromelysines, matrilysines et enfin les MMPs liées à la membrane (94). Un certain nombre de ces MMPs ont une activité enzymatique impliquée dans les processus biologiques associés à l'athérosclérose (MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14) (94). Ces MMPs sont connues pour être positivement régulées par les cytokines inflammatoires, et jouent un rôle important dans le remodelage cardiovasculaire en dégradant la matrice extracellulaire (95). Cependant les différentes études cliniques ont pour l'instant généré des résultats contradictoires sur le rôle des MMPs dans le contexte d'athérosclérose (94). Une augmentation de ces MMPs (en particulier MMP-9) a déjà été rapportée dans le contexte de SAOS, augmentation corrélée à la sévérité de l'hypoxie (96, 97). Des études chez l'homme ont par ailleurs démontré que les AG *n*-3 pourraient jouer un rôle dans la stabilité des plaques athéromateuses en modulant l'expression génique de certaines MMPs (MMP-7, -9, -12) (98, 99). Au total, le potentiel rôle des AG *n*-3 sur l'expression de ces MMPs dans le contexte de SAOS mérite d'être exploré.

3.2. Métabolisme des AG : la bêta-oxydation mitochondriale

3.2.1. Définition et rôle de la bêta-oxydation des AG

La β -oxydation des AG est une voie énergétique qui s'effectue pour 90% au niveau mitochondrial et pour le reste au niveau peroxysomal (AG à très longue chaîne). La mitochondrie, possède l'ensemble des enzymes nécessaires à la β -oxydation des AG. Celle-ci se réalise en deux phases distinctes. La première concerne le transport mitochondrial des AG à chaîne longue via le cycle de la carnitine (les AG à chaîne courte et moyenne traversent par simple diffusion passive la membrane mitochondriale), et la seconde la β -oxydation intra-mitochondriale.

Concernant le cycle de la carnitine, celui-ci se caractérise par l'action concertée de trois enzymes : la carnitinepalmitoyltransférase I (CPTI), la carnitine/acylcarnitine translocase (CACT) et la carnitinepalmitoyltransférase II (CPTII) (Figure 5) (100).

La β -oxydation proprement dite, se caractérise par une séquence de quatre réactions enzymatiques appelée hélice de Lynen (Figure 6). A chaque tour d'hélice, un résidu d'acétyl-CoA est libéré. Les quatre réactions sont les suivantes :

1) Déshydrogénation de l'acyl-CoA par une Acyl-CoA Déshydrogénase. Il existe plusieurs isoenzymes adaptées à la longueur de la chaîne de l'AG :

- la SCAD (Short Chain Acyl-CoA Dehydrogenase ou acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne courte) agit sur les AG à chaîne courte (2 à 4 C)
- la MCAD (Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase) agit sur les AG à chaîne moyenne (6 à 10 C)
- la LCAD (Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase ou acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne longue) agit sur les AG à chaîne ramifiée.
- la VLCAD (Very Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase ou acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à très longue chaîne) agit principalement sur les AG à chaîne longue (C12 à C20) mais également sur les acides gras à très longue chaîne jusqu'à 24 C.

Cette étape conduit à la formation d'énoyl-CoA.

2) Hydratation de la double liaison catalysée par une crotonase pour les chaînes moyennes et courtes ou par la protéine trifonctionnelle (activité énoyl-CoA hydratase) pour les chaînes longues.

3) Déshydrogénation par la 3-hydroxy-acyl-CoA déshydrogénase. Pour cette étape, il existe plusieurs isoenzymes suivant la longueur de la chaîne : la M/SCHAD (Medium/Short Chain 3 HydroxyAcyl-CoA Dehydrogenase ou 3 hydroxyacyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne/courte) pour les chaînes courtes et moyennes et la LCHAD (Long Chain 3 HydroxyAcyl-CoA Dehydrogenase ou 3 hydroxyacyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne longue) pour les chaînes longues (activité enzymatique détenue par la protéine trifonctionnelle).

4) Libération d'acétyl-CoA après clivage par la 3-cétothiolase. Pour les chaînes longues, il s'agit de la LKAT (Long Chain 3-Cétoacyl-CoA Thiolase ou 3 cétoacyl-CoA thiolase des chaînes longues) (activité enzymatique détenue par la protéine trifonctionnelle). Pour les chaînes moyennes et courtes, il s'agit de la MCKAT (Medium Chain 3-Cétoacyl-CoA Thiolase ou 3 cétoacyl-CoA thiolase des chaînes moyennes).

L'acyl-CoA du départ se retrouve donc amputé de deux carbones (acétyl-CoA) et subit d'autres cycles d'oxydation jusqu'à l'apparition d'un 3-céto-acyl-CoA à quatre atomes de carbone qui sera scindé en deux acétyl-CoA.

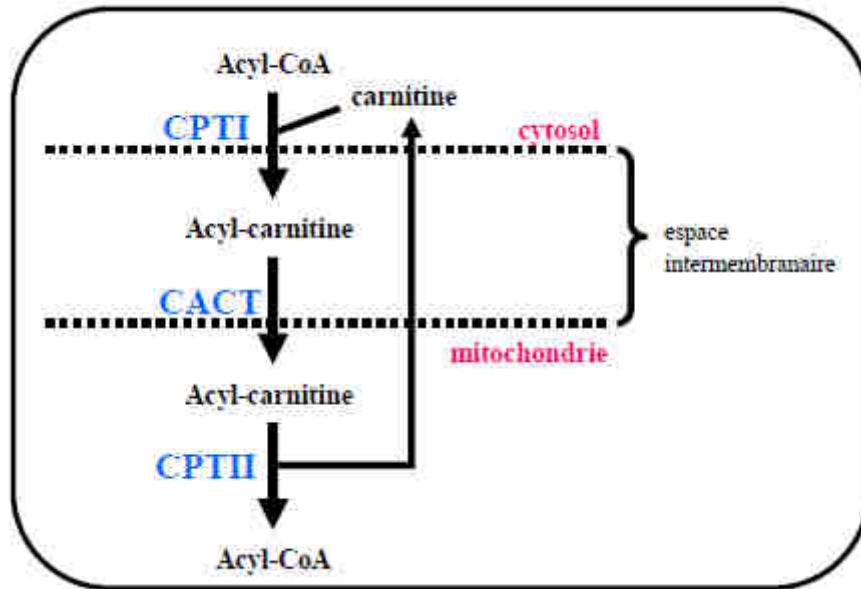


Figure 5: Cycle de la carnitine (d'après De Lonlay 2002 (101))

Les AG à longue chaîne pénètrent dans la mitochondrie via la navette carnitine qui implique trois enzymes : la CPTI (carnitine-palmitoyl transférase I), la CACT (carnitine/acylcarnitine translocase) et la CPTII (carnitinepalmitoyl transférase II)

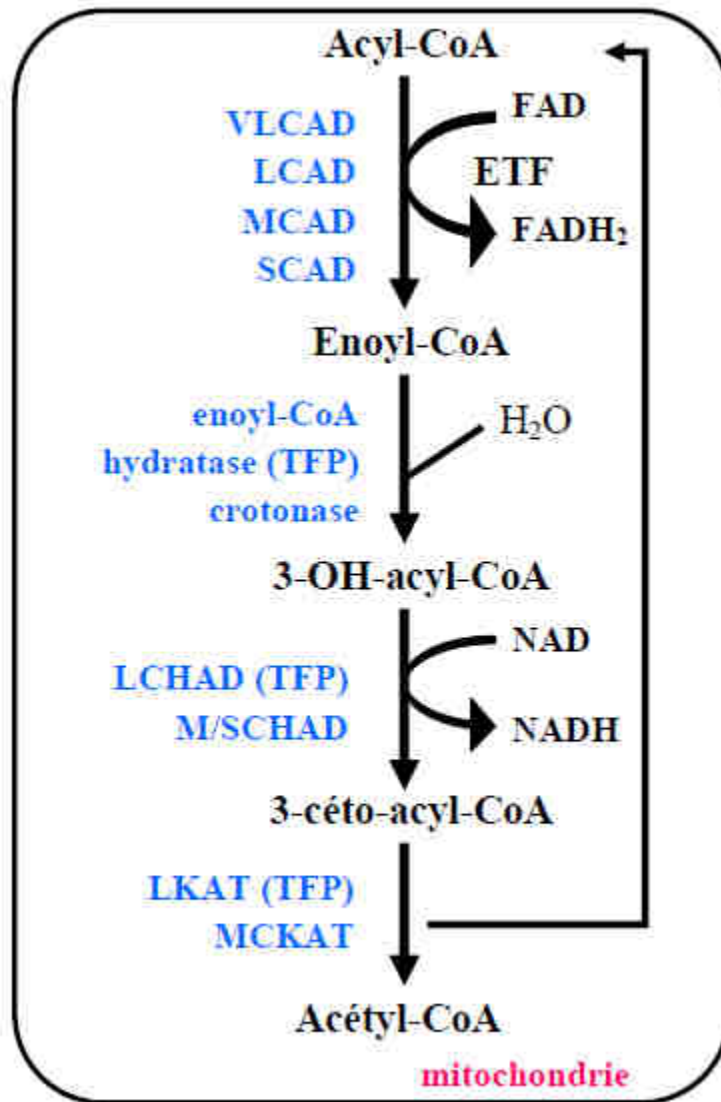


Figure 6 : Cycle de la bêta-oxydation mitochondriale (d'après Houten 2010 (102))

Enzymes impliquées : VLCAD (very long chain acyl-CoA dehydrogenase) ; LCAD (long chain acyl-CoA dehydrogenase) ; MCAD (medium chain acyl-CoA dehydrogenase) ; SCAD (short chain acyl-CoA dehydrogenase) ; TFP (enzyme trifonctionnelle) ; LCHAD (long chain 3 hydroxyacyl-CoA dehydrogenase) ; M /SCHAD (medium/short chain 3 hydroxyacyl-CoA dehydrogenase) ; LKAT (long chain 3-cétoacyl-CoA thiolase) ; MCKAT (medium chain 3-cétoacyl-CoA thiolase) ; ETF (Electron Transfer Flavoprotein).

Chez les individus sains, l'oxydation des AG permet de répondre à un besoin énergétique important lié à une déplétion en glycogène qui peut résulter soit d'un jeûne, soit d'une activité musculaire augmentée. Durant ces épisodes, les taux circulants de glucose et d'insuline diminuent et activent la lipase hormonosensible au niveau du tissu adipeux. Il y a alors libération d'AG libres, lesquels se lient à l'albumine et sont distribués aux tissus périphériques (103). En effet, toutes les cellules de l'organisme nécessitent un ou plusieurs substrats énergétiques pour assurer leur intégrité fonctionnelle. Certains organes, tels que le cœur et le muscle au repos ou à l'effort prolongé utilisent préférentiellement les AG comme principale source d'énergie cellulaire. On estime que l'oxydation des AG chez un sujet soumis à un régime normal, fournit plus de 40% des besoins énergétiques et durant le jeûne, celle-ci peut fournir jusqu'à 80% des besoins énergétiques totaux (104). Le produit final de l'oxydation des AG, l'acétyl-CoA, se condense avec l'oxaloacétate en citrate, oxydé dans le cycle de Krebs. Par ailleurs, le foie s'avère être également un site majeur d'utilisation des AG. En effet, l'énergie sous forme d'ATP nécessaire à la gluconéogenèse et à l'uréogenèse est fournie par l'oxydation des AG. D'autre part, l'acétyl-CoA est le précurseur de la cétogenèse. Les corps cétoniques produits sont déversés dans la circulation générale et utilisés à des fins énergétiques par de nombreux tissus (101).

3.2.2. Exploration du métabolisme de la bêta-oxydation : le profil des acylcarnitines (ACs)

Comme nous l'avons vu précédemment, la carnitine est indispensable au transport des AG à chaînes longues au sein de la mitochondrie pour qu'ils puissent subir la bêta-oxydation. Elle joue également un rôle dans le transport hors de la mitochondrie des fragments acylés issus de la β -oxydation. En effet, ce mécanisme de détoxification est en particulier important lorsque les acyl-CoA s'accumulent dans la mitochondrie, notamment en cas d'anomalie de la β -oxydation des AG (102). La carnitine sert alors de transporteur aux fragments d'AG potentiellement oxydés en les déplaçant hors de la mitochondrie sous la forme d'AC. Les ACs peuvent être de différentes longueurs de chaînes, en fonction du point de blocage de la bêta-oxydation (chaînes courtes, moyennes ou longues) et sont analysées sous forme de profil des AC.

La méthode de choix pour réaliser le profil des ACs est la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), méthode largement utilisée aujourd'hui. Par ailleurs, il est important d'associer à ce profil un dosage de carnitine totale et libre. En effet, étant donné que les ACs

résultent de la conjugaison des acyl-CoA avec de la carnitine libre, une déplétion en carnitine libre sanguine entraînera alors une diminution de la formation des ACs et pourra masquer l'état de bêta-oxydation du patient.

Concernant l'approche analytique de cette analyse, les ACs possèdent un groupement ammonium quaternaire leur permettant de former des ions positifs polaires et non volatils. La MS/MS permet aujourd'hui de développer des techniques permettant de réaliser la détection et l'identification des ACs sans nécessiter une étape de séparation par chromatographie liquide. Cette détermination des ACs est ainsi largement réalisée par des techniques de MS/MS associées à une source d'ionisation électrospray (ESI). L'analyse est réalisée en mode positif et utilise le mode Precursor Ion Scan. En effet ce mode permet d'évaluer le profil complet des ACs et de la carnitine libre. L'ensemble des ACs va produire un ion commun de masse 85 Da après fragmentation et perte de certains groupements. Le profil est alors obtenu en sélectionnant tous les ions parents donnant cet ion 85 Da (Figure 7) (105). Afin de permettre la quantification des différentes ACs retrouvées sur le profil, des étalons internes deutérés de différentes longueurs de chaîne sont utilisés et ajoutés en concentration connue.

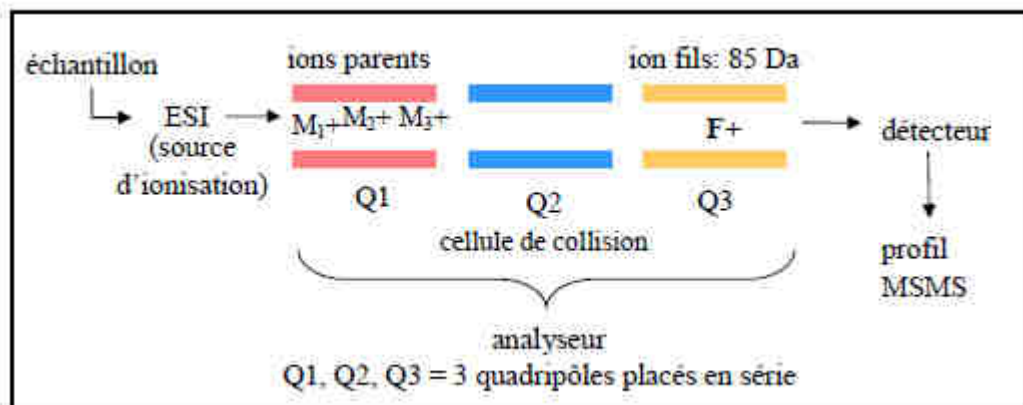


Figure 7: Application de la spectrométrie de masse en tandem au profil des ACs (mode Precursor Ion Scan)

Représentation schématique de l'analyse du profil des AC par MS/MS. L'échantillon est injecté dans le spectromètre de masse et passe dans l'analyseur constitué de trois quadripôles. Les ions parents (retrouvés en Q1) passent par la cellule de collision (Q2) et l'ion fils (85 Da) est détecté en Q3.

3.2.3. Pathologies cardiovasculaires, maladies chroniques, SAOS et bêta-oxydation des AG

L'étude de la bêta-oxydation mitochondriale des AG et la réalisation du profil des ACs étaient jusqu'à très récemment limitées aux patients suspects d'une anomalie de la bêta-oxydation mitochondriale des AG (maladie métabolique héréditaire). La revue de la littérature, rapporte maintenant des études prometteuses utilisant le profil des ACs pour évaluer les maladies métaboliques chroniques (diabète, obésité...), les pathologies cardiovasculaires, l'insuffisance rénale et même chez des patients atteints de troubles du sommeil.

Ainsi, il est rapporté que les ACs plasmatiques à chaînes longues sont augmentées chez l'obèse et le diabétique de type 2, suggérant que plus d'AG peuvent entrer dans la mitochondrie. De plus chez les diabétiques de type 2, les chaînes courtes s'accumulent, suggérant un défaut généralisé du complexe d'oxydation (106).

Les études dans le contexte des pathologies cardiovasculaires ne sont pas encore nombreuses et présentent différents résultats. Ainsi, des concentrations élevées d'acétylcarnitine (C2), d'octanoylcarnitine (C8) et de palmitoylcarnitine (C16) sont associées à un risque élevé de mortalité cardiovasculaire ainsi qu'un risque plus modéré d'infarctus du myocarde chez des patients suspects d'angine de poitrine (107). Chez des sujets âgés, une étude réalisée chez des patients ayant présenté des événements cardiovasculaires retrouve une augmentation des chaînes moyennes et longues d'ACs, reflet potentiel de la dysfonction mitochondriale (108) alors qu'une autre étude portant chez des patients à haut risque cardiovasculaire montre une augmentation des chaînes courtes et moyennes (109). Enfin, chez des patients ayant subi un pontage aorto-coronarien, une augmentation des ACs dicarboxylées à chaînes courtes est associée à un pronostic post-chirurgie plus réservé chez ces patients (110).

Dans le contexte de l'insuffisance rénale, il est décrit chez des patients dialysés, que les ACs plasmatiques à longues chaînes (en particulier l'oleylcarnitine) pourraient être un élément prédictif de comorbidité cardiovasculaire (111).

Par ailleurs, des études concernant la relation entre le profil des ACs et la sévérité des troubles respiratoires du sommeil (mesurée par l'IAH) ont déjà été réalisées et montrent que chez des patients atteints d'une insuffisance cardiaque chronique, les ACs plasmatiques sont significativement plus élevées quand les patients présentent des troubles respiratoires du

sommeil importants (IAH>30/h) par rapport aux patients présentant des troubles modérés voire pas de troubles (IAH 0-15/h) (112).

Ainsi, chez les patients atteints d'un SAOS, cette comorbidité cardiovasculaire est également présente, et une altération du profil des ACs pourrait être observée. Aussi, une étude concernant les ACs et le catabolisme des AG dans le contexte du SAOS permettrait d'améliorer les connaissances actuelles sur ce sujet.

4. Traitement et prise en charge du SAOS

Le traitement du SAOS a pour but d'atténuer les symptômes, d'améliorer la qualité de vie des patients, de réduire les comorbidités et de diminuer la mortalité. Aussi la thérapeutique mise en place devrait être adaptée à la sévérité du SAOS ainsi qu'aux comorbidités associées pour un patient donné.

Chez les patients atteints d'un SAOS sévère, un traitement est indispensable et l'application d'une PPC est la thérapeutique de première ligne (4). La PPC est un traitement qui consiste en l'application d'air légèrement pressurisé dans les voies aériennes supérieures afin d'éviter leur obstruction. Cette thérapeutique implique donc l'utilisation d'une machine divisée en trois parties (Figure 8) : un masque que l'on va appliquer sur le nez ou le nez et la bouche et qui est équipé de sangles pour le maintenir en place ; un tube qui connecte le masque au moteur de la machine et enfin une machine qui permet de souffler de l'air dans le tube.

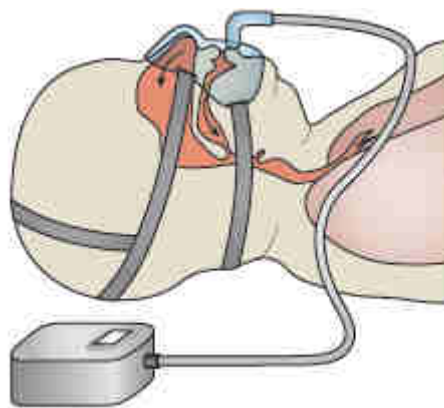


Figure 8: Traitement par PPC : appareillage (d'après Levy 2015 (4))

La PPC a été introduite en 1981 (113) et reste le traitement de première ligne du SAOS. Elle permet de normaliser la ventilation durant le sommeil et de réduire ainsi la somnolence diurne (114), cependant cette thérapeutique garde certaines limites. En effet de par son caractère contraignant, la tolérance et donc l'observance de la PPC restent médiocres. Ainsi

approximativement 15% des patients refusent la PPC après une nuit d'utilisation (4) et la compliance est difficile à obtenir chez environ 20% des patients (115). Par ailleurs, l'efficacité de ce traitement sur la morbi-mortalité cardiovasculaire semble limitée, en particulier chez les patients obèses et présentant des comorbidités cardiovasculaires (116). L'étude SERVE-HF a également récemment montré que le traitement par PPC était associé à une surmortalité cardiovasculaire chez les patients atteints d'un SAOS (22).

Il existe aujourd'hui des alternatives thérapeutiques à la PPC telle que le l'orthèse d'avancée mandibulaire (traitement mécanique), la chirurgie des voies aériennes supérieures, la perte de poids par des mesures hygiéno-diététiques ou encore des traitements pharmacologiques (voir la revue de D. White (117) et E. Gautier-Veyret (118) à ce sujet). Ces thérapeutiques peuvent être proposées comme alternatives ou en complément de la PPC (4) même si leurs effets sur le système cardiovasculaire restent à éclairer.

2^{ème} partie : Travaux de thèse

1. Objectifs des travaux de thèse

L'augmentation de la morbi-mortalité cardiovasculaire des patients apnéiques est liée aux nombreuses conséquences vasculaires et métaboliques du SAOS. Les connaissances physiopathologiques des altérations vasculaires induites par le SAOS ont largement progressé ces dernières années. Les travaux précédemment menés au sein de notre laboratoire ont montré que le métabolisme de l'acide arachidonique (AG *n*-6) est perturbé (47-49, 119, 120) avec en particulier un lien entre l'augmentation de certains eicosanoïdes (LTB₄, isoprostanes, voie du TXA₂) et le remodelage vasculaire. Ces eicosanoïdes sont identifiés comme des déterminants du processus athéromateux et sont de ce fait des cibles thérapeutiques pour lutter contre l'athérosclérose (61).

Les AG *n*-3 présentent de multiples propriétés et peuvent avoir une influence sur le développement et la progression des maladies cardiovasculaires (65, 66) notamment grâce à une modification de la balance AG *n*-6 / AG *n*-3 (62). Les conséquences d'une intervention nutritionnelle sur ces pathologies sont toujours en cours d'évaluation et génèrent des résultats variables (68). L'impact d'une telle supplémentation sur l'inflammation et *in fine* l'athérosclérose dans le contexte du SAOS n'a à ce jour pas été évaluée.

Ainsi, le premier objectif de ce travail a été de caractériser sur un modèle expérimental murin d'athérosclérose, l'effet d'une supplémentation en AG *n*-3 sur le profil tissulaire des AG, et d'évaluer son implication dans le développement de l'athérosclérose induite par l'HIC. Ces travaux ont été complétés par une étude clinique évaluant la distribution AG *n*-6 / AG *n*-3 au niveau érythrocytaire de patients atteints d'un SAOS.

Le catabolisme des AG via la β -oxydation mitochondriale génère des produits intermédiaires retrouvés sous forme d'AC. Ces métabolites font l'objet d'un nombre croissant d'études notamment dans le contexte de pathologies cardiovasculaires (107-110) annonçant l'émergence de possible biomarqueurs prédictifs du risque cardiovasculaire.

Aussi, dans un second temps, par une approche expérimentale puis clinique, nous nous sommes intéressés à l'impact du SAOS sur le métabolisme de la β -oxydation mitochondriale et à ses conséquences sur la fonction vasculaire.

2. Matériel et méthode

2.1. Etudes expérimentales

Les études animales ont été menées en accord avec la convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques (Conseil de l'Europe, Traité Européen ETS N°123 du 18 mars 1986, Strasbourg) et le guide pour l'utilisation et le soin des animaux de laboratoire (NIH Publication no. 85–23, revised 1996).

Le sujet portant sur l'athérosclérose induite par le SAOS, nous avons mené nos études expérimentales sur un modèle animal classique d'athérosclérose, c'est-à-dire la souris déficiente pour l'apolipoprotéine E (ApoE^{-/-}).

Ces souris ont été soumises à l'HI ou à la normoxie au sein d'un dispositif précédemment décrit (121) (Figure 9 A). Brièvement, un système d'électrovannes permet de distribuer de l'air et de l'azote au sein des cages de manière à faire varier la fraction partielle en oxygène (FiO₂) (Figure 9 B). Ainsi, les animaux exposés à l'HI étaient soumis à un cycle d'hypoxie par minute : exposition à un mélange d'air et d'azote pendant 30 secondes permettant d'atteindre une FiO₂ à 5%, puis à 30 secondes d'air pour rétablir une FiO₂ de 21% (Figure 9 C). Ces cycles étaient répétés 8 heures par jour à heures fixes durant toute la durée de l'exposition et ceci au cours de la journée (période où les rongeurs dorment). Les souris normoxiques étaient quant à elles soumises au même flux de gaz, de manière à reproduire exactement les mêmes conditions d'hébergement, sans que la composition de l'air ne varie au cours du temps.

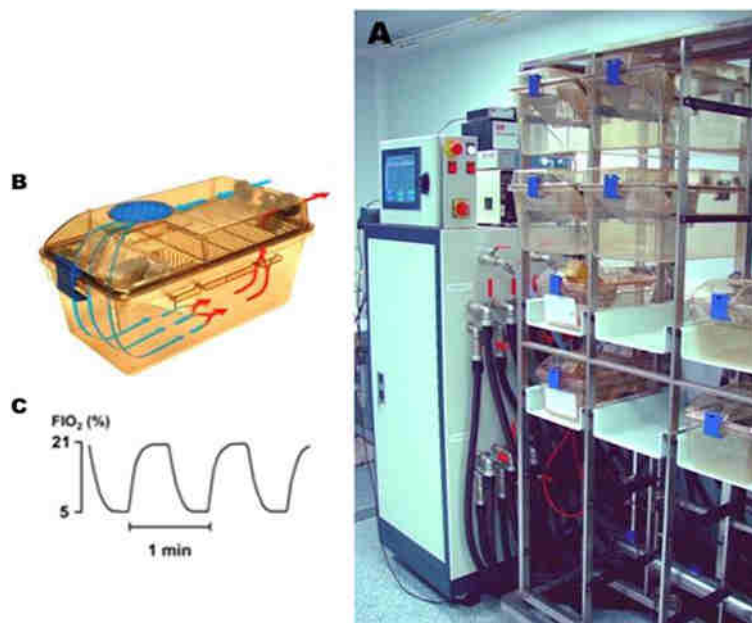


Figure 9 : Représentation du dispositif à hypoxie

A : Photographie du dispositif ; B : Flux d'air dans une cage ; C : Variation de la FiO_2 au cours du temps

2.2. Etudes cliniques

Les protocoles de recherche ont été menés dans le respect de la réglementation française en vigueur, notamment des dispositions relatives à la recherche biomédicale du Code de la Santé Publique, article L 1121-1 et suivants, des lois de Bioéthique, de la loi Informatique et Libertés, de la déclaration d'Helsinki, ainsi que des Bonnes Pratiques Cliniques.

L'analyse des AG érythrocytaires a été réalisée à partir d'une étude ancillaire du protocole clinique n° 2012-A01157-36 dont les critères d'inclusion des sujets étaient les suivants : patients de sexe masculin ou féminin, âgés de plus de 18 ans, avec un diagnostic de diabète de type 2, suivis pour coronaropathie ou artériopathie périphérique stable depuis plus de 3 mois, traités par aspirine soluble depuis plus de 10 jours, sans modification du traitement par aspirine ou du traitement antidiabétique depuis 10 jours, suivis en ambulatoire, sans événement cardiovasculaire aigu, ni pathologie inflammatoire ou infectieuse dans les trois mois précédents la recherche du SAOS. Les critères d'exclusion étaient les suivants : femme enceinte,

parturiente, patient en phase terminale d'une maladie grave, personne privée de liberté par décision judiciaire ou administrative, personne faisant l'objet d'une mesure de protection légale (article L1121-8), période d'exclusion pour d'autres études, personne qui n'est pas affiliée à un régime de sécurité sociale ou non bénéficiaire d'un tel régime, traitements médicamenteux autres que l'aspirine pouvant agir sur l'agrégation plaquettaire ou la coagulation (en particulier un autre antiagrégant plaquettaire comme le clopidogrel, le prasugrel ou le ticagrelor, un anti vitamine K, un anti inflammatoire non stéroïdien), éthylisme chronique, coagulopathie, thrombocyte < 10 000 / mm², hématicrite < 25%, clearance MDRD de la créatinine < 30 ml/min, traitement antérieur du SAOS par PPC.

Ces patients ont ensuite bénéficié d'un enregistrement polysomnographique qui a permis de les catégoriser en 3 groupes : non SAS (IAH < 15), SAOS légers ou modérés (15 ≤ IAH < 30) et enfin SAOS sévères (IAH ≥ 30). Les inclusions de cette étude n'ayant permis d'obtenir que très peu de patients SAOS légers à modérés, l'exploitation des données ne se fera qu'avec les patients non SAOS et les patients SAOS sévères. L'ensemble des patients a bénéficié de prélèvements sanguins le matin suivant l'étude du sommeil (à jeun) ainsi qu'une mesure de la rigidité artérielle (Vitesse de l'onde de pouls (VOP) et Index de pression systolique (IPS)), marqueur pronostic du risque cardiovasculaire. La VOP est mesurée de façon non invasive à l'aide de deux capteurs placés simultanément sur la peau au regard des artères carotide primitive et fémorale commune droites. La mesure est réalisée chez un sujet en décubitus dorsal, au repos depuis quelques minutes. Chaque capteur enregistre l'onde de pression dans l'artère sous-jacente. L'intervalle de temps séparant le début de l'onde carotidienne de celui de l'onde fémorale correspondante (temps de transit carotido-fémoral) est mesuré de façon automatique (Complior®, Colson, Garges-les-Gonesse, France). La VOP est définie par le rapport entre la distance séparant les deux capteurs, mesurée par un mètre ruban, sur le temps de transit carotido-fémoral moyenné sur 10 battements. L'IPS quant à lui, consiste au rapport de la pression artérielle prise au niveau de la cheville (artère tibiale postérieure et antérieure) sur la pression artérielle mesurée au bras (pression systolique humérale), mesures réalisées sur un patient au repos, détendu, en décubitus dorsal depuis au moins 10 minutes.

L'analyse du profil des ACs a été réalisée à partir d'une étude ancillaire de différents protocoles cliniques (NCT01196845 / NCT00464659 / NCT00669695) dont les critères

d'inclusion des sujets étaient les suivants : être âgé de plus de 18 ans, et avoir un SAOS modéré à sévère (IAH > 15/h). Les patients étaient exclus s'ils présentaient un antécédent d'AVC, d'arrêt cardiaque, d'hypertension artérielle essentielle sévère ou une consommation journalière d'alcool supérieure à 20g pour les femmes et 30g pour les hommes. Les sujets inclus dans différents protocoles de recherche clinique ont bénéficié d'un enregistrement polysomnographique. Le diagnostic de SAOS était retenu selon les critères précédemment détaillés (4). Le matin suivant l'étude du sommeil, des prélèvements sanguins à jeun ont été réalisés pour détermination de différents paramètres biologiques. Les patients ont ensuite été randomisés en 2 groupes : traitement par PPC ou sham PPC. La durée du traitement étant variable suivant le protocole considéré (6, 8 ou 12 semaines).

2.3. Dosages biologiques spécifiques

2.3.1. Profil des acides gras

Les lipides totaux (plasma, culot globulaire lavé, broyat d'organe) sont extraits, en présence d'un standard interne : l'acide heptadécanoïque (C17:0), par un mélange de solvants hexane/isopropanol (3/2). Ce solvant est utilisé en système monophasique pour éviter une perte des phospholipides les plus acides dans la phase aqueuse (122). Après évaporation à sec sous azote de l'extrait lipidique, les lipides sont saponifiés (soude méthanolique) et méthylés (BF3-méthanol) selon une adaptation de la méthode de Metcalfe et Schmitz (123). Les AG méthylés sont extraits par de l'heptane, puis séparés par chromatographie en phase gazeuse et détectés par ionisation de flamme (GC/FID 6890N, Agilent Technologies, Massy, France). Les pics sont identifiés et quantifiés à l'aide d'un mélange étalon calibré (comportant 22 AG) par rapport au standard interne C17:0 (Figure 10).

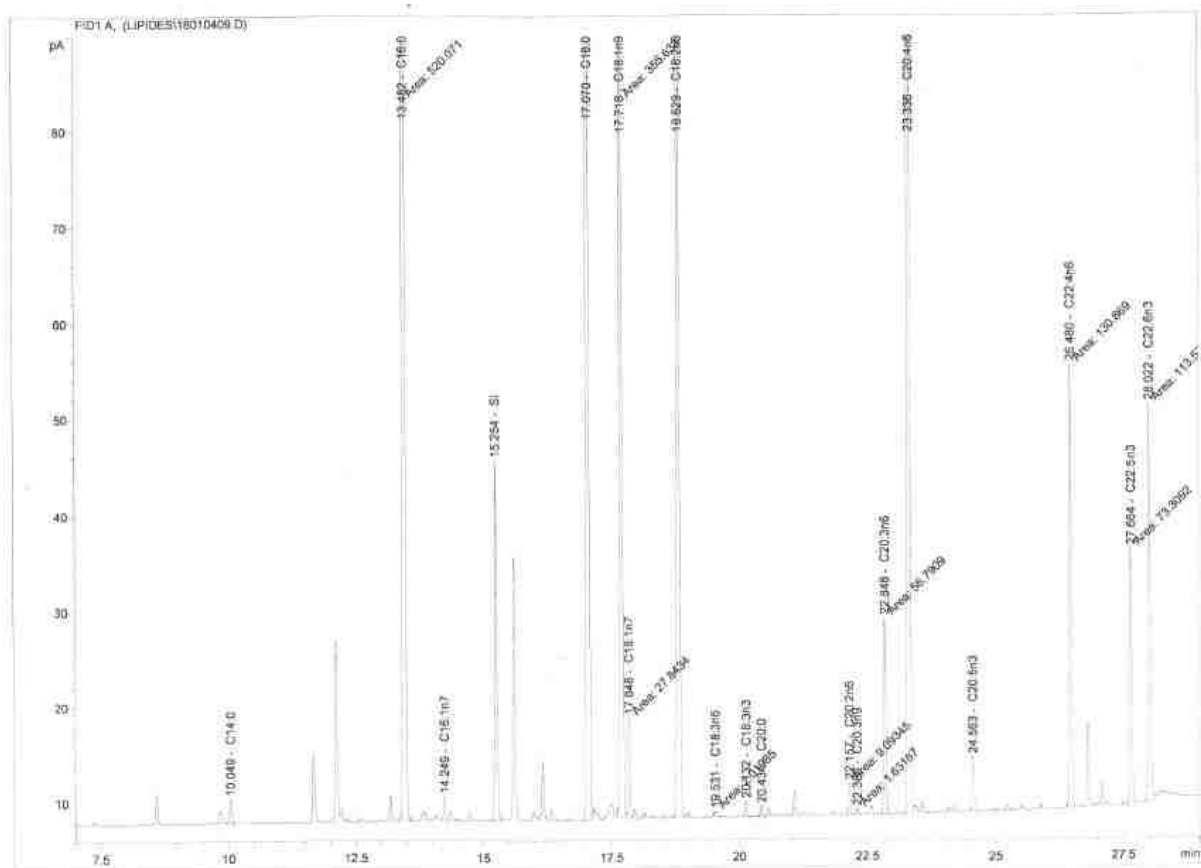


Figure 10 : Exemple de profil des acides gras chez un sujet sain

2.3.2. Profil des acylcarnitines

Le profil des ACs sériques / plasmatiques est réalisé par spectrométrie de masse en tandem (API 3000, Applied Biosystems / Sciex, Foster City, Californie, USA) (ESI/MS/MS en mode positif). Les échantillons (prise d'essai : 20µL) sont dilués dans de l'éthanol (400µL) et un mélange d'étalons internes deutérés (d3-C2, d3-C3, d3-C4, d9-C5, d3-C8, d9-C14, d3-C16) dissous dans du méthanol (20µL). Les échantillons sont centrifugés et le surnageant contenant les ACs extraites est récupéré et évaporé sous azote. Les ACs sont ensuite dérivées en butyl-esters par ajout de 3N butanol HCl et chauffées à 65°C pendant 15 minutes. Les échantillons sont de nouveau évaporés sous azote et repris au final par de la phase mobile (acétonitrile / eau / acide formique (50/50/0.025%)). Pour l'analyse en MS/MS, les ACs sont analysées sans séparation chromatographique, en utilisant le mode Precursor Ion Scan : ainsi, pour les dérivés

butylés, tous les précurseurs (masse comprise entre 200 et 500 Da) qui produisent un ion de masse 85 Da sont enregistrés (105, 124) (Figure 11).

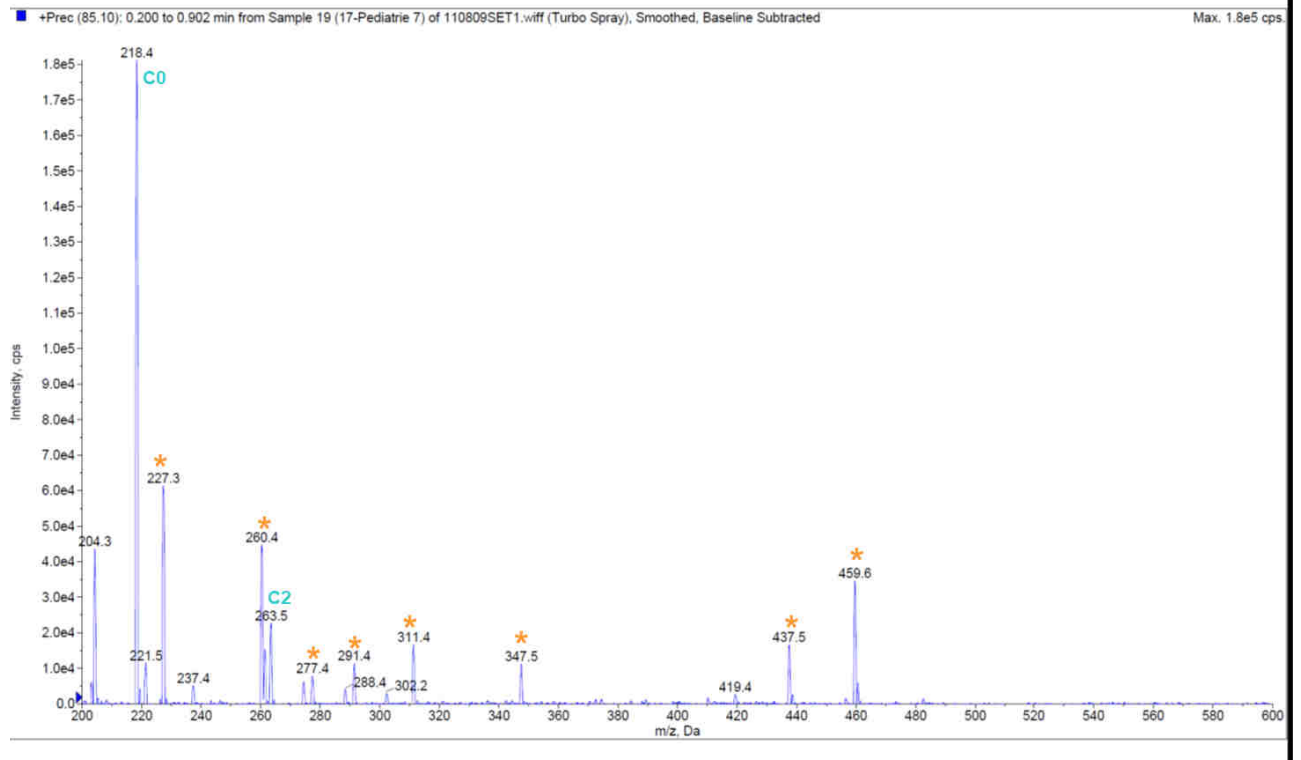


Figure 11 : Exemple de profil d'acylcarnitines plasmatiques chez un sujet sain

Les pics marqués d'un astérisque orange (*) correspondent aux standards internes ; la longueur des acylcarnitines est indiquée en bleu (Cxx)

3. Résultats et publications

3.1. Etude expérimentale : supplémentation en AG *n*-3 et prévention de l'athérosclérose induite par l'hypoxie intermittente chronique

Le rôle des AG *n*-3 dans les pathologies cardiovasculaires a été largement rapporté par de nombreuses études (66, 125) même si certains résultats restent encore controversés. Dans le contexte du SAOS, aucune étude interventionnelle sur le potentiel rôle des AG *n*-3 dans la prévention de l'athérosclérose n'a été réalisée à notre connaissance.

Ainsi, l'objectif de cette première étude originale a été d'étudier sur le modèle animal, l'effet d'une supplémentation en AG *n*-3 (en particulier de DHA) au cours de l'HIC, phénomène retrouvé chez les patients atteints d'un SAOS et de préciser son rôle dans l'athérogenèse associée à l'HIC.

L'effet du DHA a été évalué chez des souris ApoE^{-/-} exposées à l'HI pendant 8 semaines et une supplémentation en DHA (supplémentation par huile de poisson) a permis d'apprécier les effets sur l'équilibre oméga-3 / oméga-6 des AG polyinsaturés et son implication dans le processus athéromateux lié à l'HI.

Article original N°1

« Docosahexaenoic acid supplementation modifies fatty acid incorporation in tissues and prevents hypoxia induced-atherosclerosis progression in apolipoprotein-E deficient mice »

L Van Noolen, M Bäck, C Arnaud, A Rey, MH.Petri, P Levy, P Faure F Stanke-Labesque

Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 91 (2014) 111–117



Contents lists available at ScienceDirect

Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/plefa

Docosahexaenoic acid supplementation modifies fatty acid incorporation in tissues and prevents hypoxia induced-atherosclerosis progression in apolipoprotein-E deficient mice



Laetitia Van Noolen^{a,b,c}, Magnus Bäck^{d,e}, Claire Arnaud^{a,b}, Amandine Rey^c, Marcelo H. Petri^d, Patrick Levy^{a,b,c}, Patrice Faure^{a,b,c}, Françoise Stanke-Labesque^{a,b,c,*}

^a Université Grenoble Alpes, F-38041 Grenoble, France^b INSERM U1042, HP2, F-38041 Grenoble, France^c CHU, Hôpital A. Michalon, Département de Biochimie, Toxicologie et Pharmacologie, CS 10217, F-38043 Grenoble cedex 9, France^d Department of Medicine, Karolinska Institutet, 17176 Stockholm, Sweden^e Department of Cardiology, Karolinska University Hospital, 17176 Stockholm, Sweden

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 February 2014

Received in revised form

2 July 2014

Accepted 21 July 2014

Keywords:

Docosahexaenoic acid
Eicosapentaenoic acid
Omega 3 polyunsaturated fatty acid
Intermittent hypoxia
Inflammation
Atherosclerosis

ABSTRACT

The *n*-3 polyunsaturated fatty acid, docosahexaenoic acid (DHA), displays anti-inflammatory properties that may prevent atherosclerosis progression. Exposure of apolipoprotein-E deficient (ApoE^{-/-}) mice to chronic intermittent hypoxia (CIH) accelerates atherosclerosis progression. Our aim was to assess DHA-supplementation influence on fatty acid incorporation in different tissues/organs and on atherosclerosis progression in ApoE^{-/-} mice exposed to CIH.

ApoE^{-/-} mice were exposed to CIH or normoxia (N) and randomized to four groups (N control, CIH control, N+DHA, and CIH+DHA). DHA-supplementation enhanced DHA and reduced arachidonic acid (AA) contents in tissues/organs. CIH control mice exhibited increased atherosclerosis lesion sizes compared to N control mice. DHA prevented CIH induced atherosclerosis but did not improve atherosclerosis burden in N mice. Aortic matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) expression was decreased in CIH+DHA mice ($p=0.007$).

DHA-supplementation prevented CIH-induced atherosclerosis acceleration. This was associated with a decrease of AA incorporation and of aortic MMP-2 gene expression.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Obstructive sleep apnea (OSA) syndrome is a multifactorial disease characterized by recurrent episodes of nocturnal intermittent hypoxia (IH). This hallmark is the main factor involved in the increased cardiovascular morbidity and mortality in OSA patients. Thus, OSA is now recognized as an independent cardiovascular risk factor [1]. In particular, OSA patients present early signs of atherosclerosis [2] that are independent of other cardiovascular and metabolic risk factors and correlate to hypoxia severity. In addition, apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-}) mice fed with a standard diet and exposed to chronic intermittent

hypoxia (CIH) present increased aortic atherosclerosis lesion sizes [3,4], providing further evidence for a strong link between CIH and atherosclerosis.

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease [5], whose progression is regulated by numerous mediators including eicosanoids and cytokines [5]. The metabolism of arachidonic acid (AA), an omega-6 (*n*-6) polyunsaturated fatty acid (PUFA), is changed in OSA. For example, the production of leukotriene B₄ [6,7], cysteinyl-leukotrienes [7] and isoprostanes [8] is increased in relation to hypoxia severity. Interestingly, in OSA patients, these pro-inflammatory mediators are also associated to early vascular remodeling [6,9]. The production of inflammatory cytokines (MCP-1, TNF α , etc.) is also increased in mice exposed to CIH [4,10] and in OSA patients in relation to hypoxia severity [11]. In addition to eicosanoids and cytokines, matrix metalloproteinases (MMPs) are a group of endopeptidases that may affect plaque progression and vulnerability [12]. Increased MMP levels have been reported in OSA patients, in relation to OSA severity, although obesity was a strong determinant [13].

All these data suggested that CIH-induced inflammation could be a link between OSA and atherosclerosis. In this context, modulation

Abbreviations: DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; CIH, chronic intermittent hypoxia; N, normoxia; MMP, matrix metalloproteinase; ApoE^{-/-}, apolipoprotein E deficient; OSA, obstructive sleep apnea

* Corresponding author at: CHU, Hôpital A. Michalon, Département de Biochimie, Toxicologie et Pharmacologie, CS 10217, Grenoble cedex 9 F-38043, France.

Tel.: +33 4 76 76 54 92; fax: +33 4 76 76 89 38.

E-mail address: FStanke@chu-grenoble.fr (F. Stanke-Labesque).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.plefa.2014.07.016>

0952-3278/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

of inflammation through a nutritional approach such as omega-3 (*n*-3) PUFA supplementation could be of benefit to reduce the atherosclerosis progression induced by CIH.

Docosahexaenoic acid (DHA) is a *n*-3 PUFA (C22:6*n*-3) that derives from the essential fatty acid linolenic acid (C18:3*n*-3) or eicosapentaenoic acid (C20:5*n*-3) (EPA) by an alternating series of desaturation and elongation reactions. *n*-3 PUFAs present a wide range of physiological roles directly linked to clinical benefits [14] mainly by modulating the inflammatory process. First, *n*-3 PUFAs are precursors of anti-inflammatory lipid mediators, including resolvins, protectins [15] and leukotriene B₅ [16]. In addition, some studies reported that supplementation with DHA and EPA is likely to reduce pro-inflammatory cytokine levels (IL-1β, IL-6 or TNFα) in healthy human subjects [17]. Finally, *n*-3 PUFAs also inhibit the production of inflammatory matrix metalloproteinases (MMP) 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP) [18].

DHA supplementation in *wild type* mice is associated with an increased DHA incorporation in different tissues [19]. However, the effects of DHA supplementation in ApoE^{-/-} mice on atherosclerotic lesions size (aortic roots) are conflicting [20–22]. Thus, the aim of the present work was to evaluate the influence of DHA supplementation on tissue fatty acid incorporation and on CIH-induced atherosclerosis progression in ApoE^{-/-} mice and to investigate the inflammatory underlying mechanisms.

2. Material and methods

2.1. Experimental animal study

All animal procedures were conducted in accordance with European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Council of Europe, European Treaties ETS 123, Strasbourg, 18 March 1986) and with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH Publication no. 85-23, revised 1996).

Forty male ApoE^{-/-} mice (14 week-old) were exposed for 8 weeks to CIH (cyclic 21–5% FiO₂, 60 s cycle, normoxic and hypoxic phases both for 30 s, 8 h/day during daytime) or air (N, normoxic), as previously described [23]. Mice were fed with normal diet (RM1, SDS, Witham, Essex, UK) or supplemented (0.5% of food intake) with DHA/EPA (fish oil containing 80% DHA/4% EPA, PhosphoTech, Saint-Herblain, France; see online [Supplementary data](#) for fish oil composition). Thus, four experimental groups were set up: N control (*n*=10), CIH control (*n*=10), N+DHA (*n*=9) and CIH+DHA (*n*=11). Mice were fed ad libitum during all experiment duration.

At the end of CIH or N exposure, blood was collected on EDTA tubes under anesthesia (ketamine/xylazine 100 mg/kg – 10 mg/kg, intraperitoneal injection) for hematocrit, lipid and cytokine measurements. Tissues and organs (entire aortas, heart, liver, subcutaneous and epididymal adipose tissues) were harvested, immediately flash frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until fatty acid composition analysis. Abdominal aortas were cleaned of perivascular fat, placed in RNAlater (Life technologies[®], Villebon-sur-Yvette, France), frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until gene expression analysis.

2.2. Lipids measurements

Plasma cholesterol, HDL-cholesterol and triglyceride concentrations were determined using enzymatic methods on a Dimension Vista[®] analyzer (Siemens Healthcare, Munich, Germany). LDL-cholesterol was calculated using the Friedewald formula [total cholesterol – HDL cholesterol – (triglycerides/5)].

2.3. Fatty acid incorporation

Total lipids were extracted from tissue/organ homogenates with a hexane/iso-propanol (3/2) mixture. Before extraction, an internal standard (heptadecaenoic acid) was added. The organic phases were dried under nitrogen and lipids were saponified and methylated before being extracted with heptane. The different fatty acids were then separated by a gaz chromatography/ionisation flame detector (GC 6890N, Agilent Technologies, Massy, France) and quantified using a calibrated standard mix.

2.4. Atherosclerosis lesion size quantification

Atherosclerotic lesions of aortic roots were analyzed by Oil-Red-O staining, as previously described [4]. For each aortic root, lipid deposition was quantified from 5 sections (8 μm thickness), separated by 80 μm from each other, using computer images analysis (NisElement[®]).

2.5. Cytokines measurements

Plasma cytokines (IL-6, IL-1β, TNF-α, MCP-1, MIP-1α and IL-10) were studied by Luminex[®] technology (Bio-Rad Laboratories Inc., Marnes-la-Coquette, France). Due to hemolysis, the sample sizes were limited: N control (*n*=4), CIH control (*n*=5), N+DHA (*n*=4) and CIH+DHA (*n*=5).

2.6. Metalloproteinase and resolvin pathway gene expression

Total mRNA was isolated from abdominal aorta using the RNeasy kit (Qiagen[®]) as previously described and reverse-transcribed using Superscript II (Invitrogen[®], Carlsbad, CA) with random hexamers per the manufacturer's instructions. Quantitative TaqMan PCR was performed on a 7900HT using primer/probe pairs designed with Assay-On-Demand[™] (both Applied Biosystems). Data were normalized to the TATAbox binding protein (TBP) mRNA and expressed as 2^{-ΔCT}.

2.7. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Statview software (version 5.0, SAS Institute, Cary, USA). Data were expressed as median and 10th and 90th percentiles. Appropriate nonparametric tests were used (Kruskal–Wallis method and adjusted Bonferroni *t* test). A *p*-value of < 0.05 was considered to be significant.

3. Results

3.1. Weight, lipid levels and hematocrit

After 8 weeks of CIH-exposure, body weight, plasma cholesterol (total cholesterol, LDL-cholesterol, and HDL-cholesterol) and triglyceride levels were not significantly different between CIH and N mice supplemented or not by DHA (Table 1). Hematocrit was significantly higher in CIH control and CIH+DHA mice compared to N control and N+DHA mice respectively (Table 1).

3.2. Fatty acid profiles

In DHA-treated mice (N+DHA and CIH+DHA), DHA supplementation induces significant increases of DHA and EPA tissue content (*p* < 0.0001), and significant decreases of AA incorporation (Table 2). In particular, DHA content was increased by 1.7-fold in heart, 3-fold in liver, 13.5-fold in epididymal fat, 15.5-fold in subcutaneous fat and 5-fold in thoracic aorta. EPA incorporation

Table 1

Body weight, plasma lipid levels and hematocrit of ApoE^{-/-} mice exposed for 8 weeks to chronic intermittent hypoxia (CIH) or normoxia (N) and randomized to four groups (CIH+docosahexaenoic acid (DHA) (0.5% of food), N+DHA, CIH control, and N control).

	N control (n=10)	N+DHA (n=9)	CIH control (n=10)	CIH+DHA (n=11)	p
Body weight after exposure (g)	32.6 (28.6–35.2)	32.5 (28.6–34.6)	29.4 (26.4–32.8)	31.5 (26.7–33.8)	0.22
Total plasma cholesterol (g/L)	3.0 (2.5–3.9)	3.5 (2.2–4.9)	3.2 (2.3–4.4)	3.5 (2.4–4.6)	0.32
Plasma LDL-cholesterol (g/L)	1.7 (1.3–2.4)	2.1 (1.0–3.4)	2.0 (1.2–3.0)	2.1 (1.0–3.0)	0.36
Plasma HDL-cholesterol (g/L)	1.1 (0.9–1.3)	1.2 (1.0–1.3)	1.1 (0.9–1.3)	1.2 (1.1–1.3)	0.077
Plasma triglycerides (g/L)	1.1 (0.7–2.1)	1.2 (0.8–1.8)	1.0 (0.6–1.3)	1.5 (0.8–2.1)	0.065
Hematocrit (%)	41.0 (40.0–45.5) ^a	44.0 (39.0–46.6) ^b	44.0 (43.0–48.0)	47.0 (45.2–50.4)	0.0004

Data are presented as median (10th and 90th percentiles). p-Values indicate comparison of variables between the 4 groups made with Kruskal–Wallis test.

^a N control vs. CIH control mice groups ($p=0.008$, Bonferroni adjusted t test).

^b N+DHA vs. CIH+DHA mice groups ($p < 0.0001$, Bonferroni adjusted t test).

Table 2

Fatty acid profile in various tissues from mice exposed to chronic intermittent hypoxia (CIH) or normoxia (N) and supplemented or not by docosahexaenoic acid (DHA).

Fatty acids	N control	N+DHA	CIH control	CIH+DHA	p
Liver					
C18:2n-6	17.68 [16.15–20.60]	18.42 [15.60–18.48]	17.17 [14.38–22.67]	17.23 [14.81–19.07]	0.22
C18:3n-3	0.49 [0.33–1.36]	0.77 [0.46–1.10]	0.87 [0.41–1.40]	0.88 [0.44–1.23]	0.74
C20:4n-6	11.01 [6.47–14.79] ^a	6.03 [5.08–6.86]	11.29 [7.73–16.14] ^b	5.35 [4.83–6.92]	< 0.0001
C20:5n-3	0.23 [0.20–0.38] ^a	1.75 [1.45–1.88]	0.25 [0.20–0.35] ^b	1.86 [1.46–2.21]	< 0.0001
C22:6n-3	6.48 [4.06–7.32] ^a	17.66 [15.93–19.46]	6.05 [4.63–8.34] ^b	18.43 [15.26–19.77]	< 0.0001
Heart					
C18:2n-6	22.14 [20.93–22.98] ^a	16.30 [15.99–17.50]	22.15 [21.38–23.84] ^b	16.87 [14.90–17.38]	0.0016
C18:3n-3	0.68 [0.63–0.73]	0.71 [0.70–0.77]	0.72 [0.56–0.80]	0.72 [0.59–0.94]	0.59
C20:4n-6	10.48 [9.67–11.61] ^a	3.71 [3.18–4.19]	10.54 [9.80–10.88] ^b	3.84 [3.26–4.16]	0.0018
C20:5n-3	0.05 [0.04–0.06] ^a	0.26 [0.21–0.27]	0.04 [0.03–0.05] ^b	0.26 [0.21–0.27]	0.0014
C22:6n-3	21.73 [20.87–24.14] ^a	36.58 [35.44–39.96]	20.76 [18.28–25.20] ^b	34.52 [30.51–40.80]	0.0015
Subcutaneous fat					
C18:2n-6	24.58 [22.51–25.06]	26.42 [25.03–29.17]	24.62 [20.63–26.76]	26.09 [25.08–28.64]	0.063
C18:3n-3	2.38 [2.28–2.69]	2.48 [2.32–2.50]	2.50 [2.35–2.93]	2.56 [2.29–2.79]	0.67
C20:4n-6	0.30 [0.29–0.31]	0.19 [0.10–0.21]	0.89 [0.34–1.45]	0.57 [0.15–0.86]	0.0071
C20:5n-3	0.02 [0.01–0.03] ^a	0.12 [0.10–0.13]	0.02 [0.00–0.03] ^b	0.11 [0.10–0.16]	0.0013
C22:6n-3	0.12 [0.10–0.13] ^a	2.18 [1.65–2.22]	0.13 [0.11–0.15] ^b	1.68 [1.54–2.09]	0.0007
Epididymal fat					
C18:2n-6	31.21 [28.63–34.12] ^a	31.17 [27.24–33.95]	30.60 [28.59–32.81] ^b	31.90 [30.48–34.12]	0.22
C18:3n-3	1.84 [1.34–2.42] ^a	2.22 [1.52–2.56]	2.23 [1.56–2.49] ^b	2.54 [2.18–2.96]	0.001
C20:4n-6	0.37 [0.32–0.44] ^a	0.25 [0.21–0.29]	0.38 [0.26–0.49] ^b	0.23 [0.15–0.29]	< 0.0001
C20:5n-3	0.03 [0.02–0.05] ^a	0.18 [0.14–0.25]	0.02 [0.02–0.03] ^b	0.18 [0.13–0.20]	< 0.0001
C22:6n-3	0.17 [0.11–0.27] ^a	2.47 [1.82–2.87]	0.19 [0.12–0.24] ^b	2.31 [1.68–3.14]	< 0.0001
Thoracic aorta					
C18:2n-6	14.18 [10.40–18.43] ^a	16.27 [15.43–18.13]	12.68 [9.36–18.39] ^b	13.99 [10.22–15.60]	0.003
C18:3n-3	0.55 [0.33–1.56]	1.34 [0.44–1.72]	1.35 [0.28–1.87]	1.38 [1.06–1.62]	0.48
C20:4n-6	1.41 [0.97–2.06] ^a	0.66 [0.49–1.29]	1.50 [1.03–2.32] ^b	0.60 [0.47–0.86]	< 0.0001
C20:5n-3	0.03 [0.02–0.04] ^a	0.15 [0.13–0.29]	0.03 [0.02–0.26] ^b	0.15 [0.11–0.22]	< 0.0001
C22:6n-3	0.42 [0.30–0.57] ^a	2.59 [1.96–4.58]	0.55 [0.31–0.84] ^b	2.37 [1.67–3.22]	< 0.0001

Data are presented as median [minimum–maximum] (% of total fatty acid); N control ($n=9$) ($n=4$ for heart and subcutaneous fat), N+DHA ($n=9$) ($n=5$ for heart and subcutaneous fat), CIH control ($n=10$) ($n=6$ for heart and subcutaneous fat), and CIH+DHA ($n=11$) ($n=7$ for heart and subcutaneous fat).

C18:2n-6: linoleic acid, C18:3n-3: α -linolenic acid, C20:4n-6: arachidonic acid, C20:5n-3: eicosapentaenoic acid, and C22:6n-3: docosahexaenoic acid.

p-Values indicate comparison of variables between the four groups with Kruskal–Wallis test.

^a N control vs. N+DHA mice groups ($p < 0.0001$, Bonferroni adjusted t test).

^b CIH control vs. CIH+DHA mice groups ($p < 0.0001$, Bonferroni adjusted t test).

was also increased by 6-fold in heart, 7.5-fold in liver, 7.5-fold in epididymal fat, 6-fold in subcutaneous fat and 5-fold in thoracic aorta while AA incorporation was 2.5- to 1.7-fold reduced compared to mice not supplemented with DHA (N control and CIH control) (Table 2).

3.3. Atherosclerotic lesion sizes

Atherosclerotic lesion sizes were analyzed on 36/40 mice due to technical troubles. Atherosclerotic lesion sizes on aortic

roots were higher in CIH control mice compared to N control mice (CIH control: 39,947 (22,017–72,986) vs. N control: 22,641 (13,967–33,856) μm^2 ; $p=0.0025$; Fig. 1a; photographs of atherosclerosis lesions with Oil-Red-O staining; Fig. 1b). Oral supplementation with DHA prevented the rise of aortic root atherosclerotic lesion sizes in mice exposed to CIH but had no effect in N mice (Fig. 1).

In each group (N control, N+DHA, CIH control or CIH+DHA), there was no significant correlation between DHA content and lesion sizes or EPA content and lesion sizes for all organs or tissues.

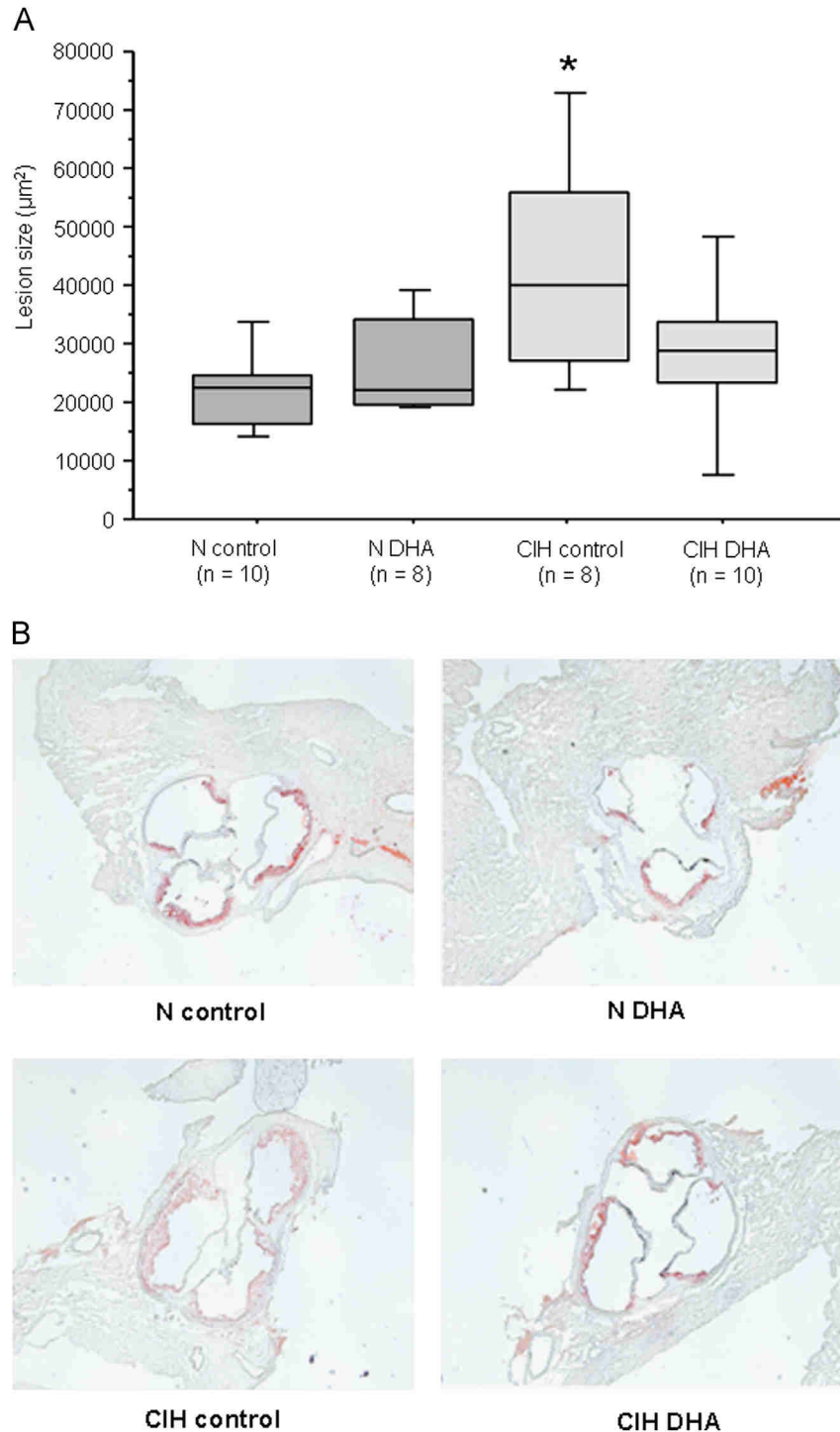


Fig. 1. Effects of docosahexaenoic acid (DHA) supplementation on atherosclerosis lesion sizes in mice exposed to chronic intermittent hypoxia (CIH) or normoxia (N). (a) Lesion sizes: boxes represent values within the interquartile range; whiskers, the data range; and the line across the boxes, median values. * $p=0.0025$ (Bonferroni adjusted t test) CIH control vs. N control. There was no significant difference between N+DHA and CIH+DHA. (b) Representative photographs of Oil-Red-O staining ($\times 40$).

In CIH mice (CIH control and CIH+DHA), hepatic AA content was significantly correlated to aortic lesion size ($r=0.52$, $p=0.032$) whereas no significant association was found in N mice (N control and N+DHA) ($p=0.46$).

In mice not treated with DHA (N control and CIH control), epididymal fat AA content was significantly correlated to aortic lesion sizes ($r=0.66$, $p=0.0085$), a correlation not found in DHA treated mice (N+DHA and CIH+DHA).

3.4. Cytokine levels

No significant difference of plasma inflammatory (MCP-1, MIP-1 α , IL-6, TNF- α and IL-1 β) and anti-inflammatory (IL-10) cytokine levels was observed between the four groups (Table 3). However, a trend toward an increase of MCP-1, MIP-1 α and TNF- α was observed in CIH mice compared to N mice; this tendency was not significantly changed by DHA supplementation.

Table 3

Plasma cytokine concentrations (pg/mL) in mice exposed to chronic intermittent hypoxia (CIH) or normoxia (N) and supplemented or not by docosahexaenoic acid (DHA).

Cytokines	N control (n=4)	N+DHA (n=4)	CIH control (n=5)	CIH+DHA (n=5)	p
MCP-1	68.2 [58.2–237.2]	146.1 [132.5–162.4]	223.8 [94.8–285.2]	272.9 [121.8–516.6]	0.23
MIP-1 α	18.4 [8.6–25.9]	19.6 [5.0–21.4]	24.4 [10.7–32.3]	26.7 [10.9–37.3]	0.20
IL-6	13.3 [4.7–29.8]	7.0 [6.0–9.0]	11.5 [4.8–13.9]	12.3 [7.4–24.0]	0.33
IL-1 β	349.1 [221.1–422.3]	306.3 [171.6–416.3]	304.8 [272.2–654.2]	521.2 [97.5–557.9]	0.78
TNF- α	153.9 [97.1–243.8]	167.9 [82.8–213.0]	282.8 [114.2–611.0]	352.3 [145.4–402.1]	0.17
IL-10	488.9 [254.3–606.0]	411.2 [197.9–465.9]	476.4 [323.4–683.1]	665.1 [234.6–689.0]	0.26

Data are presented as median [minimum–maximum].

p-Values indicate comparison of variables between the four groups with Kruskal–Wallis test.

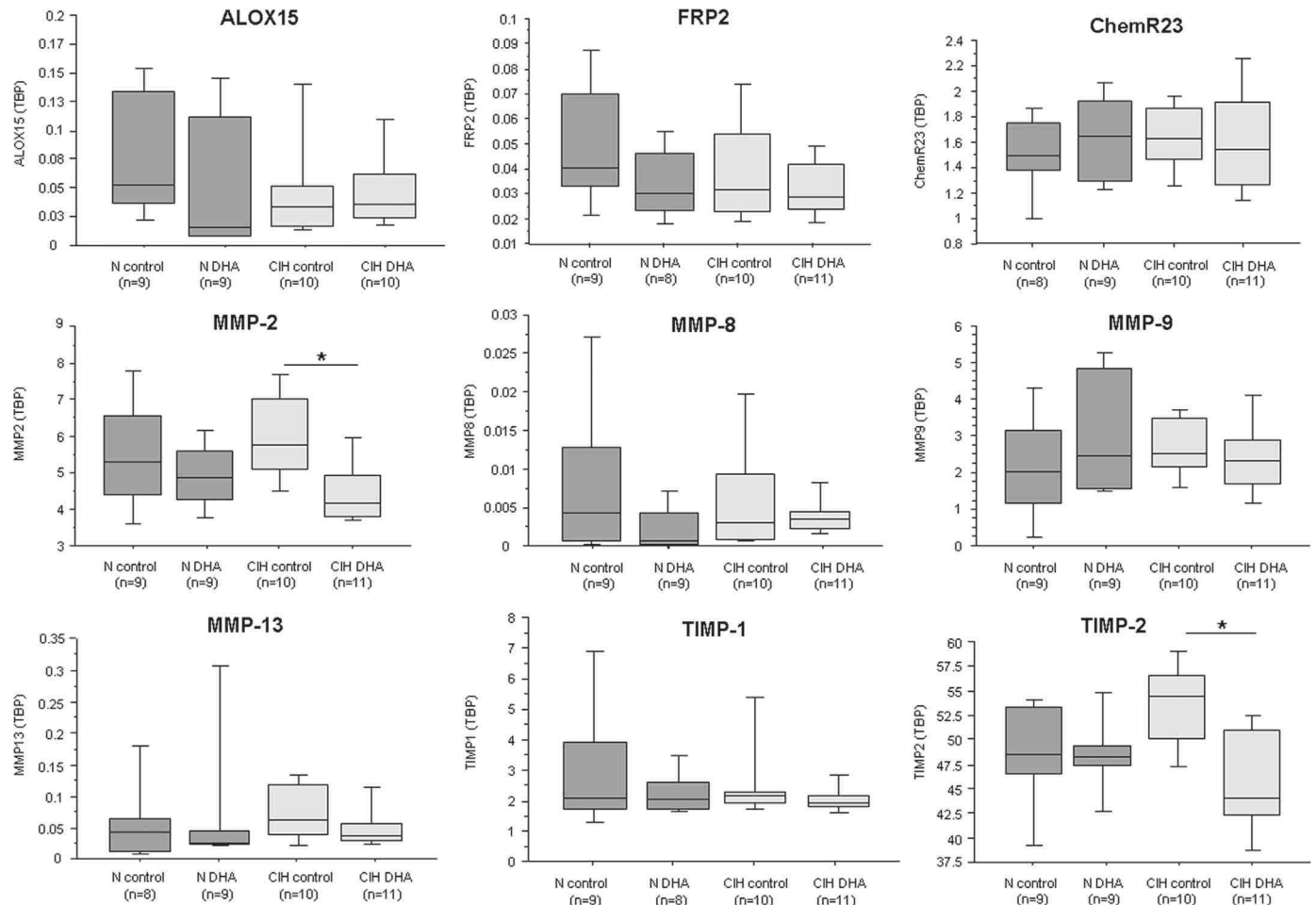


Fig. 2. mRNA expression (normalized to TBP transcript levels) of resolvins (ALOX15, FRP2 and ChemR23) and matrix metalloproteinase (MMP) pathways in mice exposed to chronic intermittent hypoxia (CIH) or normoxia (N) and supplemented or not by docosahexaenoic acid (DHA). Boxes represent values within the interquartile range; whiskers, the data range; and the line across the boxes, median values. TIMP=tissue inhibitor of metalloproteinase * $p=0.001$ (Bonferroni adjusted t test) for TIMP-2 CIH control vs. CIH+DHA and $p=0.007$ (Bonferroni adjusted t test) for MMP-2 CIH control vs. CIH+DHA.

3.5. Metalloproteinase and resolvins pathway gene expression

Aortic mRNA levels of MMP-2 and TIMP-2 were significantly decreased in CIH+DHA mice compared to CIH control mice (Fig. 2). The aortic mRNA levels of other metalloproteinases (MMP-8, MMP-9, MMP-13 and TIMP-1) and of the resolvins pathway (FRP2, ALOX-15 and ChemR23) were not significantly different between the four groups (Fig. 2).

4. Discussion

Our study demonstrated for the first time that DHA supplementation prevents atherosclerosis acceleration in ApoE^{-/-} mice

exposed to CIH, this prevention being associated with an increased incorporation of DHA and EPA, a decrease of AA incorporation in several organs and tissues and a reduction of aortic MMP-2 mRNA levels.

CIH mice had larger aortic root atherosclerotic lesions than N mice. This result was in accordance with previous works in ApoE^{-/-} mice exposed to CIH for 2 weeks [4] or 8 weeks [3] and confirmed that CIH exposure accelerates atherosclerosis development in ApoE^{-/-} mice. Few studies have investigated the effect of DHA supplementation on atherosclerosis lesion sizes and the reported results were conflicting. Some studies showed that supplementation of ApoE^{-/-} mice with chow rich in $n-3$ PUFA fish oil for 14 weeks [20] or 20 weeks [21] did not alter atherosclerotic lesion progression. Conversely, Wang et al. reported a small but significant reduction in aortic root atherosclerosis

[22] in ApoE^{-/-} mice supplemented with fish oil for 10 weeks, an effect mainly attributed to the antioxidative effects of fish oil. These discrepancies could at least be explained by the differences in *n*-3 PUFA composition and the duration of fish oil supplementation. Interestingly, whereas the results of the present study support the former reports of neutral effects of *n*-3 PUFAs on atherosclerotic lesion development in normoxic mice, we also demonstrated in the present study that oral DHA supplementation prevented CIH-induced atherosclerosis progression in our model.

Plasma total cholesterol, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol were not significantly different between N and CIH groups (with or without DHA), suggesting that the prevention by DHA of CIH-induced atherosclerosis was independent of any effect on cholesterol. These data are in line with the observation that, in the same model, CIH-induced atherosclerosis could be independent of lipid disorders [3]. These data also support most of the previous studies performed in ApoE^{-/-}, which reported that PUFA supplementation did not change the cholesterol profile [20,22]. Nevertheless, we observed a trend towards increased plasma HDL-cholesterol levels in DHA supplemented mice (N or CIH) ($p=0.077$), as previously described in fish oil supplemented ApoE^{-/-} mice [24], and in humans supplemented by *n*-3 PUFAs [25]. In addition, all previous studies on ApoE^{-/-} mice supplemented with *n*-3 PUFAs reported an increase in triglyceride levels [21,22,26], while we only observed a trend towards increased triglyceride levels ($p=0.065$) after DHA supplementation. These findings in mice are in contrast to most human studies reporting a decrease of triglyceride levels when DHA supplementation is carried out. This discrepancy could be explained by the need of a functional ApoE that appeared to be essential for the increase of triglyceride clearance in the presence of *n*-3 PUFA supplementation [26].

PUFAs are important constituents of phospholipids of all cell membranes. The analysis of their contents in liver, heart, epididymal fat, subcutaneous fat and thoracic aorta showed different profiles between the various tissues and organs. DHA oral supplementation was associated with significant increases of DHA and EPA and with a decrease of AA incorporation. These data confirmed the oral intake of DHA. Moreover, EPA incorporation increases also in all tissues and organs. This could be explained either by the dietary supplementation (fish oil contains 4% of EPA) and by the retro-conversion of DHA to EPA as reported previously [19].

In mice not supplemented with DHA (N control and CIH control), epididymal fat AA content positively correlated to aortic lesion sizes, suggesting a link between epididymal fat tissue inflammation and atherosclerosis. Adipocytes have the capability of synthesizing pro-inflammatory AA-derived mediators, including leukotrienes [27] that play a key role in CIH-induced atherogenesis [6,7]. Moreover, CIH induced an inflammatory remodeling of epididymal adipose tissue that contributed to the atherogenesis process in ApoE^{-/-} mice, independently of obesity [28]. We found a similar association between liver AA content and atherosclerotic lesion sizes in CIH mice, also suggesting a link between liver inflammation and atherosclerosis. CIH exposure led to liver hypoxia [29], and subsequent activation of NF- κ B-mediated inflammatory pathway that contributes to atherosclerosis. Overall, the decrease of AA content observed in these tissues and organs from DHA supplemented mice could contribute to the reduction of the underlying inflammatory state, and thereby to the prevention of atherosclerosis. In line with these findings, we also recently showed the benefits of pharmacological inhibition of the cyclooxygenase pathway-derived AA metabolism in the prevention of CIH-induced atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice [3].

DHA and EPA are also competitive substrates of lipoxygenases and cyclooxygenases. The metabolism of DHA by 5- and 15-lipoxygenases leads to the formation of a group of anti-inflammatory eicosanoids, called resolvins. Although these mediators were not measured in the

present study, the mRNA levels of 15-lipoxygenase were not altered by DHA supplementation (present study). The D-series resolvins were derived from DHA signal in humans through a G-protein coupled receptor denoted as GPR32, to which no murine homolog has been described, and most studies support that resolvin D₁ mediates its anti-inflammatory and pro-resolving actions through the lipoxin receptor FPR2 in mice. However, in the present study, the mRNA levels of FPR2 and ChemR23 (resolvin E1 receptor) were unaffected after DHA supplementation, and the contribution of resolvins in the prevention of the atherosclerotic process induced by CIH exposure remains to be established. The particular action of 5-LOX on DHA generates the anti-inflammatory series 5 leukotrienes (LTB₅). In healthy subjects, oral supplementation with DHA induced a dose-dependent increase of DHA incorporation in polymorphonuclear cell membrane associated with a dose-dependent increase of LTB₅ production [16]. Moreover, the leukotriene pathway was activated in OSA in relation to hypoxia severity [6,7,30]. Thus the preventive effect of DHA on atherosclerosis lesions could partly be explained by a change in LTB₅ production. Taken together further lipidomic analyses are needed to establish the effect of DHA supplementation on lipoxygenase metabolism in the present model in term of an altered systemic or local balance of pro-inflammatory leukotrienes, anti-inflammatory 5-series leukotrienes and resolvins.

The effect of *n*-3 PUFAs supplementation on plasma cytokine levels remained to be explored, since previous studies reported either a decrease of pro-inflammatory cytokine levels (IL-1 β , IL-6, TNF- α , and MCP-1) [17,31], or no change of cytokine plasma levels after *n*-3 PUFAs supplementation [17]. These discrepancies could be explained by the dose and the duration of the *n*-3 PUFAs supplementation [32,33] and the heterogeneity of the studied populations (healthy subjects or patients with high cardiovascular risk). To further explore the mechanisms by which DHA prevented the acceleration of atherogenesis in CIH mice, we evaluated the plasma levels of pro-inflammatory cytokines (MIP-1 α , TNF- α , IL-6, IL-1 β and MCP-1) and of an anti-inflammatory cytokine (IL-10). Unfortunately, some of our samples were haemolysed and the cytokines levels could have been measured in only few samples, limiting the interpretation of these data. However, our results suggest a trend towards an increase of pro-inflammatory cytokines (MIP-1 α , TNF- α , and MCP-1) in CIH mice compared to N mice, as previously reported [4,10]. In the same time, CIH+DHA mice seem to have increased pro-inflammatory (IL-1 β , TNF- α , and MCP-1) and anti-inflammatory (IL-10) cytokine levels compared to CIH mice. We acknowledge that additional experiments would have been required to reduce the variability of the results in order to confirm this tendency. Nevertheless, in the present study, DHA prevention of atherosclerosis could not be explained by changes in circulating cytokine levels.

Lastly, increased content of *n*-3 PUFAs in membrane phospholipid acid composition has been reported to alter transcription factor activation and gene expression, and to influence the function of cells involved in inflammation [31]. In our study, the beneficial effect of DHA on atherosclerosis progression was associated with a modulation of MMP-2 transcription. Indeed, the analysis of metalloproteinase gene expression showed a significant decrease of MMP-2 expression in CIH+DHA mice compared to CIH mice. Previous studies demonstrated that *n*-3 PUFA supplementation was associated to attenuated MMP-2 expression [31] and that MMP-2 deficiency leads to reduced atherosclerotic lesions in ApoE^{-/-} mice [34]. However, the decrease in MMP-2 mRNA levels was accompanied by a significant decrease of TIMP-2 expression in CIH+DHA mice compared to CIH control mice. TIMP-2 is described to bind to the catalytic site of MMP-2, leading to its inactivation [12] and the net effect of the observed alterations of MMP-2 and TIMP-2 remains to be established. Since some studies reported that MMP-2 could modulate TIMP-2 expression [34], it

could be hypothesized that decreased TIMP-2 could be a consequence of MMP-2 decreased expression in CIH+DHA mice.

To conclude, our study showed that *n*-3 PUFA supplementation prevented CIH-induced atherosclerosis acceleration by decreasing AA incorporation in tissues and organs and by modulating aortic MMP-2 expression. These data suggest the potential interest of *n*-3 PUFA supplementation in the prevention of cardiovascular morbidity in OSA patients.

Disclosures

None.

Source of funding

This study was supported by a grant from Agir à Dom.

Acknowledgments

None.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.plefa.2014.07.016>.

References

- [1] V.K. Somers, D.P. White, R. Amin, 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.
- [2] L.F. Drager, L.A. Bortolotto, M.C. Lorenzi, et al., Early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172 (2005) 613–618.
- [3] E. Gautier-Veyret, C. Arnaud, M. Bäck, et al., Intermittent hypoxia-activated cyclooxygenase pathway: role in atherosclerosis, *Eur. Respir. J.* 42 (2013) 404–413.
- [4] C. Arnaud, L. Poulain, P. Lévy, et al., Inflammation contributes to the atherogenic role of intermittent hypoxia in apolipoprotein-E knock out mice, *Atherosclerosis* 219 (2011) 425–431.
- [5] G.K. Hansson, Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease *N. Engl. J. Med.* 352 (2005) 1685–1695.
- [6] B. Lefebvre, J.L. Pépin, J.P. Baguet, et al., Leukotriene B4: early mediator of atherosclerosis in obstructive sleep apnoea? *Eur. Respir. J.* 32 (2008) 113–120.
- [7] F. Stanke-Labesque, M. Bäck, B. Lefebvre, et al., Increased urinary leukotriene E4 excretion in obstructive sleep apnea: effects of obesity and hypoxia *J. Allergy Clin. Immunol.* 124 (2009) 364–370 (370.e361–362).
- [8] D. Monneret, J.L. Pépin, D. Godin-Ribuot, et al., Association of urinary 15-F2t-isoprostane level with oxygen desaturation and carotid intima-media thickness in nonobese sleep apnea patients, *Free Radic. Biol. Med.* 48 (2010) 619–625.
- [9] F. Stanke-Labesque, J.L. Pépin, T. de Jouvencel, et al., Leukotriene B4 pathway activation and atherosclerosis in obstructive sleep apnea, *J. Lipid Res.* 53 (2012) 1944–1951.
- [10] C. Arnaud, M. Dematteis, J.L. Pépin, et al., Obstructive sleep apnea, immunoinflammation, and atherosclerosis, *Semin. Immunopathol.* 31 (2009) 113–125.
- [11] P. Lévy, J.L. Pépin, C. Arnaud, et al., Intermittent hypoxia and sleep-disordered breathing: current concepts and perspectives, *Eur. Respir. J.* 32 (2008) 1082–1095.
- [12] M. Bäck, D.F. Ketelhuth, S. Agewall, Matrix metalloproteinases in atherothrombosis, *Prog. Cardiovasc. Dis.* 52 (2010) 410–428.
- [13] J. Volná, D. Kemlink, M. Kalousová, et al., Biochemical oxidative stress-related markers in patients with obstructive sleep apnea, *Med. Sci. Monit.* 17 (2011) CR491–CR497.
- [14] P.C. Calder, Mechanisms of action of (*n*-3) fatty acids, *J. Nutr.* 142 (2012) 592S–599S.
- [15] K.H. Weylandt, C.Y. Chiu, B. Gomolka, et al., Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: towards an understanding of resolvin and protectin formation, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 97 (2012) 73–82.
- [16] F. Stanke-Labesque, P. Molière, J. Bessard, et al., Effect of dietary supplementation with increasing doses of docosahexaenoic acid on neutrophil lipid composition and leukotriene production in human healthy volunteers *Br. J. Nutr.* 100 (2008) 829–833.
- [17] C. von Schacky, *n*-3 PUFA in CVD: influence of cytokine polymorphism, *Proc. Nutr. Soc.* 66 (2007) 166–170.
- [18] H. Poudyal, S.K. Panchal, V. Diwan, et al., Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: effects and emerging mechanisms of action, *Prog. Lipid Res.* 50 (2011) 372–387.
- [19] J. Lefils, A. Géloën, H. Vidal, et al., Dietary DHA: time course of tissue uptake and effects on cytokine secretion in mice, *Br. J. Nutr.* 104 (2010) 1304–1312.
- [20] Z. Xu, N. Riediger, S. Innis, et al., Fish oil significantly alters fatty acid profiles in various lipid fractions but not atherogenesis in apo E-KO mice, *Eur. J. Nutr.* 46 (2007) 103–110.
- [21] A. Zampolli, A. Bysted, T. Leth, et al., Contrasting effect of fish oil supplementation on the development of atherosclerosis in murine models, *Atherosclerosis* 184 (2006) 78–85.
- [22] H.H. Wang, T.M. Hung, J. Wei, et al., Fish oil increases antioxidant enzyme activities in macrophages and reduces atherosclerotic lesions in ApoE-knockout mice, *Cardiovasc. Res.* 61 (2004) 169–176.
- [23] M. Dematteis, D. Godin-Ribuot, C. Arnaud, et al., Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding the human disease, *ILAR J.* 50 (2009) 262–281.
- [24] Y. Adan, K. Shibata, W. Ni, et al., Concentration of serum lipids and aortic lesion size in female and male apo E-deficient mice fed docosahexaenoic acid, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63 (1999) 309–313.
- [25] T.A. Jacobson, S.B. Glickstein, J.D. Rowe, et al., Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on low-density lipoprotein cholesterol and other lipids: a review, *J. Clin. Lipidol.* 6 (2012) 5–18.
- [26] M. Matsumoto, M. Sata, D. Fukuda, et al., Orally administered eicosapentaenoic acid reduces and stabilizes atherosclerotic lesions in ApoE-deficient mice, *Atherosclerosis* 197 (2008) 524–533.
- [27] I. Mothe-Satney, C. Filloux, H. Amghar, et al., Adipocytes secrete leukotrienes: contribution to obesity-associated inflammation and insulin resistance in mice, *Diabetes* 61 (2012) 2311–2319.
- [28] L. Poulain, A. Thomas, J. Rieusset, et al., Visceral white fat remodelling contributes to intermittent hypoxia-induced atherogenesis, *Eur. Respir. J.* 43 (2014) 513–522.
- [29] C. Reinke, S. Bevans-Fonti, L.F. Drager, et al., Effects of different acute hypoxic regimens on tissue oxygen profiles and metabolic outcomes, *J. Appl. Physiol.* 111 (2011) 881–890.
- [30] F. Stanke-Labesque, J.L. Pépin, E. Gautier-Veyret, et al., Leukotrienes as a molecular link between obstructive sleep apnoea and atherosclerosis *Cardiovasc. Res.* 101 (2014) 187–193.
- [31] P.C. Calder, The role of marine omega-3 (*n*-3) fatty acids in inflammatory processes, atherosclerosis and plaque stability, *Mol. Nutr. Food Res.* 56 (2012) 1073–1080.
- [32] A. Dewell, F.F. Marvasti, W.S. Harris, et al., Low- and high-dose plant and marine (*n*-3) fatty acids do not affect plasma inflammatory markers in adults with metabolic syndrome, *J. Nutr.* 141 (2011) 2166–2171.
- [33] H.M. Yusuf, A.L. Cawood, R. Ding, et al., Limited impact of 2 g/day omega-3 fatty acid ethyl esters (Omacor[®]) on plasma lipids and inflammatory markers in patients awaiting carotid endarterectomy, *Mar. Drugs* 11 (2013) 3569–3581.
- [34] M. Kuzuya, K. Nakamura, T. Sasaki, et al., Effect of MMP-2 deficiency on atherosclerotic lesion formation in ApoE-deficient mice, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26 (2006) 1120–1125.

Ces travaux ont ainsi mis en évidence le rôle potentiel d'une supplémentation en AG *n*-3 (en particulier de DHA) chez des souris ApoE^{-/-} soumises à une HIC sur la prévention de l'athérosclérose induite par cette HI.

En effet nous avons tout d'abord démontré que la supplémentation en AG *n*-3 entraînait une diminution significative de l'incorporation d'AA dans les tissus et organes (cœur, foie, graisse épидидymale, graisse sous-cutanée, aorte thoracique). Cette diminution d'AA est associée à une diminution de la taille des lésions d'athérosclérose chez les souris supplémentées en AG *n*-3. Enfin, notre étude a montré que cette supplémentation en AG *n*-3 est associée à une modulation de l'expression aortique de MMP-2, métalloprotéinase impliquée dans le processus athéromateux (94). Ces résultats confirment le rôle des AG *n*-3 dans la modulation de l'expression génique de certains médiateurs inflammatoires. Modulation permettant ainsi d'intervenir dans la stabilisation de la plaque d'athérosclérose (99).

Cette approche nutritionnelle présente donc des résultats encourageants et permet grâce à la modification de la balance oméga-3 / oméga-6 des AG polyinsaturés au niveau des membranes phospholipidiques, de jouer un rôle potentiel sur la voie des eicosanoïdes issus de l'AA et particulièrement sur celles conduisant à la synthèse des LTB₄ et de TXA₂ dont le rôle dans l'athérogenèse n'est plus à démontrer (61).

La voie métabolique conduisant à la synthèse de TXA₂ a fait l'objet de travaux au sein de notre laboratoire, qui ont montré à la fois chez l'animal (souris ApoE^{-/-}) soumis à l'HIC et chez les patients SAOS (présentant un facteur de risque cardiovasculaire associé) que la voie de la COX-1 était activée et impliquée dans le processus athéromateux (120). Aussi, de nombreuses stratégies thérapeutiques agissant sur cette voie et ciblant le TXA₂ ont déjà été proposées pour lutter contre l'athérosclérose (61). Ces stratégies visent soit à réduire la production de TXA₂ (via des approches pharmacologiques (126-128) ou nutritionnelles par supplémentation en huile de poisson riche en AG *n*-3 (129)), soit à bloquer les récepteurs TP (130), soit à combiner les deux approches (131-133). Cependant, l'effet de ces différentes interventions thérapeutiques sur le processus athéromateux lié à l'HI mérite d'être précisé.

Ainsi, fort de ces constatations, nous avons écrit une revue de la littérature dont le premier objectif a été de synthétiser les connaissances relatives à l'activation de la voie du TXA₂ au cours du SAOS et son implication dans le processus athéromateux ; et dans un second temps, de discuter l'intérêt potentiel des différentes approches thérapeutiques ciblant la voie du TXA₂ pour lutter contre l'athérosclérose induite par l'HI.

Revue N°2

« Could thromboxane A2 pathway be a potential therapeutic target for the treatment of OSA-induced atherosclerosis? »

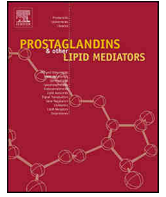
E Gautier-Veyret, L Van Noolen, P Levy, JL Pepin,
F Stanke-Labesque

Prostaglandins and Other Lipid Mediators 121 (2015) 97-104



Contents lists available at ScienceDirect

Prostaglandins and Other Lipid Mediators



Could the thromboxane A₂ pathway be a therapeutic target for the treatment of obstructive sleep apnea-induced atherosclerosis?



Elodie Gautier-Veyret^{a,b,c}, Laetitia Van Noolen^{a,b,c}, Patrick Lévy^{a,b,c}, Jean Louis Pepin^{a,b,c},
Françoise Stanke-Labesque^{a,b,c,*}

^a Univ Grenoble Alpes, F-38041 Grenoble, France

^b INSERM U1042, HP2, F-38041 Grenoble, France

^c Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, Hôpital Albert Michalon, F-38043 Grenoble, France

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 28 May 2015

Keywords:

Thromboxane A₂
Obstructive sleep apnea
Atherosclerosis
Intermittent hypoxia

ABSTRACT

Obstructive sleep apnea (OSA) is characterized by recurrent nocturnal episodes of intermittent hypoxia. This disease is associated with premature atherosclerosis and consequently with increased cardiovascular morbidity and mortality. Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease characterized by the activation of some components of the cyclooxygenase pathway. In particular, OSA is associated with activation of the thromboxane A₂ (TXA₂)-pathway, in which obesity seems to be a major confounding factor. Moreover, TXA₂-pathway activation is related to the vascular remodeling associated with OSA. In view of the modest effect of the conventional treatment of OSA by continuous positive airway pressure on the cardiovascular risk in obese OSA patients, the identification of new therapeutic targets to treat OSA-induced atherosclerosis seems essential. As disruption of the TXA₂-pathway has been suggested to be of potential interest to prevent atherosclerosis progression, we have reviewed the recent findings on the intricate interaction between the TXA₂-pathway, chronic intermittent hypoxia and atherosclerosis and suggest promising therapeutic strategies to treat OSA-related atherogenesis, including pharmacological and/or nutritional approaches.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Obstructive sleep apnea (OSA) is a worldwide public health problem affecting 5–20% of the general population [1]. OSA is characterized by recurrent episodes of nocturnal upper airway collapses, leading to intermittent hypoxia (IH) that is detrimental for the cardiovascular system. Cardiovascular morbidity and mortality are in fact increased in patients suffering from OSA [2] and OSA is now recognized as an independent cardiovascular risk factor [3].

Abbreviations: AA, arachidonic acid; AHI, apnea hypopnea index; ApoE^{-/-}, apolipoprotein E-deficient; BMI, body mass index; COX, cyclooxygenase; CPAP, continuous positive airway pressure; DHA, docosahexanoic acid; EPA, eicosapentanoic acid; IH, intermittent hypoxia; IMT, intima-media thickness; OSA, obstructive sleep apnea; PGI₂, prostacyclin (prostaglandin I₂); PUFA, polyunsaturated fatty acid; 6-ketoPGF_{1α}, 6-ketoprostaglandin F_{1α}; TXA₂, thromboxane A₂; TXB₂, thromboxane B₂; TXBS, thromboxane synthase; VSMC, vascular smooth muscle cells.

* Corresponding author at: CHU, Hôpital Albert Michallon, Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, CS10217, F-38043 Grenoble Cedex 9, INSERM U1042, France. Tel.: +33 4 76 76 54 92; fax: +33 4 76 76 89 38.

E-mail address: FStanke@chu-grenoble.fr (F. Stanke-Labesque).

Several studies have suggested that IH *per se* may promote early vascular remodeling. Indeed, OSA patients free of cardiovascular risk factors present early signs of atherosclerosis [4,5] that correlate to hypoxia severity [4,5] and are partially reversed by continuous positive airway pressure (CPAP) treatment [5]. Experimental animal studies have provided further evidence for the role of IH in the development of atherosclerosis. Chronic exposure to IH induced preatherosclerotic remodeling in lean mice [6] or an acceleration of atherogenesis in apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-}) mice [7–9], all these experiments being performed in the absence of high-fat-diet.

Atherosclerosis [10] and OSA [11,12] are diseases associated with chronic low grade inflammation. Thus, several works have supported the hypothesis that the underlying inflammation induced by IH may be a determining factor that could contribute to IH-induced vascular remodeling [6–9,13–19].

Among the numerous inflammatory mediators, the cyclooxygenase (COX)-pathway has been shown to play a major role in the onset and progression of atherosclerosis [20–22]. Thromboxane A₂ (TXA₂) and prostacyclin (PGI₂) are two COX-derived metabolites of arachidonic acid (AA). TXA₂ is predominantly generated by

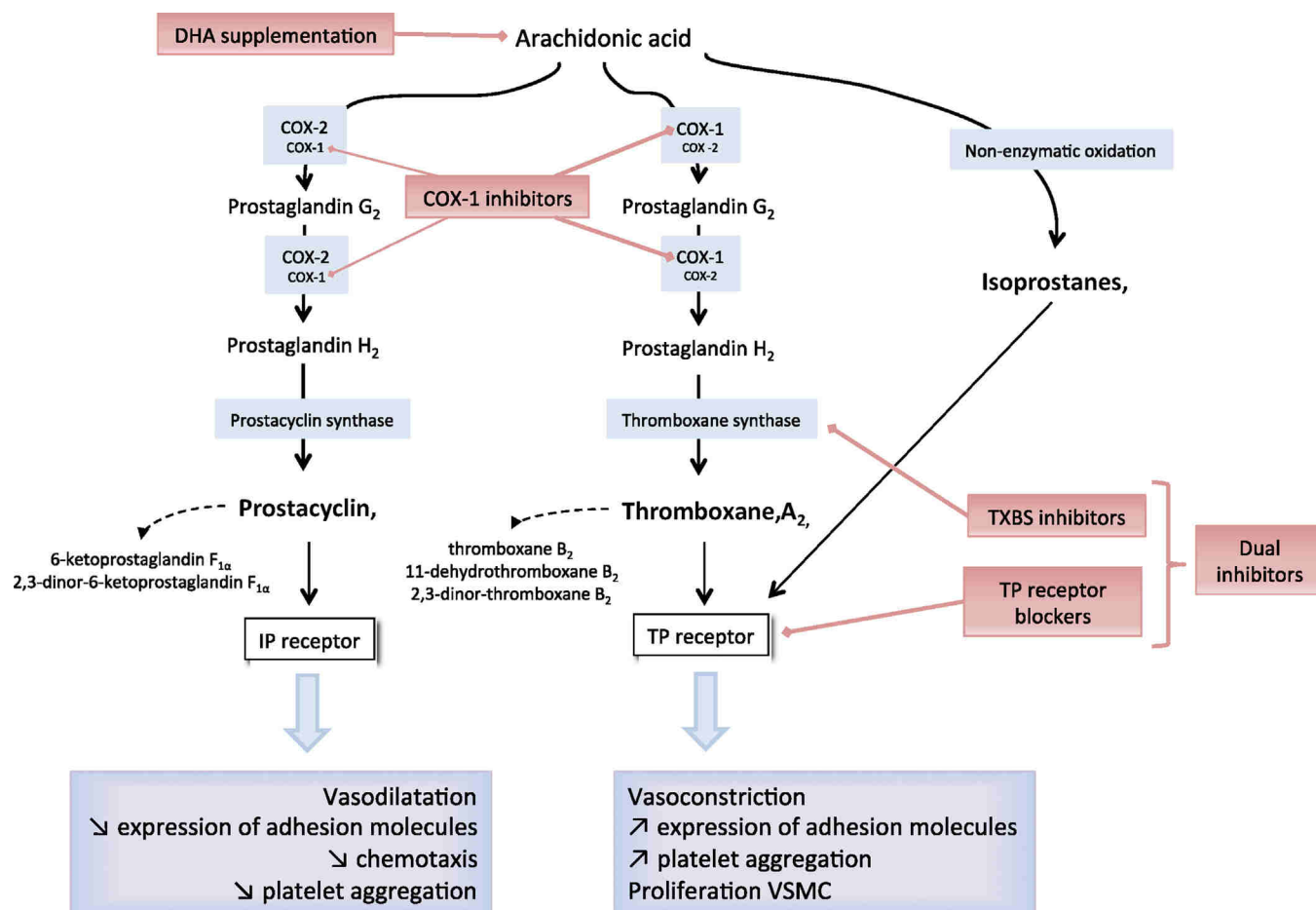


Fig. 1. Biosynthesis and biological effects of thromboxane A₂, prostacyclin and isoprostanes, and different therapeutic approaches to disrupt the thromboxane A₂ pathway. The enzymes synthesizing prostanoids are depicted in blue rectangles, whereas the white shaded rectangles indicate prostanoid receptors. The dotted arrows indicate the rapid degradation of thromboxane A₂ and prostacyclin into various metabolites. Biological effects induced by receptor activation are indicated in large blue rectangles and the different therapeutic approaches are indicated in red rectangles.

COX, cyclooxygenase; TXBS, thromboxane synthase; DHA, docosahexaenoic acid; VSMC, vascular smooth muscle cell.

platelets through the COX type 1 isoform (COX-1) and thromboxane synthase (TXBS), while PGI₂ predominately results from the activity of the endothelial COX type 2 isoform (COX-2) and prostacyclin synthase (Fig. 1). As TXA₂ and PGI₂ are unstable, they are rapidly metabolized into various metabolites that are quantifiable in plasma and/or urine: 6-ketoprostaglandin F_{1α} (6-ketoPGF_{1α}) and 2,3-dinor-6-ketoPGF_{1α} for PGI₂, thromboxane B₂ (TXB₂) and its derivatives 2,3-dinor-TXB₂ and 11-dehydroTXB₂ for TXA₂ (Fig. 1). TXA₂ and PGI₂ exert their biologic effects through binding to distinct receptors, the TP and IP receptors, respectively, both expressed on platelets, vascular smooth muscle cells (VSMC), monocytes and endothelial cells. From a biological point of view, TXA₂ and PGI₂ have antagonist properties. TXA₂ induces platelet activation, VSMC proliferation and vasoconstriction, and the expression of adhesion molecules, while PGI₂ reduces platelet aggregation, chemotaxis and vasoconstriction (Fig. 1) (see review of Capra et al. [21]).

In addition to TXA₂, others lipid mediators, i.e. the isoprostanooids, are able to bind to TP receptors [21,23], mimicking the biological effects of TXA₂ (Fig. 1). The isoprostanooids derived from AA via non-enzymatic oxidation include several isoprostanes: F-isoprostane, E-isoprostane and D-isoprostane.

Few studies have investigated the role of the TXA₂-pathway in OSA-induced atherosclerosis; although this pathway has already been proposed as a therapeutic target for the treatment of cardiovascular diseases (see reviews [20,21,23]). The present review

will focus on the role of the TXA₂-pathway as a potential molecular link between OSA and atherosclerosis, and on the therapeutic interest of targeting TXA₂ to reduce or prevent IH-induced atherosclerosis.

Thromboxane A₂ pathway and OSA/IH-induced atherosclerosis

Thromboxane A₂ pathway activation in relation to intermittent hypoxia

The activation of the COX-pathway by IH has been demonstrated in clinical and animal studies, both at the systemic and tissue levels. We demonstrated that urinary 11-dehydroTXB₂ concentrations in OSA patients free of cardiovascular comorbidities were not different from those of controls carefully matched for age and body mass index (BMI) [8]. Similarly, 11-dehydroTXB₂ levels were similar in controls and mild-to-moderate OSA patients treated with antihypertensive drugs [24]. All these results suggest that OSA *per se* might not activate the TXA₂-pathway. This hypothesis is also supported by the fact that CPAP treatment for 3 nights [25] or for at least 8 weeks [8] does not affect urinary TXA₂ metabolite concentrations. In line with these results, a recent study conducted in healthy volunteers showed that acute exposure to IH for 6h induced no change in urinary excretion of TXA₂ metabolites [26]. Taken

together, these data suggest that acute exposure to IH or OSA itself might not be sufficient to trigger the activation of the TXA₂-pathway in the absence of comorbidity.

In contrast, an increase in urinary 11-dehydroTXB₂ concentrations has been described in OSA patients exhibiting cardiovascular comorbidities [8,26]. Indeed we demonstrated that urinary 11-dehydroTXB₂ concentrations were increased in a cohort of OSA patients presenting various cardiovascular risk factors, including obesity, arterial hypertension, dyslipidemia, smoking or metabolic syndrome [8]. Among all these cardiovascular risk factors, obesity and arterial hypertension were associated with enhanced urinary excretion of 11-dehydroTXB₂ (simple regression analysis) and obesity remained the sole independent predictive factor of increased urinary 11-dehydroTXB₂ (multiple regression analysis) [8]. In another study, OSA patients exhibited enhanced urinary TXA₂ metabolite concentrations compared to controls [26]; but these OSA patients were much older and displayed higher blood pressure and BMI compared to controls. In line with previous results describing higher concentrations of TXA₂ metabolites in obese [27–30] or hypertensive patients [31], the increased TXA₂ metabolite levels observed in OSA patients [26] is likely to be related to higher BMI and blood pressure rather than to OSA itself.

Since PGI₂ and TXA₂ have antagonist properties, the TXA₂/PGI₂ ratio has been proposed as a surrogate biological marker of atherosclerosis [32], although its relevance should be considered with caution since PGI₂ counteracts not only most of the biological properties of TXA₂ but also those of others prostanoids such as prostaglandin E₂. Furthermore, data concerning this ratio (or its inverse) in OSA patients are limited and conflicting. Indeed, both an increase [33] and a decrease [25] of the 6-ketoPGF_{1α}/TXB₂ ratio have been reported in OSA patients and these results must be regarded with caution due to the very small number of patients included in these studies ($n=11$ and $n=7$, respectively). Then again, these discrepancies could probably be due to the presence of confounding factors such as obesity (the BMI of OSA patients in the studies of Krieger et al. [33] and Kimura et al. [25] were 28.7 ± 4.3 and 31 ± 2.0 kg/m², respectively). More recently, Beaudin et al. reported no difference in urinary PGI₂ metabolite concentrations and PGI₂/TXA₂ ratios between OSA patients and controls, and between pre- and post-6 hour-IH exposure of healthy subjects [26]. On the contrary, higher plasma concentrations of 6-ketoPGF_{1α} were found in mild-to-moderate OSA patients compared to controls, but no comparison of the 6-ketoPGF_{1α}/TXB₂ ratio was done [24]. Nevertheless, in the latter study, the efficient treatment by mandibular advancement splints during 6 months had no effect on the increased production of PGI₂, suggesting that this increase was independent of OSA [24]. A possible explanation could be the higher frequency of antihypertensive drug use by the OSA patients of this study, probably including angiotensin converting enzyme inhibitors that are known to increase PGI₂ production [34].

In contrast to the clinical data, experimental studies in OSA animal models have strongly suggested that the TXA₂-pathway is activated in OSA. Experimental models of sleep-disordered breathing are numerous, including both surgical and non-surgical models. Surgical models consist of inserting a collapsible endotracheal tube in tracheostomized animals [35], mimicking the obstructive apneas of OSA. While this approach is limited by the invasive nature of the procedure, variations of oxygen content in the flushed air permit the separate investigation of the effects of increased respiratory effort and IH [35]. The more widely used nonsurgical models consist of placing animals in devices in which the oxygen content of the air can be varied [8,36]. These nonsurgical models result in exposure to IH which can be modulated in terms of duration of daytime exposure, the frequency of desaturating events or the severity of induced hypoxia (for more details on experimental models of OSA, see the review by Dematteis et al. [37]).

In rats subjected to obstructive apnea for 3 h [35] or exposed to IH for 6 h per day during 4 weeks [36], the plasma TXB₂ concentrations and the TXB₂/6-ketoPGF_{1α} ratios were increased. Nacher et al. used an animal model to determine the respective contributions of IH and respiratory effort in the activation of the TXA₂-pathway. They demonstrated that the increased plasma TXB₂/6-ketoPGF_{1α} ratio was related to IH and not to respiratory effort [35], suggesting that the hypoxic component of OSA may play a major role in triggering TXA₂ production.

In parallel to these systemic studies, the influence of IH exposure on TXA₂-pathway activation was investigated at the tissue level. In the cortical region of rat brain, the levels of COX-1 mRNA were unchanged in rats exposed to IH, while the expression of COX-2 was enhanced at both transcriptional and protein levels; this increase being associated with neuronal apoptosis and neurobehavioral deficit [38]. Little is known about possible IH-related COX-pathway activation in the cardiovascular system, whereas the influence of COX-derived mediators in the development of cardiovascular diseases has been largely demonstrated [20–22]. An increase in COX-2 transcriptional expression in the myocardium and cardiomyocytes of rats exposed to IH was demonstrated [39], but prostanoids were not measured in parallel. In aorta of ApoE^{-/-} mice exposed to IH for 8 weeks, COX-1 and TXBS mRNA were up-regulated [8] but not associated with an *in situ* increase in prostanoid release, since concentrations of TXB₂ and 6-ketoPGF_{1α} in the supernatants of aortic rings stimulated with A23187 were similar in mice exposed to IH or normoxia [8].

These discrepancies between clinical and experimental studies could be explained by the greater severity of hypoxia in animal models compared to OSA patients. The intensity of hypoxia evaluated by minimal oxygen saturation was notably greater in animal models (60–80%) [37] compared to OSA patients (approximately 80%) [8,24]. Moreover, in the OSA animal model of Nacher [35] and Farré [36], rats exhibited 60 hypoxic events per hour, whereas in humans the respiratory disturbance index was around 30 to 35 events per hour [8,26]. Another possible explanation could be that TXA₂ production was evaluated by the quantification of either urinary or plasma metabolites of TXA₂ in clinical and animal studies, respectively. While the measurement of urinary metabolites reflects the systemic production of TXA₂, the measurement of plasma metabolites seems more closely related to TXA₂ production by platelets [40] and can be altered by residual production during blood collection and/or handling [41,42].

To summarize, animal data have suggested that chronic exposure to IH could be sufficient to activate the TXA₂-pathway; while in OSA patients, the activation of the TXA₂-pathway could more likely be related to the presence of confounding factors such as obesity or hypertension rather than to the OSA itself. Nevertheless, one study suggested that the hypoxic component of OSA could partly contribute to the activation of the TXA₂-pathway observed in OSA patients. Indeed, changes in plasma 11-dehydroTXB₂ levels observed after 6 months of OSA treatment by mandibular advancement splints were positively correlated to the improvement of polysomnographic markers of OSA (apnea hypopnea index (AHI) and mean oxygen desaturation), while BMI did not change throughout the 6-months treatment period [24]. Thus we make the hypothesis that IH and obesity act in synergy toward the activation of the thromboxane A₂ pathway in OSA patients (Fig. 2). Further studies are therefore needed to provide definitive evidence for the contribution of IH in TXA₂-pathway activation and to determine the underlying mechanisms.

Studies concerning isoprostanoid levels in OSA are also numerous and the results conflicting [43–49], and are hampered by the presence of confounding factors such as overweight/obesity [44,47,49], which are associated with increased levels of isoprostanoids independently of OSA itself [50–53]. Nevertheless, some

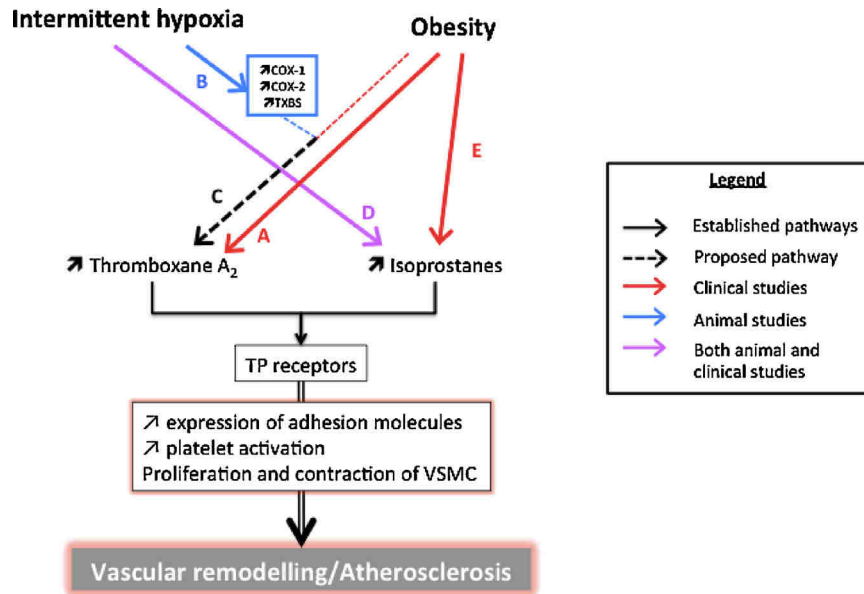


Fig. 2. Respective contribution of intermittent hypoxia and obesity to thromboxane A₂/TP receptor pathway activation during obstructive sleep apnea.

Obesity is associated with increased concentrations of thromboxane A₂ metabolites (A) [27–30]; In contrast, the influence of intermittent hypoxia on thromboxane A₂ pathway activation still remains unclear since results are conflicting. Experimental animal data demonstrated that intermittent hypoxia activates the thromboxane A₂ pathway both at a systemic level (plasma thromboxane A₂ metabolite levels [35,36]), or at a tissue level (COX-1 and TXBS mRNA levels in aorta [8], COX-2 mRNA levels in heart [39]) (B). Conversely, in OSA patients, thromboxane A₂ pathway activation is more likely to be strongly dependent on obesity rather than OSA itself [8,24,26]. Thus, it could be hypothesized that obesity and intermittent hypoxia act in synergy towards the activation of the thromboxane A₂ pathway in OSA (C). Both intermittent hypoxia [45,46,48,92] (D) and obesity [50–53] (E) lead to the higher concentrations of 15-F_{2t}-isoprostanes observed in OSA patients. Prostacyclin was not mentioned in the figure because very little data is available about the influence of intermittent hypoxia and obesity on this prostanoid.

OSA, obstructive sleep apnea; COX, cyclooxygenase; TXBS, thromboxane synthase; VSMC, vascular smooth muscle cell.

studies with rigorous methodology have provided convincing results suggesting that OSA could be associated with increased isoprostanoic concentrations [45,46,48]. Minoguchi et al. demonstrated that OSA patients had increased overnight urinary excretion of 15-F_{2t}-isoprostanes compared to controls carefully matched for age and BMI [48]. Interestingly, AHI remained the sole independent predictor of 15-F_{2t}-isoprostane levels [46,48], even after adjustment on BMI [48]. Similarly, while the effects of CPAP on isoprostane levels observed in uncontrolled studies [44,47–49] are questionable, a prospective, randomized, placebo controlled, double-blind, crossover study demonstrated its efficacy in normalizing plasma 15-F_{2t}-isoprostane levels [45]. Taken together, these data suggest that, in addition to obesity, the hypoxic component of OSA may play a major role in the isoprostane pathway activation observed in OSA patients (Fig. 2).

Link between IH-related thromboxane A₂ activation and vascular remodeling/atherosclerosis

TXA₂ is a well-known proatherogenic mediator since it is able to induce VSMC proliferation, contraction and to promote chemotaxis *via* an increased expression of adhesion molecules (Fig. 1) (see reviews [21,23]). Since some experimental studies have demonstrated that IH can activate the TXA₂-pathway [8,35,36], the later could be implicated in IH-induced atherogenesis. Importantly, the increased aortic COX-1 and TXBS mRNA levels observed in ApoE^{-/-} mice exposed to IH for 8 weeks correlated with atherosclerosis lesion size on the aortic roots [8]. Moreover, pharmacological COX-1 inhibition during 4 weeks abrogated the IH related progression of atherosclerosis in these mice [8]. Together these data strongly suggest that TXA₂ could act as an important mediator in IH-induced atherogenesis in ApoE^{-/-} mice. In OSA patients, the TXA₂-pathway seems also to be associated with vascular remodeling

since urinary 11-dehydroTXB₂ levels were increased in OSA patients with carotid hypertrophy (defined by an intima-media thickness (IMT) > 0.8 mm) [8]. These data are consistent with the direct chemotactic and proliferative effects of TXA₂ on VSMC (see reviews [21,23]). Similarly, urinary 15-F_{2t}-isoprostane concentrations were correlated with mean carotid IMT [46], consistent with their ability to activate TP receptors [21,23].

Therapeutic approaches to treat the OSA/IH-induced atherosclerosis

CPAP, the reference treatment of OSA, abolishes nocturnal apnea but fails to reduce cardiovascular risk in minimally symptomatic obese OSA patients [54], advocating for combined therapies [55] associating CPAP and pharmacological [56] or nutritional strategies targeting intermediary mechanisms leading to OSA related cardiovascular consequences.

Pharmacological approach

In a randomized double-blind study, we demonstrated that a 12-week treatment with atorvastatin (40 mg/d) neither improved endothelial function, nor reduced early signs of atherosclerosis, although it lowered blood pressure and improved the lipid profile, in patients with no history of cardiovascular disease [57]. Consistent with these data, the urinary levels of 11-dehydroTXB₂ remained unchanged during this treatment period [57].

However, considering the activation of the TXA₂-pathway in OSA patients presenting cardiovascular comorbidities [8,26], and the failure of CPAP to reduce urinary 11-dehydroTXB₂ concentrations in OSA patients [8,25], targeting the TXA₂-pathway could represent an alternative strategy to address early on or to delay the deleterious cardiovascular consequences linked to OSA.

Numerous studies have suggested the interest of disrupting the TXA₂ signaling pathway to reduce atherosclerosis, either by inhibiting TXA₂ production [58–60], blocking TP receptors [61–63] or combining a TXA₂ synthesis inhibitor and a TP receptor antagonist [64–66]. Pharmacological inhibition of TXA₂ biosynthesis with non-steroidal anti-inflammatory preferential COX-1 inhibitor [58], low-dose aspirin [60] or a more selective COX-1 inhibitor (SC560) [59,64] reduced atherosclerosis lesion size. In ApoE^{-/-} mice exposed to IH for 8 weeks, COX-1 inhibition by SC-560 during the last 4 weeks of IH exposure reduced the IH related progression of established atherosclerosis [8]. In addition to the up-regulation of COX-1 and TXBS mRNA in aorta from ApoE^{-/-} mice exposed to chronic IH and the correlation between these mRNA levels and the atherosclerosis lesion size [8], these results provided further evidence for the role of the COX-1 pathway in IH-induced atherogenesis. Conversely, SC-560 treatment had no influence on established atherosclerotic lesions from ApoE^{-/-} mice fed on a high-fat-diet [59] or a normal diet [8]. All these experimental data strongly suggest the potential interest of disrupting the TXA₂-pathway to reduce IH related atherosclerosis progression. However, further studies are required to investigate the potential efficacy of this pharmacological strategy in OSA.

In contrast, the effects of COX-2 inhibition on atherosclerosis are controversial since increased [67], reduced [68] or unchanged [58,59,69] atherosclerosis lesion sizes have been described after chronic treatment with COX-2 inhibitors. However, the increased risk of cardiovascular events associated with the use of the COX-2 selective inhibitor coxibs [32,70] opposes the putative interest of using these drugs to prevent OSA-induced atherosclerosis.

Blockade of TP receptors constitutes another way of disrupting the TXA₂-signaling pathway, in order to treat atherosclerosis. This approach has several theoretical advantages over COX-1 inhibition. First, while COX-1 inhibition (notably by low-doses of aspirin) inhibits platelet mediated-TXA₂ production, targeting the TP receptor counteracts the effects of TXA₂ generated not only by platelet COX-1, but also by COX-2 in immature platelets [71] and by monocyte/macrophage COX-2 [72]. Moreover, this strategy inhibits the binding to TP receptor of all its agonists, including TXA₂ and isoprostanes. Overall, a greater inhibition of atherogenesis through TP blockade, compared to that obtained by the inhibition of TXA₂ production, might be expected [20]. Several experimental studies have indeed demonstrated that TP receptor antagonism is more efficient in reducing lesion formation than COX inhibition [61,62,73]. Nevertheless, in a randomized double-blind study conducted in well-treated patients with a history of cerebrovascular events, TP receptor blockade by terutroban for 3 years did not beneficially affect progression of carotid atherosclerosis compared to aspirin [74]. This apparent discrepancy could partly be due to the fact that TP antagonism while efficient in preventing atherosclerotic lesion formation [61–63], does not seem effective against established atherosclerotic lesions as conflicting results have been published [63,73]. Indeed, while in rabbits fed with a high cholesterol diet, the regression of an established lesion was demonstrated by 6-month treatment with a selective TP receptor inhibitor (S18886) [63], the same treatment for 16 weeks in old Apobec-1/LDLR double knock-out mice had no effect on established atherosclerosis [73]. Finally, a better strategy could be the combination of both COX-1 inhibition and TP receptor blockade, as supported by studies conducted in animal models [64] and in patients [75,76].

Currently, no study investigating the effect of TP blockade has been conducted in an experimental model of OSA or in patients suffering from OSA. Regarding TXA₂-pathway activation [8,26] and the increased isoprostane levels observed in OSA patients [45,46,48], both related to vascular remodeling [8,46], it could be

suggested that TP antagonism represents an interesting pharmacological strategy to reduce IH-induced atherosclerosis.

Nutritional approach

The health benefits of *n*-3 polyunsaturated fatty acids (*n*-3 PUFAs) on cardiovascular diseases have been reported by numerous studies (see reviews [77,78]), even if results still remain controversial [77]. *n*-3 PUFAs are a family of biologically active fatty acids. Among them, docosahexaenoic acid (DHA) (C22:6*n*-3), one of the most biologically active compounds derives from the essential fatty acid linolenic acid (C18:3*n*-3) or eicosapentaenoic acid (C20:5*n*-3) (EPA) by an alternating series of desaturation and elongation reactions [79]. *n*-3 PUFAs display a wide range of physiological roles and are directly linked to clinical benefits, mainly by modulating the inflammatory process. These fatty acids can partly inhibit low grade inflammation by reducing leukocyte chemotaxis, the expression of adhesion molecules, and the production of inflammatory cytokines [80]. They are also precursors of anti-inflammatory eicosanoids, including resolvins and protectins [81], leukotriene B₅ [82] and series-3 prostaglandins and thromboxanes [80].

Among the underlying mechanisms involved, the influence of *n*-3 PUFAs on inflammation is mediated by, or associated with, changes in the fatty acid composition of cell membranes [83]. In healthy subjects, oral supplementation with DHA induced a dose-dependent increase of DHA incorporation in polymorphonuclear cell membranes [82]. Similarly, experimental studies on Wistar rats [84], wild type mice [85] or ApoE^{-/-} mice [9] demonstrated that oral DHA supplementation was associated with an increase in DHA and EPA incorporation, and a decrease of AA incorporation in different tissues. Since DHA, EPA and AA are competitive substrates of the lipoxygenases and COXs, changes in the eicosanoid profile is also expected. Experimental studies on rabbits fed with a high-fat-diet and supplemented with fish oil reported a decrease in TXB₂ levels in the ascending and abdominal aortas associated with a significant suppression of atherosclerosis [86]. In addition, we demonstrated that oral supplementation with fish oil (containing 80% DHA/4% EPA) of ApoE^{-/-} mice exposed to IH for 8 weeks, prevented the IH-induced atherosclerosis progression [9]. Unfortunately, thromboxane B₂/B₃ productions were not measured. However, in this model, fish oil supplementation induced no change in the mRNA levels of the resolvin pathway components (ALOX15, FRP2 and ChemR23) [9].

The impact of fish oil supplementation on TXB₂ levels has also been studied in several clinical studies reporting a decrease of TXB₂ serum levels in men at risk of cardiovascular disease [87], in hypercholesterolemic patients [88] or in patients with known cardiovascular disease [89]. However, whether this decrease in TXB₂ serum concentrations was associated with improvement of early markers of atherosclerosis was not mentioned in these studies.

To date, no study in humans suffering from OSA and given *n*-3 PUFA supplements has been performed, although some authors have recommended dietary supplementation with omega-3 fatty acids in order to minimize the inflammatory process associated with OSA [90]. One study reported that red blood cell membrane DHA levels were inversely correlated to OSA severity [91], but unfortunately confounding factors such as obesity were not considered. Further studies are obviously needed to confirm these results.

Taken together, experimental animal and clinical data confirm the role of *n*-3 PUFAs in decreasing the availability of AA as a substrate for eicosanoid synthesis. These data suggest the potential interest of *n*-3 PUFAs supplementation in the prevention of cardiovascular morbidity in OSA patients.

Conclusion

As discussed in this review, there is a growing body of evidence from both experimental animal-model studies and clinical studies, suggesting that the TXA₂-pathway could represent a molecular link between OSA and atherosclerosis. To summarize, IH and obesity the two major characteristic features of OSA seem to have a synergistic effect on the activation of the TXA₂-pathway. TXA₂ could therefore contribute to the development of atherosclerosis, particularly in obese OSA patients. Since CPAP treatment fails to reduce cardiovascular risk in minimally symptomatic obese OSA patients [54], multiple modalities of treatment should be proposed to patients [55]. Disrupting the TXA₂-pathway by pharmacological or nutritional approaches may provide interesting therapeutic strategies to treat atherosclerosis in obese OSA patients.

Acknowledgement

We thank Dr Alison Foote (Grenoble Clinical Research Centre) for language editing.

References

- [1] Young T, Palta M, Dempsey J, et al. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med* 1993;328:1230–5, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199304293281704>.
- [2] Yaggi HK, Concato J, Kernan WN, et al. Obstructive sleep apnea as a risk factor for stroke and death. *N Engl J Med* 2005;353:2034–41, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa043104>.
- [3] Somers VK, White DP, Amin R, et al. Sleep apnea and cardiovascular disease: an American Heart Association/American College of Cardiology Foundation Scientific Statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:686–717, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2008.05.002>.
- [4] Baguet J-P, Hammer L, Lévy P, et al. The severity of oxygen desaturation is predictive of carotid wall thickening and plaque occurrence. *Chest* 2005;128:3407–12, <http://dx.doi.org/10.1378/chest.128.5.3407>.
- [5] Drager LF, Bortolotto LA, Lorenzi MC, et al. Early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:613–8, <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200503-3400C>.
- [6] Arnaud C, Beguin PC, Lantuejoul S, et al. The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184:724–31, <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201012-2033OC>.
- [7] Arnaud C, Poulain L, Lévy P, et al. Inflammation contributes to the atherogenic role of intermittent hypoxia in apolipoprotein-E knock out mice. *Atherosclerosis* 2011;219:425–31, <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.07.122>.
- [8] Gautier-Veyret E, Arnaud C, Bäck M, Pépin J-L, et al. Intermittent hypoxia-activated cyclooxygenase pathway: role in atherosclerosis. *Eur Respir J* 2013;42:404–13, <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00096512>.
- [9] Van Noolen L, Bäck M, Arnaud C, et al. Docosahexaenoic acid supplementation modifies fatty acid incorporation in tissues and prevents hypoxia induced-atherosclerosis progression in apolipoprotein-E deficient mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2014;91:111–7, <http://dx.doi.org/10.1016/j.plefa.2014.07.016>.
- [10] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685–95, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra043430>.
- [11] Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation* 2005;112:2660–7, <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.556746>.
- [12] Arnaud C, Dematteis M, Pépin J-L, et al. Obstructive sleep apnea, immunoinflammation, and atherosclerosis. *Semin Immunopathol* 2009;31:113–25, <http://dx.doi.org/10.1007/s00281-009-0148-5>.
- [13] Fang G, Song D, Ye X, et al. Chronic intermittent hypoxia exposure induces atherosclerosis in ApoE knockout mice: role of NF- κ B p50. *Am J Pathol* 2012;181:1530–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.07.024>.
- [14] Tuleta I, França CN, Wenzel D, et al. Hypoxia-induced endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice; effects of infliximab and L-glutathione. *Atherosclerosis* 2014;236:400–10, <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.08.021>.
- [15] Stanke-Labesque F, Bäck M, Lefebvre B, Tamisier R, Baguet J-P, Arnol N, et al. Increased urinary leukotriene E4 excretion in obstructive sleep apnea: effects of obesity and hypoxia. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:364–70, 370.e1–2. doi:10.1016/j.jaci.2009.05.033.
- [16] Stanke-Labesque F, Pépin J-L, de Jouvencel T, et al. Leukotriene B4 pathway activation and atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *J Lipid Res* 2012;53:1944–51, <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.P022814>.
- [17] Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Systemic inflammation: a key factor in the pathogenesis of cardiovascular complications in obstructive sleep apnoea syndrome? *Postgrad Med J* 2009;85:693–8, <http://dx.doi.org/10.1136/thx.2008.105577>.
- [18] Lefebvre B, Pépin J-L, Baguet J-P, et al. Leukotriene B4: early mediator of atherosclerosis in obstructive sleep apnoea? *Eur Respir J* 2008;32:113–20, <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00137107>.
- [19] Stanke-Labesque F, Pépin J-L, Gautier-Veyret E, et al. Leukotrienes as a molecular link between obstructive sleep apnoea and atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2014;101:187–93, <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvt247>.
- [20] Dogné J-M, Hanson J, Pratico D. Thromboxane, prostacyclin and isoprostanes: therapeutic targets in atherogenesis. *Trends Pharmacol Sci* 2005;26:639–44, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2005.10.001>.
- [21] Capra V, Bäck M, Barbieri SS, et al. Eicosanoids and their drugs in cardiovascular diseases: focus on atherosclerosis and stroke. *Med Res Rev* 2013;33:364–438, <http://dx.doi.org/10.1002/med.21251>.
- [22] Tang SY, Monslow J, Todd L, et al. Cyclooxygenase-2 in endothelial and vascular smooth muscle cells restrains atherogenesis in hyperlipidemic mice. *Circulation* 2014;129:1761–9, <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007913>.
- [23] Praticò D, Dogné J-M. Vascular biology of eicosanoids and atherogenesis. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2009;7:1079–89, <http://dx.doi.org/10.1586/erc.09.91>.
- [24] Niżankowska-Jędrzejczyk A, Almeida FR, Lowe AA, et al. Modulation of inflammatory and hemostatic markers in obstructive sleep apnea patients treated with mandibular advancement splints: a parallel, controlled trial. *J Clin Sleep Med* 2014;10:255–62, <http://dx.doi.org/10.5664/jcsm.3522>.
- [25] Kimura H, Nijima M, Abe Y, et al. Compensatory excretion of prostacyclin and thromboxane metabolites in obstructive sleep apnea syndrome. *Intern Med* 1998;37:127–33, <http://dx.doi.org/10.2169/internalmedicine.37.127>.
- [26] Beaudin AE, Pun M, Yang C, et al. Cyclooxygenases 1 and 2 differentially regulate blood pressure and cerebrovascular responses to acute and chronic intermittent hypoxia: implications for sleep apnea. *J Am Heart Assoc* 2014;3:e000875, <http://dx.doi.org/10.1161/JAHA.114.000875>.
- [27] Davì G, Guagnano MT, Ciabattini G, et al. Platelet activation in obese women. *JAMA* 2002;288:2008, <http://dx.doi.org/10.1001/jama.288.16.2008>.
- [28] Graziani F, Biasucci LM, Cialdella P, et al. Thromboxane production in morbidly obese subjects. *Am J Cardiol* 2011;107:1656–61, <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjcard.2011.01.053>.
- [29] Basili S, Pacini G, Guagnano MT, et al. Insulin resistance as a determinant of platelet activation in obese women. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:2531–8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2006.08.040>.
- [30] Canales A, Bastida S, Librelotto J, et al. Platelet aggregation, eicosanoid production and thrombotic ratio in individuals at high cardiovascular risk consuming meat enriched in walnut paste. A crossover, placebo-controlled study. *Br J Nutr* 2009;102:134–41, <http://dx.doi.org/10.1017/S000711450813361X>.
- [31] Minuz P, Patrignani P, Gaiño S, et al. Determinants of platelet activation in human essential hypertension. *Hypertension* 2004;43:64–70, <http://dx.doi.org/10.1161/01.HYP.0000105109.44620.1B>.
- [32] Praticò D, Dogné J-M. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors development in cardiovascular medicine. *Circulation* 2005;112:1073–9, <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.524231>.
- [33] Krieger J, Benzoni D, Sforza E, et al. Urinary excretion of prostanoids during sleep in obstructive sleep apnoea patients. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1991;18:551–5.
- [34] Buczek W, Kramkowski K, Mogielnicki A. Are the endothelial mechanisms of ACE-Is already established? *Pharmacol Rep* 2006;58(Suppl.):126–31.
- [35] Nâcher M, Farré R, Montserrat JM, et al. Biological consequences of oxygen desaturation and respiratory effort in an acute animal model of obstructive sleep apnea (OSA). *Sleep Med* 2009;10:892–7, <http://dx.doi.org/10.1016/j.sleep.2008.09.014>.
- [36] Farré R, Nâcher M, Serrano-Mollar A, et al. Rat model of chronic recurrent airway obstructions to study the sleep apnea syndrome. *Sleep* 2007;30:930–3.
- [37] Dematteis M, Godin-Ribuot D, Arnaud C, et al. Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding the human disease. *ILAR J* 2009;50:262–81, <http://dx.doi.org/10.1093/ilar.50.3.262>.
- [38] Li RC, Row BW, Gozal E, et al. Cyclooxygenase 2 and intermittent hypoxia-induced spatial deficits in the rat. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:469–75, <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200211-1264OC>.
- [39] Klusonová P, Reháková L, Borchert G, et al. Chronic intermittent hypoxia induces 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in rat heart. *Endocrinology* 2009;150:4270–7, <http://dx.doi.org/10.1210/en.2008-1493>.
- [40] Ohmori T, Yatomi Y, Nonaka T, et al. Aspirin resistance detected with aggregometry cannot be explained by cyclooxygenase activity: involvement of other signaling pathway(s) in cardiovascular events of aspirin-treated patients. *J Thromb Haemost* 2006;4:1271–8, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01958.x>.

- [41] Catella F, Healy D, Lawson JA, et al. 11-Dehydrothromboxane B2: a quantitative index of thromboxane A2 formation in the human circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:5861–5.
- [42] Catella F, Nowak J, Fitzgerald GA. Measurement of renal and non-renal eicosanoid synthesis. *Am J Med* 1986;81:23–9.
- [43] Öztürk L, Mansour B, Yüksel M, et al. Lipid peroxidation and osmotic fragility of red blood cells in sleep-apnea patients. *Clin Chim Acta* 2003;332:83–8. [http://dx.doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00126-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00126-8).
- [44] Svatikova A, Wolk R, Lerman LO, et al. Oxidative stress in obstructive sleep apnoea. *Eur Heart J* 2005;26:2435–9. <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehi440>.
- [45] Alonso-Fernández A, García-Río F, Arias MA, et al. Effects of CPAP on oxidative stress and nitrate efficiency in sleep apnoea: a randomised trial. *Thorax* 2009;64:581–6. <http://dx.doi.org/10.1136/thx.2008.100537>.
- [46] Monneret D, Pepin J-L, Godin-Ribuot D, et al. Association of urinary 15-F2t-isoprostane level with oxygen desaturation and carotid intima-media thickness in nonobese sleep apnea patients. *Free Radic Biol Med* 2010;48:619–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.008>.
- [47] Carpagnano GE, Kharitonov SA, Resta O, et al. 8-Isoprostane, a marker of oxidative stress, is increased in exhaled breath condensate of patients with obstructive sleep apnea after night and is reduced by continuous positive airway pressure therapy. *Chest* 2003;124:1386–92. <http://dx.doi.org/10.1378/chest.124.4.1386>.
- [48] Minoguchi K, Yokoe T, Tanaka A, et al. Association between lipid peroxidation and inflammation in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 2006;28:378–85. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.06.00084905>.
- [49] Barceló A, Miralles C, Barbé F, et al. Abnormal lipid peroxidation in patients with sleep apnoea. *Eur Respir J* 2000;16:644–7.
- [50] Keane JF, Larson MG, Vasan RS, et al. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:434–9. <http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.0000058402.34138.11>.
- [51] Dennis BA, Ergul A, Gower BA, et al. Oxidative stress and cardiovascular risk in overweight children in an exercise intervention program. *Child Obes* 2013;9:15–21. <http://dx.doi.org/10.1089/chi.2011.0092>.
- [52] Urakawa H, Katsuki A, Sumida Y, et al. Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4673–6. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2003-030202>.
- [53] Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1752–61. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI21625>.
- [54] Craig SE, Kohler M, Nicoll D, et al. Continuous positive airway pressure improves sleepiness but not calculated vascular risk in patients with minimally symptomatic obstructive sleep apnoea: the MOSAIC randomised controlled trial. *Thorax* 2012;67:1090–6. <http://dx.doi.org/10.1136/thoraxjnl-2012-202178>.
- [55] Pépin J-L, Tamisier R, Lévy P. Obstructive sleep apnoea and metabolic syndrome: put CPAP efficacy in a more realistic perspective. *Thorax* 2012;67:1025–7. <http://dx.doi.org/10.1136/thoraxjnl-2012-202807>.
- [56] Pépin J-L, Tamisier R, Barone-Rochette G, et al. Comparison of continuous positive airway pressure and valsartan in hypertensive patients with sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:954–60. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200912-1803OC>.
- [57] Joyeux-Faure M, Tamisier R, Baguet J-P, et al. Response to statin therapy in obstructive sleep apnea syndrome: a multicenter randomized controlled trial. *Mediators Inflamm* 2014;2014:423120. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/423120>.
- [58] Pratiçò D, Tillmann C, Zhang ZB, et al. Acceleration of atherogenesis by COX-1-dependent prostanoid formation in low density lipoprotein receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:3358–63. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.061607398>.
- [59] Belton OA, Duffy A, Toomey S, et al. Cyclooxygenase isoforms and platelet vessel wall interactions in the apolipoprotein E knockout mouse model of atherosclerosis. *Circulation* 2003;108:3017–23. <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.0000104565.78013.AD>.
- [60] Cyrus T, Sung S, Zhao L, et al. Effect of low-dose aspirin on vascular inflammation, plaque stability, and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 2002;106:1282–7. <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.0000027816.54430.96>.
- [61] Cayatte AJ, Du Y, Oliver-Krasinski J, et al. The thromboxane receptor antagonist S18886 but not aspirin inhibits atherogenesis in apo E-deficient mice: evidence that eicosanoids other than thromboxane contribute to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1724–8.
- [62] Worth NF, Berry CL, Thomas AC, Campbell JH. S18886, a selective TP receptor antagonist, inhibits development of atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 2005;183:65–73. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2005.02.034.
- [63] Viles-Gonzalez JF, Fuster V, Corti R, et al. Atherosclerosis regression and TP receptor inhibition: effect of S18886 on plaque size and composition—a magnetic resonance imaging study. *Eur Heart J* 2005;26:1557–61. <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehi175>.
- [64] Cyrus T, Yao Y, Ding T, et al. Thromboxane receptor blockade improves the antiatherogenic effect of thromboxane A2 suppression in LDLR KO mice. *Blood* 2007;109:3291–6. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-08-044990>.
- [65] Cherdon C, Rolin S, Hanson J, et al. BM-573 inhibits the development of early atherosclerotic lesions in Apo E deficient mice by blocking TP receptors and thromboxane synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2011;94:124–32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2011.03.001>.
- [66] Cyrus T, Yao Y, Ding T, et al. A novel thromboxane receptor antagonist and synthase inhibitor, BM-573, reduces development and progression of atherosclerosis in LDL receptor deficient mice. *Eur J Pharmacol* 2007;561:105–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.12.024>.
- [67] Rott D, Zhu J, Burnett MS, et al. Effects of MF-tricyclic, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on atherosclerosis progression and susceptibility to cytomegalovirus replication in apolipoprotein-E knockout mice. *Am Coll Cardiol* 2003;41:1812–9. [http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097\(03\)00304-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097(03)00304-8).
- [68] Burleigh ME, Babaev VR, Oates JA, et al. Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice. *Circulation* 2002;105:1816–23. <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.0000014927.74465.7F>.
- [69] Bea F, Blessing E, Bennett BJ, et al. Chronic inhibition of cyclooxygenase-2 does not alter plaque composition in a mouse model of advanced unstable atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2003;60:198–204. [http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6363\(03\)00464-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6363(03)00464-4).
- [70] Fitzgerald GA. Coxibs and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 2004;351:1709–11. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMp048288>.
- [71] Weber AA, Zimmermann KC, Meyer-Kirchrath J, et al. Cyclooxygenase-2 in human platelets as a possible factor in aspirin resistance. *Lancet* 1999;353:900. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)00498-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(99)00498-5).
- [72] Halushka MK. Why are some individuals resistant to the cardioprotective effects of aspirin?: Could it be thromboxane A2? *Circulation* 2002;105:1620–2. <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.0000015422.86569.52>.
- [73] Egan KM, Wang M, Fries S, et al. Cyclooxygenases, thromboxane, and atherosclerosis: plaque destabilization by cyclooxygenase-2 inhibition combined with thromboxane receptor antagonism. *Circulation* 2005;111:334–42. <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.0000153386.95356.78>.
- [74] Bots ML, Ford I, Lloyd SM, et al. Thromboxane prostaglandin receptor antagonist and carotid atherosclerosis progression in patients with cerebrovascular disease of ischemic origin: a randomized controlled trial. *Stroke* 2014;45:2348–53. <http://dx.doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.004775>.
- [75] Belhassen L, Pelle G, Dubois-Randé J-L, et al. Improved endothelial function by the thromboxane A2 receptor antagonist S 18886 in patients with coronary artery disease treated with aspirin. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1198–204. [http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097\(03\)00048-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097(03)00048-2).
- [76] Lesault P-F, Boyer L, Pelle G, et al. Daily administration of the TP receptor antagonist terutroban improved endothelial function in high-cardiovascular-risk patients with atherosclerosis. *Br J Clin Pharmacol* 2011;71:844–51. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2125.2010.03858.x>.
- [77] Superko HR, Superko AR, Lundberg GP, et al. Omega-3 fatty acid blood levels clinical significance update. *Curr Cardiovasc Risk Rep* 2014;8:407. <http://dx.doi.org/10.1007/s12170-014-0407-4>.
- [78] Kromhout D, de Goede J. Update on cardiometabolic health effects of ω -3 fatty acids. *Curr Opin Lipidol* 2014;25:85–90. <http://dx.doi.org/10.1097/MOL.0000000000000041>.
- [79] Calder PC. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J Nutr* 2012;142:592S–9S. <http://dx.doi.org/10.3945/jn.111.155259>.
- [80] Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta* 2014. doi:10.1016/j.bbaliip.2014.08.010.
- [81] Weylandt KH, Chiu C-Y, Gomolka B, et al. Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: towards an understanding of resolvin and protectin formation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2012;97:73–82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2012.01.005>.
- [82] Stanke-Labesque F, Molière P, Bessard J, et al. Effect of dietary supplementation with increasing doses of docosahexaenoic acid on neutrophil lipid composition and leukotriene production in human healthy volunteers. *Br J Nutr* 2008;100:829–33. <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114508923692>.
- [83] Calder PC. The role of marine omega-3 (n-3) fatty acids in inflammatory processes, atherosclerosis and plaque stability. *Mol Nutr Food Res* 2012;56:1073–80. <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.201100710>.
- [84] Balková P, Jezková J, Hlaváčková M, et al. Dietary polyunsaturated fatty acids and adaptation to chronic hypoxia alter acyl composition of serum and heart lipids. *Br J Nutr* 2009;102:1297–307. <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114509389242>.
- [85] Lefils J, Gélöën A, Vidal H, et al. Dietary DHA: time course of tissue uptake and effects on cytokine secretion in mice. *Br J Nutr* 2010;104:1304–12. <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114510002102>.
- [86] Chen MF, Hsu HC, Lee YT. Effects of fish oil supplementation on atherosclerosis in different regions of the aorta of rabbits with diet-induced hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)* 1995;89:497–504.
- [87] Mori TA, Beilin LJ, Burke V, et al. Interactions between dietary fat, fish, and fish oils and their effects on platelet function in men at risk of cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:279–86. <http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.17.2.279>.
- [88] Pirich C, Gaszo A, Granegger S, et al. Effects of fish oil supplementation on platelet survival and ex vivo platelet function

- in hypercholesterolemic patients. *Thromb Res* 1999;96:219–27, [http://dx.doi.org/10.1016/S0049-3848\(99\)00103-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0049-3848(99)00103-6).
- [89] Kidson-Gerber G, Weaver J, Gemmell R, et al. Serum thromboxane B2 compared to five other platelet function tests for the evaluation of aspirin effect in stable cardiovascular disease. *Heart Lung Circ* 2010;19:234–42, <http://dx.doi.org/10.1016/j.hlc.2009.11.002>.
- [90] Scorza FA, Cavalheiro EA, Scorza CA, Galduróz JCF, Tufik S, Andersen ML. Sleep apnea and inflammation—getting a good night's sleep with omega-3 supplementation. *Front Neurol* 2013;4:193. doi:10.3389/fneur.2013.00193.
- [91] Ladesich JB, Pottala JV, Romaker A, et al. Membrane level of omega-3 docosa-hexaenoic acid is associated with severity of obstructive sleep apnea. *J Clin Sleep Med* 2011;7:391–6, <http://dx.doi.org/10.5664/JCSM.1198>.
- [92] Lam S-Y, Liu Y, Ng K-M, et al. Chronic intermittent hypoxia induces local inflammation of the rat carotid body via functional upregulation of proinflammatory cytokine pathways. *Histochem Cell Biol* 2012;137:303–17, <http://dx.doi.org/10.1007/s00418-011-0900-5>.

Au total, ces différents travaux ont permis de démontrer que la supplémentation en AG *n*-3 prévenait l'accélération de l'athérosclérose induite par l'HIC. Cet effet étant en partie lié à la modification de l'équilibre oméga-3 / oméga-6 des AG polyinsaturés au sein des membranes phospholipidiques. La voie du TXA₂, prostanöide issu du métabolisme de l'AA, est activée au cours du SAOS et contribue à l'athérosclérose liée au SAOS (120). De ce fait, cette voie est une cible thérapeutique potentielle pour lutter contre l'athérogenèse induite par l'HIC. Différentes options thérapeutiques ont été détaillées dans la revue, l'approche nutritionnelle par supplémentation en AG *n*-3 fait partie des stratégies à considérer.

3.2. Etude clinique préliminaire : AG érythrocytaires chez les patients atteints d'un SAOS et marqueurs du remodelage vasculaire

Les résultats de la précédente étude expérimentale (134) ont montré le potentiel intérêt de supplémentation en AG *n*-3 chez les patients atteints d'un SAOS pour la prévention de l'athérosclérose. Fort de cette observation, nous avons souhaité étudier le profil en AG de la membrane érythrocytaire de patients apnéiques. Ce profil érythrocytaire a en effet l'avantage d'être le reflet de l'incorporation des AG (et donc de l'équilibre oméga-3 / oméga-6) des derniers mois puisque le globule rouge a une durée de vie de 120 jours. Par ailleurs, le rôle des AG *n*-3 via la modulation de l'inflammation sur l'athérosclérose chez les humains n'est plus à démontrer (99). De plus, la littérature rapporte une étude clinique réalisée chez des patients atteints d'un SAOS et dont l'augmentation de la concentration en DHA au niveau des membranes des globules rouges a été corrélée négativement à la sévérité du SAOS de ces patients (135). Par ailleurs, une étude clinique japonaise récente réalisée chez des patients atteints d'un SAOS et présentant une maladie coronaire a montré que le ratio plasmatique EPA/AA est significativement plus bas que chez les patients présentant une maladie coronaire mais n'ayant pas de SAOS (136). Aussi, nous avons voulu savoir dans un premier temps si la composition en AG de la membrane érythrocytaire (en particulier AA, EPA et DHA) de patients atteints d'un SAOS était comparable à celle de patients sains et dans un second temps, étudier l'association possible entre la composition en AG des membranes érythrocytaires chez les patients SAOS et les marqueurs du remodelage vasculaire.

Les patients étudiés sont issus de l'étude ancillaire du protocole clinique n° 2012-A01157-36 dont les critères d'inclusion des sujets étaient les suivants : patients de sexe masculin ou féminin, âgés de plus de 18 ans, avec un diagnostic de diabète de type 2, suivis pour coronaropathie ou artériopathie périphérique stable depuis plus de 3 mois, traités par aspirine soluble depuis plus de 10 jours, sans modification du traitement par aspirine ou du traitement antidiabétique depuis 10 jours, suivis en ambulatoire, sans événement cardiovasculaire aigu, ni pathologie inflammatoire ou infectieuse dans les trois mois précédents la recherche du SAOS.

3.2.1. Résultats

- Statistiques descriptives de la population :

Au total nous avons pu inclure dans notre étude : 11 patients témoins (non SAOS) et 30 patients avec un SAOS sévère (IAH > 30).

Le tableau 1 résume les caractéristiques initiales pour les 2 groupes de patients.

	Patients non SAOS (n=11)	Patients SAOS sévère (n=30)	<i>p-value</i>
Âge (années)	57 (47 - 73)	63 (55 - 75)	0,29
Hommes (% (n))	73 (8)	63 (19)	0,17
IMC (kg.m ⁻²)	30,8 (22,6 - 35,6)	31,5 (25,6 - 36,4)	0,26
Paramètres biologiques			
Cholestérol total (g.L ⁻¹)	1,44 (1,11 - 1,97)	1,72 (1,29 - 2,07)	0,12
Cholestérol HDL (g.L ⁻¹)	0,41 (0,29 - 0,48)	0,39 (0,32 - 0,62)	0,56
Cholestérol LDL (g.L ⁻¹)	0,63 (0,43 - 1,20)	0,91 (0,56 - 1,25)	0,23
Triglycérides (g.L ⁻¹)	1,62 (0,81 - 2,42)	1,56 (0,90 - 2,65)	0,87
Glycémie à jeun (mmol.L ⁻¹)	6,3 (4,8 - 12,8)	7,2 (5,9 - 10,2)	0,42
CRP ultrasensible (mg.L ⁻¹)	2,1 (0,4 - 32,4)	1,5 (0,5 - 7,25)	0,94
Marqueurs du remodelage vasculaire			
VOP (m.s ⁻¹)	9,6 (8,4 - 13,3)	12,7 (8,7 - 17,9)	0,018
IPS	1,2 (1,0 - 1,4)	1,1 (1,0 - 1,3)	0,12

Tableau 1 : Caractéristiques initiales pour les 2 groupes de patients (SAOS et non SAOS)

Les résultats sont présentés avec la médiane (10^{ème} – 90^{ème} percentile). La p-value a été calculée par comparaison des 2 groupes avec le test de Mann Whitney pour les variables continues et le test de Fischer pour les variables nominales. Le test est significatif si $p < 0,05$.

Concernant les caractéristiques initiales des 2 groupes de patients, un seul paramètre est significativement différent entre les 2 groupes : il s'agit de la VOP ($p=0,018$) qui est plus élevée dans le groupe de patients avec SAOS sévère.

- Etude du profil des AG érythrocytaires chez les 2 groupes de patients :

Les résultats de cette étude sont présentés dans le tableau 2.

	Patients non SAOS (n=11)	Patients SAOS sévère (n=30)	<i>p-value</i>
Acide α-linolénique (%)	0,13 (0,06 - 0,22)	0,14 (0,08 - 0,25)	0,33
Acide linoléique (%)	10,7 (6,7 - 13,3)	10,5 (8,6 - 12,4)	0,81
AA (%)	18 (10,0 - 21,9)	17,6 (7,1 - 20,3)	0,38
EPA (%)	0,6 (0,4 - 1,6)	0,9 (0,3 - 1,8)	0,26
DHA (%)	5,6 (2,1 - 8,3)	5,8 (1,3 - 8,7)	0,88
Index oméga 3 : [(DHA+EPA)/AA]	0,34 (0,23 - 0,50)	0,37 (0,22 - 0,57)	0,35

Tableau 2 : Distribution des AG érythrocytaires pour les 2 groupes de patients (SAOS et non SAOS)

Les résultats sont présentés avec la médiane (10^{ème} – 90^{ème} percentile). La p-value a été calculée par comparaison des 2 groupes avec le test de Mann Whitney. Le test est significatif si $p < 0,05$.

Au total, la distribution au sein des membranes érythrocytaires en acide α-linolénique, acide linoléique, AA, EPA et DHA n'est pas significativement différente entre les 2 groupes.

- Relation AG n-3 et marqueurs de remodelage vasculaire

Les études de corrélation entre l'index oméga 3 et l'IAH, la VOP et l'IPS réalisés sur l'ensemble de notre population (patients SAOS et non SAOS) n'ont pas donné de résultats significatifs (Figure 12).

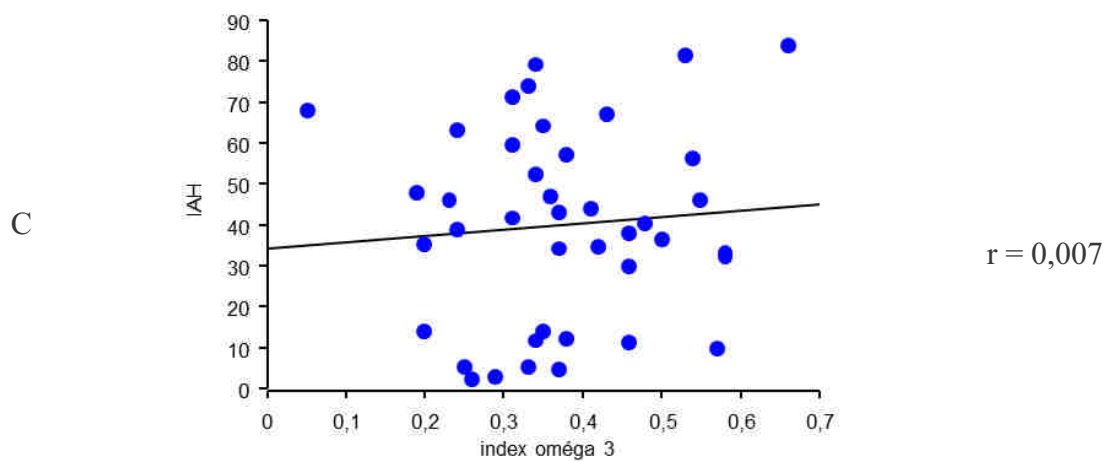
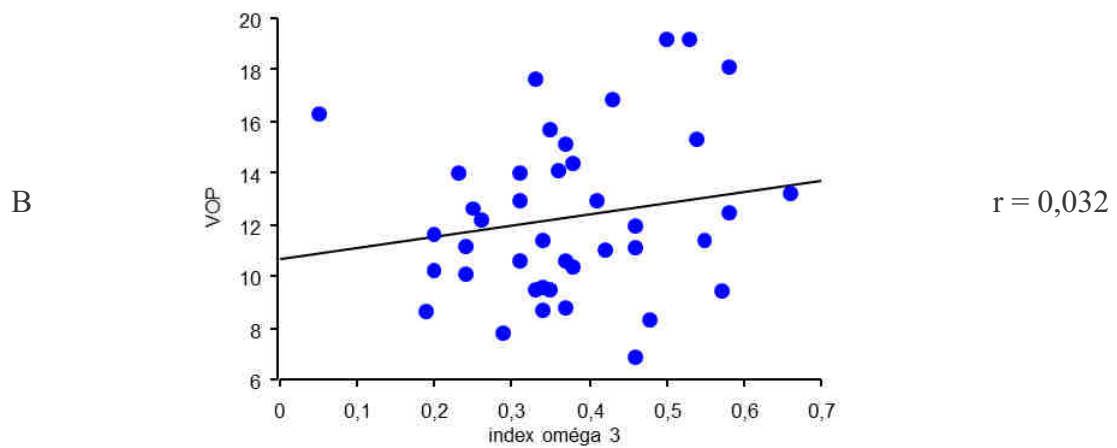
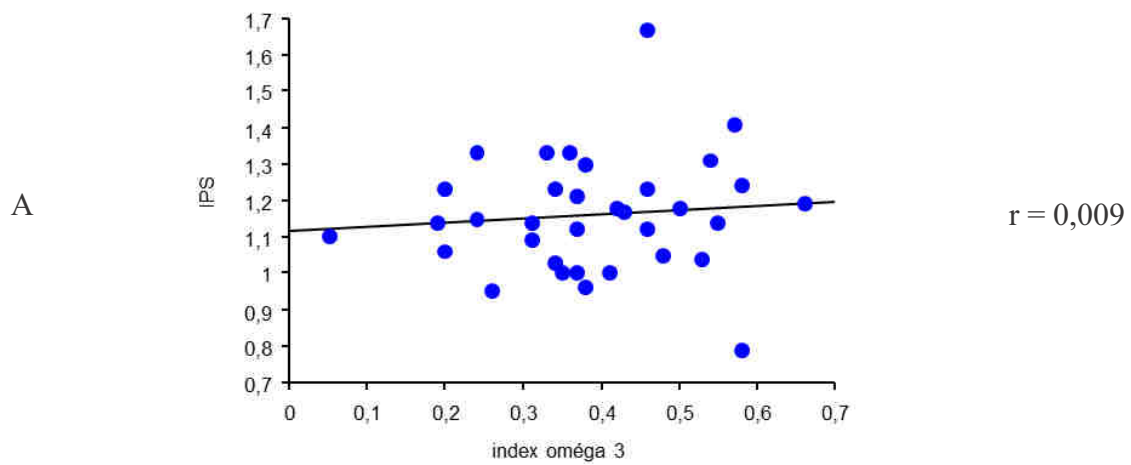


Figure 12 : Régression entre l'index oméga 3 et A) l'index de pression systolique (IPS) ; B) la vitesse de l'onde de pouls (VOP) et C) l'index d'apnées-hypopnées (IAH)

3.2.2. Discussion

Notre étude originale sur le profil des AG érythrocytaires chez les patients atteints d'un SAOS n'a pas mis en évidence de différence significative dans le profil des AG chez les patients SAOS versus les patients non SAOS ni d'association entre les AG $n-3$ et les marqueurs du remodelage vasculaire évalués au cours de cette étude.

Tout d'abord, la comparaison du profil d'AG entre les patients non SAOS et les patients présentant un SAOS sévère ne met pas en évidence de différence significative. Actuellement très peu d'études ont traité des AG $n-3$ et du SAOS. On peut citer les travaux de Ladesich *et al.* (135). Dans cette étude, les auteurs se sont intéressés à la relation entre les concentrations de DHA au niveau des membranes des globules rouges et la sévérité du SAOS (AHI compris entre 0 et 14 : SAOS absent/léger, AHI compris entre 15 et 34 : SAOS modéré, AHI > 34 : SAOS sévère) chez 350 patients ayant eu une étude polysomnographique. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence une corrélation négative entre la sévérité du SAOS et l'augmentation des concentrations de DHA. Ainsi pour une augmentation de 1 SD de la concentration de DHA, un patient a approximativement 50% de moins de chance d'avoir un SAOS sévère. Ces résultats quoique très intéressants présentent certaines limites, en particulier les facteurs confondants telle que l'obésité n'ont pas été pris en compte. Récemment, une étude de Tittus *et al.* (137) a également évalué chez 315 patients la relation possible entre index oméga 3 et sévérité du SAOS et ne retrouve pas de relation significative. On retrouve cependant la même limite qu'à l'étude précédente. Enfin, l'étude japonaise de Nakabayashi *et al.* (136) a montré que le ratio plasmatique EPA/AA de patients SAOS présentant une maladie coronaire est significativement plus bas que chez les patients non SAOS présentant une maladie coronaire. Cependant cette étude est limitée par l'absence d'enquête diététique chez ces patients. Aussi, face à ces résultats discordants, peu nombreux et présentant des limites, des études supplémentaires sont nécessaires pour préciser la potentielle relation entre SAOS et index oméga 3.

Par ailleurs, les marqueurs du remodelage vasculaire évalués dans cette étude (VOP et IPS) montrent effectivement une augmentation significative de l'un d'eux : la VOP chez la population atteinte d'un SAOS par rapport aux patients non SAOS. Cette observation a déjà été mise en évidence chez les patients SAOS (33) et confirme que le SAOS présente un facteur de risque indépendant pour le développement de maladies cardiovasculaires (5). Nous n'avons

cependant pas mis en évidence de relation entre cette VOP et le profil des AG érythrocytaires chez les patients SAOS de notre étude.

Il faut néanmoins noter un certain nombre de limites à notre étude préliminaire. En effet, l'effectif étudié est encore insuffisant pour pouvoir répondre à la question posée. De plus, nous avons initialement prévu d'interroger les patients inclus sur deux points : leur consommation hebdomadaire de poisson et s'ils prenaient une supplémentation en AG *n*-3. Malheureusement, ce questionnaire ne leur a pas été soumis, ce qui limite encore plus l'interprétation des résultats.

Au total, ces résultats nous incitent à envisager d'autres études plus complètes avec un effectif plus conséquent. De même qu'une étude interventionnelle (DHA et EPA) est à envisager car pour l'instant, à notre connaissance, aucune étude dans le contexte du SAOS n'a été réalisée (138, 139).

3.3. Métabolisme des AG (AC), SAOS et risque cardiovasculaire

Nous venons de voir avec les précédents travaux, que les AG jouent un rôle important dans les conséquences cardiovasculaires liées au SAOS et en particulier via la voie des eicosanoïdes, ils participent à la régulation de l'inflammation (61). Fort de cette constatation, nous nous sommes donc intéressés de plus près au catabolisme propre des AG c'est-à-dire à la β -oxydation mitochondriale. En effet, les résultats d'études de ce catabolisme via le profil des ACs dans les pathologies cardiovasculaires se multiplient et mettent en évidence des modifications de cette β -oxydation permettant *in fine* l'émergence de biomarqueurs (107-110) et il apparaît donc intéressant de l'évaluer dans le contexte du SAOS.

Ainsi, l'objectif de ce travail original a été dans un premier temps d'étudier chez le modèle animal l'impact de l'HIC sur le profil des ACs et de préciser la potentielle relation entre ce profil des ACs et l'athérosclérose induite par l'HIC, puis dans un second temps d'évaluer grâce à une étude clinique les modifications de ce profil dans le contexte de SAOS.

Le profil des ACs a été évalué chez des souris ApoE^{-/-} exposées à l'HI pendant 8 semaines dans un premier temps et complété par des données cliniques de patients SAOS issus de différents protocoles cliniques pour lesquels une sérothèque était à notre disposition.

Article original N°3

« Acylcarnitines profiling, atherosclerosis and OSA syndrome »

L. Van Noolen, I. Jullian-Desayes, M. Joyeux-Faure, J.L. Pépin,
P. Faure

A soumettre

Acylcarnitines profiling, atherosclerosis and OSA syndrome

L. Van Noolen,^{1,2,3,§} I. Jullian-Desayes,^{1,2,3,§} M. Joyeux-Faure,^{1,2,3} J.L. Pépin,^{1,2,3} P. Faure^{1,2,3}

1.Univ. Grenoble Alpes, HP2, F-38041 Grenoble, France

2.INSERM U1042, 38041 Grenoble, France

3.Centre hospitalier Universitaire Grenoble Alpes, 38043 Grenoble, France

§These authors contributed equally to this work

Abstract

Intermittent hypoxia, the main stimulus of obstructive sleep apnea (OSA) is involved in the increased cardiovascular morbidity and mortality in OSA patients. Underlying mechanisms linking OSA to atherosclerosis are still poorly understood. Fatty acid (FA) mitochondrial β -oxidation metabolism products acylcarnitines (ACs). These ACs are increasingly studied especially in cardiovascular diseases context. To date, OSA impact on FA β -oxidation metabolism and its vascular function consequences has not been studied. We first evaluated on a murine model (ApoE^{-/-} mice), the impact of CIH exposure on ACs profile and we investigated the potential link between ACs profile and CIH-induced atherosclerosis. We secondly estimated the effect of gold standard treatment of OSA, that is to say continuous positive airway pressure (CPAP) on ACs profile in OSA patients. Our results show that ACs profiling is a relevant biological parameter which deserves to be evaluated in the field of atherosclerosis and encourage us to increase our knowledge by deeper exploring ACs roles in this context of OSA syndrome.

Key words: obstructive intermittent hypoxia – atherosclerosis – fatty acid - acylcarnitine

Introduction

Obstructive sleep apnea (OSA) syndrome is a multifactorial disease characterized by recurrent episodes of nocturnal intermittent hypoxia (IH). This hallmark is the main factor involved in the increased cardiovascular morbidity and mortality in OSA patients. Thus, OSA is now recognized as an independent cardiovascular risk factor (1). In particular, OSA patients present early signs of atherosclerosis (2) that are independent of other cardiovascular and metabolic risk factors and correlate to hypoxia severity. In addition, Apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-}) mice fed with a standard diet and exposed to chronic intermittent hypoxia (CIH) present increased aortic atherosclerosis lesion sizes (3-5), providing further evidence for a strong link between CIH and atherosclerosis.

Profiling of circulating acylcarnitines (ACs) is a very useful tool for inherited metabolic disorders diagnosis (particularly for mitochondrial fatty acid β -oxidation defects) (6). Indeed, the most important function of L-carnitine is the transport of fatty acids into the mitochondria for β -oxidation, a process resulting in the esterification of L-carnitine to form AC derivatives (7). Intracellular ACs formation is a mechanism that buffer potentially toxic acyl-CoA metabolites accumulating in cells when for example impaired mitochondrial FA oxidation occurs in order to maintain optimal activity of mitochondrial Krebs cycle-related enzymes. Moreover, ACs can be transported out of mitochondria and out of the cell to the bloodstream, and thereby directly reflect the intracellular pool of corresponding acyl-CoAs (which are sequestered in the mitochondria) (8).

Recently, ACs profiling has evolved as been a promising approach to evaluate other health field such as metabolic chronic disease (diabetes, obesity), cardiovascular disease and also patients with sleep disorder. These studies are not yet numerous and show various results,

particularly concerning cardiovascular disease (9-12). However, it appears that ACs profiling is disrupted and in patients with cardiovascular pattern, ACs are increased (short-, medium- or long- chain, it depends on the study). Moreover, in patients with chronic heart failure, ACs are higher when patients present serious sleep disorders (13). Thus, increase in AC serum levels are associated with cardiometabolic comorbidities that are also present in obstructive sleep apnea (OSA).

First line option of treatment for severe OSA is continuous positive airway pressure (CPAP) (14). This therapeutic is able to improve some biomarker plasma levels such as lipids (15), glucose metabolism (16) or liver biomarkers (17). However, this positive effect of CPAP is not confirmed in all randomized controlled trials (18). To date no study has investigated the effect of CPAP on ACs serum levels.

Thus, the aim of the present work was first to evaluate the impact of CIH exposure on ACs profile in ApoE^{-/-} mice and to investigate the potential link between ACs profile and CIH-induced atherosclerosis and secondly to estimate the effect of CPAP treatment on ACs profile in OSA patients.

Material and Methods

Experimental animal study

All animal procedures were conducted in accordance with 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 to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

Thirty male ApoE^{-/-} mice (14-week-old) were exposed for 8 weeks to CIH (cyclic 21-5% FiO₂, 60s cycle, normoxic and hypoxic phases both for 30s, 8h/day during daytime) or air (N, normoxic), as previously described (19). The mice used for this analysis stemmed from a first series already published (5) completed by a supplementary series of experiences. Mice were fed with normal diet (RM1, SDS, Witham, Essex, UK). Two experimental groups were set up: N (n = 14) and CIH (n = 16). Mice were fed *ad libitum* during all experiment duration.

At the end of CIH or N exposure, blood was collected on EDTA tubes under anesthesia (ketamine / xylazine 100 mg/kg -10 mg/kg, intraperitoneal injection) for hematocrit and ACs profiling measurements. Entire aortas were harvested.

Atherosclerosis lesion size quantification

Atherosclerotic lesions of aortic roots were analyzed by Oil-red-O staining, as previously described (3). For each aortic root, lipid deposition was quantified from 5 sections (8 μm thickness), separated by 80 μm from each other, using computer images analysis (NisElement[®], Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA).

Clinical study

Patients were recruited from sleep laboratories in accordance with applicable good clinical practice requirements in Europe, French law, ICH E6 recommendations, and the ethical principles of the Helsinki Declaration. This clinical study is an ancillary study from 3 clinical trials (NCT01196845 / NCT00464659 / NCT00669695). Inclusion criteria were: patients aged over 18 years, with proven severe OSA defined by an apnoea + hypopnoea index (AHI) > 30 /h. Patients presenting any of the following criteria were not included: history of stroke, heart failure, severe hypertension. All patients had an overnight sleep study before treatment with CPAP or sham CPAP as previously described (20). Several physiological variables were recorded during sleep in order to characterize abnormal respiratory events. Overnight Sleep studies were scored according to international guidelines (21). At the baseline visit as well as at the end of the treatment, patients underwent an overnight sleep study. After waking and while still fasting, a peripheral blood sample was drawn. Samples were frozen at -80°C until analyses. The Epworth sleepiness scale was completed and arterial blood gases analysis was performed in order to exclude obesity hypoventilation syndrome. Patients were then randomized by an independent statistician to be treated by CPAP (auto-titrating machines as Autoset Spirit, ResMed, UK or Remstar Auto; Philips Respironics, Murrysville, PA) or sham CPAP (previously validated) (22) applied during 6, 8 or 12 weeks depending on the initial clinical trial.

Biological measurements

ACs profiling

Serum/Plasma ACs profiling was determined using tandem mass spectrometry (API 3000, Applied Biosystems / Sciex, Foster City, California, USA). Briefly, specimens were diluted in ethanol (20 μ L of specimen in 400 μ L ethanol) with a mixture of deuterium-labeled internal standards (d3-C2, d3-C3, d3-C4, d9-C5, d3-C8, d9-C14, d3-C16) dissolved in methanol. Samples were centrifuged, and the supernatant containing the extracted ACs was transferred to another tube and evaporated to dryness under nitrogen. ACs were derivatized to their butyl-esters by adding 3N HCl in *n*-butanol and heating at 65°C for 15 minutes. Samples were again evaporated to dryness under nitrogen, and finally reconstituted in the mobile phase (acetonitrile / water / formic acid (50/50/0.025%)).

For MS/MS analysis, ACs were analyzed without chromatographic separation in the positive-ion mode, using precursor-ion scan: for butylated derivatives, all precursors of products m/z 85 within a mass range between 200 and 500 m/z were recorded (23).

Statistical analysis

For the clinical study, baseline comparisons between groups were made using the Student test or Mann-Whitney test, depending on validation of normality distribution. Student test was also used to compare mean AC levels in groups after treatment. Two analyses were performed: an intention-to-treat (ITT) analysis (including data from all randomized patients) and a per-protocol analysis (including only subjects with complete follow-up data). For the ITT analysis, missing data were replaced by multiple imputation using linear regression models for

continuous data and logistic regression models for categorical data. Adjustment on free carnitine for ACs was made.

For the experimental study, data were expressed as median and 10th and 90th percentiles. Appropriate nonparametric tests were used (Mann Whitney method).

Analysis were performed with SAS Version 9.1.3 (SAS Institute Inc) software or Statview software (version 5.0, SAS Institute, Cary, USA) and statistical significance was concluded when p-values were < 0.05.

Results

Experimental animal study

Weight and hematocrit

After 8 weeks of CIH-exposure, body weight was not significantly different between CIH and N mice groups. Hematocrit was significantly higher in CIH mice group compared to N mice group ([Table 1](#)).

Atherosclerotic lesion sizes

Atherosclerotic lesion sizes were analyzed on 28/30 mice due to technical troubles. Atherosclerotic lesion sizes on aortic roots were significantly higher in CIH mice group compared to N mice group ([Table 1](#)).

ACs profiling

Homogeneity of free carnitine status in each group (N and CIH) was evaluated by determining mean \pm two standard deviation of each group. There was no difference in free carnitine status between the two groups ([Table 2](#)).

Each AC (n=37) was compared between N and CIH mice groups. There was no difference except for one AC: 3OH-butyrylcarnitine which was higher in CIH group compared to N group ([Table 2](#)). No difference was found between the groups when ACs were pooled by chain length (short-, medium- and long-chain ACs). Finally, esterified carnitine / total carnitine and acetylcarnitine / total carnitine ratio were not significantly different between the two groups ([Table 2](#)).

In CIH mice group, long chain ACs were significantly negatively correlated to aortic lesion size ($r=0.57$; $p=0.0052$) (**Figure 1**) which was not seen for short- and medium-chain. In N mice group, there was no significant correlation between ACs chain length (short-, medium, long-) and aortic lesion size.

Clinical Study

ACs profiling

A total of 103 OSA patients were included (52 in the sham CPAP group and 51 in the CPAP group). Baseline characteristics are represented in **Table 3**. There was no difference between the 2 groups (**Table 3**). None difference was observed between free carnitine / acylcarnitine levels and CPAP / sham CPAP group at baseline, as well as after treatment (**Table 4.A**). These levels were unchanged after 6 to 12 weeks of CPAP (**Table 4.B**) in Intention To Treat (ITT) analysis. Per protocol analysis and adjustment of acylcarnitine levels on free carnitine levels at baseline and after treatment did not change these results.

Discussion

Our original work evaluates for the first time ACs profiling in the context of hypoxia. The subject deals with two approaches. First, an experimental study based on CIH induced-atherosclerosis and fatty acid catabolism and secondly, a clinical study based on treatment impact on this catabolism.

Results of the experimental study confirmed that CIH mice had larger aortic root atherosclerotic lesions than N mice. This observation was in accordance with our previous work (5) and confirmed that CIH exposure accelerates atherosclerosis development in ApoE^{-/-} mice.

In order to investigate the underlying mechanisms of atherosclerosis in the context of CIH, fatty acid catabolism through ACs profiling was evaluated. Long chain fatty acids are the basic substrate for oxidative energy metabolism in the myocardium. The major role of carnitine is to enable esterified fatty acids to enter into the mitochondrial matrix where β -oxidation occurs and generates in fine ATP synthesis (24). In our study, free carnitine status and global comparison (short-, medium- and long-chain) ACs status between the two groups (CIH and N) did not show significant differences. These results are not in line with those observed by Miyata *et al.* (13). In their study, patients with chronic heart failure presenting sleep-disordered breathing had increased free carnitine and ACs levels when the apnea-hypopnea index was upper than thirty (13). However, complementary studies are needed to confirm or infirm these results since our experimental group size is limited.

Interestingly, when each AC was individually compared, we highlighted that 3OH-butyrylcarnitine was significantly higher in CIH exposed mice. 3OH-butyrylcarnitine reflects 3OH-butyric acid ketone body level. This observation was also reported by Jun *et al.* who showed that a severe hypoxia ($FiO_2 < 0.07$) in mice increased plasma ketone body level (25).

Ketone body are synthesized with acetyl-CoA which derived from fatty acid and glucose metabolism. This observation confirms that energetic metabolism is altered with CIH.

Furthermore, we observed a negative correlation between long chain ACs and aortic lesion sizes i.e. when aortic lesion sizes were higher, lower were the long chain ACs levels in CIH exposed mice. This observation raises some questions. Indeed, could the ACs be less available for β -oxydation when atherosclerosis plaque size increases? This question needs to be investigated in order to find some responses.

Since experimental results were very interesting, we took advantage of a registered serum bank of characterized OSA patients, which was disposable, and we evaluated carnitine and ACs status in OSA patients before and after CPAP treatment. Analysis of the results did not show significant difference in our OSA population.

However, these observations have some limits. First and unfortunately, we did not have any control subjects. Indeed, it would have been interesting to compare ACs distribution between our OSA population and a control population, to confirm or infirm our experimental results. Secondly, treatment duration (6 to 12 weeks) was maybe too short to see any effect on carnitine and ACs status. Finally, patients' phenotype study could be a supplementary approach in order to interpret our results. All in all, further studies are needed to explore this metabolism with larger populations.

To conclude, our experimental study confirmed that CIH induced atherosclerosis acceleration, as we previously already showed it (5). Exploration of fatty acid metabolism via ACs profiling showed a negative correlation between long chain ACs and atherosclerosis lesion size suggesting a reduction of availability of these ACs for metabolism. In order to deeper investigate ACs metabolism during chronic intermittent hypoxia, our clinical study evaluated the impact of CPAP treatment on ACs profiling but did not show any significative result. These

first original results show that ACs profiling is a relevant biological parameter which deserves to be evaluated in the field of atherosclerosis and encourage us to increase our knowledge by deeper exploring ACs roles in this context of OSA syndrome.

References

1. 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(10):1080-111.
2. 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(5):613-8.
3. Arnaud C, Poulain L, Lévy P, Dematteis M. Inflammation contributes to the atherogenic role of intermittent hypoxia in apolipoprotein-E knock out mice. *Atherosclerosis*. 2011;219(2):425-31.
4. Gautier-Veyret E, Arnaud C, Bäck M, Pépin JL, Petri MH, Baguet JP, et al. Intermittent hypoxia-activated cyclooxygenase pathway: role in atherosclerosis. *Eur Respir J*. 2013;42(2):404-13.
5. Van Noolen L, Bäck M, Arnaud C, Rey A, Petri MH, Levy P, et al. Docosahexaenoic acid supplementation modifies fatty acid incorporation in tissues and prevents hypoxia induced-atherosclerosis progression in apolipoprotein-E deficient mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2014;91(4):111-7.
6. Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. The application of tandem mass spectrometry to neonatal screening for inherited disorders of intermediary metabolism. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2002;3:17-45.
7. Reuter SE, Evans AM. Carnitine and acylcarnitines: pharmacokinetic, pharmacological and clinical aspects. *Clin Pharmacokinet*. 2012;51(9):553-72.
8. Friolet R, Hoppeler H, Krähenbühl S. Relationship between the coenzyme A and the carnitine pools in human skeletal muscle at rest and after exhaustive exercise under normoxic and acutely hypoxic conditions. *J Clin Invest*. 1994;94(4):1490-5.
9. Strand E, Pedersen ER, Svingen GF, Olsen T, Bjørndal B, Karlsson T, et al. Serum Acylcarnitines and Risk of Cardiovascular Death and Acute Myocardial Infarction in Patients With Stable Angina Pectoris. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(2).
10. Rizza S, Copetti M, Rossi C, Cianfarani MA, Zucchelli M, Luzi A, et al. Metabolomics signature improves the prediction of cardiovascular events in elderly subjects. *Atherosclerosis*. 2014;232(2):260-4.

11. Guasch-Ferré M, Zheng Y, Ruiz-Canela M, Hruby A, Martínez-González MA, Clish CB, et al. Plasma acylcarnitines and risk of cardiovascular disease: effect of Mediterranean diet interventions. *Am J Clin Nutr.* 2016;103(6):1408-16.
12. Shah AA, Craig DM, Sebek JK, Haynes C, Stevens RC, Muehlbauer MJ, et al. Metabolic profiles predict adverse events after coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012;143(4):873-8.
13. Miyata M, Yoshihisa A, Yamauchi H, Owada T, Sato T, Suzuki S, et al. Impact of sleep-disordered breathing on myocardial damage and metabolism in patients with chronic heart failure. *Heart Vessels.* 2015;30(3):318-24.
14. Lévy P, Kohler M, McNicholas WT, Barbé F, McEvoy RD, Somers VK, et al. Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15015.
15. Nadeem R, Singh M, Nida M, Kwon S, Sajid H, Witkowski J, et al. Effect of CPAP treatment for obstructive sleep apnea hypopnea syndrome on lipid profile: a meta-regression analysis. *J Clin Sleep Med.* 2014;10(12):1295-302.
16. Martínez-Cerón E, Barquiel B, Bezos AM, Casitas R, Galera R, García-Benito C, et al. Effect of Continuous Positive Airway Pressure on Glycemic Control in Patients with Obstructive Sleep Apnea and Type 2 Diabetes. A Randomized Clinical Trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;194(4):476-85.
17. Chin K, Nakamura T, Takahashi K, Sumi K, Ogawa Y, Masuzaki H, et al. Effects of obstructive sleep apnea syndrome on serum aminotransferase levels in obese patients. *Am J Med.* 2003;114(5):370-6.
18. Jullian-Desayes I, Joyeux-Faure M, Tamisier R, Launois S, Borel AL, Levy P, et al. Impact of obstructive sleep apnea treatment by continuous positive airway pressure on cardiometabolic biomarkers: a systematic review from sham CPAP randomized controlled trials. *Sleep Med Rev.* 2015;21:23-38.
19. Dematteis M, Godin-Ribuot D, Arnaud C, Ribouot C, Stanke-Labesque F, Pépin JL, et al. Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding the human disease. *ILAR J.* 2009;50(3):262-81.
20. Minville C, Hilleret MN, Tamisier R, Aron-Wisnewsky J, Clement K, Trocme C, et al. Nonalcoholic fatty liver disease, nocturnal hypoxia, and endothelial function in patients with sleep apnea. *Chest.* 2014;145(3):525-33.
21. 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(5):597-619.
22. Farré R, Hernández L, Montserrat JM, Rotger M, Ballester E, Navajas D. Sham continuous positive airway pressure for placebo-controlled studies in sleep apnoea. *Lancet.* 1999;353(9159):1154.

23. Rinaldo P, Cowan TM, Matern D. Acylcarnitine profile analysis. *Genet Med*. 2008;10(2):151-6.
24. Houten SM, Wanders RJ. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *J Inherit Metab Dis*. 2010;33(5):469-77.
25. Jun JC, Shin MK, Yao Q, Bevans-Fonti S, Poole J, Drager LF, et al. Acute hypoxia induces hypertriglyceridemia by decreasing plasma triglyceride clearance in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012;303(3):E377-88.

Table 1. Body weight, hematocrit and aortic lesion sizes of ApoE^{-/-} mice exposed for 8 weeks to chronic intermittent hypoxia (CIH) or normoxia (N) and randomized to two groups.

	Normoxic (n=14)	Chronic Intermittent Hypoxia (n=16)	<i>p-value</i>
Body weight after exposure (g)	31.5 (27.4 - 34.6)	29.4 (25.9 - 32.6)	0.14
Hematocrit (%)	42.5 (40.0 - 45.1)	45.0 (43.0 - 47.0)	0.038
Atherosclerosis lesion size (μm ²)	26237 (14864 - 98815)	70140 (24246 - 269941)	0.024

Data are presented as median (10th and 90th percentiles). p-values indicate comparison of variables between the 2 groups made with Mann-Whitney test.

Table 2. Plasma acylcarnitines (ACs) levels of ApoE^{-/-} mice exposed for 8 weeks to chronic intermittent hypoxia (CIH) or normoxia (N) and randomized to two groups.

	Normoxic (n=14)	Chronic Intermittent Hypoxia (n=16)	<i>p-value</i>
Free carnitine status (μmol.L ⁻¹)	23.1 (18.6 - 27.1)	24.6 (20.3 - 31.4)	0.34
C4OH (3OH-butylcarnitine) (μmol.L ⁻¹)	0.12 (0.09 - 0.21)	0.16 (0.13 - 0.20)	0.046
Short chain ACs (μmol.L ⁻¹)	20.6 (14.4 - 32.1)	23.2 (15.8 - 33.0)	0.24
Medium chain ACs (μmol.L ⁻¹)	0.95 (0.7 - 1.0)	0.9 (0.7 - 1.1)	0.95
Long chain ACs (μmol.L ⁻¹)	1.9 (0.9 - 3.0)	1.8 (1.1 - 2.6)	0.98
Esterified carnitine / total carnitine	0.51 (0.41 - 0.63)	0.53 (0.42 - 0.59)	0.97
Acetylcarnitine / total carnitine	0.42 (0.33 - 0.49)	0.45 (0.33 - 0.53)	0.71

Data are presented as median (10th and 90th percentiles). p-values indicate comparison of variables between the 2 groups made with Mann-Whitney test.

Table 3. Before treatment patient's characteristics.

	Sham CPAP (n = 52)	CPAP (n = 51)	<i>p-value</i>
Age (years)	57 (50 / 62)	57 (49 / 62)	0.78
Men (% (n))	73.1 (38)	84.3 (43)	0.16
BMI (kg.m ⁻²)	28.5 (25.2 / 31.9)	28.1 (26.3 / 32.3)	0.70
History			
Current smokers (% (n))	21.2 (11)	15.7 (8)	0.75
Type 2 Diabetes (% (n))	3.8 (2)	7.8 (4)	0.44
Hypertension (% (n))	28.8 (15)	25.5 (13)	0.70
Treatments			
Antidiabetic drugs (% (n))	3.8 (2)	5.9 (3)	0.63
Antihypertensive drugs (%)	23.1 (12)	21.6 (11)	0.85
Statins (% (n))	15.4 (8)	21.6 (11)	0.42
Respiratory characteristics			
AHI (events.h ⁻¹)	31.3 (27.8 / 44.0)	42.8 (30.1 / 65)	0.04
Mean SaO ₂ (%)	92.8 ± 2.1	92.3 ± 2.5	0.35
SaO ₂ < 90% (%)	3.0 (1.0 / 10.9)	5.7 (2.1 / 10.8)	0.22
Biological parameters			
Fasting glucose (mmol.L ⁻¹)	5.30 (4.90 / 5.78)	5.50 (5.10 / 5.90)	0.17
Total cholesterol (g.L ⁻¹)	2.10 (1.75 / 2.45)	2.24 (1.82 / 2.50)	0.35
Triglycerids (g.L ⁻¹)	1.15 (0.90 / 1.59)	1.36 (0.81 / 2.10)	0.13
CPAP compliance (h/night)	3.1 ± 2.4	4.0 ± 0.9	0.066

Data are presented as median (25th, 75th percentiles), mean ± SD, or percentage (number of patients). AHI apnoea-hypopnoea index; BMI, body mass index; SaO₂, oxygen saturation; SaO₂ < 90%, percentage of recording time spent at a SaO₂ < 90%. Student or Mann-Whitney test for continuous data. For qualitative data, a Chi-2 test or a Fisher test was performed.

Table 4. Acylcarnitines (ACs) serum levels in OSA patients**4.A Before and after treatment with CPAP or sham CPAP (Intention To Treat (ITT) analysis).**

	Before treatment			After treatment		
	Sham	CPAP	<i>p-value</i>	Sham	CPAP	<i>p-value</i>
Free carnitine	51.7 [48.7 ; 54.8]	53.5 [50.1 ; 56.9]	0,44	53.1 [49.5 ; 56.8]	55.5 [51.5 ; 59.4]	0,41
Short chain ACs	19 [17.6 ; 20.4]	20.2 [18.4 ; 22]	0,30	20.8 [18.8 ; 22.8]	20.5 [18.6 ; 22.5]	0,84
Medium chain ACs	1.9 [1.7 ; 2]	1.8 [1.6 ; 2.1]	0,62	1.7 [1.6 ; 1.9]	1.8 [1.6 ; 2]	0,40
Long chain ACs	0.9 [0.8 ; 1]	0.9 [0.8 ; 1]	0,79	0.9 [0.8 ; 0.9]	0.9 [0.8 ; 1]	0,50
Total ACs	21.8 [20.3 ; 23.3]	23 [21.1 ; 24.9]	0,33	23.4 [21.4 ; 25.5]	23.3 [21.2 ; 25.3]	0,91

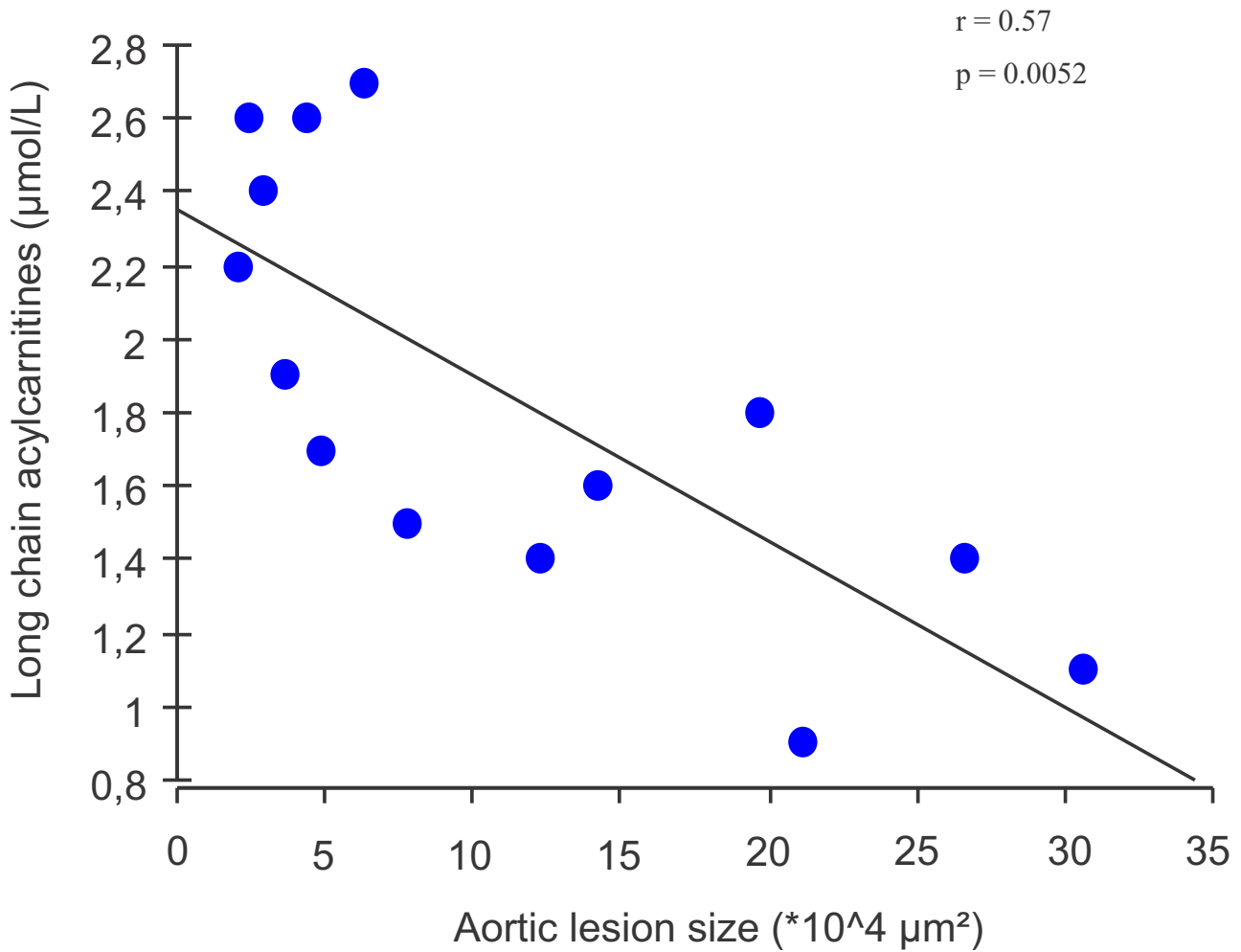
4.B Differences in AC serum levels before and after treatment in ITT.

	Sham				CPAP			
	Before treatment	After treatment	Difference	<i>p-value</i>	Before treatment	After treatment	Difference	<i>p-value</i>
Free carnitine	51.7 [48.7 ; 54.8]	53.1 [49.5 ; 56.8]	1.4 [-2.8 ; 5.6]	0,50	53.5 [50.1 ; 56.9]	55.5 [51.5 ; 59.4]	1.9 [-2.6 ; 6.5]	0,40
Short chain ACs	19 [17.6 ; 20.4]	20.8 [18.8 ; 22.8]	1.8 [-0.4 ; 4]	0,11	20.2 [18.4 ; 22]	20.5 [18.6 ; 22.5]	0.3 [-2.4 ; 3]	0,82
Medium chain ACs	1.9 [1.7 ; 2]	1.7 [1.6 ; 1.9]	-0.1 [-0.3 ; 0.1]	0,23	1.8 [1.6 ; 2.1]	1.8 [1.6 ; 2]	0 [-0.3 ; 0.2]	0,86
Long chain ACs	0.9 [0.8 ; 1]	0.9 [0.8 ; 0.9]	-0.1 [-0.2 ; 0.1]	0,32	0.9 [0.8 ; 1]	0.9 [0.8 ; 1]	0 [-0.1 ; 0.1]	0,70
Total ACs	21.8 [20.3 ; 23.3]	23.4 [21.4 ; 25.5]	1.6 [-0.7 ; 4]	0,18	23 [21.1 ; 24.9]	23.3 [21.2 ; 25.3]	0.3 [-2.5 ; 3.1]	0,85

Results are expressed as $\mu\text{mol/L}$ and represented as mean [IC 95%]. Comparisons used the Student test.

Logarithmic transformation was performed for medium chain ACs in 4.A table

Figure 1. Regression between aortic lesion size and long chain acylcarnitines plasma levels of ApoE^{-/-} mice exposed for 8 weeks to chronic intermittent hypoxia (CIH).



Ce travail original a permis de mettre en évidence sur notre modèle expérimental d'HIC une relation inverse entre les ACs à chaînes longues circulantes et la taille de la lésion d'athérosclérose, suggérant un rôle potentiel de la plaque d'athérosclérose dans la disponibilité des ACs. Des études complémentaires sont bien évidemment nécessaires pour confirmer / infirmer cette hypothèse qui mérite d'être explorée. Pour approfondir l'évaluation des effets de l'HIC sur le métabolisme des ACs, l'étude clinique des sérums de patients atteints d'un SAOS n'a pas permis de mettre en évidence des différences significatives avant et après traitement par PPC. Cependant, cette exploration mérite d'être approfondie car l'interprétation de nos résultats est difficile vu les nombreuses limites de notre étude. Au total, l'exploration du catabolisme des AG via l'étude du profil des ACs dans les conséquences cardiovasculaires liées au SAOS est à approfondir car les perspectives d'émergence de biomarqueurs sont réelles.

Discussion générale

Ces différents travaux ont permis d'une part de mettre en évidence le rôle des AG *n-3* dans la prévention de l'athérosclérose induite par l'HIC, suggérant la potentielle utilité d'une supplémentation nutritionnelle chez les patients apnéiques en prévention du risque cardiovasculaire et d'autre part d'éclairer sur l'intérêt de l'exploration du profil des AG et du profil des ACs pour le monitoring de l'état cardiovasculaire et métabolique de ces patients.

- **AG *n-3* et prévention de l'athérosclérose liée au SAOS**

Les résultats de notre première étude originale ont montré que sur le modèle murin, la supplémentation en AG *n-3* (et en particulier de DHA) permet de prévenir l'accélération de l'athérosclérose liée à l'hypoxie intermittente (134). Ces résultats originaux sont les premiers dans le contexte de l'HIC à montrer l'effet bénéfique d'une telle supplémentation. En effet, peu d'études expérimentales ont étudié l'effet des AG *n-3* sur les lésions d'athérosclérose et les résultats sont de plus discordants : pas d'effet (140, 141), peu d'effet (142) et plus récemment deux études montrent un effet significatif (143, 144) confortant nos résultats.

Nos travaux confirment que la supplémentation en AG *n-3* entraîne une augmentation de l'incorporation de DHA et EPA dans la membrane phospholipidique associée à une diminution de l'AA. Il a déjà été suggéré que la modification du rapport oméga 3 / oméga 6 au niveau des membranes phospholipidiques a un impact sur les fonctions des cellules de l'inflammation via la fluidité membranaire, la signalisation cellulaire (qui peut altérer l'expression génique) et la production de médiateurs lipidiques particuliers (résolvines) (99). Dans nos travaux, l'impact de cette supplémentation se traduit par une modulation de l'expression génique de MMP-2. Cette MMP, comme d'autres, est connue pour jouer un rôle non négligeable dans le remodelage vasculaire en dégradant la matrice extracellulaire (95). De plus, l'augmentation de MMP-2 a récemment été retrouvée chez un modèle animal soumis à l'HI (145). L'ensemble de ces données suggère qu'un des mécanismes d'action de la supplémentation en AG *n-3* dans le contexte de l'HIC serait une potentielle stabilisation des plaques d'athérome (67). Il faut néanmoins noter que d'autres mécanismes sont certainement impliqués dans cette prévention de l'accélération de l'athérosclérose liée au SAOS et des études supplémentaires sur notamment le métabolisme

des eicosanoïdes nécessitent d'être réalisées. En effet l'activation de la voie des leucotriènes a déjà été largement étudiée dans le contexte du SAOS (119) et des travaux antérieurs ont montré l'impact d'une supplémentation en DHA sur la production de leucotriènes, en particulier une augmentation du rapport LTB_5/LTB_4 par les polynucléaires neutrophiles (82). Aussi il apparaît important de pouvoir évaluer cet effet dans le contexte du SAOS. Enfin, le rôle des résolvines et leur mécanisme d'action anti-inflammatoire méritent d'être étudiés plus largement (64, 83).

Fort de ces observations, nous souhaitons compléter ces données animales avec des données humaines. Cependant l'étude du profil des AG chez les patients SAOS ne nous a pas permis de mettre en évidence une différence significative de ce profil avec la population témoin. Nous n'avons par ailleurs pas retrouvé de corrélation entre les AG *n*-3 (DHA et EPA) et AG *n*-6 (AA) et les marqueurs du remodelage vasculaire. La grosse difficulté de notre étude réside dans le nombre limité de patients ainsi que le manque de données concernant les patients inclus. Des inclusions complémentaires sont nécessaires pour explorer correctement cette possible relation.

L'approche thérapeutique principale du SAOS pour lutter contre les maladies vasculaires repose sur la PPC et peut être associée à tout un panel de molécules pharmacologiques (118). Pour lutter plus spécifiquement contre l'athérosclérose, notre revue détaille les différentes approches thérapeutiques possibles agissant sur le métabolisme des eicosanoïdes et plus particulièrement sur la voie du TXA_2 (146). Dans ce contexte, l'approche préventive nutritionnelle (supplémentation en AG *n*-3) a toute sa place et permettrait d'agir en amont sur l'athérosclérose liée au SAOS.

Aussi, face aux résultats de nos deux études (animale et clinique), et devant la nécessité d'approfondir les connaissances concernant les conséquences inflammatoires d'une modification du rapport oméga 3 / oméga 6 au niveau des membranes phospholipidiques, il semble qu'une étude interventionnelle chez les patients SAOS avec une supplémentation en AG *n*-3 (DHA / EPA) serait très informative. En effet, cette étude pourrait, d'une part étayer l'hypothèse d'un effet bénéfique sur la sphère cardiovasculaire d'une approche nutritionnelle préventive et d'autre part compléter les données sur le mécanisme d'action d'une telle supplémentation dans le contexte du SAOS. A ce jour, aucune étude clinique dans ce contexte n'a été réalisée (139).

- **AC et monitoring de l'athérosclérose liée au SAOS**

Le second volet de ce travail a permis d'évaluer le profil des ACs dans le contexte du SAOS. Notre étude sur le modèle animal d'HIC n'a pas mis en évidence de différence significative lorsque le profil des ACs a été comparé au groupe témoin mais a cependant montré une corrélation inverse entre les ACs à chaînes longues et la taille des plaques d'athérosclérose (article N°3). Cette observation inédite soulève quelques questions quant au mécanisme d'action sous-jacent. Rôle de la plaque athéromateuse dans la disponibilité des ACs ? Des études supplémentaires concernant ce point précis sont à envisager pour comprendre le mécanisme d'action (plus grand effectif, étude des autres marqueurs du métabolisme intermédiaire, rôle des ACs à chaînes longues...).

Devant ces résultats originaux et ayant à disposition une banque de séra de patients atteints d'un SAOS traités ou non par PPC, nous avons décidé de compléter nos investigations concernant les ACs avec une approche clinique. Les résultats obtenus, issus de la comparaison du groupe de patients avant et après traitement par PPC et de la comparaison patients traités versus patients non traités n'ont pas montré de différence significative. Malgré les nombreuses limites de cette étude clinique (absence de population témoin, durée limitée du traitement par PPC, absence de phénotypage des patients) il semble néanmoins intéressant de persévérer dans cette approche. A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur la relation entre profil des ACs et SAOS.

En effet, l'analyse du profil des ACs, qui était jusque-là utilisée pour le diagnostic de pathologies métaboliques héréditaires (en particulier pour les anomalies de la bêta-oxydation mitochondriale des AG), est désormais largement évaluée dans des contextes plus étendus tels que les pathologies chroniques et les maladies cardiovasculaires (147). Nous avons vu qu'un certain nombre de travaux étudient ces ACs comme marqueurs de pathologies cardiovasculaires (107-110, 148). Il apparait encore difficile à ce stade de mettre en évidence une modification consensuelle de ce profil dans le contexte cardiovasculaire, le nombre d'études étant encore limité et les résultats hétérogènes.

Néanmoins, ces dernières années, la carnitine a également fait l'objet de nombreux travaux qui rapportent dans un premier temps un potentiel effet protecteur de celle-ci en améliorant l'athérosclérose sur les modèles animaux (149, 150) et, paradoxalement, plus récemment les études rapportent à l'inverse un rôle de promoteur de l'athérosclérose, notamment via l'action sur le métabolisme du microbiote et la production de molécules

proathérogéniques (151). Ainsi, les recommandations actuelles sont de réaliser des études cliniques pour déterminer le bénéfice ou le méfait de la carnitine sur le spectre des maladies cardiovasculaires (152). Parallèlement, d'autres hypothèses sont suggérées quant aux fonctions de la carnitine, qui pourrait potentiellement jouer le rôle de portier cellulaire pour restreindre l'entrée des AG dans la cellule (pour rappel la carnitine est nécessaire aux AG à chaînes longues pour pénétrer dans la mitochondrie), ce qui permettrait d'éviter la surcharge lipidique et en fin de compte la mort des cellules spumeuses qui seraient hypothétiquement à l'origine d'un cercle vicieux de phagocytose et toxicité causant la croissance de la plaque athéromateuse (153). Cette hypothèse a été soutenue par les travaux de l'équipe de Vilskersts qui ont montré chez un modèle murin ApoE^{-/-} que la diminution de la carnitine mobilisable comme transporteur d'AG (via l'utilisation d'inhibiteurs), atténue la progression de l'athérosclérose (154).

Enfin, de récents travaux suggèrent que les ACs à chaînes moyennes et longues pourraient présenter des propriétés pro-inflammatoires en activant la COX-2. Ces résultats ont été avancés par l'équipe de Rutkowsky qui a montré que *in vitro*, l'accumulation d'ACs entraînait l'augmentation de l'expression du gène de la COX-2 ainsi que celle de nombreuses cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF α , MCP1, MIP2, Ccl5...) (155). Cette observation inédite est d'une importance capitale si on se replace dans la perspective d'une supplémentation en AG *n*-3 des patients atteints d'un SAOS. En effet, cette même équipe a également montré que *in vitro*, le DHA est capable d'inhiber les effets de l'accumulation des ACs sur la COX-2 et les cytokines pro-inflammatoires (155). Il apparaît donc que l'analyse du profil des ACs a toute sa place dans le contexte de supplémentation en AG *n*-3.

- **Intérêt du profil des AG associé au profil des ACs : vers un monitoring du risque cardiovasculaire ?**

Les deux approches abordées dans ces travaux : le profil des AG et le profil des ACs présentent chacune un intérêt pour le monitoring des patients et en particulier concernant l'évolution de l'athérosclérose. Il apparaît même que l'utilisation du profil des AG ne devrait pas se limiter aux classiques DHA, EPA et AA mais être élargi car un certain nombre d'AG pourrait également permettre de monitorer le risque cardiovasculaire (156). De plus l'étude du profil des ACs dans le contexte des pathologies cardiovasculaires nécessite désormais de concentrer les efforts sur l'applicabilité clinique des variations observées (157).

Au total, comme le suggère l'équipe de H. Blair, l'étude de ces deux profils devrait donc être systématique pour permettre d'approfondir les données actuelles et réaliser des progrès dans l'étude de l'athérosclérose. Ces marqueurs pourraient permettre une meilleure prédiction des patients présentant un risque élevé de pathologie cardiovasculaire et pourraient tout autant avoir leur place dans le monitoring thérapeutique de ces mêmes patients (153).

Conclusion

Le SAOS est une pathologie reconnue comme étant un facteur de risque cardiovasculaire à part entière. Le traitement de cette pathologie repose sur la PPC qui améliore les conséquences cardiovasculaires mais dont la principale limite est son observance. D'autres approches pharmacologiques sont proposées pour lutter contre les conséquences cardiovasculaires du SAOS et en particuliers l'athérosclérose.

Nos travaux expérimentaux ont permis de proposer une approche nutritionnelle avec la supplémentation en AG *n*-3 comme agent préventif du processus athéromateux. Les résultats obtenus encouragent à proposer une étude clinique en ce sens, qui pourrait à terme permettre d'élargir le panel thérapeutique et nutritionnel du SAOS.

Enfin, à l'ère de la métabolomique, l'étude du profil des AG et du profil des ACs dans le monitoring cardiovasculaire de ces patients semble incontournable. Les futures études permettront peut-être l'émergence de biomarqueurs dont la pertinence clinique restera à préciser.

Références bibliographiques

1. Eckert DJ, Malhotra A. Pathophysiology of adult obstructive sleep apnea. *Proc Am Thorac Soc.* 2008;5(2):144-53.
2. Sleep-related breathing disorders in adults: recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. The Report of an American Academy of Sleep Medicine Task Force. *Sleep.* 1999;22(5):667-89.
3. Milleron O. Risque cardiovasculaire et syndrome d'apnées du sommeil. *MT Cardio.* 2005;1(5):397-406.
4. Lévy P, Kohler M, McNicholas WT, Barbé F, McEvoy RD, Somers VK, et al. Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15015.
5. McNicholas WT, Bonsignore MR, Bonsignore MR, B26 MCoECA. Sleep apnoea as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence, basic mechanisms and research priorities. *Eur Respir J.* 2007;29(1):156-78.
6. Kendzerska T, Gershon AS, Hawker G, Leung RS, Tomlinson G. Obstructive sleep apnea and risk of cardiovascular events and all-cause mortality: a decade-long historical cohort study. *PLoS Med.* 2014;11(2):e1001599.
7. Marshall NS, Wong KK, Liu PY, Cullen SR, Knuiaman MW, Grunstein RR. Sleep apnea as an independent risk factor for all-cause mortality: the Busselton Health Study. *Sleep.* 2008;31(8):1079-85.
8. Javaheri S, Barbe F, Campos-Rodriguez F, Dempsey JA, Khayat R, Malhotra A, et al. Sleep Apnea: Types, Mechanisms, and Clinical Cardiovascular Consequences. *J Am Coll Cardiol.* 2017;69(7):841-58.
9. Lavie P, Herer P, Hoffstein V. Obstructive sleep apnoea syndrome as a risk factor for hypertension: population study. *BMJ.* 2000;320(7233):479-82.
10. Hoyos CM, Drager LF, Patel SR. OSA and cardiometabolic risk: What's the bottom line? *Respirology.* 2017;22(3):420-9.
11. 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(10):1080-111.

12. Fatureto-Borges F, Lorenzi-Filho G, Drager LF. Effectiveness of continuous positive airway pressure in lowering blood pressure in patients with obstructive sleep apnea: a critical review of the literature. *Integr Blood Press Control*. 2016;9:43-7.
13. Loke YK, Brown JW, Kwok CS, Niruban A, Myint PK. Association of obstructive sleep apnea with risk of serious cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2012;5(5):720-8.
14. Baroin J. Risque cardiovasculaire et syndrome d'apnées-hypopnées obstructives du sommeil. *La lettre du cardiologue*. 2012;460:10-7.
15. Martínez-García MA, Soler-Cataluña JJ, Ejarque-Martínez L, Soriano Y, Román-Sánchez P, Illa FB, et al. Continuous positive airway pressure treatment reduces mortality in patients with ischemic stroke and obstructive sleep apnea: a 5-year follow-up study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(1):36-41.
16. Peker Y, Carlson J, Hedner J. Increased incidence of coronary artery disease in sleep apnoea: a long-term follow-up. *Eur Respir J*. 2006;28(3):596-602.
17. Cassar A, Morgenthaler TI, Lennon RJ, Rihal CS, Lerman A. Treatment of obstructive sleep apnea is associated with decreased cardiac death after percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(14):1310-4.
18. Stevenson IH, Teichtahl H, Cunnington D, Ciavarella S, Gordon I, Kalman JM. Prevalence of sleep disordered breathing in paroxysmal and persistent atrial fibrillation patients with normal left ventricular function. *Eur Heart J*. 2008;29(13):1662-9.
19. Mehra R, Principe-Rodriguez K, Kirchner HL, Strohl KP. Sleep apnea in acute coronary syndrome: high prevalence but low impact on 6-month outcome. *Sleep Med*. 2006;7(6):521-8.
20. Nalliah CJ, Sanders P, Kalman JM. Obstructive Sleep Apnea Treatment and Atrial Fibrillation: A Need for Definitive Evidence. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2016;27(8):1001-10.
21. Gottlieb DJ, Yenokyan G, Newman AB, O'Connor GT, Punjabi NM, Quan SF, et al. Prospective study of obstructive sleep apnea and incident coronary heart disease and heart failure: the sleep heart health study. *Circulation*. 2010;122(4):352-60.
22. Cowie MR, Woehrle H, Wegscheider K, Angermann C, d'Ortho MP, Erdmann E, et al. Adaptive Servo-Ventilation for Central Sleep Apnea in Systolic Heart Failure. *N Engl J Med*. 2015;373(12):1095-105.
23. Lavie L. Obstructive sleep apnoea syndrome--an oxidative stress disorder. *Sleep Med Rev*. 2003;7(1):35-51.
24. Lavie L. Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia--revisited--the bad ugly and good: implications to the heart and brain. *Sleep Med Rev*. 2015;20:27-45.
25. 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.

26. Bisogni V, Pengo MF, Maiolino G, Rossi GP. The sympathetic nervous system and catecholamines metabolism in obstructive sleep apnoea. *J Thorac Dis.* 2016;8(2):243-54.
27. Shamsuzzaman A, Amin RS, Calvin AD, Davison D, Somers VK. Severity of obstructive sleep apnea is associated with elevated plasma fibrinogen in otherwise healthy patients. *Sleep Breath.* 2014;18(4):761-6.
28. Liak C, Fitzpatrick M. Coagulability in obstructive sleep apnea. *Can Respir J.* 2011;18(6):338-48.
29. 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.
30. Namtvedt SK, Hisdal J, Randby A, Agewall S, Stranden E, Somers VK, et al. Impaired endothelial function in persons with obstructive sleep apnoea: impact of obesity. *Heart.* 2013;99(1):30-4.
31. Ip MS, Tse HF, Lam B, Tsang KW, Lam WK. Endothelial function in obstructive sleep apnea and response to treatment. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;169(3):348-53.
32. Kohler M, Craig S, Pepperell JCT, Nicoll D, Bratton DJ, Nunn AJ, et al. CPAP improves endothelial function in patients with minimally symptomatic OSA: results from a subset study of the MOSAIC trial. *Chest.* 2013;144(3):896-902.
33. Phillips CL, Butlin M, Wong KK, Avolio AP. Is obstructive sleep apnoea causally related to arterial stiffness? A critical review of the experimental evidence. *Sleep Med Rev.* 2013;17(1):7-18.
34. Wons AM, Kohler M. Established vascular effects of continuous positive airway pressure therapy in patients with obstructive sleep apnoea-an update. *J Thorac Dis.* 2015;7(5):912-9.
35. Lin X, Chen G, Qi J, Chen X, Zhao J, Lin Q. Effect of continuous positive airway pressure on arterial stiffness in patients with obstructive sleep apnea and hypertension: a meta-analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2016;273(12):4081-8.
36. 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(5):613-8.
37. Baguet JP, Hammer L, Lévy 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(5):3407-12.
38. Drager LF, Bortolotto LA, Figueiredo AC, Krieger EM, Lorenzi GF. Effects of continuous positive airway pressure on early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176(7):706-12.
39. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Systemic inflammation: a key factor in the pathogenesis of cardiovascular complications in obstructive sleep apnoea syndrome? *Postgrad Med J.* 2009;85(1010):693-8.

40. Minoguchi K, Tazaki T, Yokoe T, Minoguchi H, Watanabe Y, Yamamoto M, et al. Elevated production of tumor necrosis factor- α by monocytes in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Chest*. 2004;126(5):1473-9.
41. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation*. 2005;112(17):2660-7.
42. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Predictors of elevated nuclear factor- κ B-dependent genes in obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(7):824-30.
43. Nácher M, Serrano-Mollar A, Farré R, Panés J, Seguí J, Montserrat JM. Recurrent obstructive apneas trigger early systemic inflammation in a rat model of sleep apnea. *Respir Physiol Neurobiol*. 2007;155(1):93-6.
44. 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(6):724-31.
45. 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(7):934-9.
46. Arnaud C, Dematteis M, Pepin JL, Baguet JP, Lévy P. Obstructive sleep apnea, immunoinflammation, and atherosclerosis. *Semin Immunopathol*. 2009;31(1):113-25.
47. Lefebvre B, Pépin JL, Baguet JP, Tamisier R, Roustit M, Riedweg K, et al. Leukotriene B₄: early mediator of atherosclerosis in obstructive sleep apnoea? *Eur Respir J*. 2008;32(1):113-20.
48. Stanke-Labesque F, Bäck M, Lefebvre B, Tamisier R, Baguet JP, Arnol N, et al. Increased urinary leukotriene E₄ excretion in obstructive sleep apnea: effects of obesity and hypoxia. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(2):364-70, 70.e1-2.
49. 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(4):619-25.
50. Taylor CT. Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor- κ B in hypoxic inflammation. *J Physiol*. 2008;586(17):4055-9.
51. Ip MS, Lam B, Ng MM, Lam WK, Tsang KW, Lam KS. Obstructive sleep apnea is independently associated with insulin resistance. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(5):670-6.
52. Drager LF, Drager L, Polotsky VY, Polotsky L. Lipid metabolism: a new frontier in sleep apnea research. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184(3):288-90.
53. Savransky V, Nanayakkara A, Li J, Bevans S, Smith PL, Rodriguez A, et al. Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(12):1290-7.

54. Savransky V, Jun J, Li J, Nanayakkara A, Fonti S, Moser AB, et al. Dyslipidemia and atherosclerosis induced by chronic intermittent hypoxia are attenuated by deficiency of stearyl coenzyme A desaturase. *Circ Res*. 2008;103(10):1173-80.
55. Phillips CL, Yee BJ, Marshall NS, Liu PY, Sullivan DR, Grunstein RR. Continuous positive airway pressure reduces postprandial lipidemia in obstructive sleep apnea: a randomized, placebo-controlled crossover trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184(3):355-61.
56. Colette C, Monnier L. Acides gras : classification, fonction et équilibre entre les différentes familles. *Médecine des maladies métaboliques*. 2011;5(N°3):237-45.
57. Poudyal H, Panchal SK, Diwan V, Brown L. Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: effects and emerging mechanisms of action. *Prog Lipid Res*. 2011;50(4):372-87.
58. Arterburn LM, Hall EB, Oken H. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr*. 2006;83(6 Suppl):1467S-76S.
59. Calder PC. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochem Soc Trans*. 2017;45(5):1105-15.
60. Schmitz G, Ecker J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res*. 2008;47(2):147-55.
61. Capra V, Bäck M, Barbieri SS, Camera M, Tremoli E, Rovati GE. Eicosanoids and their drugs in cardiovascular diseases: focus on atherosclerosis and stroke. *Med Res Rev*. 2013;33(2):364-438.
62. Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1851(4):469-84.
63. Weylandt KH, Chiu CY, Gomolka B, Waechter SF, Wiedenmann B. Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: Towards an understanding of resolvin and protectin formation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2012;97(3-4):73-82.
64. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*. 2014;510(7503):92-101.
65. Yanai H, Masui Y, Katsuyama H, Adachi H, Kawaguchi A, Hakoshima M, et al. An Improvement of Cardiovascular Risk Factors by Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *J Clin Med Res*. 2018;10(4):281-9.
66. Burke MF, Burke FM, Soffer DE. Review of Cardiometabolic Effects of Prescription Omega-3 Fatty Acids. *Curr Atheroscler Rep*. 2017;19(12):60.
67. Bäck M. Omega-3 fatty acids in atherosclerosis and coronary artery disease. *Future Sci OA*. 2017;3(4):FSO236.
68. Sperling LS, Nelson JR. History and future of omega-3 fatty acids in cardiovascular disease. *Curr Med Res Opin*. 2016;32(2):301-11.

69. Bang HO, Dyerberg J, Hjörne N. The composition of food consumed by Greenland Eskimos. *Acta Med Scand.* 1976;200(1-2):69-73.
70. Dyerberg J, Bang HO, Hjerne N. Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. *Am J Clin Nutr.* 1975;28(9):958-66.
71. von Schacky C. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2004;7(2):131-6.
72. Calder PC. n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clin Sci (Lond).* 2004;107(1):1-11.
73. Balk EM, Lichtenstein AH, Chung M, Kupelnick B, Chew P, Lau J. Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: a systematic review. *Atherosclerosis.* 2006;189(1):19-30.
74. Leslie MA, Cohen DJ, Liddle DM, Robinson LE, Ma DW. A review of the effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids on blood triacylglycerol levels in normolipidemic and borderline hyperlipidemic individuals. *Lipids Health Dis.* 2015;14:53.
75. Neff LM, Culiner J, Cunningham-Rundles S, Seidman C, Meehan D, Maturi J, et al. Algal docosahexaenoic acid affects plasma lipoprotein particle size distribution in overweight and obese adults. *J Nutr.* 2011;141(2):207-13.
76. Miller PE, Van Elswyk M, Alexander DD. Long-chain omega-3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid and blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Hypertens.* 2014;27(7):885-96.
77. Mozaffarian D, Geelen A, Brouwer IA, Geleijnse JM, Zock PL, Katan MB. Effect of fish oil on heart rate in humans: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Circulation.* 2005;112(13):1945-52.
78. von Schacky C, Fischer S, Weber PC. Long-term effects of dietary marine omega-3 fatty acids upon plasma and cellular lipids, platelet function, and eicosanoid formation in humans. *J Clin Invest.* 1985;76(4):1626-31.
79. Li K, Huang T, Zheng J, Wu K, Li D. Effect of marine-derived n-3 polyunsaturated fatty acids on C-reactive protein, interleukin 6 and tumor necrosis factor α : a meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9(2):e88103.
80. Thies F, Garry JM, Yaqoob P, Rerkasem K, Williams J, Shearman CP, et al. Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2003;361(9356):477-85.
81. Stanke-Labesque F, Pépin JL, Gautier-Veyret E, Lévy P, Bäck M. Leukotrienes as a molecular link between obstructive sleep apnoea and atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2014;101(2):187-93.

82. Stanke-Labesque F, Molière P, Bessard J, Laville M, Véricel E, Lagarde M. Effect of dietary supplementation with increasing doses of docosahexaenoic acid on neutrophil lipid composition and leukotriene production in human healthy volunteers. *Br J Nutr.* 2008;100(4):829-33.
83. Laguna-Fernandez A, Checa A, Carracedo M, Artiach G, Petri MH, Baumgartner R, et al. ERV1/ChemR23 Signaling Protects from Atherosclerosis by Modifying oxLDL Uptake and Phagocytosis in Macrophages. *Circulation.* 2018.
84. Lévy P, Pépin JL, Arnaud C, Tamisier R, Borel JC, Dematteis M, et al. Intermittent hypoxia and sleep-disordered breathing: current concepts and perspectives. *Eur Respir J.* 2008;32(4):1082-95.
85. Arnaud C, Poulain L, Lévy P, Dematteis M. Inflammation contributes to the atherogenic role of intermittent hypoxia in apolipoprotein-E knock out mice. *Atherosclerosis.* 2011;219(2):425-31.
86. De Caterina R, Cybulsky MI, Clinton SK, Gimbrone MA, Libby P. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb.* 1994;14(11):1829-36.
87. Khalfoun B, Thibault F, Watier H, Bardos P, Lebranchu Y. Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit in vitro human endothelial cell production of interleukin-6. *Adv Exp Med Biol.* 1997;400B:589-97.
88. Novak TE, Babcock TA, Jho DH, Helton WS, Espat NJ. NF-kappa B inhibition by omega -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;284(1):L84-9.
89. Renier G, Skamene E, DeSanctis J, Radzioch D. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids prevent the development of atherosclerotic lesions in mice. Modulation of macrophage secretory activities. *Arterioscler Thromb.* 1993;13(10):1515-24.
90. Yaqoob P, Calder P. Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages. *Cell Immunol.* 1995;163(1):120-8.
91. Sadeghi S, Wallace FA, Calder PC. Dietary lipids modify the cytokine response to bacterial lipopolysaccharide in mice. *Immunology.* 1999;96(3):404-10.
92. Endres S, Ghorbani R, Kelley VE, Georgilis K, Lonnemann G, van der Meer JW, et al. The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Engl J Med.* 1989;320(5):265-71.
93. Caughey GE, Mantzioris E, Gibson RA, Cleland LG, James MJ. The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am J Clin Nutr.* 1996;63(1):116-22.

94. Bäck M, Ketelhuth DF, Agewall S. Matrix metalloproteinases in atherothrombosis. *Prog Cardiovasc Dis.* 2010;52(5):410-28.
95. Gunasinghe SK, Ikonomidis J, Spinale FG. Contributory role of matrix metalloproteinases in cardiovascular remodeling. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 2001;1(2):75-91.
96. Volná J, Kemlink D, Kalousová M, Vávrová J, Majerová V, Mestek O, et al. Biochemical oxidative stress-related markers in patients with obstructive sleep apnea. *Med Sci Monit.* 2011;17(9):CR491-7.
97. Chuang LP, Chen NH, Lin SW, Chang YL, Chao IJ, Pang JH. Increased matrix metalloproteinases-9 after sleep in plasma and in monocytes of obstructive sleep apnea patients. *Life Sci.* 2013;93(5-6):220-5.
98. Cawood AL, Ding R, Napper FL, Young RH, Williams JA, Ward MJ, et al. Eicosapentaenoic acid (EPA) from highly concentrated n-3 fatty acid ethyl esters is incorporated into advanced atherosclerotic plaques and higher plaque EPA is associated with decreased plaque inflammation and increased stability. *Atherosclerosis.* 2010;212(1):252-9.
99. Calder PC. The role of marine omega-3 (n-3) fatty acids in inflammatory processes, atherosclerosis and plaque stability. *Mol Nutr Food Res.* 2012;56(7):1073-80.
100. McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem.* 1997;244(1):1-14.
101. de Lonlay P, Djouadi F, Bonnefont JP, Saudubray JM, Bastin J. [Mitochondrial beta-oxidation of fatty acids: an essential metabolic pathway of muscular function]. *Arch Pediatr.* 2002;9 Suppl 2:175s-8s.
102. Houten SM, Wanders RJ. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33(5):469-77.
103. Bennett MJ. Pathophysiology of fatty acid oxidation disorders. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33(5):533-7.
104. Saudubray JM, Baumgartner M, Walter J. *Inborn Metabolic Diseases - Diagnosis and Treatment.* 6th ed 2016. 658 p.
105. Rinaldo P, Cowan TM, Matern D. Acylcarnitine profile analysis. *Genet Med.* 2008;10(2):151-6.
106. Mihalik SJ, Goodpaster BH, Kelley DE, Chace DH, Vockley J, Toledo FG, et al. Increased levels of plasma acylcarnitines in obesity and type 2 diabetes and identification of a marker of glucolipotoxicity. *Obesity (Silver Spring).* 2010;18(9):1695-700.
107. Strand E, Pedersen ER, Svingen GF, Olsen T, Bjørndal B, Karlsson T, et al. Serum Acylcarnitines and Risk of Cardiovascular Death and Acute Myocardial Infarction in Patients With Stable Angina Pectoris. *J Am Heart Assoc.* 2017;6(2).

108. Rizza S, Copetti M, Rossi C, Cianfarani MA, Zucchelli M, Luzi A, et al. Metabolomics signature improves the prediction of cardiovascular events in elderly subjects. *Atherosclerosis*. 2014;232(2):260-4.
109. Guasch-Ferré M, Zheng Y, Ruiz-Canela M, Hruby A, Martínez-González MA, Clish CB, et al. Plasma acylcarnitines and risk of cardiovascular disease: effect of Mediterranean diet interventions. *Am J Clin Nutr*. 2016;103(6):1408-16.
110. Shah AA, Craig DM, Sebek JK, Haynes C, Stevens RC, Muehlbauer MJ, et al. Metabolic profiles predict adverse events after coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2012;143(4):873-8.
111. Kalim S, Clish CB, Wenger J, Elmariah S, Yeh RW, Deferio JJ, et al. A plasma long-chain acylcarnitine predicts cardiovascular mortality in incident dialysis patients. *J Am Heart Assoc*. 2013;2(6):e000542.
112. Miyata M, Yoshihisa A, Yamauchi H, Owada T, Sato T, Suzuki S, et al. Impact of sleep-disordered breathing on myocardial damage and metabolism in patients with chronic heart failure. *Heart Vessels*. 2015;30(3):318-24.
113. Sullivan CE, Issa FG, Berthon-Jones M, Eves L. Reversal of obstructive sleep apnoea by continuous positive airway pressure applied through the nares. *Lancet*. 1981;1(8225):862-5.
114. Sharples LD, Clutterbuck-James AL, Glover MJ, Bennett MS, Chadwick R, Pittman MA, et al. Meta-analysis of randomised controlled trials of oral mandibular advancement devices and continuous positive airway pressure for obstructive sleep apnoea-hypopnoea. *Sleep Med Rev*. 2016;27:108-24.
115. Pépin JL, Krieger J, Rodenstein D, Cornette A, Sforza E, Delguste P, et al. Effective compliance during the first 3 months of continuous positive airway pressure. A European prospective study of 121 patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(4):1124-9.
116. Pépin JL, Tamisier R, Lévy P. Obstructive sleep apnoea and metabolic syndrome: put CPAP efficacy in a more realistic perspective. *Thorax*. 2012;67(12):1025-7.
117. White DP. Pharmacologic Approaches to the Treatment of Obstructive Sleep Apnea. *Sleep Med Clin*. 2016;11(2):203-12.
118. Gautier-Veyret E, Pépin JL, Stanke-Labesque F. Which place of pharmacological approaches beyond continuous positive airway pressure to treat vascular disease related to obstructive sleep apnea? *Pharmacol Ther*. 2017.
119. Stanke-Labesque F, Pépin JL, de Jouvencel T, Arnaud C, Baguet JP, Petri MH, et al. Leukotriene B4 pathway activation and atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *J Lipid Res*. 2012;53(9):1944-51.
120. Gautier-Veyret E, Arnaud C, Bäck M, Pépin JL, Petri MH, Baguet JP, et al. Intermittent hypoxia-activated cyclooxygenase pathway: role in atherosclerosis. *Eur Respir J*. 2013;42(2):404-13.

121. Dematteis M, Godin-Ribuot D, Arnaud C, Ribuot C, Stanke-Labesque F, Pépin JL, et al. Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding the human disease. *ILAR J.* 2009;50(3):262-81.
122. Rockerbie RA, Dobson RD, Frohlich J. Gas-chromatographic analysis of patterns of fatty acids of cholesteryl esters and phosphatidylcholine. *Clin Chem.* 1979;25(8):1411-4.
123. Metcalfe LD, Schmitz AA. The Rapid Preparation of Fatty Acid Esters for Gas Chromatographic Analysis. *Analytical Chemistry.* 1961;33(3):363-64.
124. Cheillan D, Cognat S, Vianey-Saban C, Maire I, Dorche C. [Application of tandem mass spectrometry to neonatal screening of inherited metabolic diseases: focus on present developments]. *Ann Biol Clin (Paris).* 2004;62(3):269-77.
125. Elagizi A, Lavie CJ, Marshall K, DiNicolantonio JJ, O'Keefe JH, Milani RV. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cardiovascular Health: A Comprehensive Review. *Prog Cardiovasc Dis.* 2018.
126. Praticò D, Tillmann C, Zhang ZB, Li H, FitzGerald GA. Acceleration of atherogenesis by COX-1-dependent prostanoid formation in low density lipoprotein receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(6):3358-63.
127. Belton OA, Duffy A, Toomey S, Fitzgerald DJ. Cyclooxygenase isoforms and platelet vessel wall interactions in the apolipoprotein E knockout mouse model of atherosclerosis. *Circulation.* 2003;108(24):3017-23.
128. Cyrus T, Sung S, Zhao L, Funk CD, Tang S, Praticò D. Effect of low-dose aspirin on vascular inflammation, plaque stability, and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation.* 2002;106(10):1282-7.
129. Chen MF, Hsu HC, Lee YT. Effects of fish oil supplementation on atherosclerosis in different regions of the aorta of rabbits with diet-induced hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond).* 1995;89(5):497-504.
130. Worth NF, Berry CL, Thomas AC, Campbell JH. S18886, a selective TP receptor antagonist, inhibits development of atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis.* 2005;183(1):65-73.
131. Cyrus T, Yao Y, Ding T, Dogné JM, Praticò D. A novel thromboxane receptor antagonist and synthase inhibitor, BM-573, reduces development and progression of atherosclerosis in LDL receptor deficient mice. *Eur J Pharmacol.* 2007;561(1-3):105-11.
132. Cherdon C, Rolin S, Hanson J, Ooms A, de Leval L, Drion P, et al. BM-573 inhibits the development of early atherosclerotic lesions in Apo E deficient mice by blocking TP receptors and thromboxane synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2011;94(3-4):124-32.
133. Lesault PF, Boyer L, Pelle G, Covali-Noroc A, Rideau D, Akakpo S, et al. Daily administration of the TP receptor antagonist terutroban improved endothelial function in high-cardiovascular-risk patients with atherosclerosis. *Br J Clin Pharmacol.* 2011;71(6):844-51.

134. Van Noolen L, Bäck M, Arnaud C, Rey A, Petri MH, Levy P, et al. Docosahexaenoic acid supplementation modifies fatty acid incorporation in tissues and prevents hypoxia induced-atherosclerosis progression in apolipoprotein-E deficient mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2014;91(4):111-7.
135. Ladesich JB, Pottala JV, Romaker A, Harris WS. Membrane level of omega-3 docosahexaenoic acid is associated with severity of obstructive sleep apnea. *J Clin Sleep Med*. 2011;7(4):391-6.
136. Nakabayashi K, Jujo K, Saito K, Oka T, Hagiwara N. Evaluation of the association between sleep apnea and polyunsaturated fatty acids profiles in patients after percutaneous coronary intervention. *Heart Vessels*. 2017;32(11):1296-303.
137. Tittus J, Huber MT, Storck K, Köhler A, Köhler JM, von Arnim T, et al. Omega-3 Index and Obstructive Sleep Apnea: A Cross-Sectional Study. *J Clin Sleep Med*. 2017;13(10):1131-6.
138. Scorza FA, Cavalheiro EA, Scorza CA, Galduróz JC, Tufik S, Andersen ML. Sleep Apnea and Inflammation - Getting a Good Night's Sleep with Omega-3 Supplementation. *Front Neurol*. 2013;4:193.
139. Alzoubi MR, Aldomi Al-Domi H. Could omega-3 fatty acids a therapeutic treatment of the immune-metabolic consequence of intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea? *Diabetes Metab Syndr*. 2017;11(4):297-304.
140. Xu Z, Riediger N, Innis S, Moghadasian MH. Fish oil significantly alters fatty acid profiles in various lipid fractions but not atherogenesis in apo E-KO mice. *Eur J Nutr*. 2007;46(2):103-10.
141. Zampolli A, Bysted A, Leth T, Mortensen A, De Caterina R, Falk E. Contrasting effect of fish oil supplementation on the development of atherosclerosis in murine models. *Atherosclerosis*. 2006;184(1):78-85.
142. Wang HH, Hung TM, Wei J, Chiang AN. Fish oil increases antioxidant enzyme activities in macrophages and reduces atherosclerotic lesions in apoE-knockout mice. *Cardiovasc Res*. 2004;61(1):169-76.
143. Sun R, Wang X, Liu Y, Xia M. Dietary supplementation with fish oil alters the expression levels of proteins governing mitochondrial dynamics and prevents high-fat diet-induced endothelial dysfunction. *Br J Nutr*. 2014;112(2):145-53.
144. Liu L, Hu Q, Wu H, Xue Y, Cai L, Fang M, et al. Protective role of n6/n3 PUFA supplementation with varying DHA/EPA ratios against atherosclerosis in mice. *J Nutr Biochem*. 2016;32:171-80.
145. Wei Q, Bian Y, Yu F, Zhang Q, Zhang G, Li Y, et al. Chronic intermittent hypoxia induces cardiac inflammation and dysfunction in a rat obstructive sleep apnea model. *J Biomed Res*. 2016;30(6):490-5.

146. Gautier-Veyret E, Van Noolen L, Lévy P, Pepin JL, Stanke-Labesque F. Could the thromboxane A2 pathway be a therapeutic target for the treatment of obstructive sleep apnea-induced atherosclerosis? *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2015;121(Pt A):97-104.
147. McCoin CS, Knotts TA, Adams SH. Acylcarnitines--old actors auditioning for new roles in metabolic physiology. *Nat Rev Endocrinol.* 2015;11(10):617-25.
148. Hunter WG, Kelly JP, McGarrah RW, Khouri MG, Craig D, Haynes C, et al. Metabolomic Profiling Identifies Novel Circulating Biomarkers of Mitochondrial Dysfunction Differentially Elevated in Heart Failure With Preserved Versus Reduced Ejection Fraction: Evidence for Shared Metabolic Impairments in Clinical Heart Failure. *J Am Heart Assoc.* 2016;5(8).
149. Sayed-Ahmed MM, Khattab MM, Gad MZ, Mostafa N. L-carnitine prevents the progression of atherosclerotic lesions in hypercholesterolaemic rabbits. *Pharmacol Res.* 2001;44(3):235-42.
150. Spagnoli LG, Orlandi A, Marino B, Mauriello A, De Angelis C, Ramacci MT. Propionyl-L-carnitine prevents the progression of atherosclerotic lesions in aged hyperlipemic rabbits. *Atherosclerosis.* 1995;114(1):29-44.
151. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med.* 2013;19(5):576-85.
152. Johri AM, Heyland DK, Héту MF, Crawford B, Spence JD. Carnitine therapy for the treatment of metabolic syndrome and cardiovascular disease: evidence and controversies. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2014;24(8):808-14.
153. Blair HC, Sepulveda J, Papachristou DJ. Nature and nurture in atherosclerosis: The roles of acylcarnitine and cell membrane-fatty acid intermediates. *Vascul Pharmacol.* 2016;78:17-23.
154. Vilskersts R, Kuka J, Liepinsh E, Makreka-Kuka M, Volska K, Makarova E, et al. Methyl- γ -butyrobetaine decreases levels of acylcarnitines and attenuates the development of atherosclerosis. *Vascul Pharmacol.* 2015;72:101-7.
155. Rutkowsky JM, Knotts TA, Ono-Moore KD, McCoin CS, Huang S, Schneider D, et al. Acylcarnitines activate proinflammatory signaling pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014;306(12):E1378-87.
156. Jackson KH, Harris WS. Blood Fatty Acid Profiles: New Biomarkers for Cardiometabolic Disease Risk. *Curr Atheroscler Rep.* 2018;20(5):22.
157. Elmariah S, Farrell LA, Furman D, Lindman BR, Shi X, Morningstar JE, et al. Association of Acylcarnitines With Left Ventricular Remodeling in Patients With Severe Aortic Stenosis Undergoing Transcatheter Aortic Valve Replacement. *JAMA Cardiol.* 2018;3(3):242-6.

